

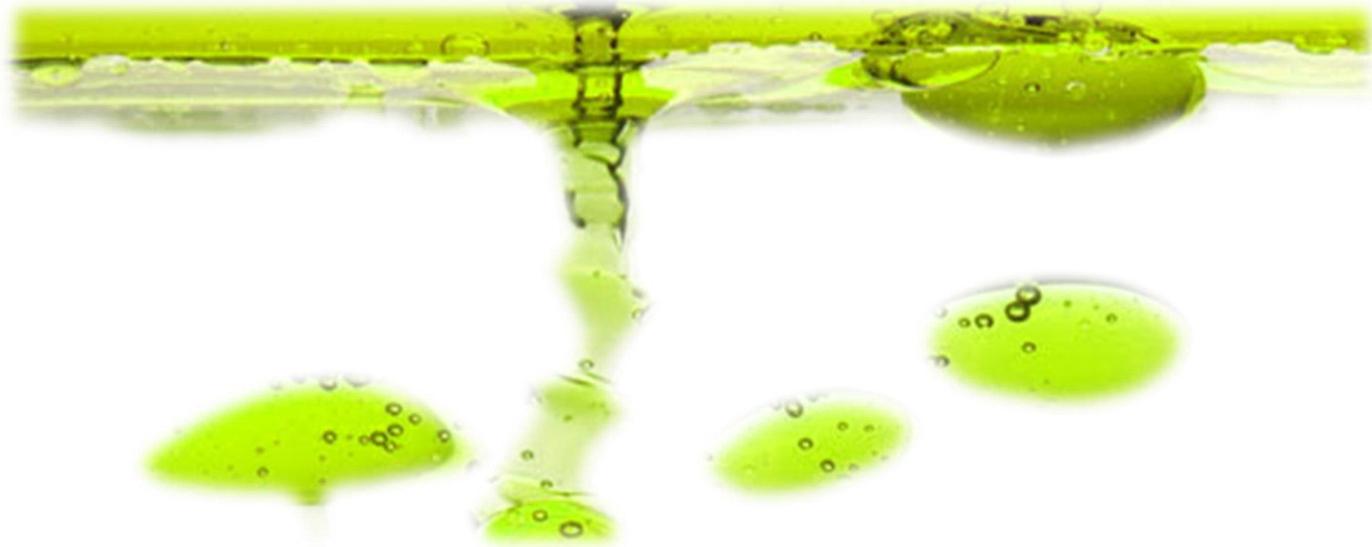
Présentation Club CCM

Analyses des lipides de levures

Doctorante : Cassandra Breil

Directrice de thèse : Maryline Vian

Co-directeur: Farid Chemat



❖ Le laboratoire GREEN

Créé en 2006

Fait parti de l'Unité Mixte de Recherche 408

- 7 Permanents

Directeur



Pr CHEMAT

Maitres de conférence



HDR M. VIAN



HDR A. TIXIER



HDR S. PERINO



HDR
N. RAKOTOMANOMANA

Ingénieur/ Assistant ingénieur



RUIZ



PETICOLAS

- 5 Thésards
- 2 Post doctorants
- 5 Stagiaires



❖ Extraction des composés d'origines naturelles



Pigments



Huiles



Antioxydants



**Huiles
essentielles**

Caroténoïdes

Phycocyanine

Lipides

Polyphénols

Chlorophylles

Anthocyanes

...

❖ Extraction par des techniques innovantes et solvants alternatifs

❖ Plusieurs projets





Production biocatalytique de bioproduits lipidiques à partir de matières premières renouvelables et coproduits industriels : application bio kérosène

Vise à développer une nouvelle filière de biocarburant



Description:

- Réduire les impacts environnementaux de l'activité aéronautique
- Accroître l'indépendance énergétique
- Sécuriser les approvisionnements en biocarburant



❖ Laboratoire GREEN & PROBio3

Déterminer la meilleure souche (sauvage ou OGM) pour la production de lipides (application biokérosen)

Déterminer une méthode d'extraction permettant d'extraire la totalité des lipides

- ✓ Transposition à l'échelle industrielle

Etude sur un type de microorganisme:

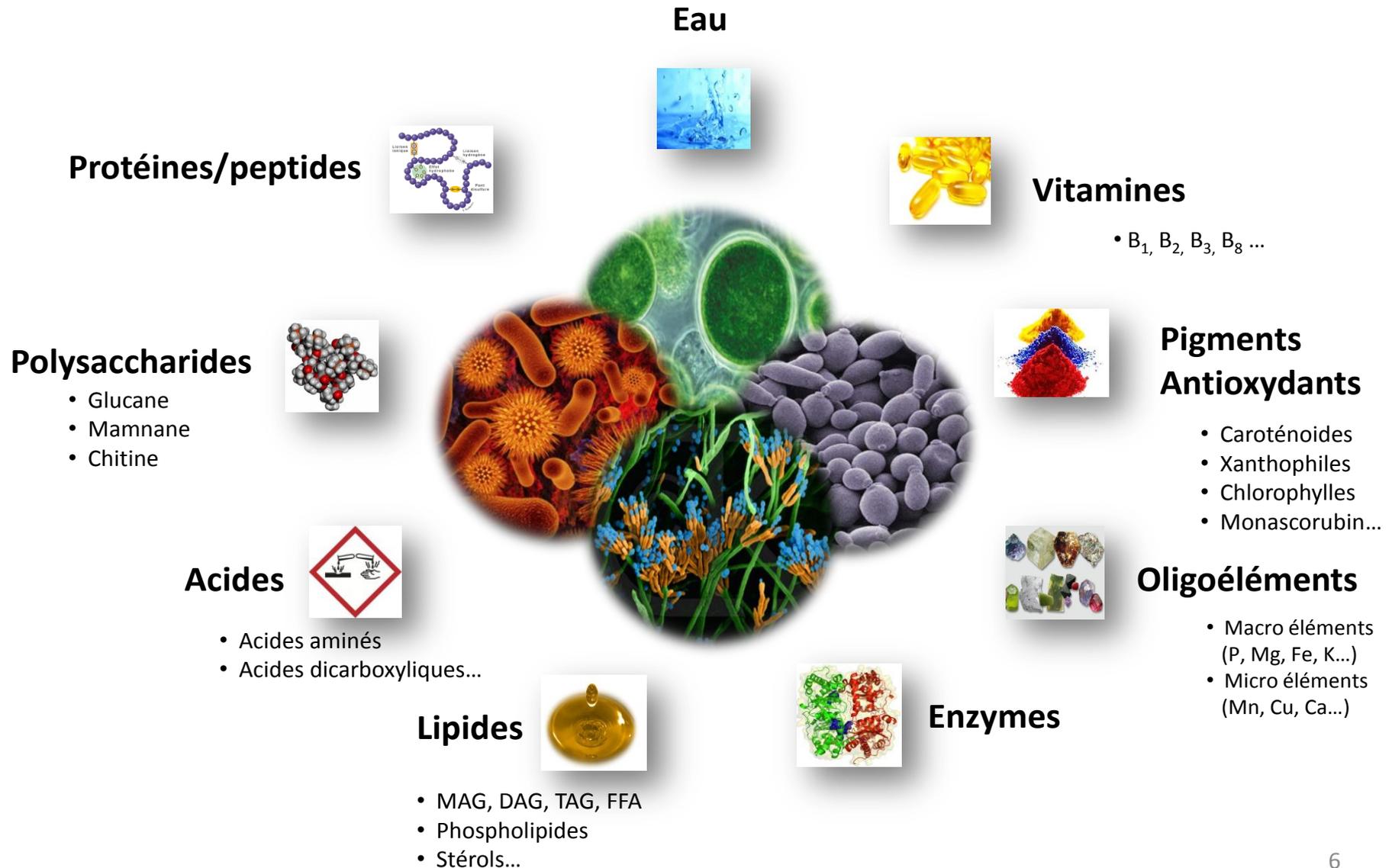
Deux levures

- ✓ *Yarrowia lipolytica*
- ✓ *Rhodotorula glutinis*



Les levures

❖ Composés extraits des levures

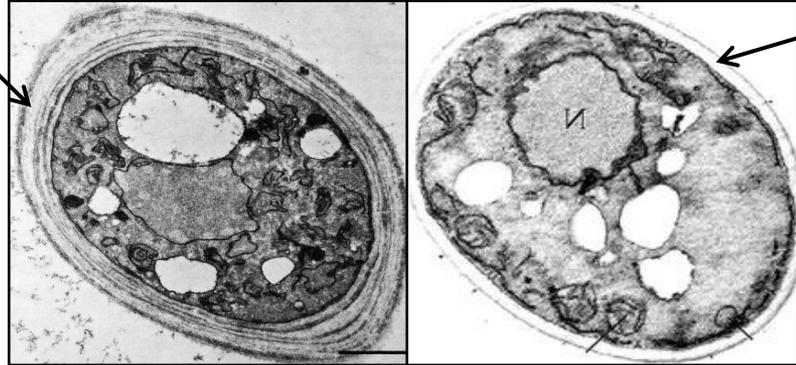


Rhodotorula glutinis

Levure rose à rouge orangée (pigmentée)



Membrane externe épaisse



Utilisée pour :

- ✓ La production de biofuel
- ✓ L'industrie agro alimentaire
- ✓ L'industrie pharmaceutique

Caroténoïdes :

- ✓ B-carotène
- ✓ Torulene
- ✓ Torularhodin

Lipides (jusqu'à 80 %) :

- ✓ MAG, DAG, TAG, FFA, Sterols

Yarrowia lipolytica

Levure verte texture lait



Membrane externe fine

Utilisée pour :

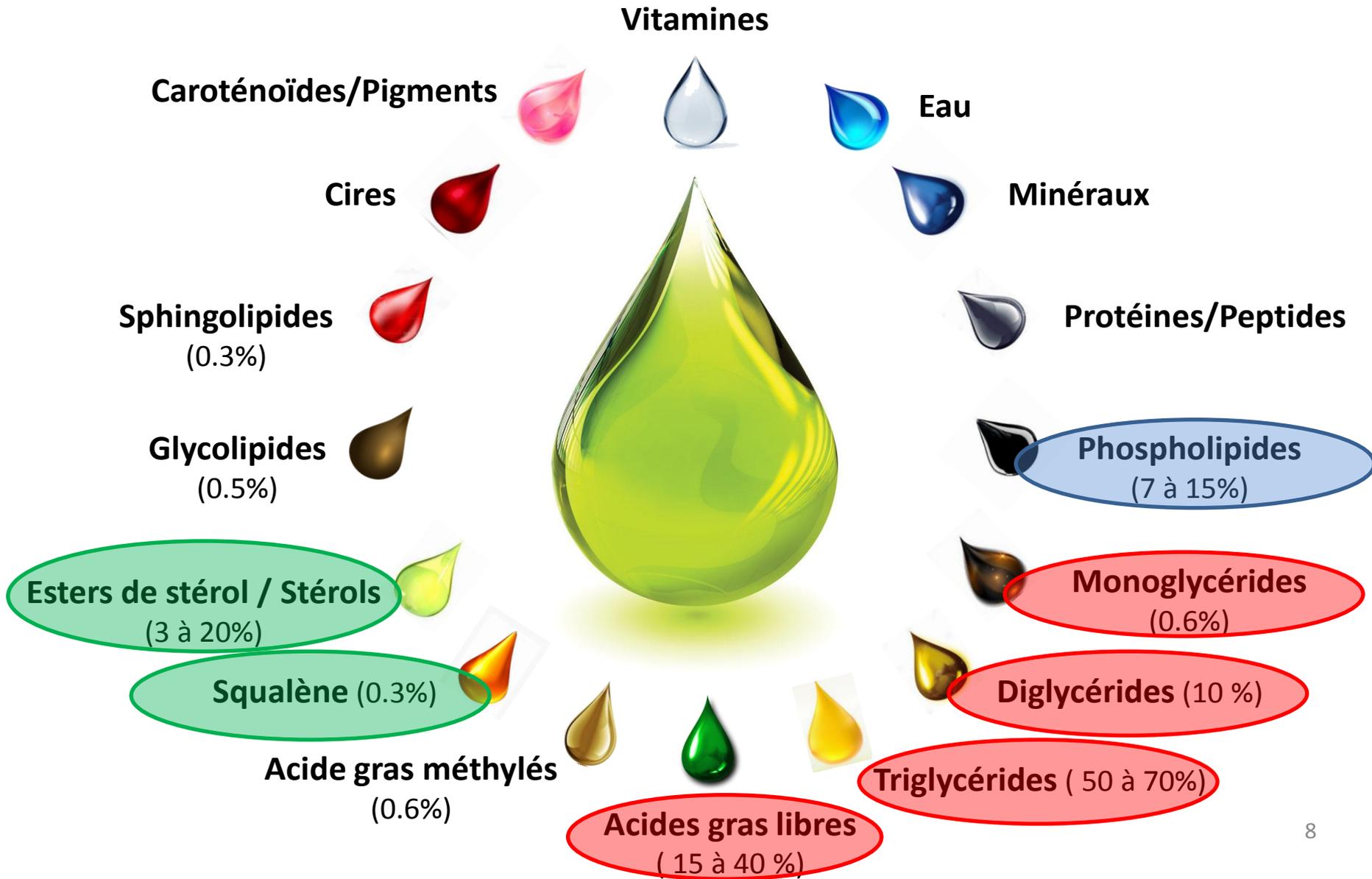
- ✓ La dépollution des océans
- ✓ La fabrication d'enzymes
- ✓ Production de protéines
- ✓ Production d'acides

Lipides (jusqu'à 50 %) :

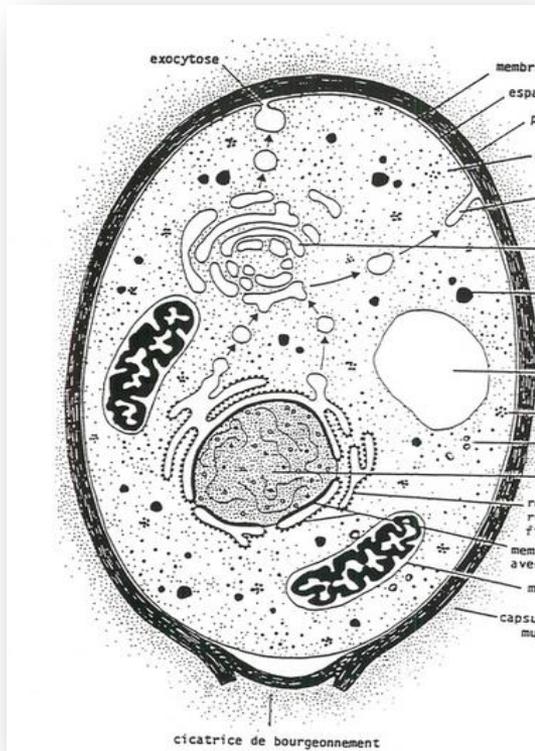
- ✓ MAG, DAG, TAG, FFA, Sterols

Les levures

❖ Composition générale d'une huile de levure

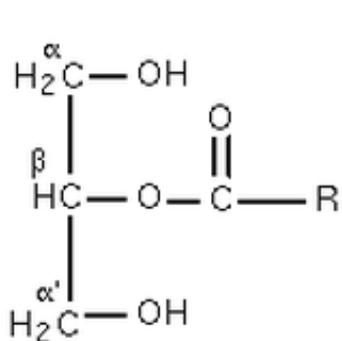


Les levures

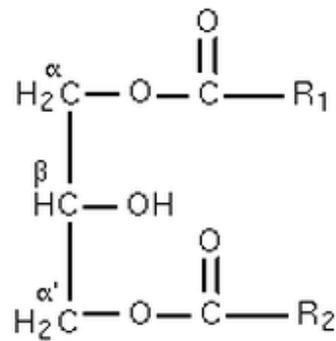


- Stockage dans le cytoplasme
- Accumulation lors d'une apparition de limitation nutritionnelle
 - ✓ Carence en N₂, Mg, FeSO₄...
 - ✓ Excès de carbones
- Principaux lipides

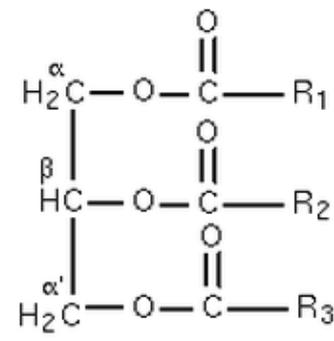
Monoglycéride MAG



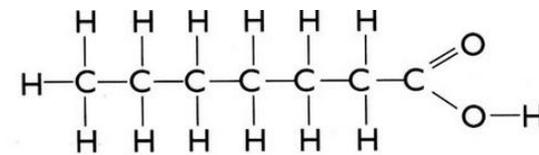
Diglycéride DAG



Triglycéride TAG

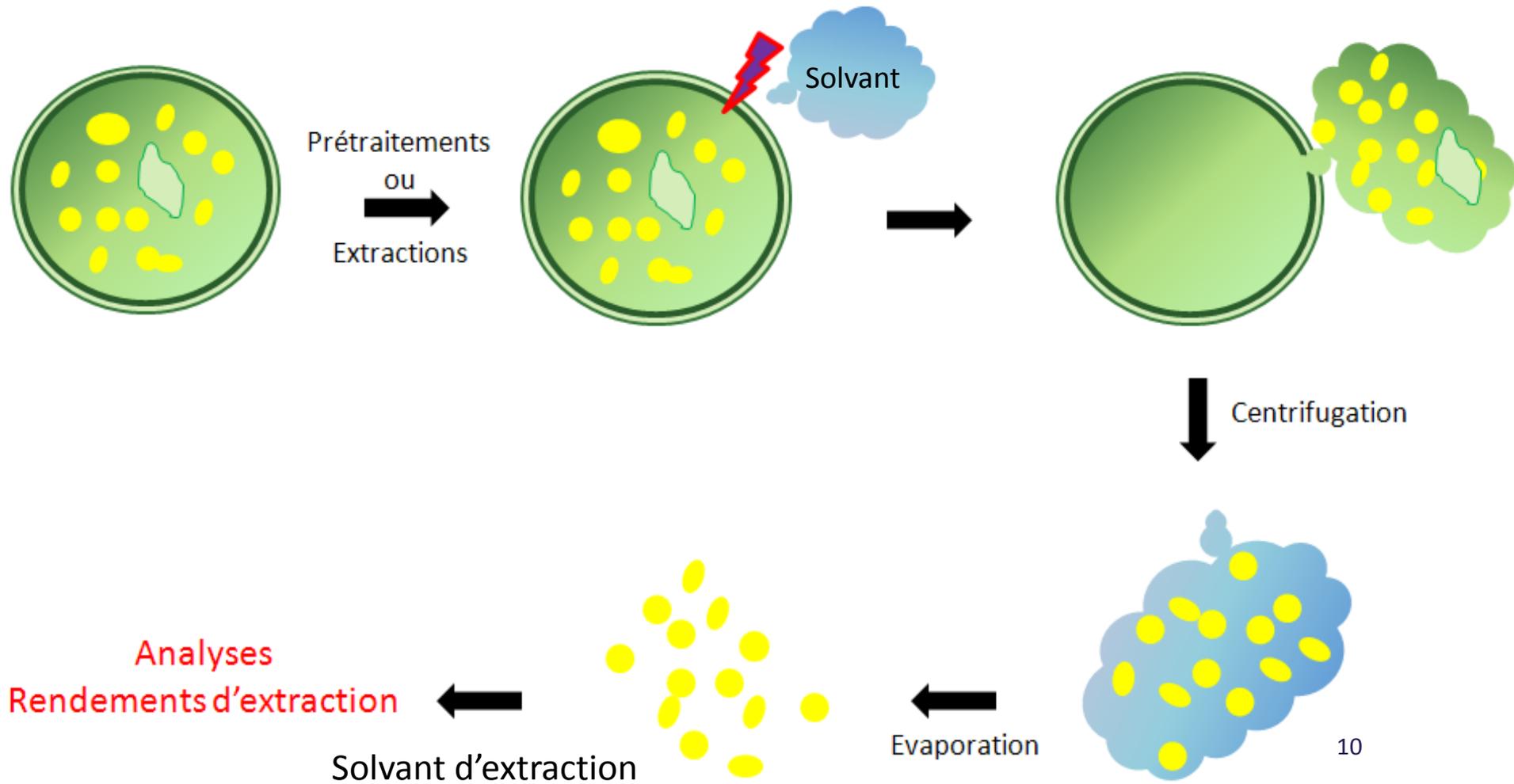


Acides gras libres FFA



❖ Extraction des lipides

Extraction des granules lipidiques à l'intérieur du cytoplasme et de la membrane



❖ Analyse par HP-TLC (High Performance Thin-Layer Chromatography)

- Depuis 4 ans au laboratoire
- Utilisée en stage 2 mois

ATS 4



Dépôt de l'échantillon
automatique en bande
sous azote

ADC 2



Développement
automatisé
(isocratique) de la
plaque

Scanner



Evaluation densitométrique
Différentes lampes
Différentes longueurs
d'ondes

Visualizer



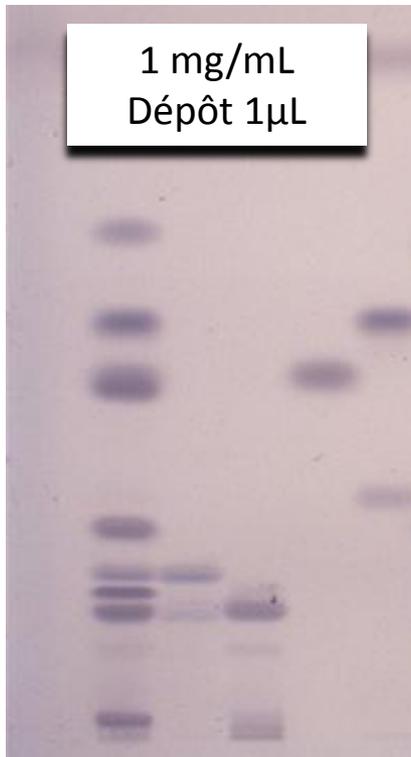
Documentation par
image

❖ Plaque initiale : Quantification des lipides

Standards

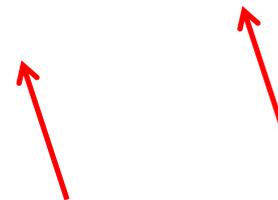
1 mg/mL
Dépôt 1 μ L

Squalène
Ester de stérol
TAG
FFA
Lanostérol
DAG
Ergostérol
MAG



17 échantillons

Dépôt 2 μ L



Conditionnement de la plaque

- ❖ Solvant: MeOH/CHCl₃
- ❖ Séchage 20 min, 110 °C



- ❖ Standards
Single point
- ❖ Echantillons
17 échantillons / plaque



- ❖ Solvants

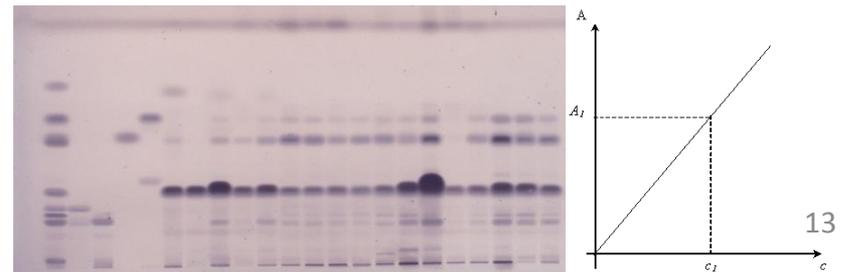
1. Migration jusqu'à 55 mm: n-hexane / diéthyléther / acide acétique 70/30/2 (v/v/v)
2. Migration jusqu'à **85 mm**: n-hexane

Révélation

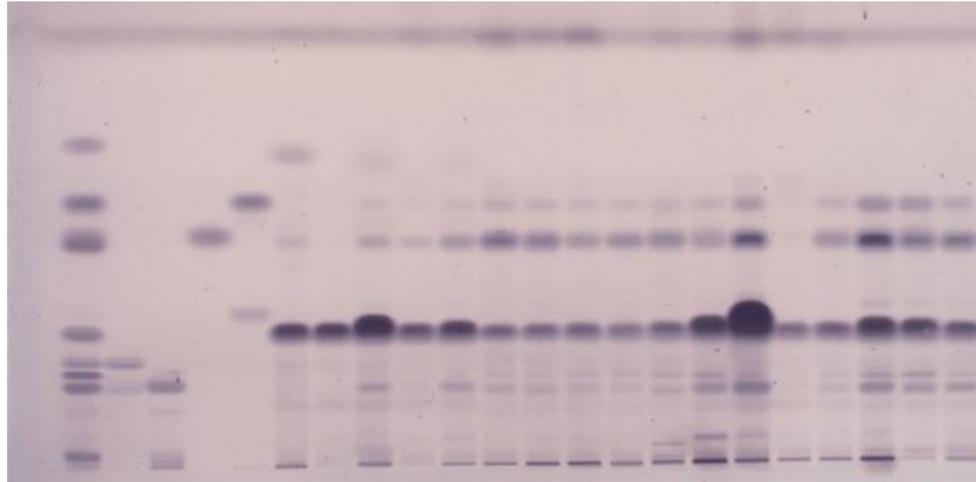
- ❖ Solvants : Sulfate de cuivre, H₂SO₄, H₃PO₄, 141 °C 30 min



- ❖ Lampe D₂
- ❖ Longueur d'onde : 600 nm



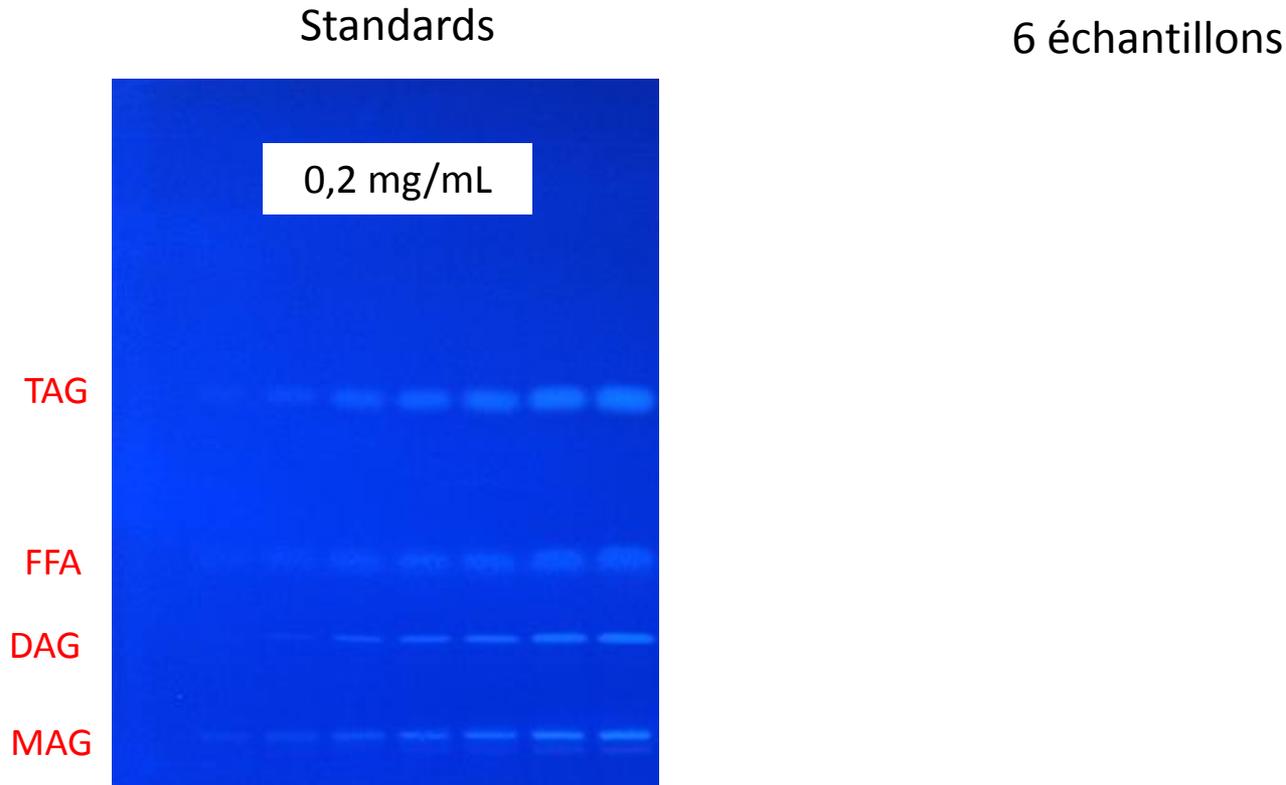
❖ Plaque initiale : Quantification des lipides



Résultats non répétables

- Tâches trop diffuses
- Echantillons trop concentrés
- Bruit de fond important
- « Single point » des standards

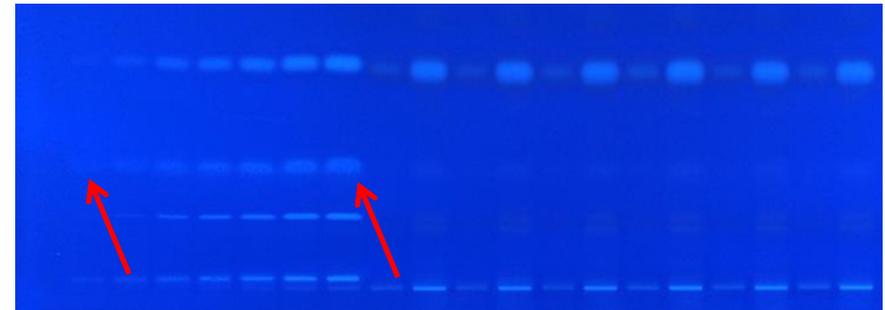
❖ Plaque après optimisation : Quantification des lipides



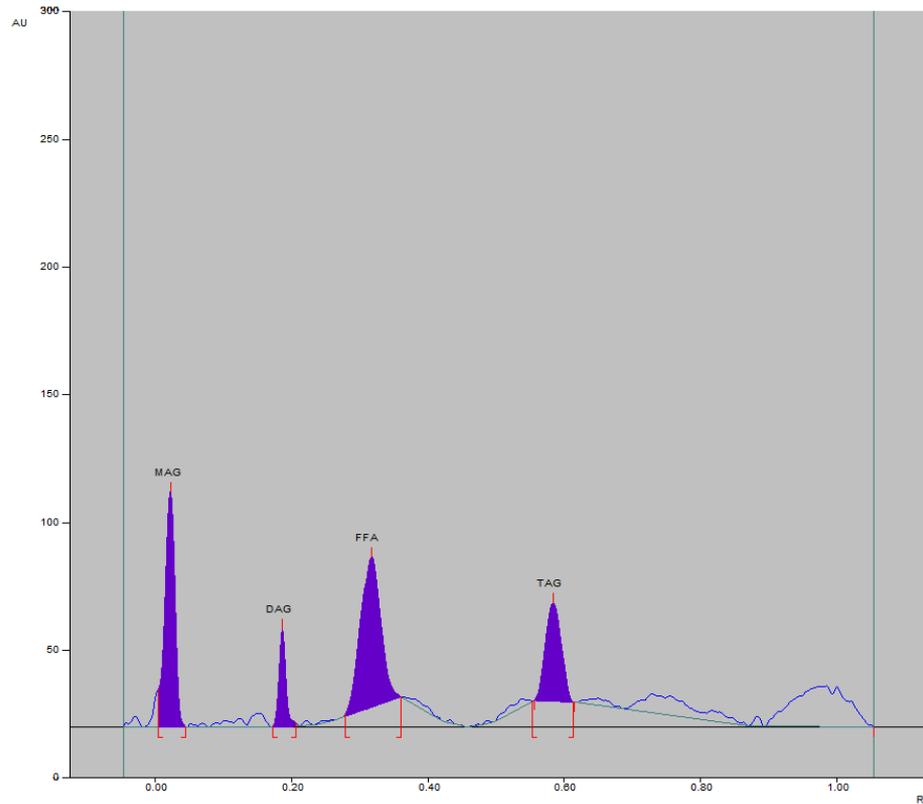
- Quantifications possibles des composés présents entre les points de la gammes étalons
- Quantifications des composés de faibles [c]

❖ Densitogrammes

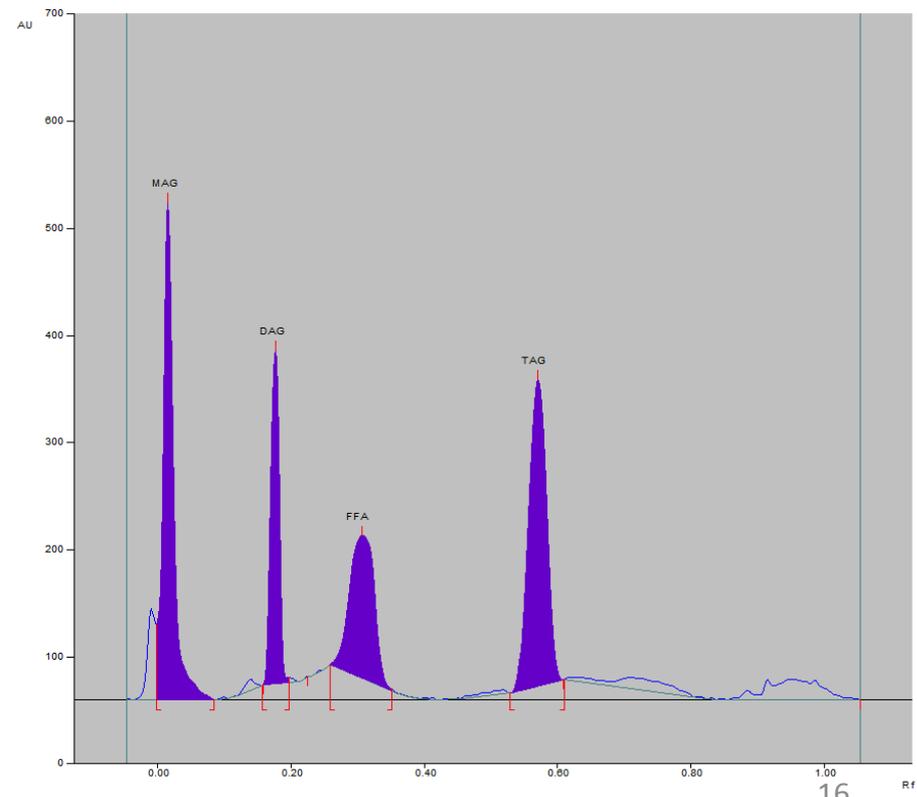
- Bonnes séparations des standards
- Bruit de fond faible



Concentrations faibles



Concentrations élevées



Conditionnement de la plaque

- ❖ Solvant: MeOH/CHCl₃
- ❖ Séchage 1h, 110 °C



- ❖ Standards
 Courbe étalon à 7 points
- ❖ Echantillons
 Spotter minimum 2 fois à différents volumes
- ❖ 6 échantillons / plaque



- ❖ Solvants

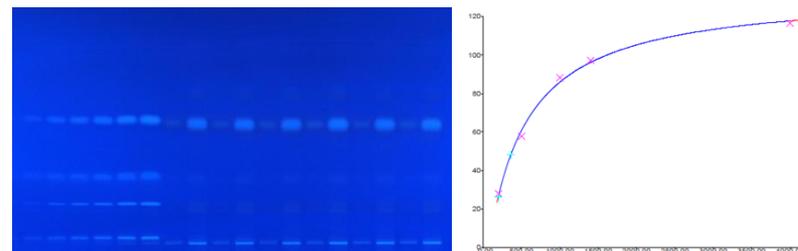
Migration jusqu'à 70 mm: n-hexane / diéthyléther / acide acétique 70/30/2 (v/v/v)

Révélation

- ❖ Solvants : Primuline, H₂O, acétone , séchage 5 min

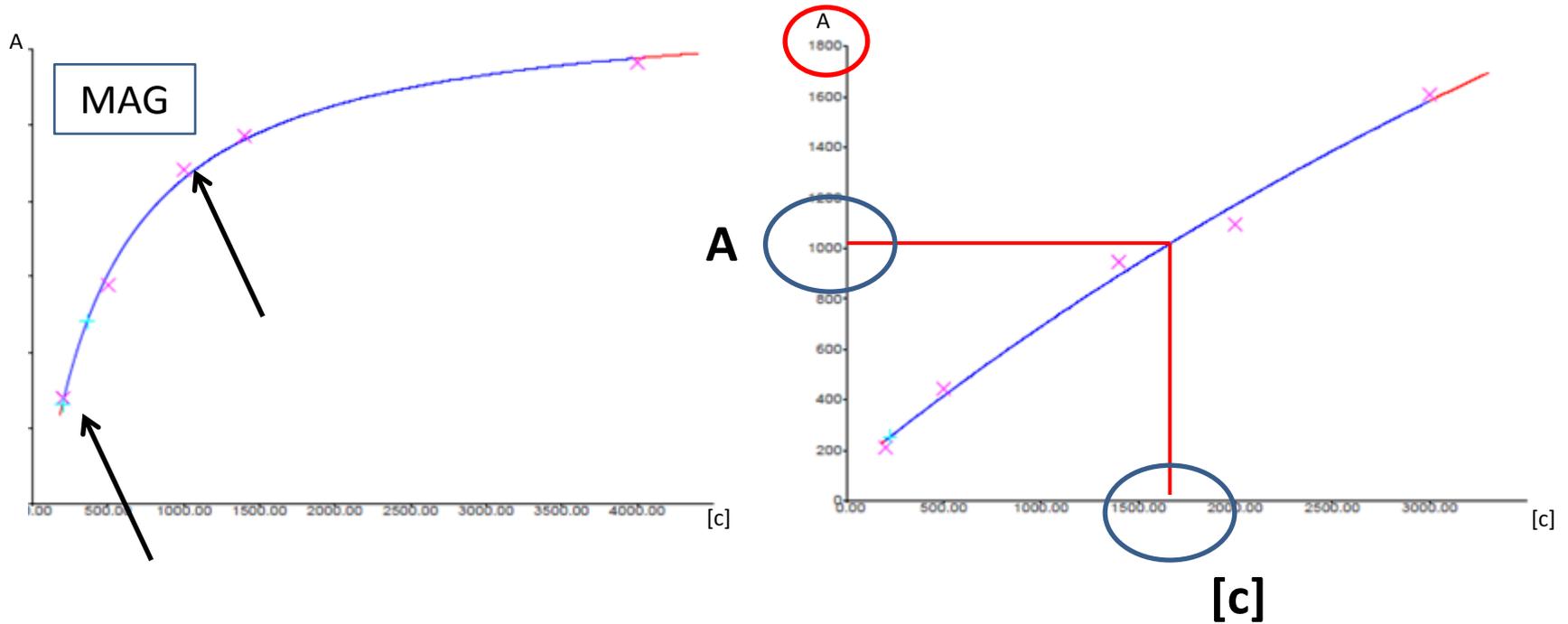


- ❖ Lampe: Hg
- ❖ Longueur d'onde : 366 nm



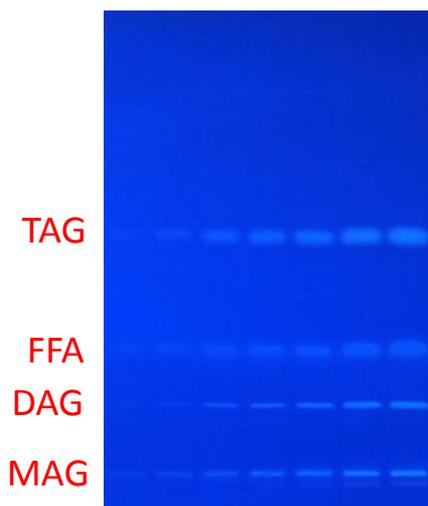
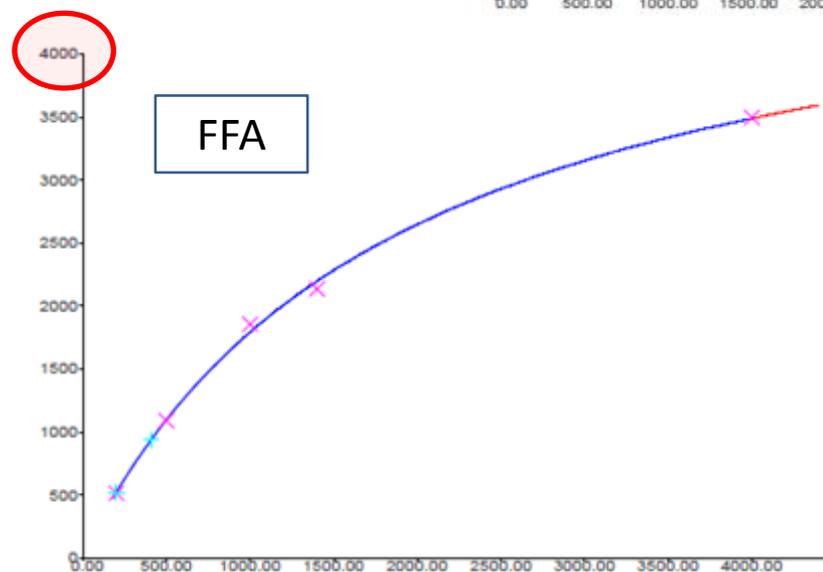
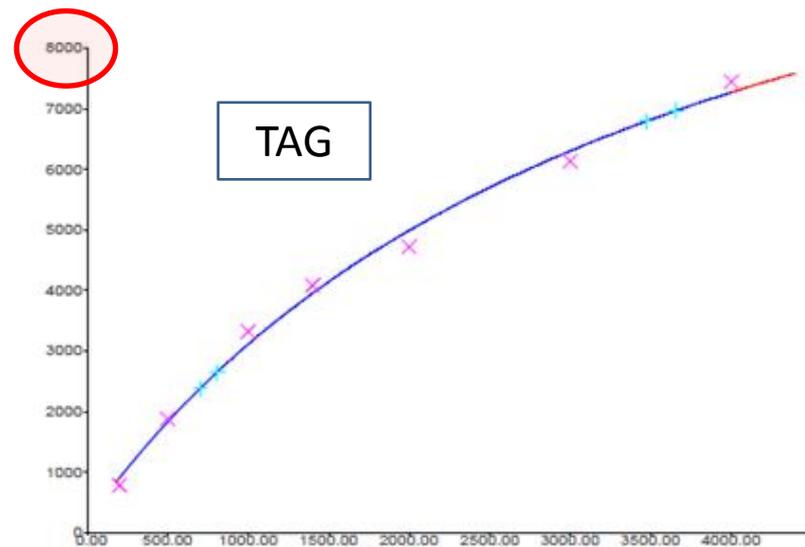
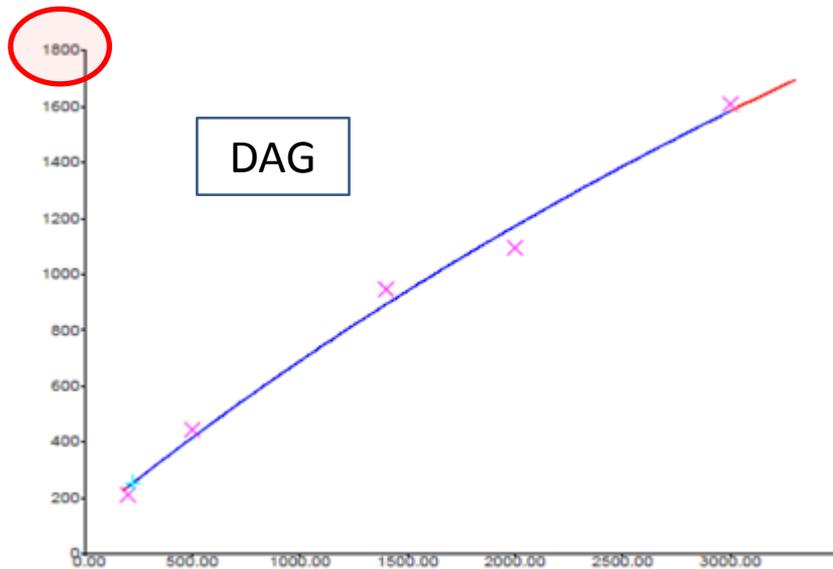
❖ Calibration selon le modèle de Michaelis Menten

Lipides neutres

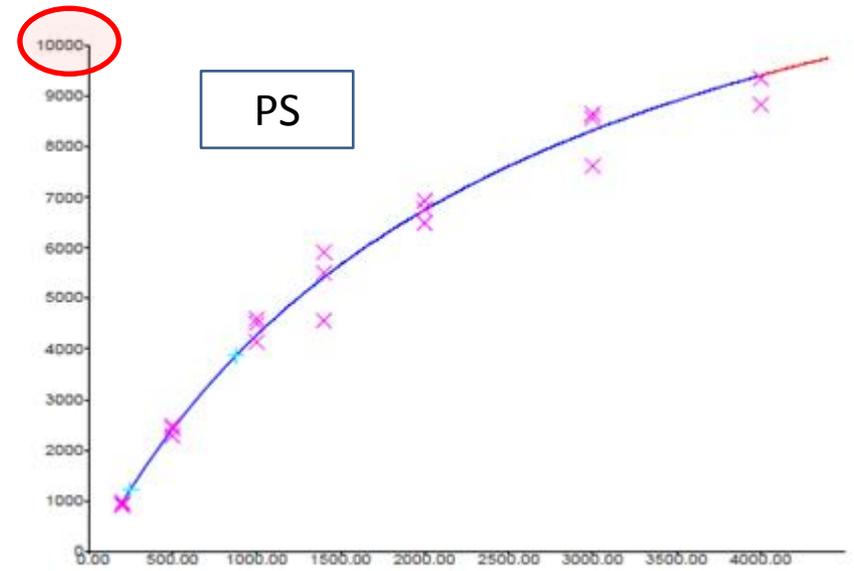
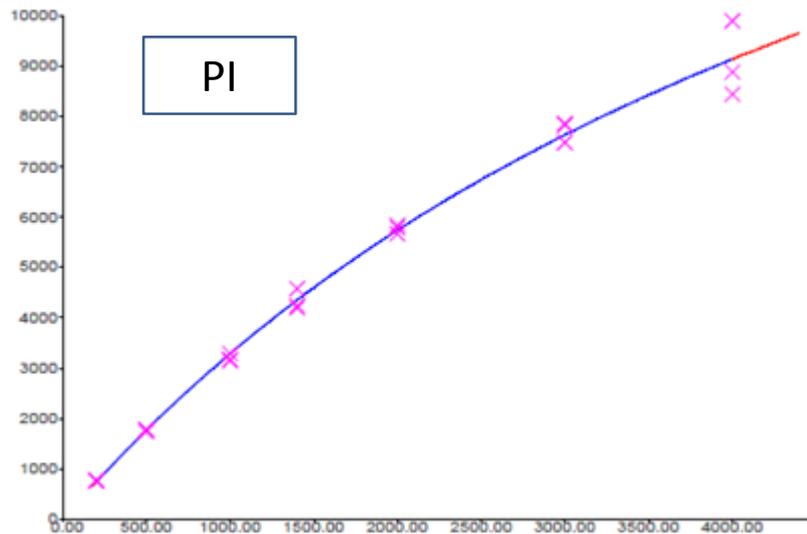
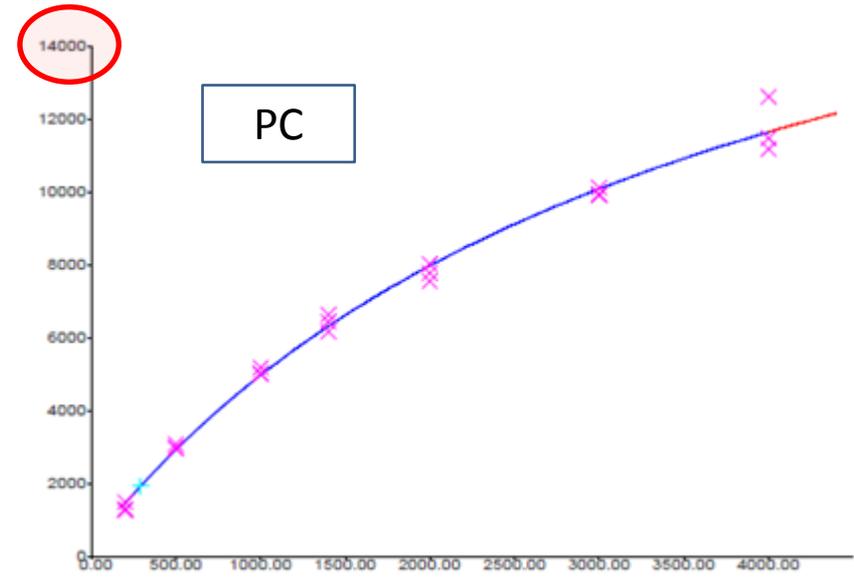
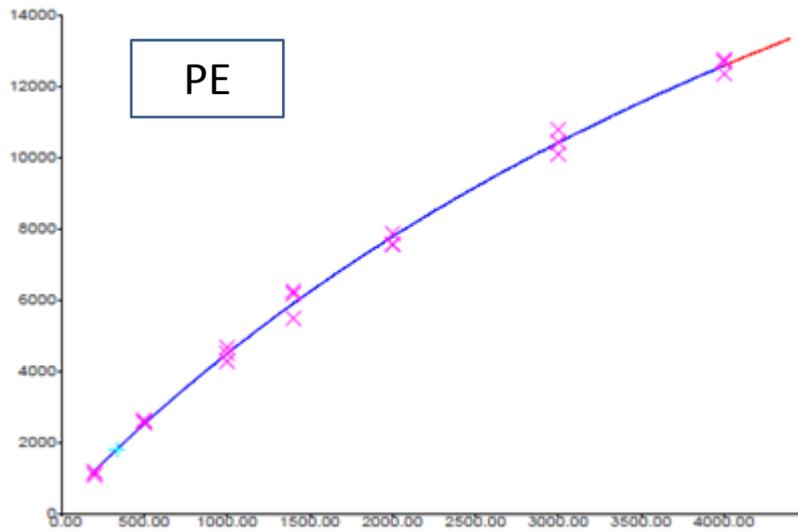


Calculs réalisés par le logiciel

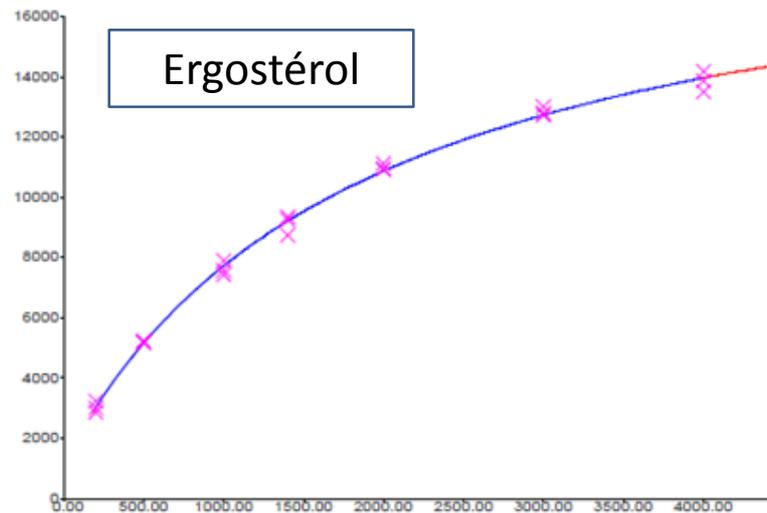
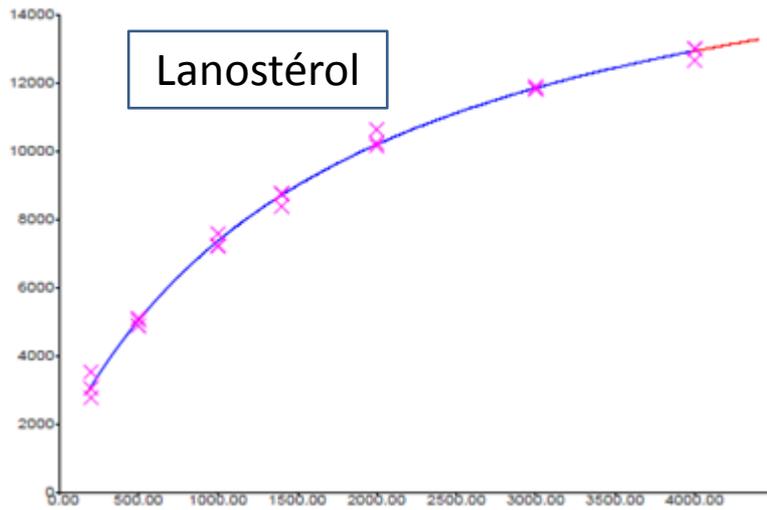
❖ Lipides neutres



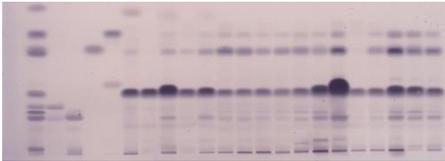
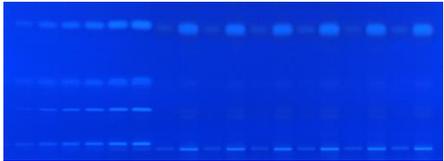
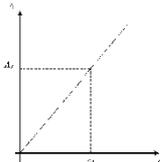
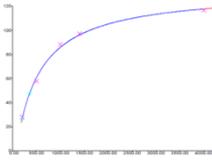
❖ Lipides polaires : phospholipides



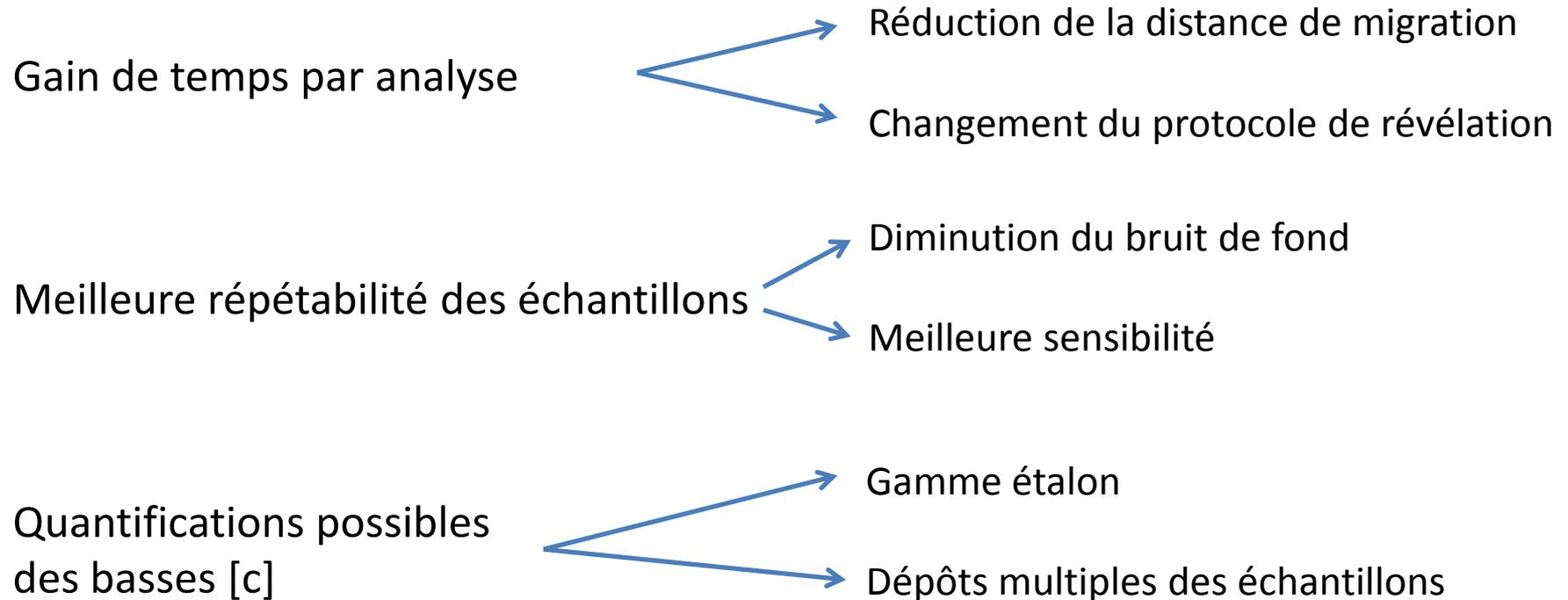
❖ Stérols



❖ Plaque après optimisation : Quantification des lipides

		
Lavage plaques	MeOH / CHCl ₃ , 20 min 110°C	MeOH / CHCl ₃ , 1h, 110°C
Standard	Single point	Gamme étalon 7 points / plaque
Spot échantillons	17 éch / plaque – 1 Dépôt / éch	6 éch / plaque – 2 dépôts / éch
Migration	85 mm	70 mm
Révélation	CuSO ₄ , H ₂ SO ₄ , H ₃ PO ₄ , 141°C 30 min	Primuline, eau, acétone Meilleurs résultats
Analyses	Lampe: D ₂ Longueur d'onde : 420 nm 	Lampe: Hg Longueur d'onde : 366 nm 

❖ Conclusion



❖ Modifications à venir

- Alternier échantillons et les standards sur la plaque
- Affiner l'intervalle des gammes étalons
- Dépôts multiples des standards de même concentration
- Traitement total des données par le logiciel (rendements)
- Validation de méthode en cours

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

