

BIOTECHNOLOGIE ET COMPOSES D'AROME

I. INTRODUCTION

II. BIOGENESE DE COMPOSES D'AROME

III. METABOLISME DES ACIDES GRAS ET FORMATION DE COMPOSES D'ARÔME

IV. PRODUCTION DES ESTERS PAR DES LIPASES

V. PRODUCTION DES TERPENES ET DES DERIVES DE TERPENES

VI. PRODUCTION DES PHENOLS VOLATILS

I. INTRODUCTION

Des procédés biotechnologiques pour l'obtention de composés d'arôme se développent depuis plusieurs décennies :

En effet :

- Une demande croissante des consommateurs de plus en plus vers les produits naturels.
 - Arômes obtenus par des procédés biotechnologiques peuvent être considérés comme « arôme naturel » à condition de respecter les cahiers de charges concernés (milieu réactionnel, milieu de culture, microorganismes **GRAS** (generally recognized as safe), extraction..)

- Le marché des composés d'arômes provenant des productions agricoles est très dépendant des conditions climatologiques, des considérations politiques.....
 - Il est possible de produire des arômes biotechnologiques tout au long de l'année

Un arôme naturel « biotechnologique » a un prix plus élevé qu'un arôme synthétique

Cost ratio between different chemical classes of natural flavoring substances and their natural identical correspondence (G. Feron, personal data, 2003).

| Class of Aroma | Cost Ratio : Natural/ Natural Identical |
|-----------------------|--|
| Lactones | 20 – 25 |
| Esters | 10 – 20 |
| Acids | 10 |
| Alcohols | 25 – 30 |
| Aldehydes | 100 or more |

Feron et Waché, 2005

Exemple : vanilline synthétique : 15 €/kg ; extrait de vanille ca. 3000-4000 €/kg

- Le marché mondial aromatique : ca. 11 milliard d'euros
- Taux de croissance de l'industrie aromatique : 4 à 5 %
- Actuellement plus de 2000 sociétés aromatiques dans le monde
- Actuellement ca. 2000 arômes de synthèse commercialisés contre ca. 4000 arômes naturels dont 15 à 20 % obtenus par procédés biotechnologiques

Principaux composés d'arôme obtenus par des procédés biotechnologiques

Principal natural flavoring substances produced by biotechnological means

| Compounds | Aromatic Note | Estimated Market T/Yr (1997) | Precursor | Biocatalyst (Not Exhaustive) | Process | Concentration g/l | Commercial Availability | Ref. |
|--|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------------|---|
| Vanilline | Vanilla | 5000 | Ferulic acid | <i>Amycolatopsis sp.</i> <i>Pycnoporus sp.</i> | Liquid | 11 | Yes | (42,129, G. Feron, personal data, 1997) |
| γ -decalactone | Fruity/peach | 5-10 | Ricinoleic acid | <i>Yarrowia lypolitica</i> <i>Sporidiobolus sp.</i> | Liquid | 10-15 | Yes | (131) |
| δ -decalactone | Nuts/milk/ coconut/fruity | 3.5 | Massoia lactonez Other ? | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Various filamentous fungi | Liquid | > 1 | Yes | (132,133, G. Feron, personal data, 1997) |
| γ -dodecalactone | Peach/musk | 0.5 | Oleic acid | Strain 458 + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Liquid | > 5 ? | Yes | (56,57, G. Feron, personal data, 1997) |
| δ -dodecalactone | Butter | ? | 5-ketododecanoic acid | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Liquid | < 1 | Yes | (132,133, G. Feron, personal data, 1997) |
| γ -octalactone | Coconut | 0.6-1 | Esters of octanoic acid | <i>Mucor sp.</i> | Liquid | ~ 11 | Yes | (134, G. Feron, personal data, 1997) |
| Alcohols, aldehydes : Cis-3-hexenol Trans-2-hexenal, hexanal... | « leaf alcohol », fruity | 5-10 | Poly-unsaturated | Soybean lipoxygenase fatty acids | Liquid and HPL | 2-5 | Yes | (67) |
| Raspberry-ketone | Raspberry | 5-20 | Betuloside | Enzyme (glycosidase) + yeast (<i>S. cerevisiae</i>) | Liquid | 1 | No | (46,47, 130, G. Feron, personal data, 1997) |
| 2-phenylethanol | Rose, honey | 0.5-1 | Phenyl-alanine | <i>Pichia sp.</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces sp.</i> | Liquid | 2-3 | Yes | (54) |
| Benzaldehyde | Almond | 115 | Phenyl-alanine | <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Pycnoporus cinabarinus</i> | Liquid | < 1 | No | (135) |
| Sotolon | Curry | ? | OH-isoleucine | <i>M. morgani</i> | Liquid | ? | ? | (136,137) |
| Pyrazine | Roasty, nutty | ? | Threonine | <i>Bacillus subtilis</i> | Solid | 2-3 | ? | (29) |
| Methyl-ketones | Blue cheese notes | ? | Coconut fat | <i>Aspergillus niger</i> | Solid | ? (Yield = 42%) | yes | (4) |

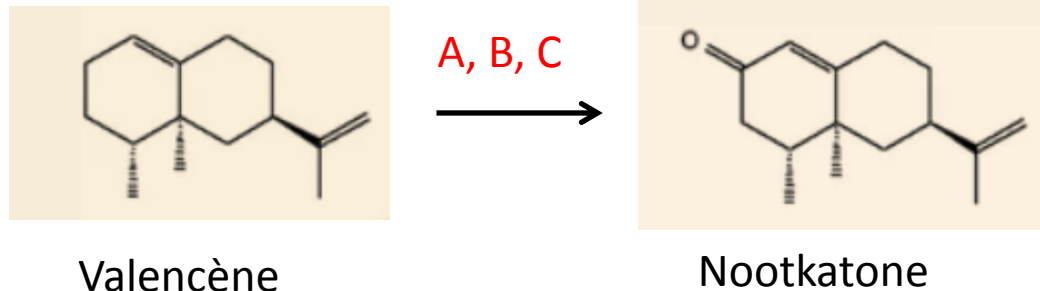
La production des arômes par des procédés biotechnologiques implique des catalyseurs biologiques soit des enzymes.

Propriétés des enzymes

1. Régiosélectivité des réactions :

- Les réactions catalysées par des enzymes sont régiosélectives contrairement à celles réalisées par des catalyseurs chimiques

Exemple : transformation de valencène (présent à forte teneur HE d'orange) en nootkatone (présente à faible teneur en pamplemousse .Très recherché dans les formulations aromatiques)



L'oxydation allylique :

A : chimique (tert-butyl chromate, tert-butylperacetate mais rendement faible)

B : par une bactérie isolée du sol (12 % rdt)

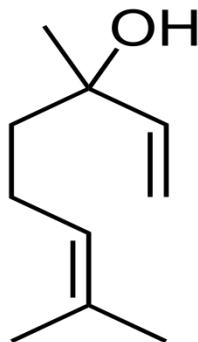
C : par des cultures de cellules végétales de *Citrus paradisi* (66 % rdt). Mais dans ce cas les concentrations finales en nootkatone est très faible (inf. à 10 mg/L, donc procédé non rentable. En effet des concentrations faibles en valencène doivent être utilisées dans les cultures cellulaires pour éviter la toxicité de la valencène.

➤ Remarque : pour envisager une production industrielle, la concentration en composés d'arôme ciblé dans le milieu final doit être souvent supérieur à 1 g/L. Après la production, reste encore les étapes d'extraction, de purification et de concentration éventuelle.

2. Stéréosélectivité des réactions :

- Les propriétés sensorielles de même que biologiques des composés organiques sont souvent dépendants d'une structure stéréochimique bien définie.
- Les formes énantiomères d'un composé chiral peuvent présenter des odeurs différentes :

Exemple : le linalol



R-(-)-linalol : boisé, lavande

S-(+)-linalol : floral, agrume

- Contrairement aux synthèses chimiques, les synthèses enzymatiques (par les plantes, microorganismes) sont souvent hautement énantiosélective.

Exemple :

- γ - decalactone synthétisée par la levure est majoritairement (> 90%) est l'énantiomère R comme dans la pêche

3. Accélération des vitesses des réactions

- L'enzyme accélère la vitesse de la réaction jusqu'à 10^{11} comparée à une réaction spontanée
- Les constantes de vitesse (k) de réactions catalysées par les enzymes sont souvent plus élevées que celles obtenus par les catalyseurs chimiques :

| Réaction | Catalyseur | k relative |
|---|--------------------|---------------------|
| $H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2 O_2$ | - | 1,0 |
| | Platine colloïdale | $2,1 \cdot 10^3$ |
| | Catalase | $3,5 \cdot 10^8$ |
| Saccharose + $H_2O \rightarrow$ Glucose+Fructose | H+ | 1,0 |
| | Invertase | $5,6 \cdot 10^{10}$ |

4. Les milieux de culture et les milieux réactionnels peuvent être compatibles avec les cahiers de charges pour l'obtention des produits naturels

Limites des catalyseurs biologiques (ou enzymes)

- Faible stabilité de l'enzyme : les enzymes étant des protéines peuvent être dénaturées ou encore inactifs suivant les conditions : température, pH, inhibiteurs (organique ou inorganique, les produits de la réaction
- Indisponibilité de certaines enzymes dans le commerce
- Coût élevé pour certaines transformations enzymatiques : enzymes, co-facteurs

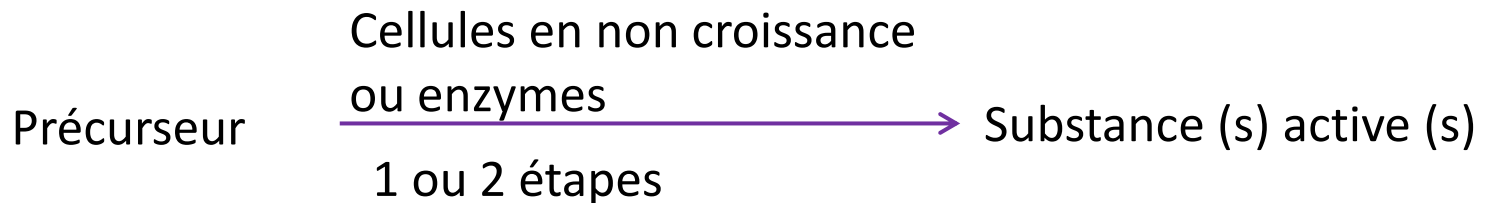
En bref :

| Catalyseurs biologiques | |
|--|--|
| Avantages | Inconvénients |
| Régiosélectivité des réactions | Faible stabilité (car il s'agit de protéines) |
| Stéréosélectivité des réactions | Coût peut être élevé comparé aux synthèses chimiques |
| Vitesse de réaction élevées | Indisponibilité de certaines enzymes |
| Milieus de cultures compatibles avec cahier de charges pour obtenir un produit naturel | |

PRODUCTION D'ARÔME EN BIOTECHNOLOGIE

➤ 2 approches : bioconversion ou synthèse de novo

1. BIOCONVERSION :



Une bioconversion est la transformation d'un précurseur en une molécule aromatisante dans le cas de procédés biotechnologiques

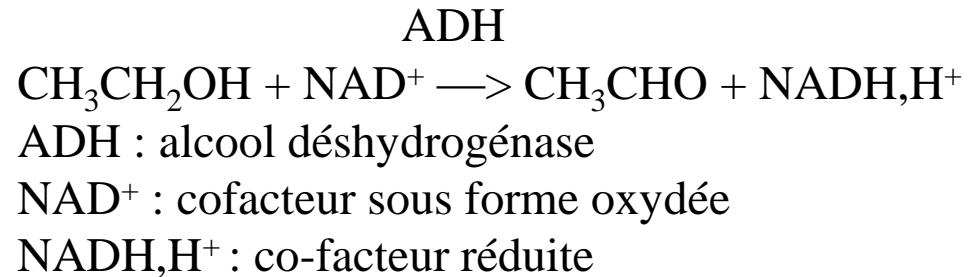
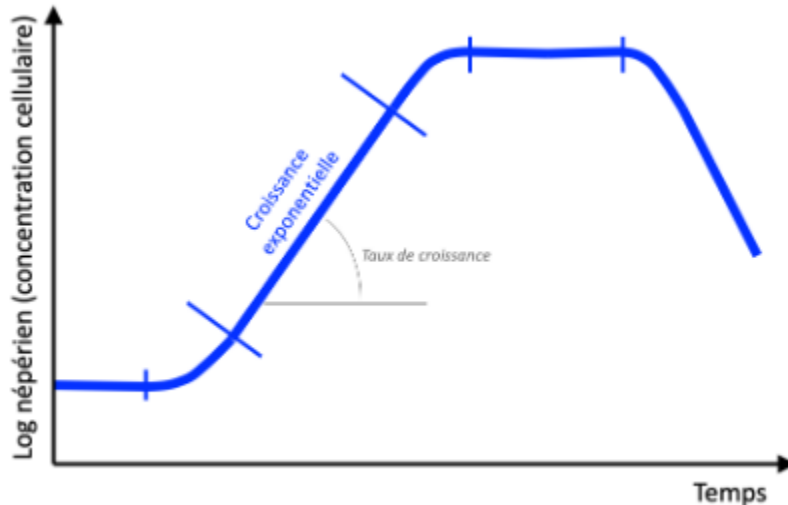
Si la réaction se déroule en une seule étape, on parle alors de biotransformation

La composition du milieu de bioconversion est très simple contrairement à un milieu de fermentation qui est complexe

Comme catalyseur biologique, on utilise :

- soit des cellules microbiennes ou végétales isolées lors d'une culture

Courbe de croissance



Les cellules sont isolées à un moment donné de la culture (souvent vers la fin de phase exponentielle) où le maximum d'enzyme d'intérêt est présent

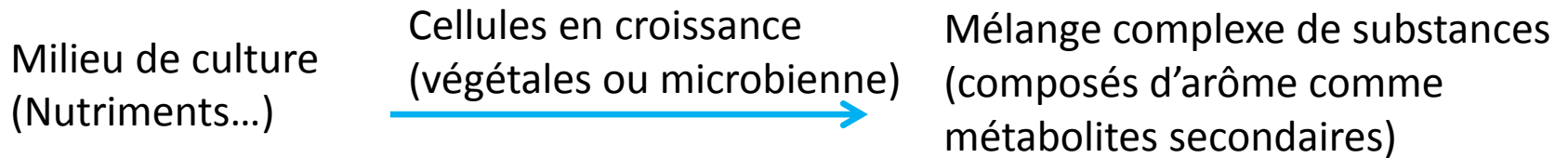
- Soit des enzymes de préférence purifiés (immobilisés ou non)

Comparaison entre cellules et enzymes pour la synthèse de composés d'arôme par bioconversion

| | AVANTAGES | INCONVENIENTS |
|----------|---|---|
| ENZYMES | Absence de réactions secondaires | Coût (enzyme) |
| | Transfert de masse facilité | Stabilité d'enzyme peut diminuer dans le temps |
| | Synthèse rapide | Nécessite de co-facteurs pour certaines réactions |
| | Reproductibilité | |
| | Arôme produit isolé facilement à l'état pur | |
| | Coût souvent modeste | Accessibilité enzyme-substrat limitée |
| CELLULES | Stabilité des enzymes | Réactions secondaires |
| | Co-facteurs souvent accessibles | Réactions longues |

➤ Les enzymes peuvent être immobilisées : possibilité de réutilisation (diminution de coût)

2. SYNTHÈSE DE NOVO (BIOSYNTHESE , FERMENTATION)



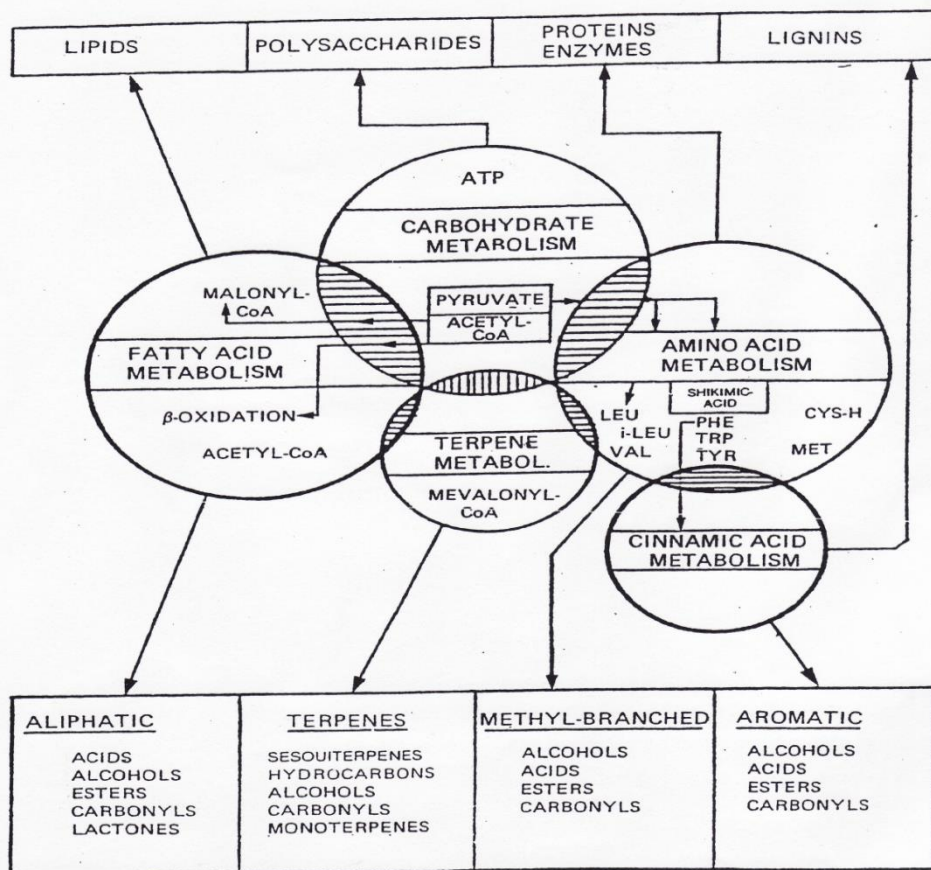
- Synthèse de novo par des microorganismes (levures, bactéries, champignons filamenteux cultivés sur un milieu synthétique) peut aboutir à la synthèse de composés d'arôme (alcools, esters, lactones, pyrazines...).
- Actuellement de nombreux composés d'arôme sont dans le marché obtenus par ce biais
- Synthèse de novo par des cultures de cellules végétales peut aboutir à la synthèse de composés d'arôme mais les rendements sont limités pour envisager une production industrielle

II. BIOGENESE DES COMPOSE D'AROME

- Les fruits ont été des modèles pour étudier la biogénèse de composés d'arôme.
- Les mêmes voies de biosynthèse ont lieu dans d'autres végétaux et dans les microorganismes
- La biosynthèse de composés d'arôme implique souvent plusieurs voies et enzymes
- Les composés d'arôme formés aux premiers stades subissent ensuite de nombreuses transformations enzymatiques/chimiques, ce qui explique la présence de plusieurs milliers de molécules volatils

II. BIOGENESE DE COMPOSES D'AROME

Voies principales de biosynthèse de composés d'arôme



Principle pathways of biosynthesis of fruit volatiles. [Reprinted with permission from R. Tressl et al., Biogenesis of volatiles in fruit and vegetables, in: Aroma Research (H. Maarse and P. J. Groenen, eds.), Pudoc, Wageningen (1975) 41.]

➤ Le modèle d'étude a été souvent les fruits, mais les mêmes voies se déroulent dans les microorganismes

4 voies principales :

1. Métabolisme d'acides gras (alcools, esters, lactones...)
2. Voie mévalonique et glycèraldéhyde phosphate (GAP) (terpènes)
3. Métabolisme d'acides aminés (alcools, esters, aldéhydes...)
4. Voie cinnamique acide ou voie shikimique (phénols volatils et leurs dérivés)

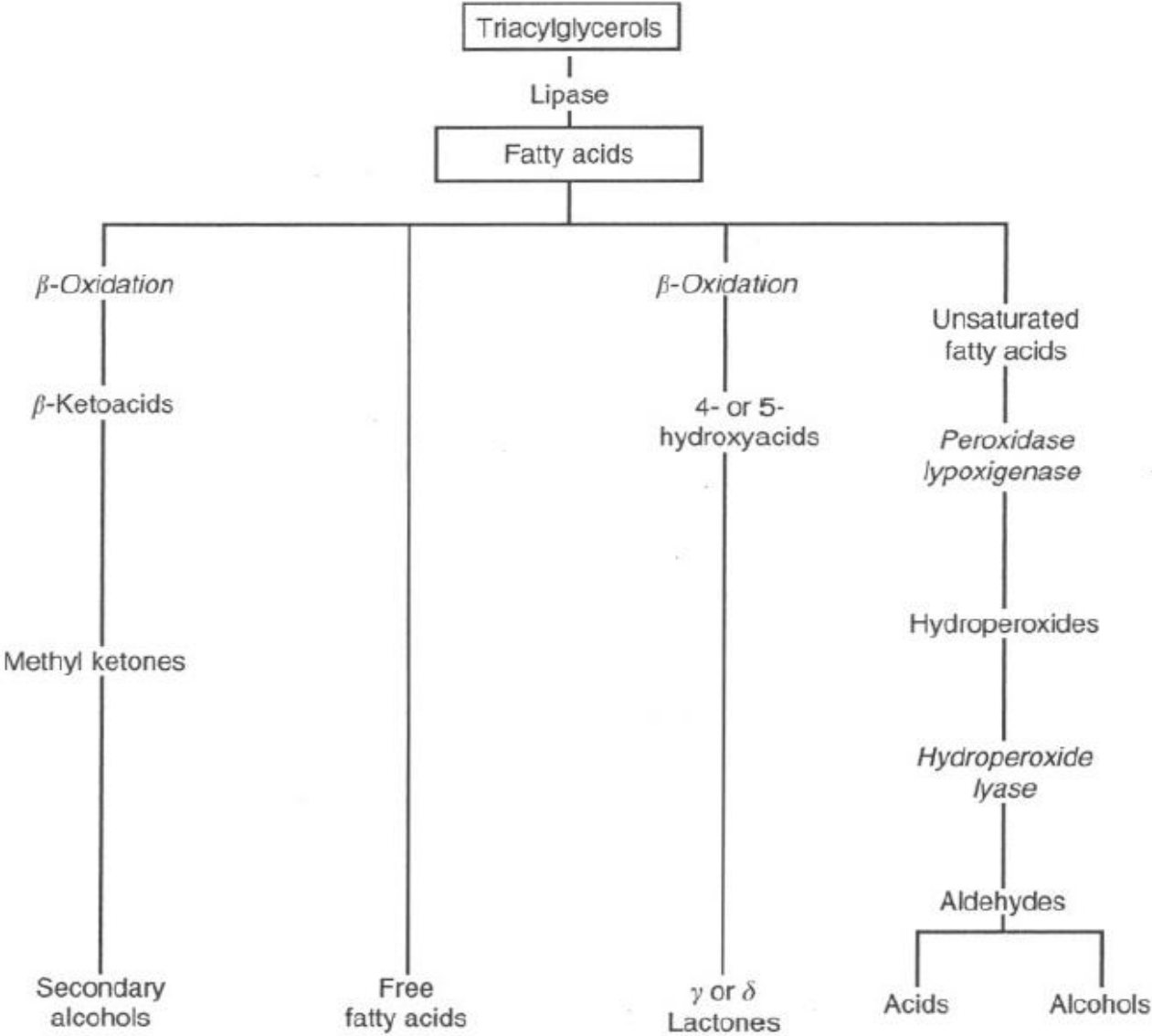
III. METABOLISME DES ACIDES GRAS ET FORMATION DE COMPOSES D'ARÔME

Les acides gras sont les précurseurs de nombreux CA :

acides gras, alcools, esters, aldéhydes, lactones...

impliqués dans l'arôme de nombreux produits d'origine végétale
et microbienne

Formation de composés d'arôme à partir des lipides et des acides gras



2 voies principales impliquées dans le catabolisme des acides gras :

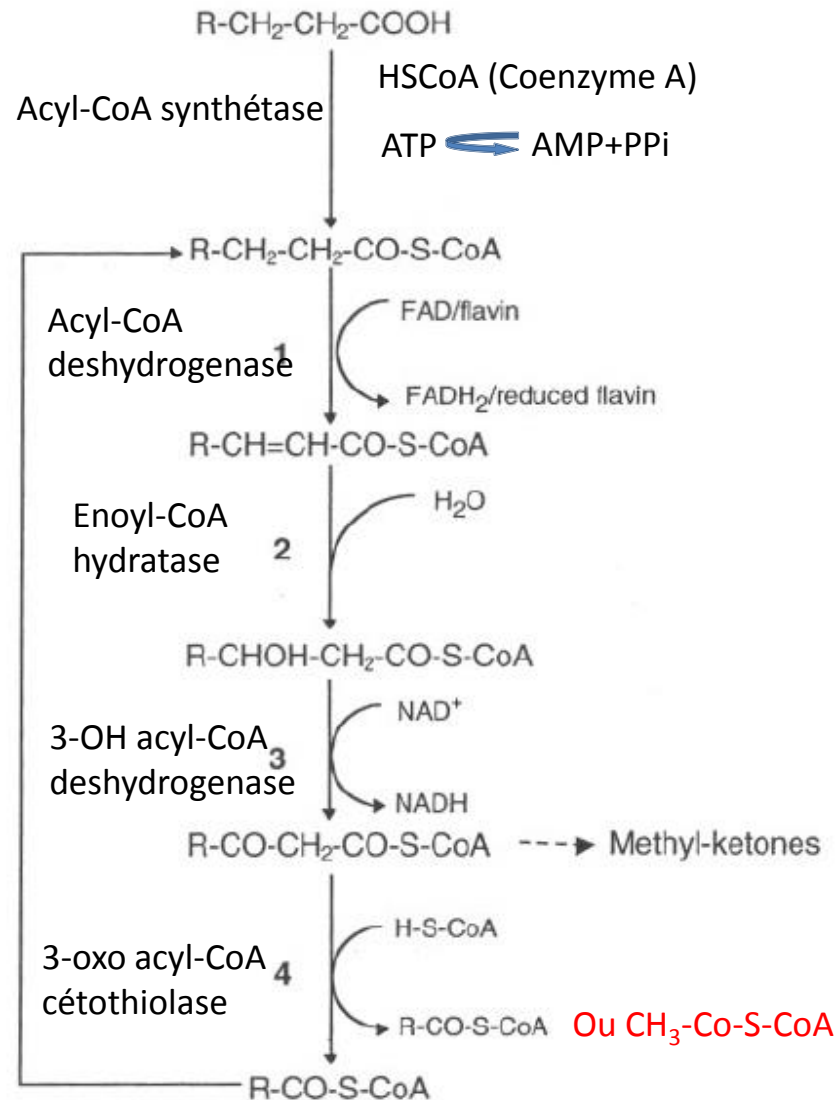
B-oxidation et la voie lipoxygénase

III.1. β -oxidation des acides gras

Par cette voie des CA sont générés dans les tissus de végétaux intacts et dans les cellules microbiennes

Elle a lieu dans les mitochondries. La dégradation des cellules végétales ou microbiennes détruit les mitochondries

Le processus de β -oxydation des acides gras est complexe, impliquant plusieurs enzymes et co-enzymes (ou co-facteurs). Toutes les réactions ont lieu au niveau de carbone β .



- Un cycle comporte 4 étapes. A la fin de chaque cycle, la molécule perd 2 atomes de carbone sous forme d'acétyl-Co-A ($CH_3-Co-S-CoA$)

III.1.1 Production des lactones

Les lactones apportent essentiellement des notes fruitées (pêche, abricot, noix de coco, ..)

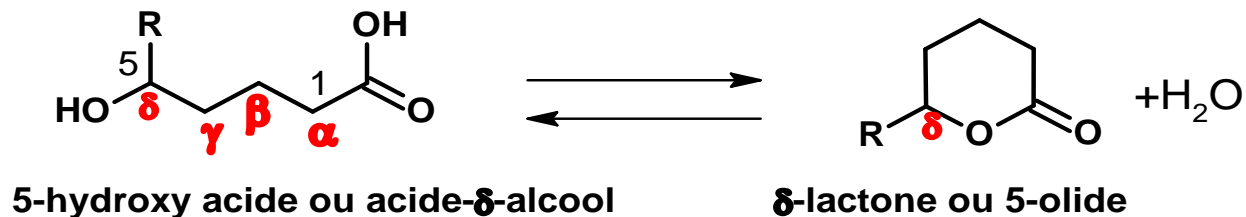
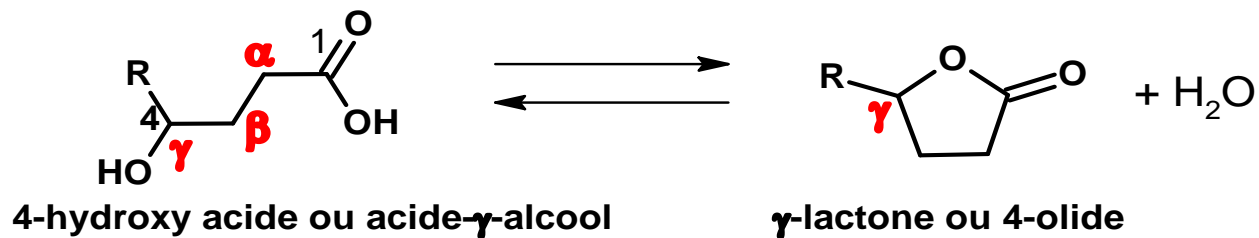
Ils sont présents dans de nombreux aliments (fruits, produits laitiers, boissons alcoolisées ou non...)

Sont très recherchés pour l'aromatisation de différents aliments (jus de fruits, eau, Beurre) ou encore en parfumerie

Une centaine de lactones ont été détectés dans les plantes et les aliments comportant de 4 à 18 atomes de carbone

Il existe différents lactones dans la nature mais les plus abondants et les plus utilisés en industrie sont les γ et δ -lactones.

Les γ et δ -lactones sont obtenus par l'inter-esterification des acides alcools, 4-hydroxy acide et 5-hydroxy acide respectivement.



Un exemple de production de lactones : cas de γ -decalactone avec l'implication de β -oxydation

γ -decalactone a été un des premiers composés d'arôme produit à l'échelle industrielle par des procédés biotechnologiques (les années 80-90)

Plusieurs tentatives ont été développées pour sa production, en utilisant différents substrats et microorganismes

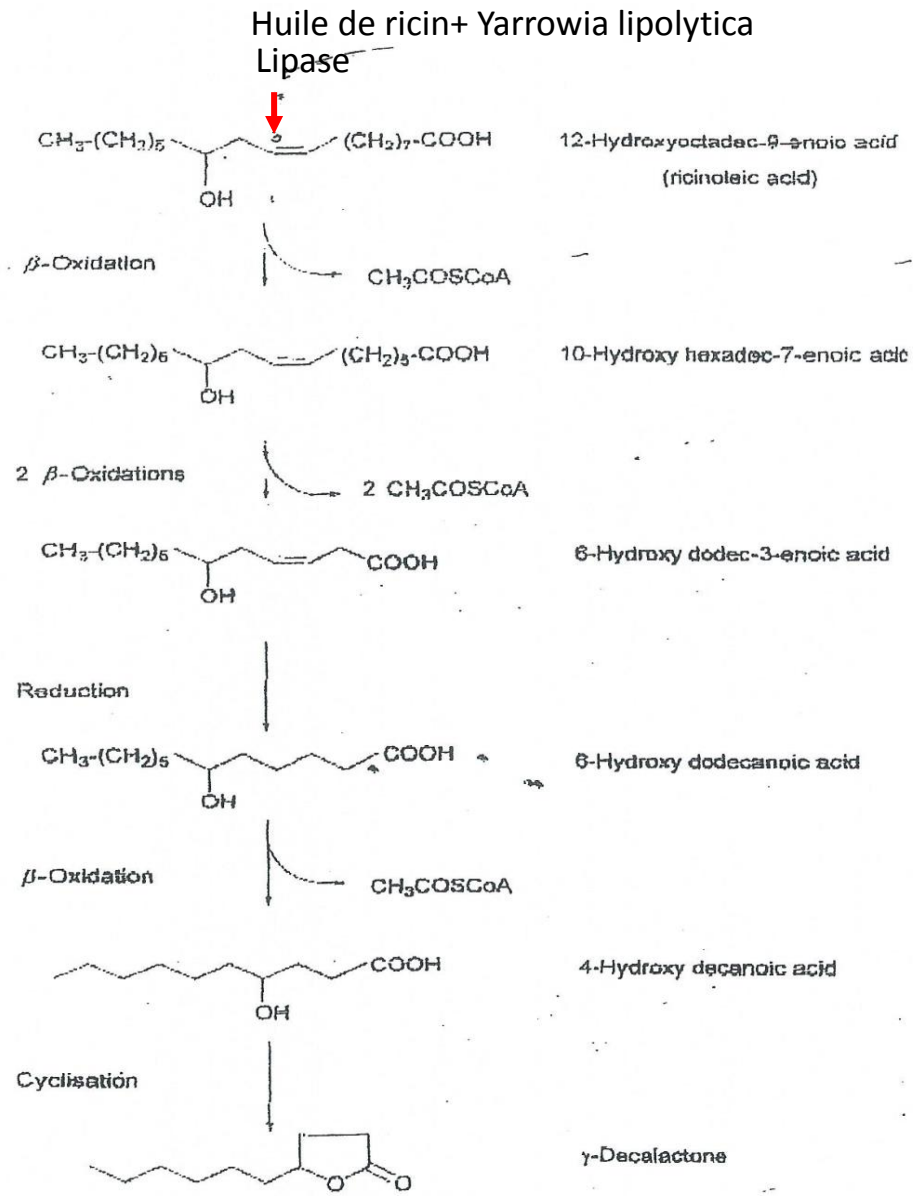
Sa synthèse nécessite la présence d'un 4-hydroxy acide, comme substrat comme signalé précédemment

La seule source naturelle et peu coûteuse et en quantité intéressante en hydroxy acide gras est l'huile de ricin. Cette huile est obtenue à partir de Ricinus communis .

En effet les lipides de Ricinus communis est riche en acide ricinoléique (C18 : 1) (environ 90 % des acides gras) qui est un hydroxy-acide.

Plusieurs brevets ont été déposés pour l'obtention de γ -decalactone à partir de cette **huile** (ex : brevet Unilever)

Bioconversion d'acide ricinoléique de l'huile de ricin en γ -decalactone par *Yarrowia lipolytica* :



L'huile de ricin est utilisée par la production **γ -decalactone à l'échelle industrielle**

La production annuelle est près de 10 tonnes, ce qui correspond à un volume de fermentation de 2 500 m³.

L'acide ricinoléique subit 4 cycles de β -oxidation, une étape de réduction

Dès qu'il y ait une production optimale en acide 4-hydroxy décanoïque, on abaisse le pH à 3.5 afin de favoriser la lactonisation, la température est montée entre 50 et 80 °C afin d'arrêter l'activité levurienne

La concentration en **γ -decalactone est > 1 g/L**

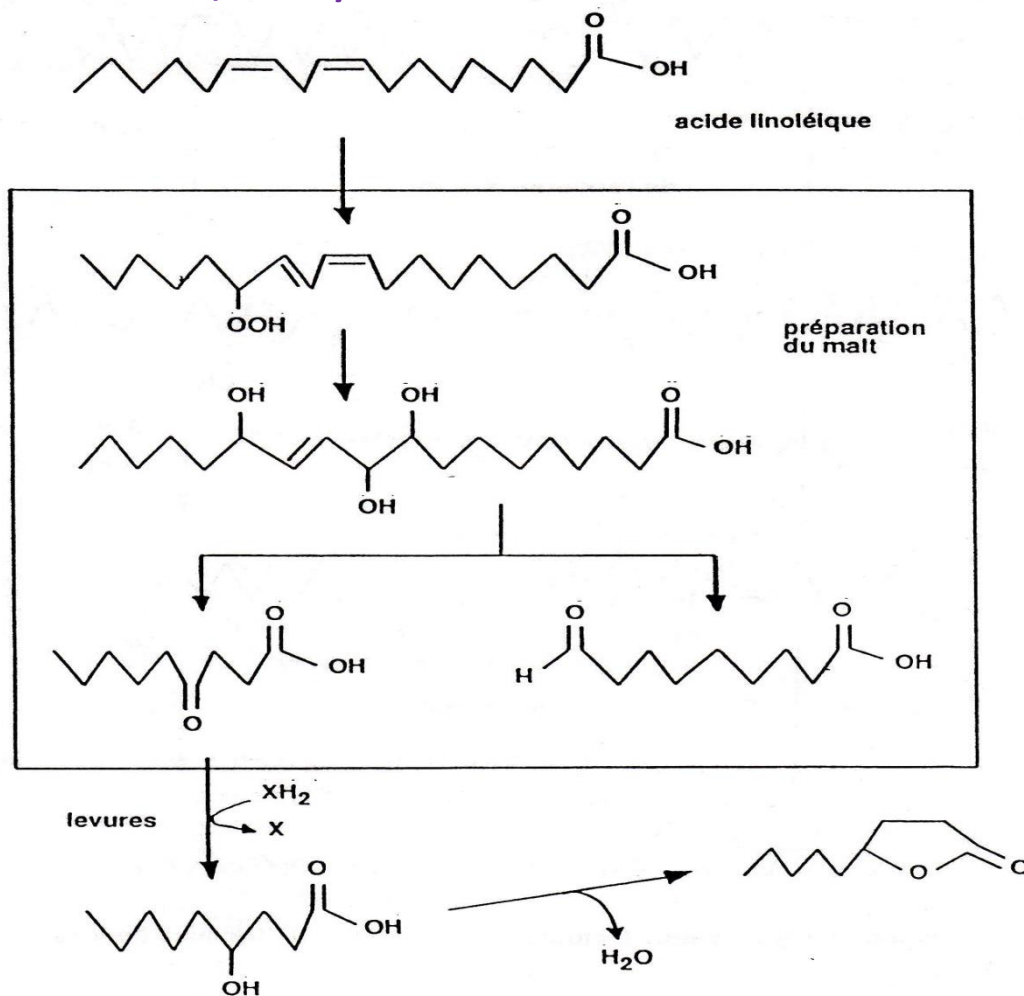
γ -decalactone a une pureté optique élevée (enantiomère R > 98 %. Dans la pêche cette enantiomère est prédominante

Une souche de *Yarrowia lipolytica* génétiquement modifiée a permis d'obtenir 9.5 g/L de γ -decalactone à partir de **methly ester d'acide ricinoléique après 75 h de culture (Pagot et al., 1997)**

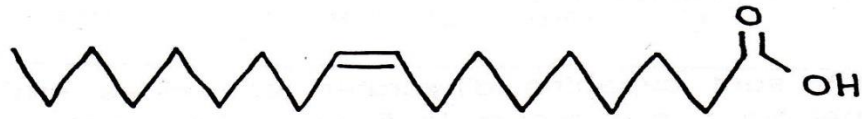
Mucor circillenioides en utilisant le decanoate d'éthyle a conduit à la production de 10.5 g/L de γ -decalactone après **60 h (Kumin & Munch, 1997, société Givaudan)**

➤ La synthèse des lactones requiert des acides gras hydroxylés : le substrat de départ peut être un acide-alcool, comme l'acide ricinoléique (voir plus loin) ou acides gras non hydroxylés comme l'acide linoléique ou oléique

Formation de γ -nonalactone lors de la fabrication de la bière à partir d'acide linoléique (Tressl et al., 1978)



Production microbienne de γ -dodécalactone à partir de l'acide oléique

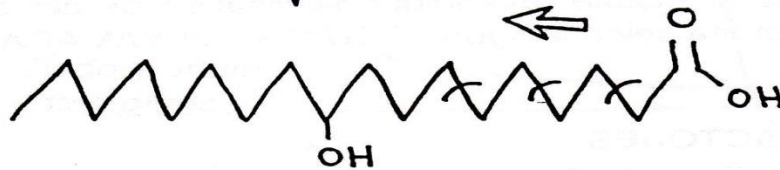


acide oléique



hydratation
microbiologique

(*Nocardia*)
(bactérie)

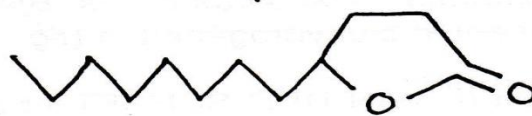


acide (*R*)-10-hydroxy stéarique



β -oxydation

(*Saccharomyces*)



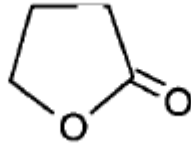
γ -dodécalactone

World consumption of lactones (kg/year)
(STOFBERG and GRUNDSCHOBBER, 1987)

| | Molécule | Sous forme native dans l'aliment | Sous forme d'additif |
|--------------------|---------------|-------------------------------------|----------------------|
| γ -lactones | γ -C4 | 44 710 | 149 |
| | γ -C5 | 34 954 | 81 |
| | γ -C6 | 829 | 104 |
| | γ -C8 | 4 438 | 770 |
| | γ -C9 | 8 537 | 3 112 |
| | γ -C10 | 3 527 | 647 |
| | γ -C11 | 57 | 3 089 |
| | γ -C12 | 609 | 385 |
| δ -lactones | δ -C6 | 964 | 42 |
| | δ -C8 | 1 740 | 49 |
| | δ -C9 | 17 | 23 |
| | δ -C10 | 5 619 | 4 801 |
| | δ -C11 | 138 | 616 |
| | δ -C12 | 10 200 | 5 753 |
| | δ -C14 | 8 970 | 1 |
| Total | | 125.309 | 19.622 |

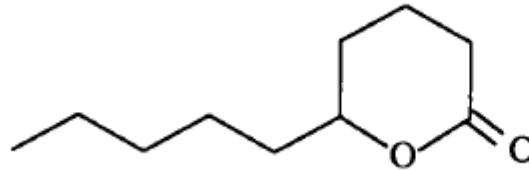
Quelques lactones détectés dans les aliments

$C_4H_6O_2$
(γ -butyro lactone)



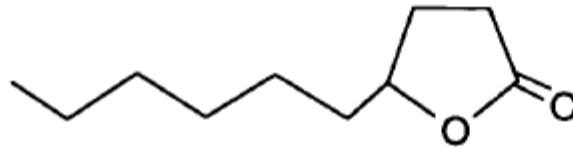
Faible odeur de type beurre (MAGA, 1976), âcre, fétide, caoutchouteux (ETIEVANT, 1991)

$C_{10}H_{18}O_2$
(δ -déca lactone)



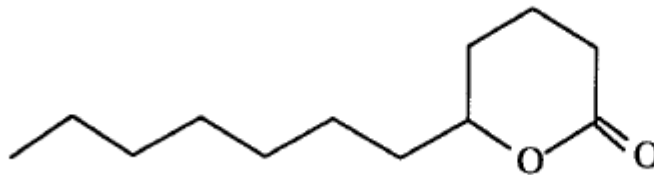
Odeur de pêche, huileux
arôme de pêche, noix de coco, beurre (MAGA, 1976)
arôme crémeux, doux, noix de coco, pêche, lait (FORSS, 1972)

$C_{10}H_{18}O_2$
~~(δ -déca lactone)~~
 γ -déca lactone
4-decanolide



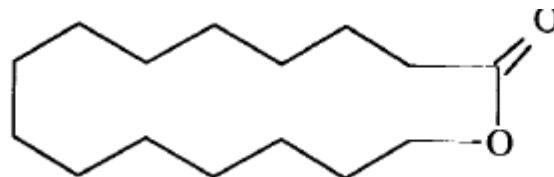
Odeur agréable, fruitée
arôme type pêche/abricot (MAGA, 1976)

$C_{12}H_{22}O_2$
(δ -dodeca lactone)



Odeur puissante de fruit frais
arôme de pêche, poire, prune (MAGA, 1976)
beurre, noix de coco (ALDRICH)
arôme de pêche, poire, prune (FORSS, 1972)

$C_{15}H_{28}O_2$
(15-pentad ecanolide)



Odeur délicate, musquée
(BAUER *et al.*, 1990)

➤ Les γ et δ -lactones contiennent un carbone asymétrique respectivement au carbone 4 et 5. Il y a donc deux énantiomères, R et S, l'énantiomère R étant souvent prédominant dans les aliments

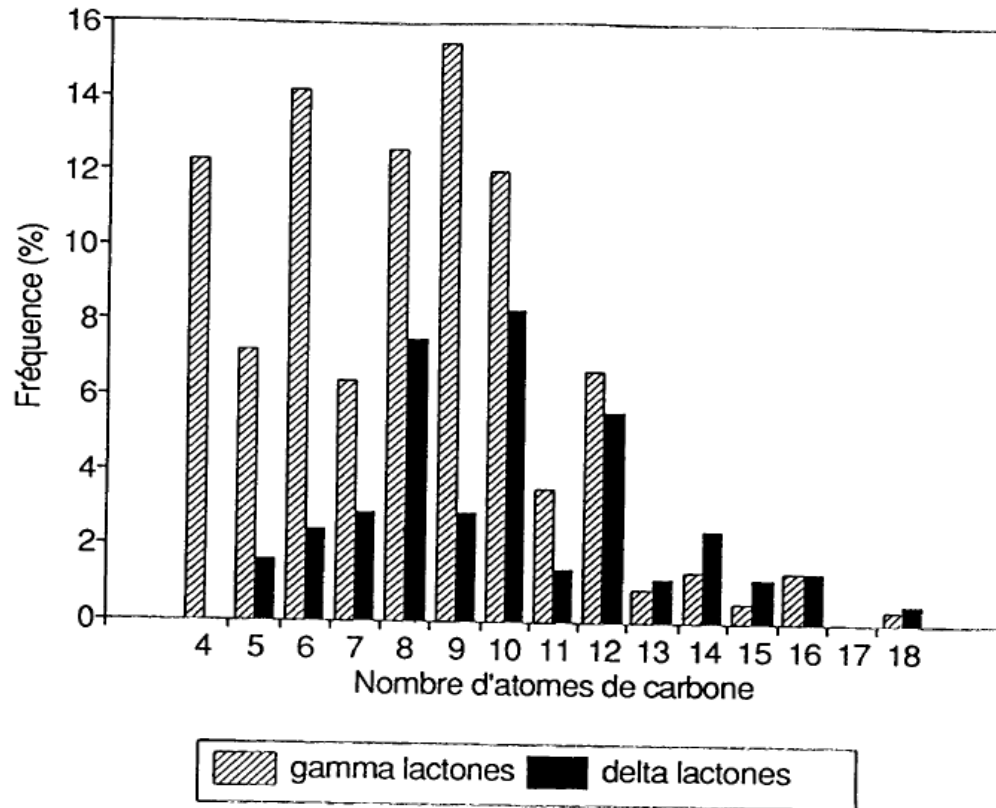


Figure 2
Fréquence des γ et des δ -lactones en fonction de la longueur de la chaîne carbonée.
Résultats exprimés pour 100 aliments. Données bibliographiques concernant
374 aliments (MAARSE et VISSCHER, 1989)

Seuils de perception (olfactif et gustatif) des γ et δ -lactones

Flavour thresholds of some γ and δ -lactones

a) Olfactory perception after dispersion in water (ENGEL et al., 1989a ¹)

b) Perception "in mouth" after dispersion in aqueous or deodorized oily solution (SIEK et al., 1971 ² ; KEITH and POWERS, 1968 ³)

| a) ¹ (seuils exprimés en $\mu\text{g.kg}^{-1}$) | | | |
|---|-------|---------------|-----|
| γ -C6 | 1 600 | | |
| γ -C7 | 400 | | |
| γ -C8 | 7 | δ -C8 | 400 |
| γ -C10 | 11 | δ -C10 | 100 |
| γ -C12 | 7 | 6-psp* | 150 |

| b) (seuils exprimés en mg.kg^{-1}) | | | |
|--|--------------------|-------------------|-------------------|
| | Dans l'eau | Dans l'huile | |
| γ -C6 | 13 ² | 8 ² | |
| γ -C7 | 0,52 ² | 3,4 ² | |
| γ -C8 | 0,095 ² | 0,4 ³ | δ -C8 |
| γ -C9 | | 3,5 ² | 0,57 ² |
| γ -C10 | | 2,4 ² | |
| γ -C10 | 0,088 ² | 1 ² | δ -C10 |
| γ -C11 | 0,025 ² | 0,93 ² | 0,16 ² |
| γ -C12 | | | δ -C12 |
| γ -C14 | | | 0,1 ² |
| | | | 9,8 ² |
| | | | 1 ³ |
| | | | 95 ² |
| | | | 500 ² |

6-psp* : 6-pentyl- α -pyrone.

Dufossé et al., 1994

III.1.2. Production des aldéhydes et des alcools à 6 atomes de carbone (notes fraîches, vertes) « green notes »

Les aldéhydes et les alcools à 6 atomes de carbone, comme hexenal et hexenol , leurs isomères sont utilisés en industrie aromatique et parfumerie.

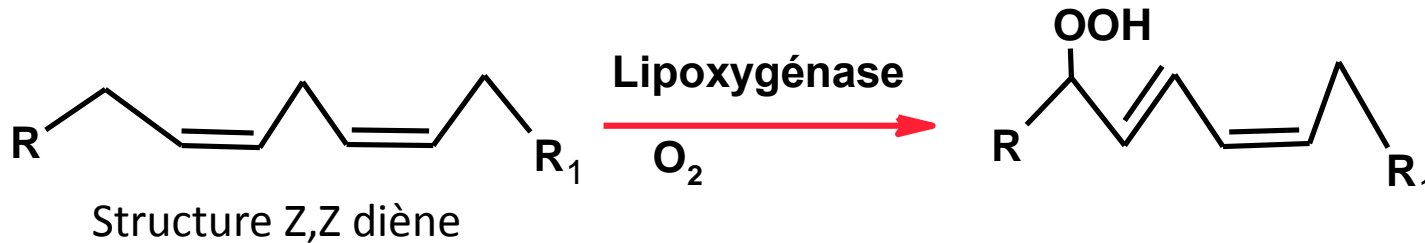
Traditionnellement obtenus par la distillation fractionnée de l'huile essentielle, comme la menthe. Ceci est coûteux et ne peut satisfaire la demande

La demande annuelle est de l'ordre de 5 à 10 tonnes. (produit naturel : 3000 €/kg)

Les aldéhydes et les alcools à 6 atomes de carbone peuvent être obtenus à partir des acides gras (α . linoléique et linoléique) par un système enzymatique incluant la lipoxygénase, hydroperoxyde lyase, l'alcool déshydrogénase

La lipoxygénase (lpx) :

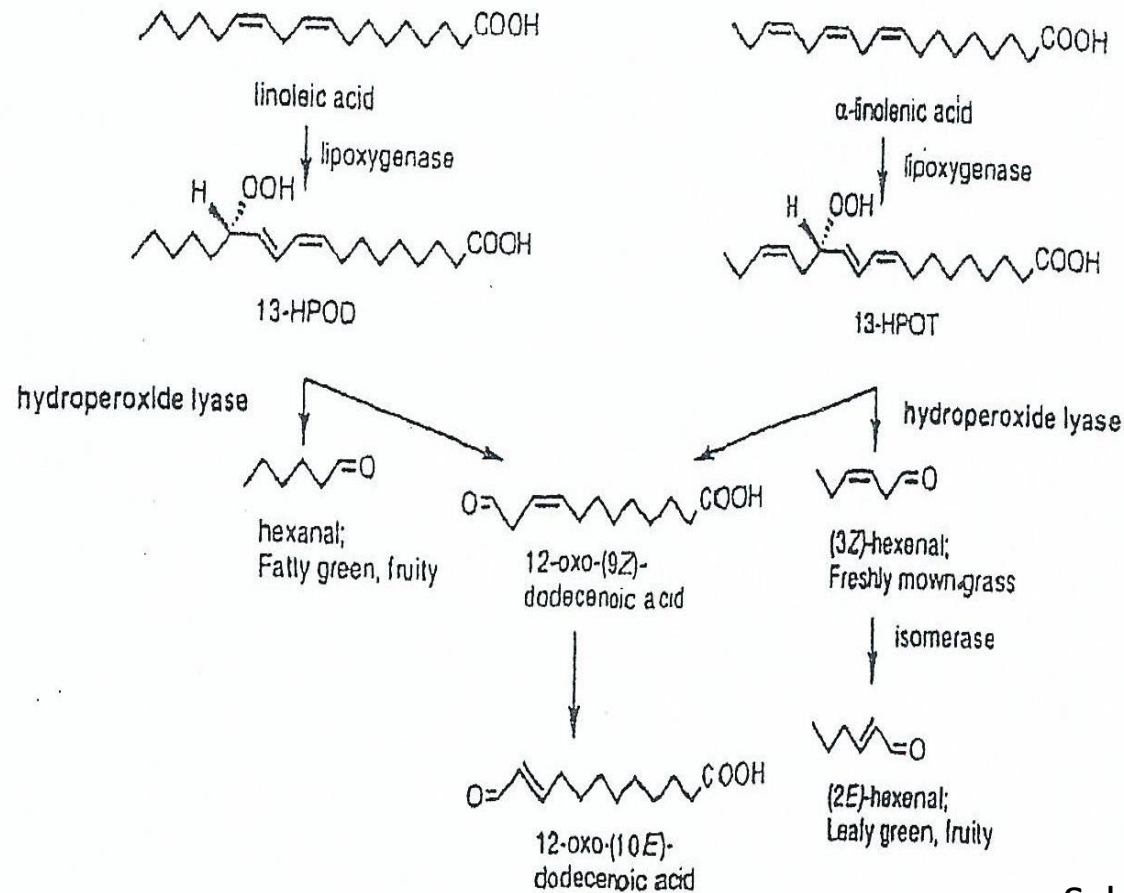
La lipoxygénase catalyse l'oxygénation des acides gras dans le règne végétal comportant une structure Z,Z diène. On en rencontre 2 dans le règne végétal : acides linoléïque (C18:2) et linoléïque (C18:3)



En présence d'oxygène moléculaire, la lpx catalyse la formation d'hydroperoxydes selon un processus radicalaire. On obtient les hydroperoxydes en position 13-(S) et 9-(R) des acides linoléïque et linoléïque

Le rapport entre ces deux isomères dépend essentiellement de la spécificité de l'enzyme. L'hydroperoxyde 9-(R) est abondant dans le cas de tomate, concombre, blé, alors que l'hydroperoxyde 13-(S) est abondant dans le raisin et le soja.

Synthèse des aldéhydes à 6 atomes de carbone à partir des acides linoléïque et linolénique

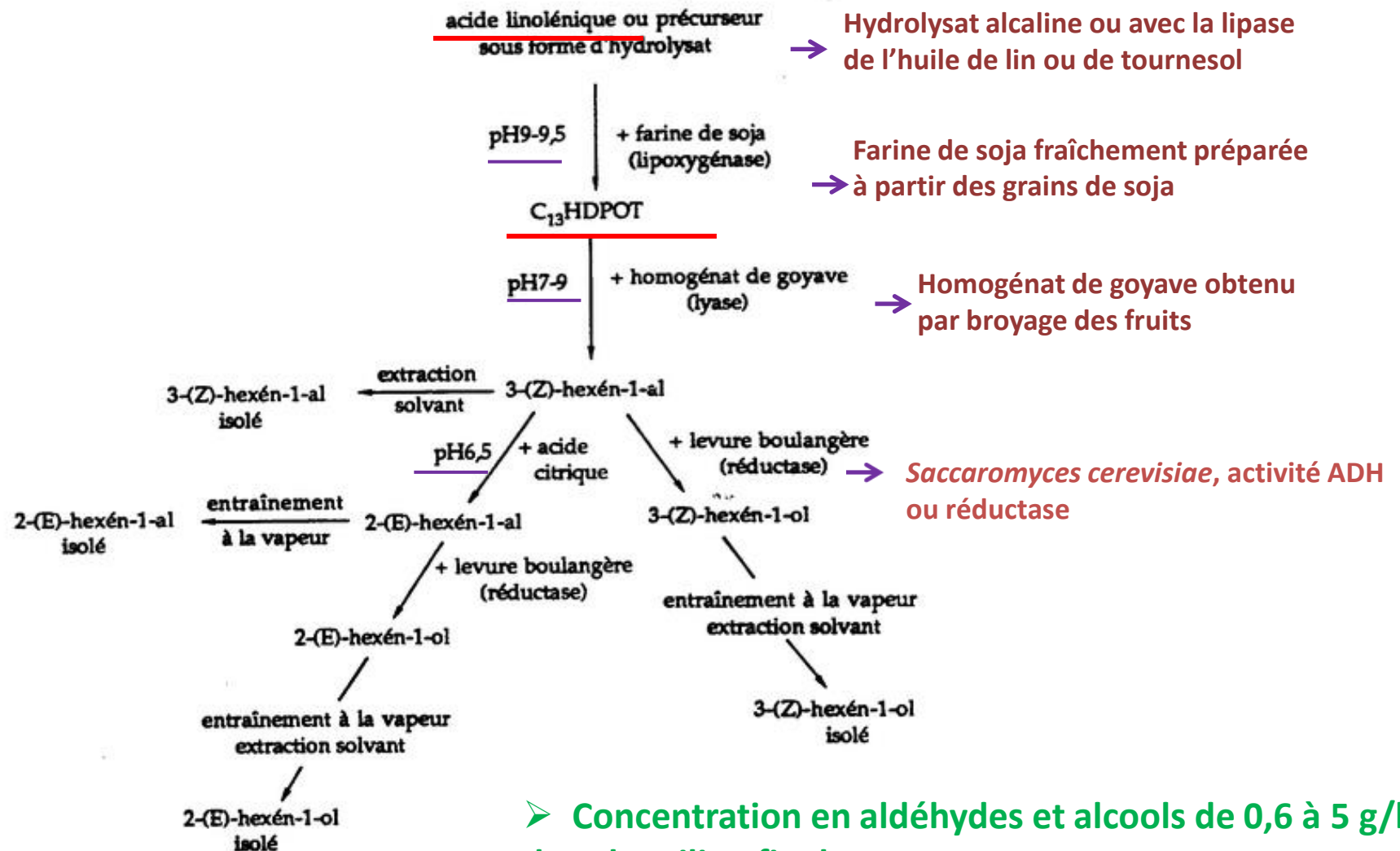


Schrader et al, 2004

HPOD=hydroperoxyde di-ène HPOT=hydroperoxyde tri-ène

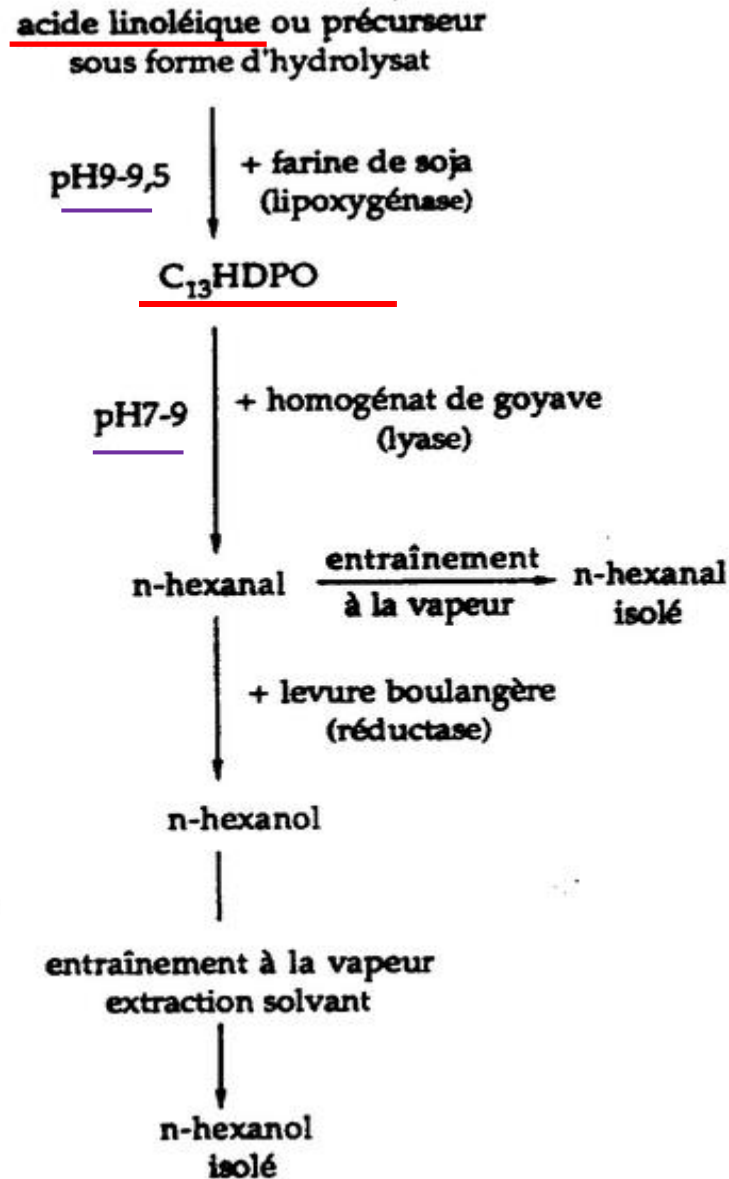
BREVET FIRMENICH (1993) : EP0597069B1

Procédé enzymatique pour la préparation de n-hexanal, 3-(Z)-hexén-1-al, ou 2-(E)-hexén-1-al, ou des alcools correspondants mettant en œuvre une lipoxygénase de soja et une lyase de goyave



➤ Concentration en aldéhydes et alcools de 0,6 à 5 g/kg dans le milieu final

BREVET FIRMENICH (1993) : EP0597069B1



Approche OGM : synthèse d'aldéhydes à 6 atomes de carbone en 2 étapes par l'utilisation de farine de soja comme source de lipoxygénase et de l'hydroperoxyde lyase (HPL) de luzerne exprimé chez E.coli (Noordermeer et al., 2002)

L'huile de tournesol hydrolysé (73% a. linoléique) ou ou l'huile de lin hydrolysé (44% a. linoléique, 20 % a.linoéique)
+farine de soja (lipoxygénase)
(pH 8,25 ; 20°C ; 120 min. ; oxygénation du milieu)



Formation de 13-HPOD et 13-HPOT



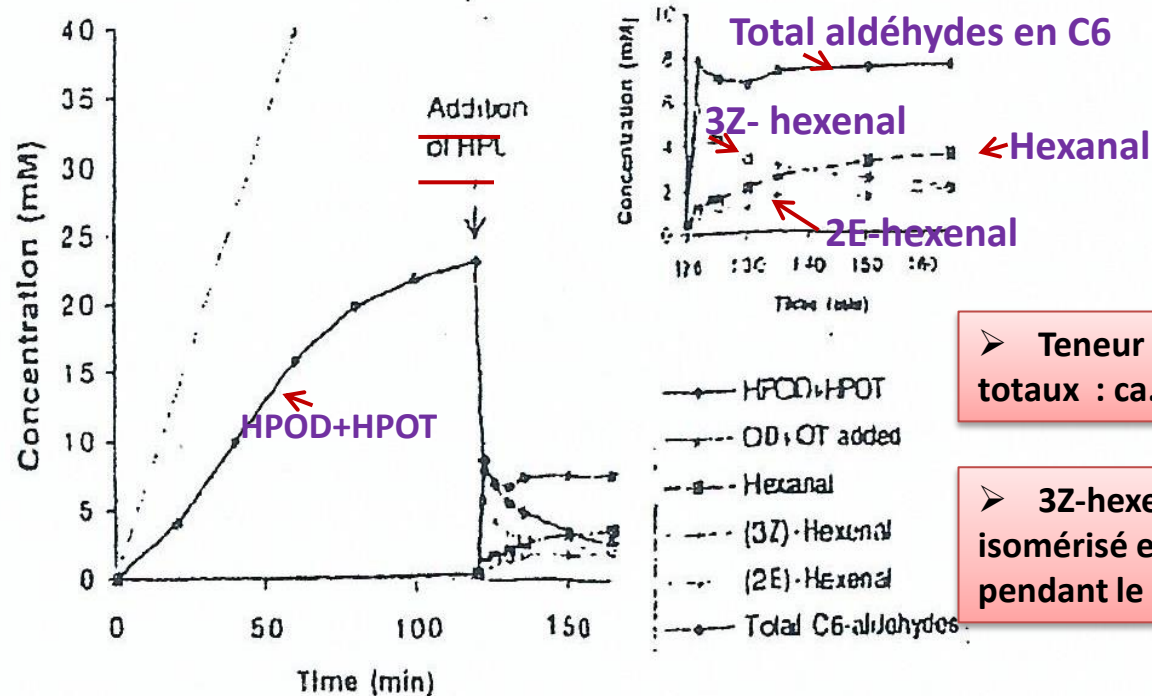
Addition du hydroperoxyde lyase (HPL) produit par *E.coli* recombinant (production par *E.coli* du HPL de luzerne)
(pH 8,25 ; 10°C ; 150 min. ; faible agitation)



Extraction des aldéhydes par l'éther diéthylique puis analyse CPG

Remarque : la dernière étape se déroule à 10 °C pour protéger l'HPL.

Approche OGM : synthèse d'aldéhydes à 6 atomes de carbone en 2 étapes par l'utilisation de farine de soja comme source de lipoxygénase et de l'hydropéroxyde lyase (HPL) de luzerne exprimé chez E.coli (Noordermeer et al., 2002)



➤ Teneur en aldéhydes totaux : ca. 750 mg/L

➤ 3Z-hexenal est lentement isomérisé en 2E-hexenal pendant le process

Figure 7. C6-Aldehyde formation in a two-step biocatalytic process with hydrolyzed linseed oil as substrate (linearly added over 1 h to a concentration of 40 mM OD + OT). HPL was added in ratios of 115 U/mmol of formed 13-HPOD and 400 U/mmol of formed 13-HPOT after the LOX reaction was finished and the oxygen flow was stopped. (Inset) Enlargement of C6-aldehyde formation after addition of HPL.

Quantité de matière pour la synthèse d'une gramme d'aldéhyde formé

Table 1. Starting Material Needed per Gram of Produced Aldehyde

| | hexanal | (3Z)- or (2E)-hexenal |
|---------------------------------------|---------|-----------------------|
| safflower or linseed oil | 8.2 g | 26 g |
| K ₂ HPO ₄ | 5.1 g | 15 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.3 g | 0.9 g |
| soybean flour | 5 g | 15 g |
| <i>E. coli</i> culture expressing HPL | 0.6 L | 1.6 L |
| molar conversion | 50% | 26% |

En bref :

- La réaction avec l'HPL étant un facteur limitant. HPL de différentes sources (tomate, melon, luzerne, poivron) a été exprimé chez *E.coli*. Les résultats ne sont pas encourageant car de faibles quantités d'aldéhydes (inf. 1 g/L) ont été obtenus.

- Les levures (*Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*) ont été modifiées pour produire l'HPL de tomate ou de banane. Un brevet a été déposé concernant une souche de *S. cerevisiae* modifiée qui exprime l'HPL de banane ainsi que la l'ADH (Häusler et al., 2001) .

- La production d'aldéhydes et d'alcools avec les levures génétiquement modifiées est supérieure à celle obtenu par *E.coli* (GMO). Toutefois les concentrations sont actuellement faibles pour envisager une production industrielle. Le facteur limitant étant souvent l'activité HPL car assez instable.

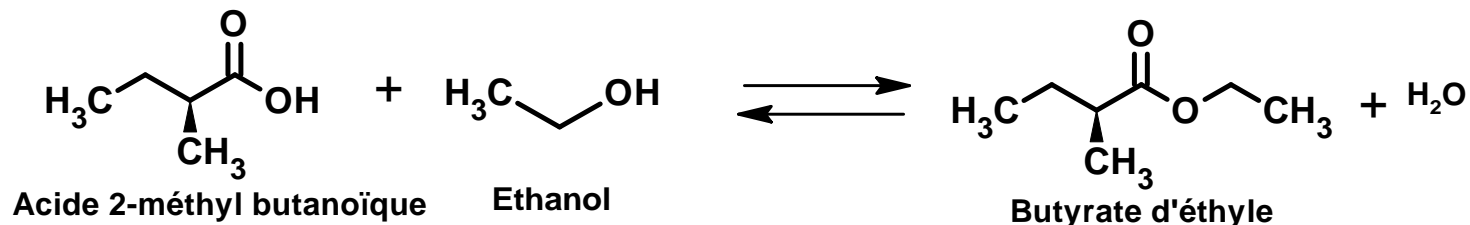
IV. PRODUCTION DES ESTERS PAR DES LIPASES

Les esters d'acides gras, les esters de terpènes sont utilisés en industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et en parfumerie

Ils sont obtenus par la synthèse chimique ou par fermentation. Toutefois le coût devient élevé dans le dernier cas.

Les lipases catalysent soit la synthèse des esters, soit l'hydrolyse des esters en fonction des conditions :

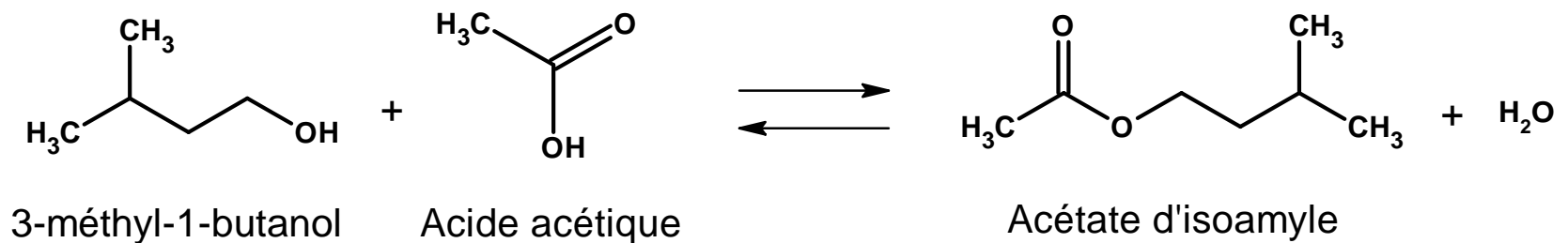
En présence d'eau l'hydrolyse des esters est favorisée, en l'absence d'eau (en milieu organique) la réaction se déplace vers la synthèse des esters



IV.1. Synthèse des esters d'acide gras

Les lipases de levure comme *Rhizomucor*, *Candida*, *Yarrowia* permettent, en milieu organique, la synthèse des esters avec des rendements très élevés (> 80 %)

Rhizomucor miehei (sous forme immobilisée) synthétise **en présence du heptane** l'acétate d'isoamyle avec un rendement de 80 % (synthèse de 150 g/L d'ester)



**Exemple : synthèse des esters par une lipase immobilisée de *Mucor* sp.
(Abbas et Comeau, 2003)**

Protocole :

**Production de lipase par *Mucor* sp.
dans un milieu de culture (pH 5,0, 25 °C)**

**Récupération de lipase extracellulaire par filtration
ou centrifugation**

**Purification de la lipase
(précipitation par ammonium sulfate , suivie
de tamisage moléculaire sur Sephadex 25)**

Immobilisation de lipase sur résine

**Synthèse des esters : 5 mL cyclohexane+acides
et alcools en concentration équimolaire (0.15 mol)+
0,3 g lipase immobilisée (35 °C, agitation)**

Immobilisation de la lipase sur la résine

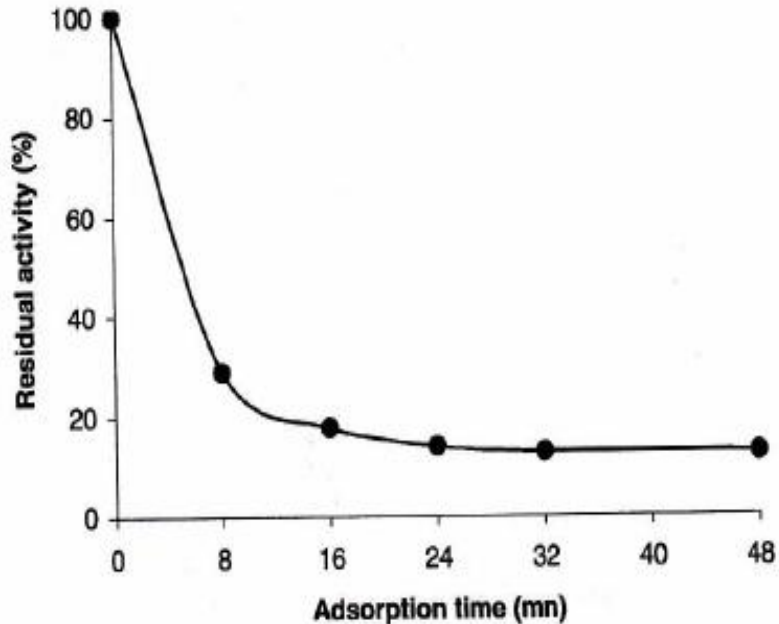
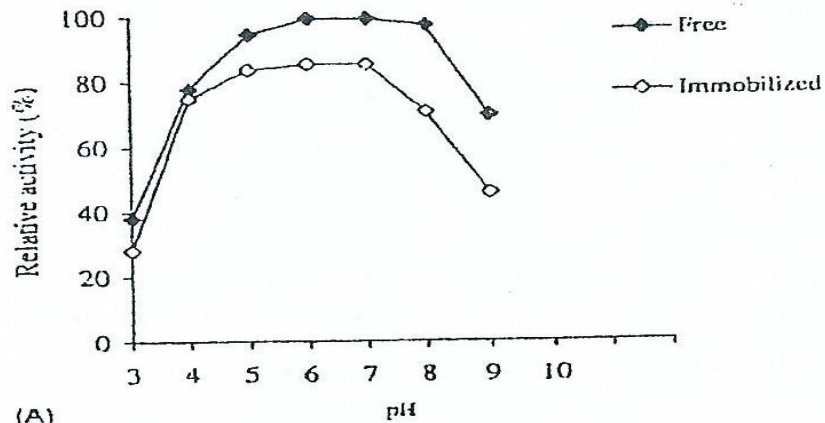


Fig. 1. Effect of adsorption time on the residual lipase activity of free *Mucor* sp. lipase during immobilization on Amberlite IRC50.

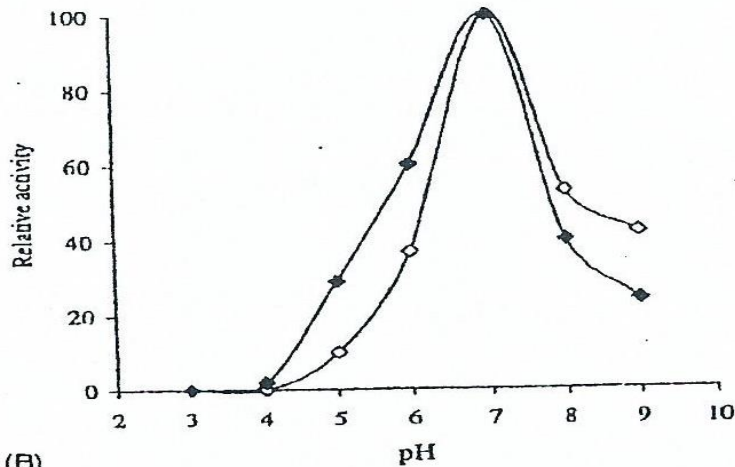
20 mL de solution d'enzyme purifiée (pH 5,0) additionnée de 10 g d'une résine d'échangeur de cation (Amberlite IRC 50) , agitation (48 min., température ambiante).

L'activité résiduelle en lipase de la solution mesurée aux différents temps

➤ Après 48 min., ca. 87 % de l'enzyme se trouve fixé sur la résine.



(A)



(B)

Fig. 2. Effect of pH on the (A) stability and (B) activity of the free and immobilized *Mucor* sp. lipase. The activity was assayed titrimetrically at various pH values as described above using glycine-HCl (pH 3.0-4.0), phosphate buffer (pH 5.0-6.0) and Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0). For pH stability, the purified enzyme was incubated at indicated pH and residual activity was measured after 1 h with the standard triacetoin assay. Activities are expressed relative to that of the most active sample.

L'enzyme montre une meilleure stabilité entre pH 5 et 7

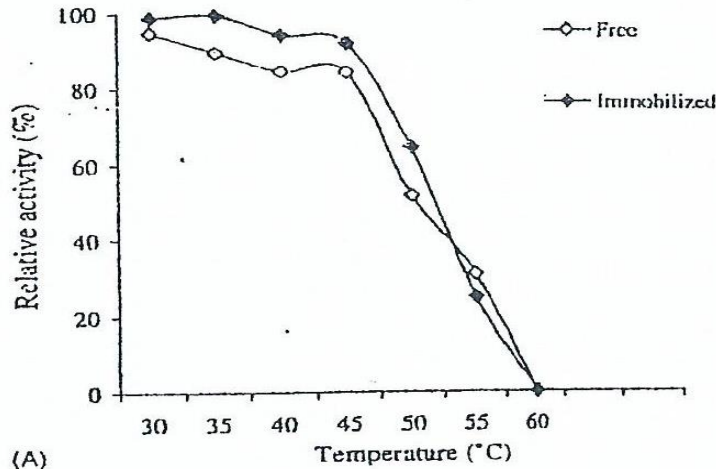
L'immobilisation d'enzyme n'améliore pas la stabilité pH de l'enzyme

Remarque : souvent l'enzyme immobilisée montre une meilleure stabilité de pH

Le pH optimum d'activité est de 7.

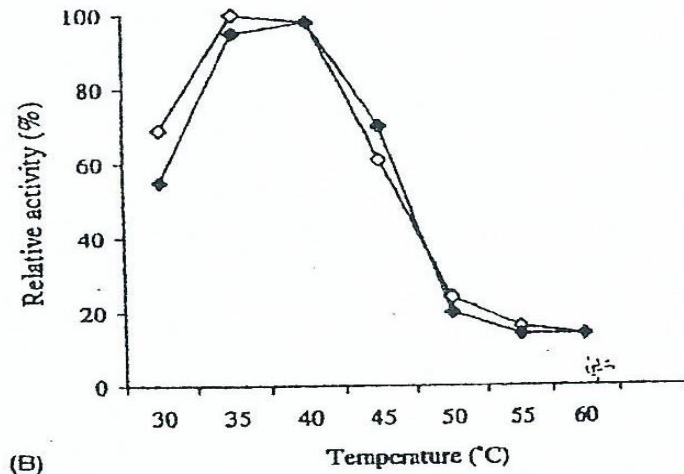
L'immobilisation d'enzyme ne modifie pas son pH optimum d'activité

Effet de l'immobilisation de l'enzyme sur la température optimale de stabilité et d'activité



L'enzyme libre ou immobilisé a été maintenu pendant 1 heure aux différentes températures, puis l'activité est mesurée

Les 2 formes d'enzyme commencent à être dénaturés aux températures supérieures à 45 °C



Pas de différence entre les 2 formes d'enzyme pour la température optimale d'activité Qui se situe entre 35-40 °C

Fig. 3. Effect of temperature on the (A) stability and (B) activity of the free and immobilized *Mucor* sp. lipase. Activity was determined at pH 7.0 using triacetin as substrate. For thermal stability, purified lipase solutions were incubated for 1 h at the indicated temperatures. Residual activity was assayed at 30°C as described above. Residual activity is expressed as percentage of the activity of the initial enzyme sample determined at 30°C under standard conditions.

Synthèse des esters au cours du temps

Table 2

Progress conversion for methyl, ethyl and allyl caproate esters

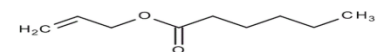
| Incubation period (h) | % conversion (ethyl caproate) | % conversion (methyl caproate) | % conversion (allyl caproate) |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 2 | 63 | 57 | 12 |
| 4 | 98 | 92 | 26 |
| 10 | 99 | 93 | 57 |
| 24 | 99 | 97 | 91 |

Le rendement de synthèse varie en fonction du substrat et du temps

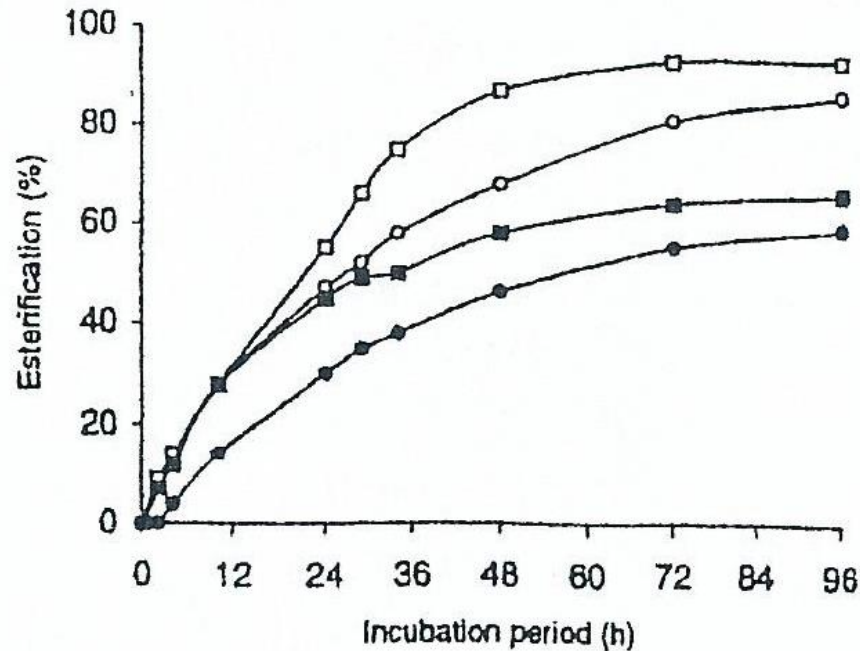
Le rendement de synthèse devient plus de 90 % pour les caproates de méthyle et d'éthyle après 4 h

Pour les caproates de méthyle et d'éthyle pratiquement 100 % de rendement après 24 h

Le rendement est le plus faible pour le caproate d'allyl(91%)



Cinétique de synthèse des esters aliphatiques

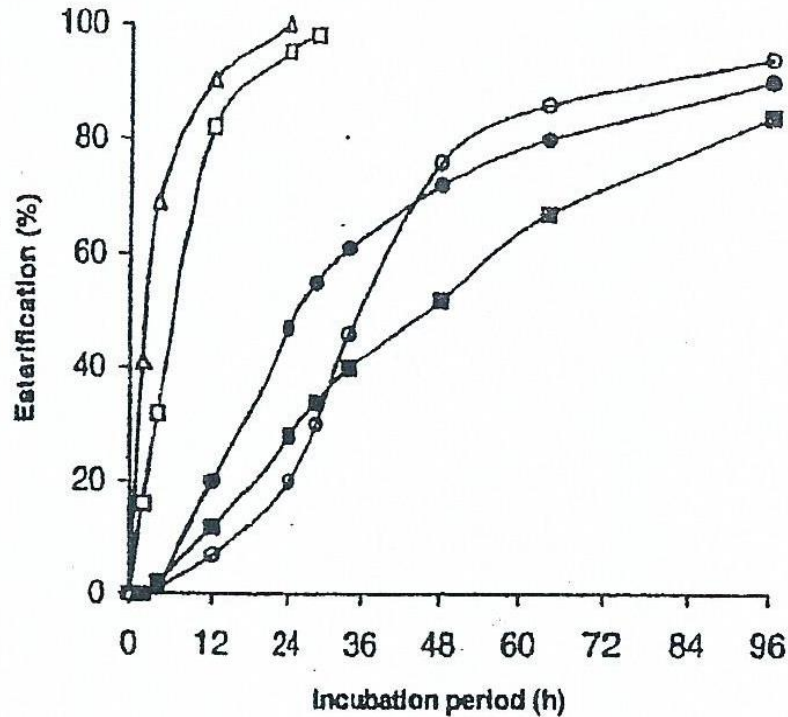


Il est important de contrôler l' a_w (activité de l'eau) dans le milieu réactionnel
Ici l' a_w a été ajusté à 0,6 en gardant l'enzyme immobilisé dans une enceinte avec une solution saturée en sel (NaBr.8H₂O)

Fig. 4. Progress curves for ethyl and methyl alcohols ester reaction conditions: substrates are in equimolar ratio (0.15 mol), $a_w = 0.6$, 5 ml of cyclohexane, 35 °C. (○) methylpropionate, (□) methyl butyrate, (●) ethyl propionate, (■) ethyl butyrate.

- Pour le même alcool, le % d'estérification augmente lorsque le nombre de carbone d'acide gras augmente
Exemple : butyrate de méthyle > propionate de méthyle

Cinétique de synthèse des esters aliphatiques



La cinétique de synthèse est variable en fonction de la nature de l'alcool et d'acide gras

Fig. 5. Progress curves for butyl and isoamyl alcohols ester reaction conditions: substrates are in equimolar ratio (0.15 mol), $a_w = 0.6$, 5 ml of cyclohexan, 35 °C. (○) butylpropionate, (□) butyl butyrate, (△) butyl caproate, (●) isoamyl propionate, (■) isoamyl butyrate.

Cinétique de synthèse des esters terpéniques

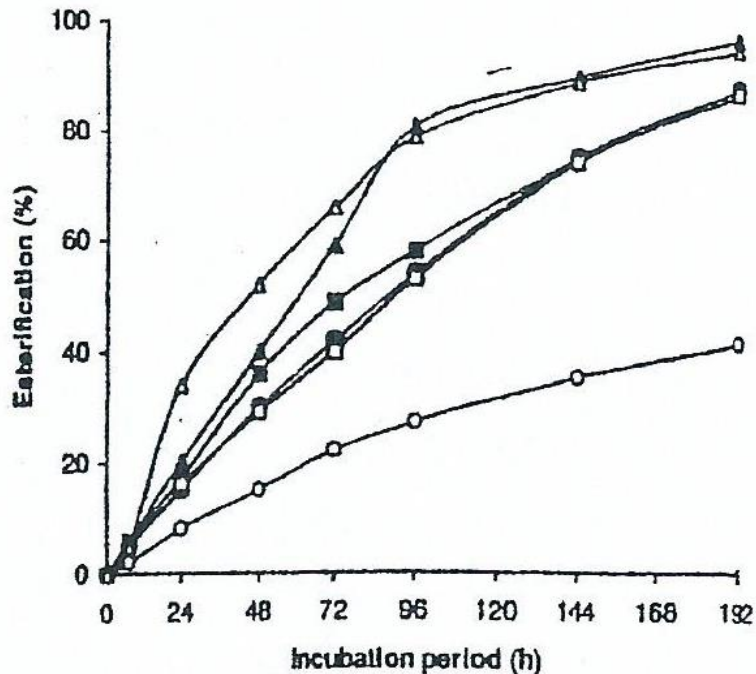


Fig. 6. Progress curves for citronyl and geranyl alcohols ester. Reaction conditions: substrates are in equimolar ratio (0.15 mol), $n_w = 0.6$, 5 ml of cyclohexan, 35°C. (○) citronyl propionate, (□) citronyl butyrate, (△) citronyl caproate, (●) geranyl propionate, (■) geranyl butyrate, (▲) geranyl caproate.

➤ Pour le même alcool, le % d'estérification augmente lorsque le nombre de carbone d'acide gras augmente



Pour la synthèse d'esters de citronellole :
acide caprique > a. buyrique > a. propionique

Pour la synthèse d'esters de géraniole :
acide caprique > a. buyrique > a. propionique

➤ En bref, la nature du donneur d'acyle, en particulier la longueur de chaîne carbonée a une influence importante sur la synthèse d'esters d'acides gras.

V. PRODUCTION DES TERPÈNES ET DÉRIVÉS DE TERPENES

Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont des COV caractéristiques des huiles essentielles.

Ils interviennent, notamment les monoterpènes dans l'arôme de nombreux fruits (abricot, raisin, agrumes, litchi...)

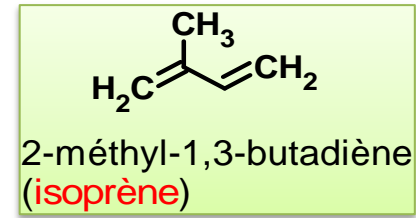
Ils sont recherchés dans les formulations aromatiques, en parfumerie

Ils participent à la pollinisation, à la défense des plantes (effet répulsif, effet antifongique), jouent le rôle de photo protecteurs dans les plantes.

Plus de 30 000 terpènes et dérivés de terpènes ont été identifiés dans la nature.

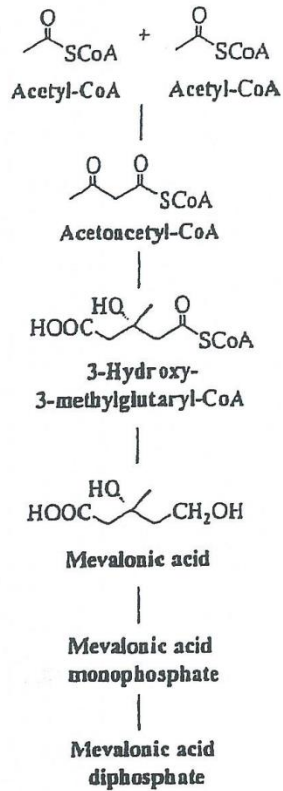
V.1. Biosynthèse des isoprénoïdes (terpènes)

Les terpènes sont constitués d'unités d'isoprène (C5) →

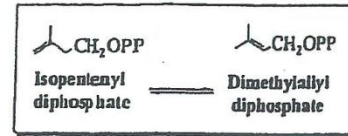
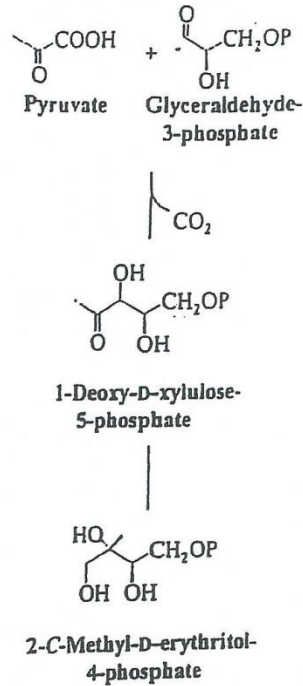


2 voies de biosynthèse de terpènes : mevalonate et pyruvate/GAP

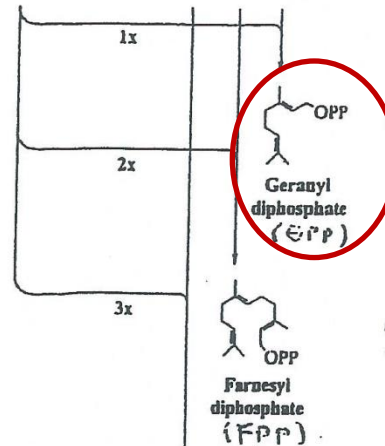
Mevalonic Acid Pathway



Pyruvate/GAP Pathway



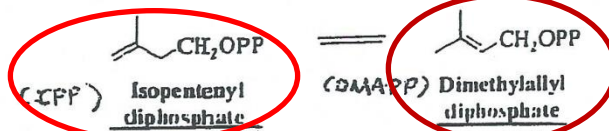
⇒ Hemiterpenes (C5)



⇒ Monoterpenes (C10)

⇒ Sesquiterpenes (C15)
 2x Squalene ⇒ Triterpenes (C30)

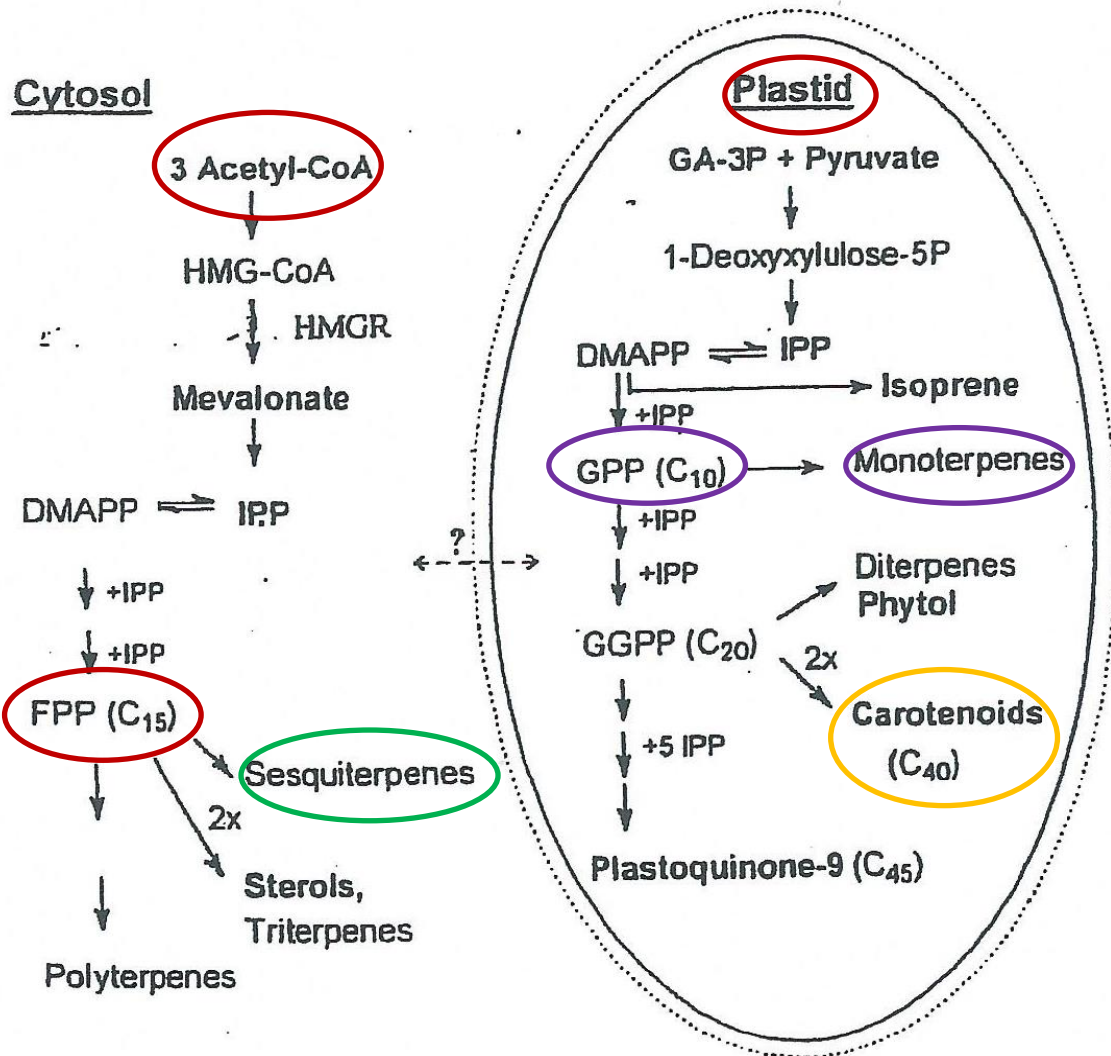
⇒ Diterpenes
 2x Phytoene ⇒ Tetraterpenes (C40)
 ⇒ Polyterpenes
 Polyprenols
 (Caroténoïdes)



in Little et Croteau, 1999

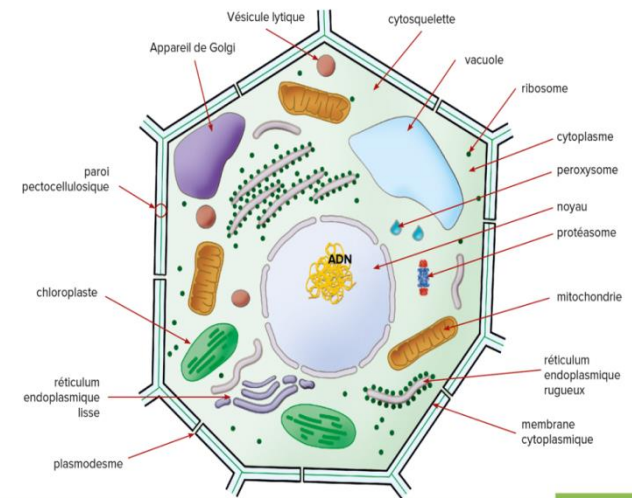
Little D.B., Croteau R.B., 1999

Compartimentation de la synthèse des terpènes dans la cellule



La cellule végétale

Les principaux constituants



- La voie mévalonate a lieu dans le cytosol et conduit aux sesquiterpènes
- La voie « pyruvate/GAP » a lieu dans les plastes et conduit aux monoterpènes

Biosynthèse du géraniol

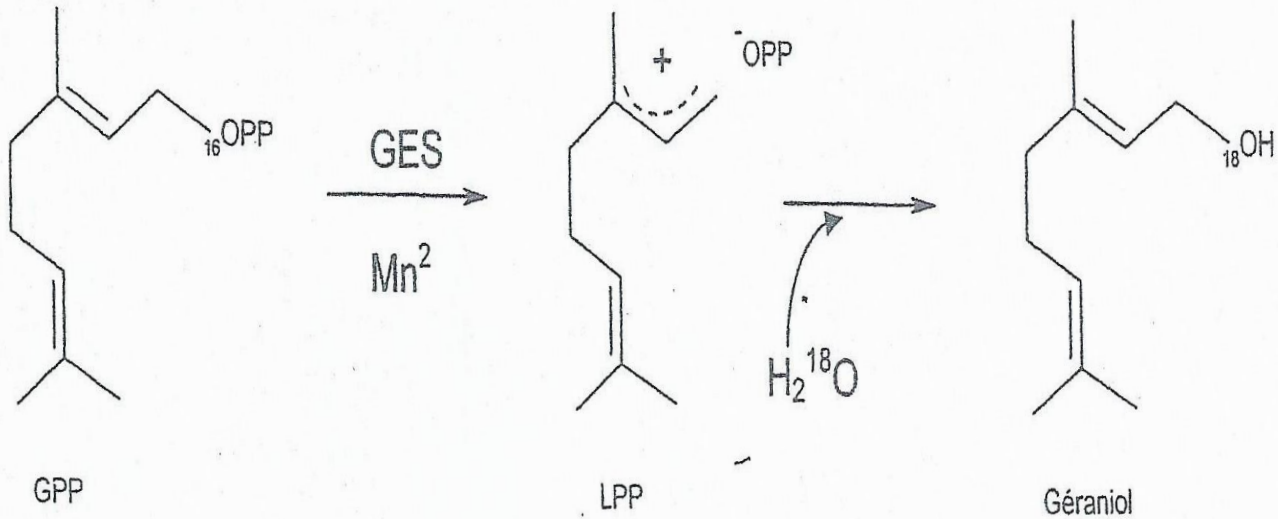


Figure 12 : Mécanisme de réaction de la géraniol synthase. Le géraniol n'est pas généré à partir du GPP par une activité phosphatase mais par l'addition d'un groupe hydroxyle sur le carbocation intermédiaire. (Iijima et al. 2004b)

Biosynthèse du linalool

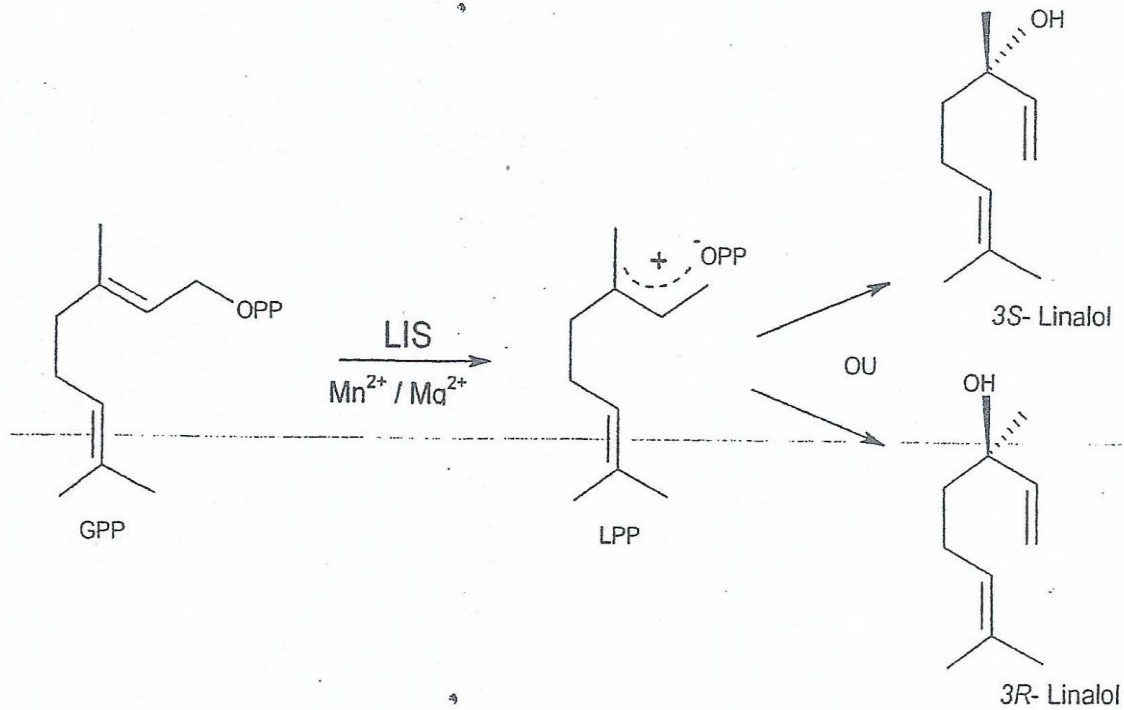
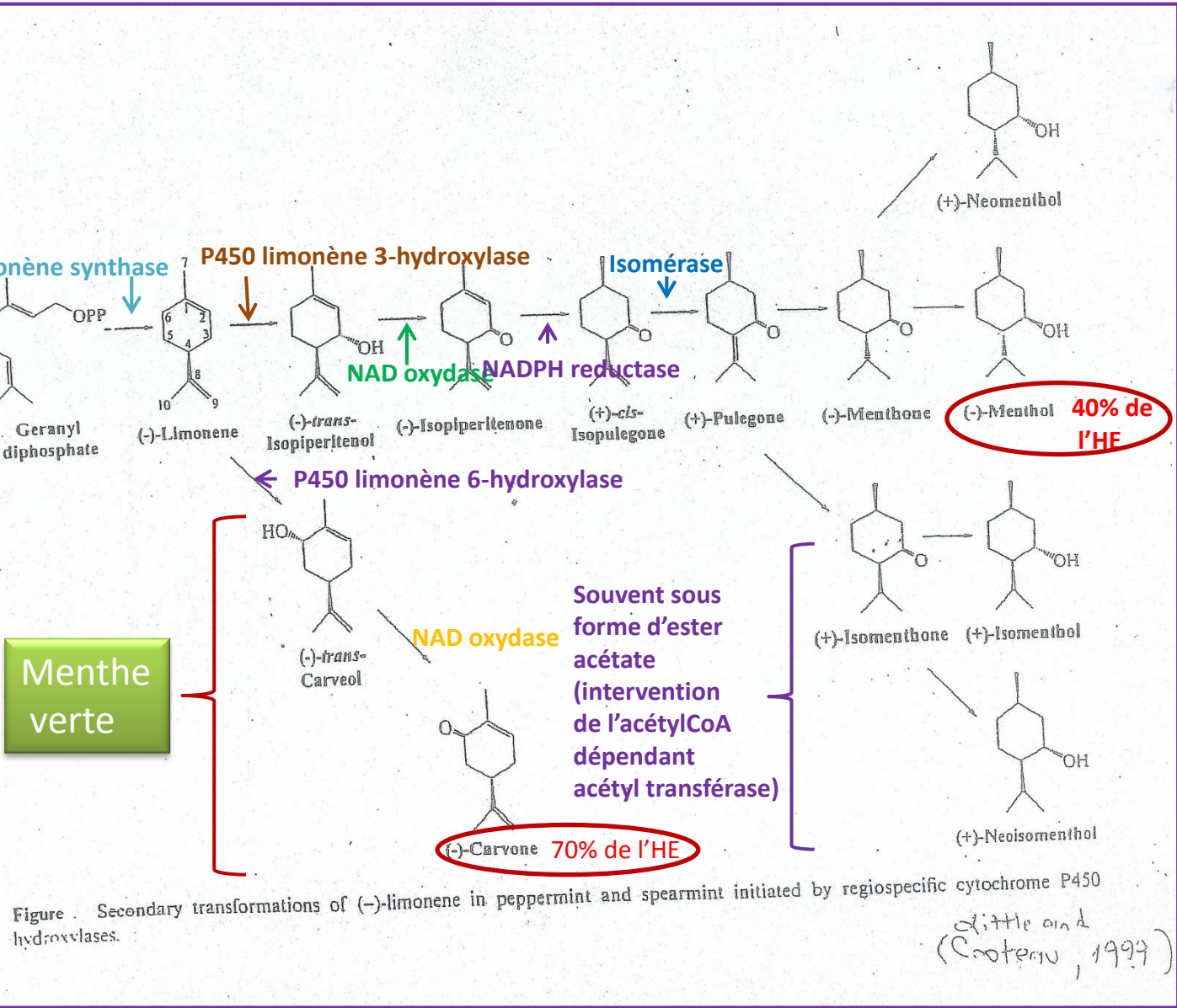


Figure 13: Mécanisme de réaction de la linalol synthase. Elle génère de manière énanti-sélective du 3S-linalol ou du 3R-linalol.

Biosynthèse du menthol et ses dérivés

Menthe poivrée

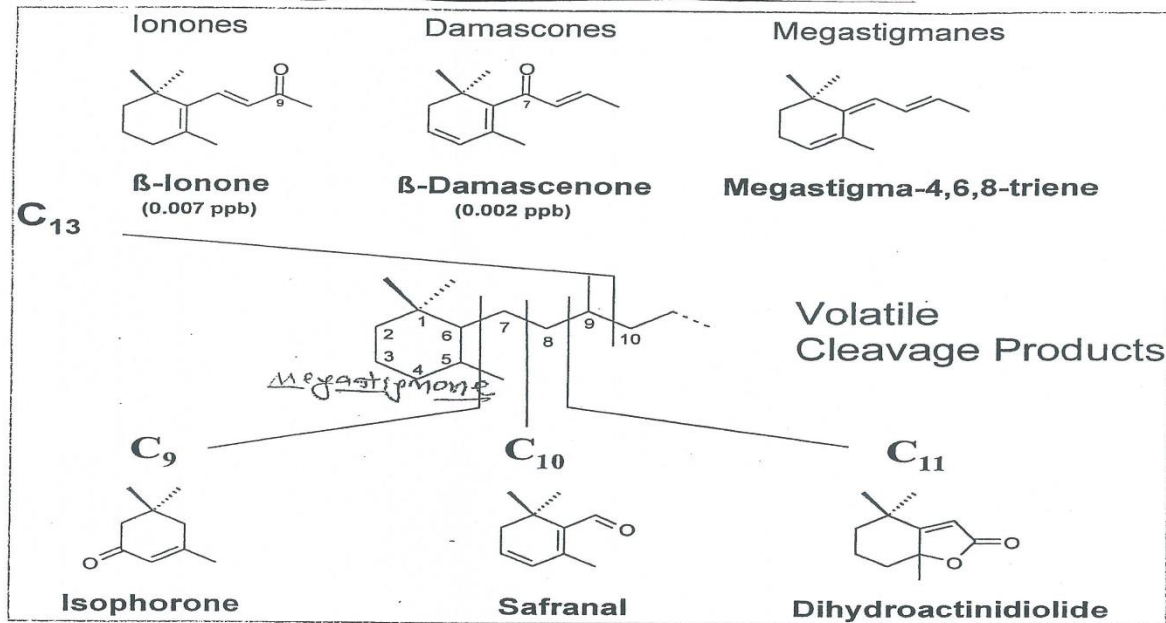


Menthe verte

➤ Plusieurs enzymes (hydroxylase, NAD+, NADH,H+ dépendant oxydo-réductases, isomérase) interviennent dans la synthèse du menthol et ses dérivés à partir du géranyl diphosphate

V.2. Biosynthèse des nor-isoprénoïdes

- Les COV nor-isoprénoïdiques dans le règne végétal sont issus du clivage des caroténoïdes. Ils renferment de 9 à 13 atomes de carbone
- Plusieurs centaines de composés nor-isoprénoïdiques ont été détectés. Certains comme les β -ionone, β -damascenone sont très odorants et recherchés



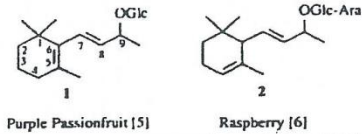
Non-volatile cleavage products:

- Apocarotenoids (> C₂₀)
- Retinal (C₂₀)
- Abscisic acid (C₁₅)

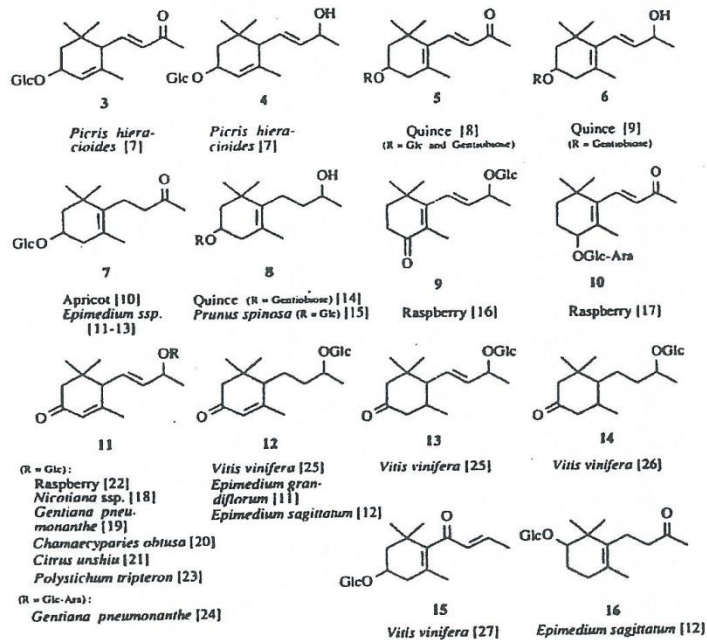
in Winterhalter et Rouseff, 2000

Norisoprénoïdes dans les végétaux

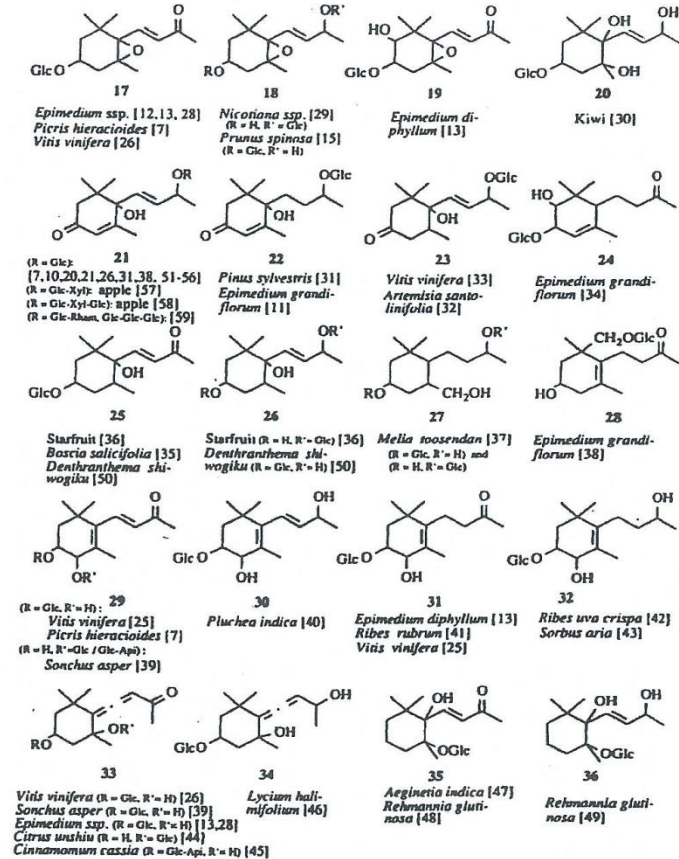
(i) mono-oxygenated conjugates:



(ii) di-oxygenated conjugates:



(iii) higher-oxygenated conjugates:



Review: Winterhalter & Schreier, *Flav. Frag. J.* **9**, 281-287 (1994)

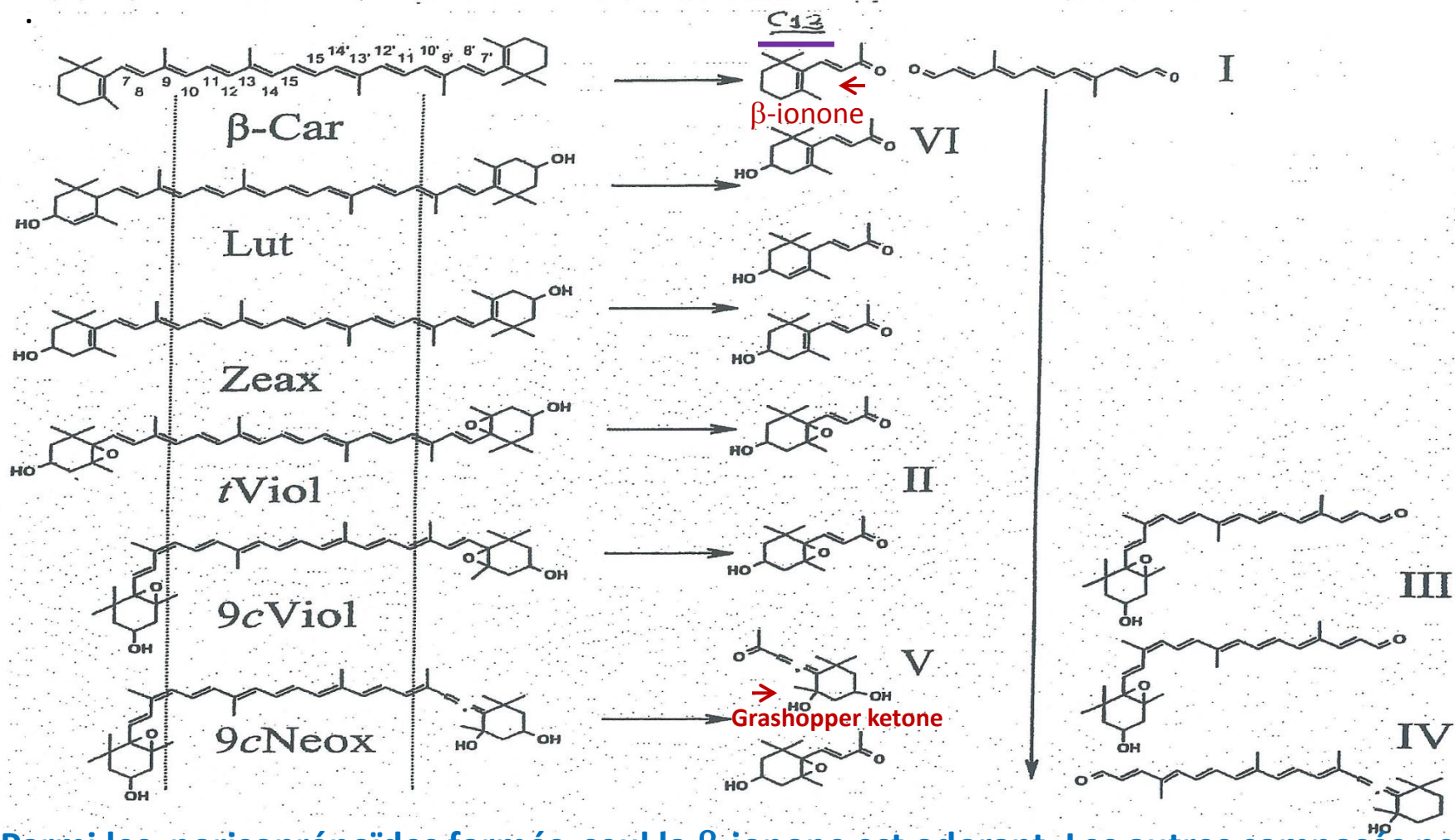
Les norsioprénoïdes sont générés par le clivage oxydatif des caroténoïdes:

Ce clivage a lieu :

- **par photo-oxydation**
- **par traitement thermique en présence d'oxygène**
- **par co-oxydation (couplage réaction enzymatique et chimique (voir plus loin))**
- **par carotène dioxygénase ou caroten cleavage dioxygenase (CCD)**

Clivage symétrique des caroténoïdes par une carotène-dioxygénase

En 2001, il a été montré qu'une carotène-dioxygénase d'*Arabidopsis thaliana* exprimé chez *E.Coli* était capable de cliver symétriquement les caroténoïdes en introduisant l'oxygène moléculaire au niveau carbone 9,10[9',10'], ce qui conduit aux norisoprénoïdes à 13 atomes de carbone (Schwartz et al, 2001)

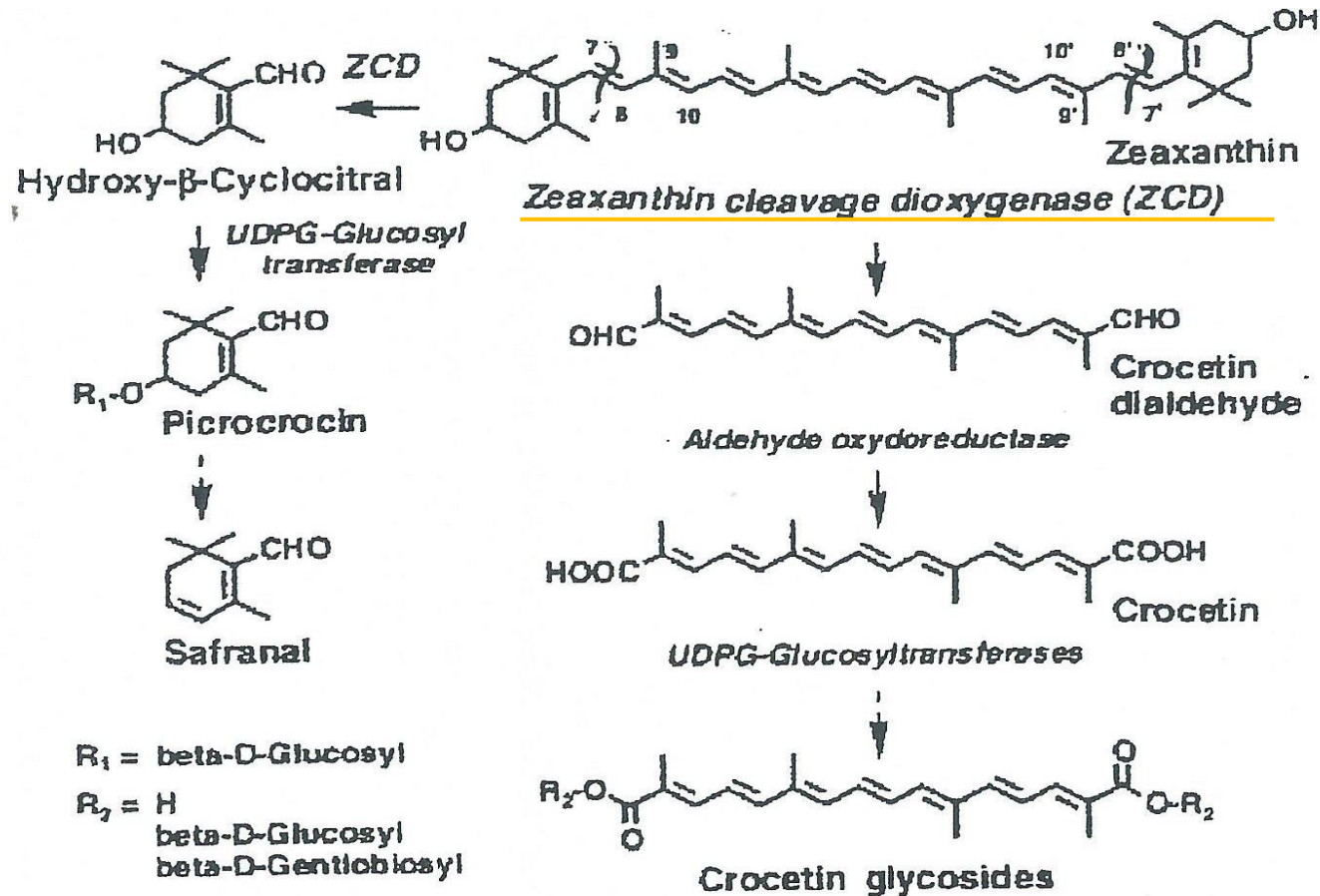


➤ Parmi les norisoprénoïdes formés, seul la β -ionone est odorant. Les autres composés peuvent donner naissance aux composés odorants par des réactions de réarrangement acido-catalysé

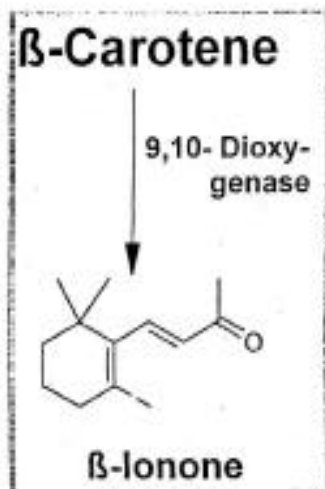
La carotène-dioxygénase (CD) a été détectée dans plusieurs végétaux/fruits : raisin, melon, abricot, safran...

Dans le cas du raisin, du melon, de l'abricot il s'agit de 9,10[9',10'] CD.

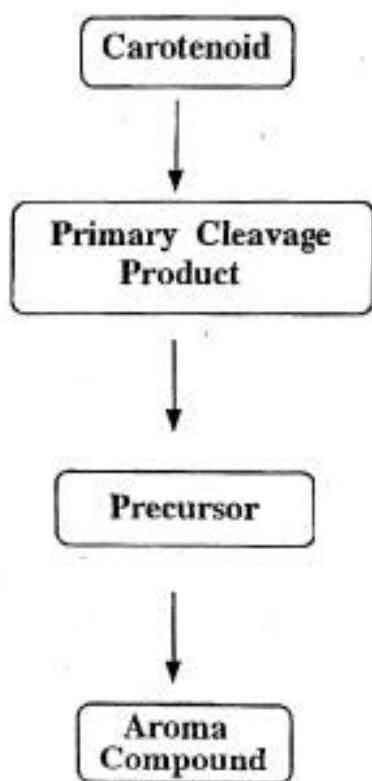
Or dans le cas du safran, une autre CD, soit zeaxanthin CD : 7,8 et 7',8' ZCD a été détecté



Formation de composés d'arôme à partir des caroténoïdes (Winterhalter et Roussef, 2001)



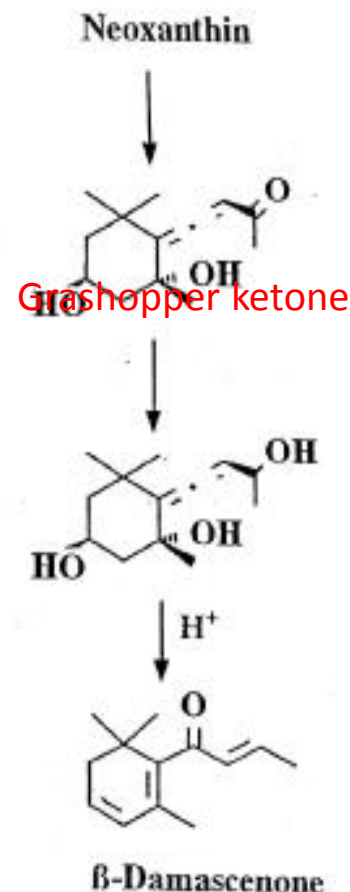
Usually multiple (!!)
enzymatic
and non-enzymatic
steps



STEP I: Oxidative cleavage

STEP II: Enzymatic (reductase)

STEP III: Acid catalyzed conversions

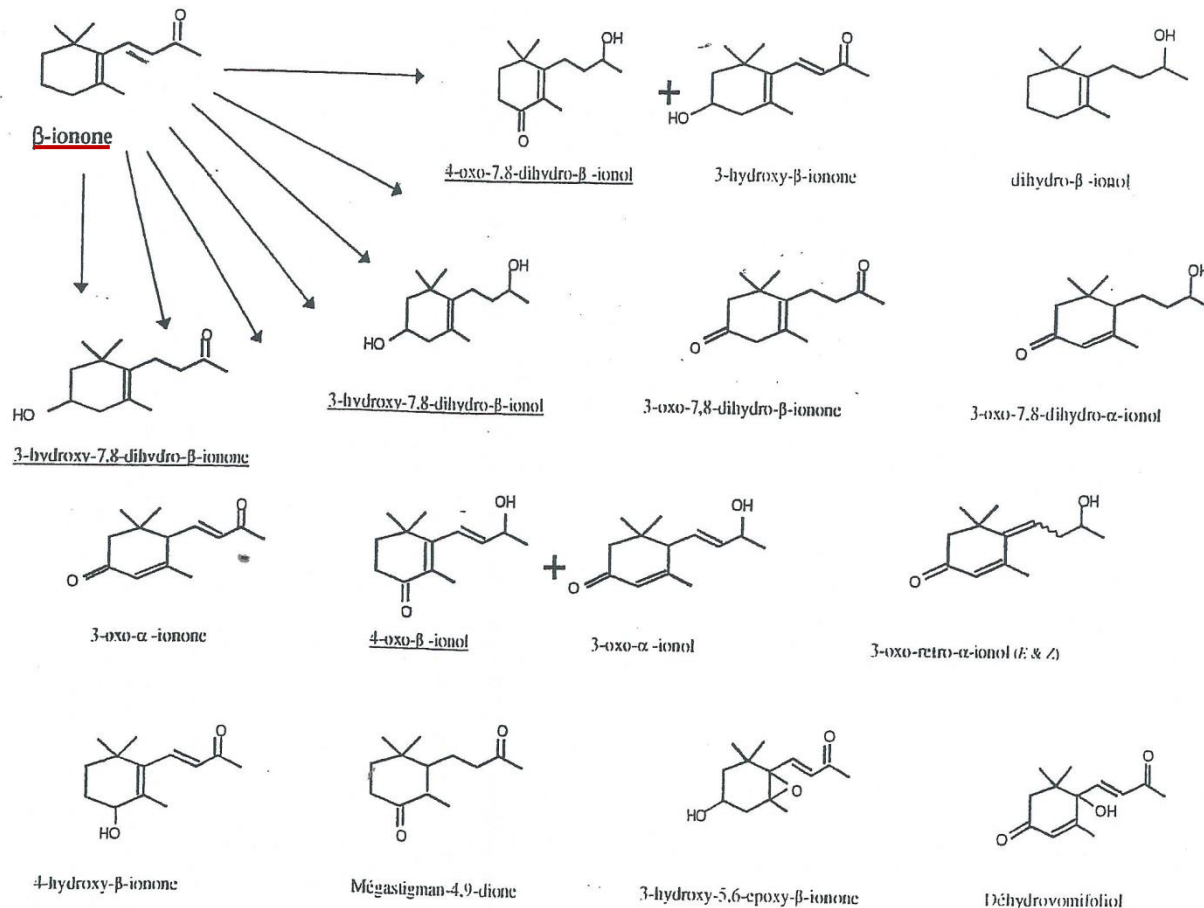


- La plupart des norisoprénoïdes issus de clivage de caroténoïdes ne sont pas odorants, sauf la β-ionone. Ils subissent ensuite des transformations enzymatique et chimique ou chimique pour conduire aux CA. L'exemple ici est le grashopper ketone issu du clivage oxydatif de neoxanthin. Il est d'abord réduit par une réductase (ADH). Le produit formé subit un réarrangement acido-catalysée pour former la β-damascenone

Métabolisme de la β -ionone par des cultures cellulaires de raisin (Wirth, 2001)

Les produits de clivage des caroténoïdes, comme la β -ionone subissent de nombreux transformations enzymatiques via les hydroxylase, oxydo-réductase, isomérase dans les plantes. Aussi plus d'une centaine norisoprénoïdes y sont rencontrés.

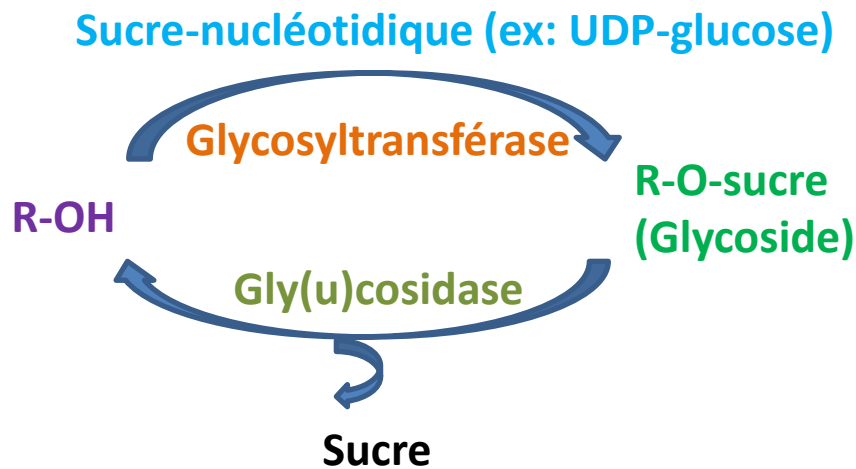
Un exemple : la β -ionone introduit dans une culture cellulaire de raisin est transformé en un dizaine de composés



V.3. La glycosylation et les glycosides

Plusieurs métabolites secondaires (terpènes, flavonoïdes, phénols....) sont stockés dans les végétaux sous forme de glycosides ou hétérosides : sucre(s)-o-aglycone.

Les glycosides sont synthétisés par les glycosyltransférases (GTFs). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupe glycosyle à un groupe nucléophile, souvent un alcool. Le sucre doit être sous forme activée, soit « sucre-nucléotidique » pour agir comme donneur de glycosyl. Cette synthèse conduit aux O,N,S ou C-glycosides. Les oligosaccharides, les polysaccharides (ex: cellulose), les glycosides sont synthétisés par ces enzymes. Les GTFs sont une famille multigénique et peuvent présenter une affinité pour l'alcool et le sucre.



La partie non sucre d'un glycoside est appelé « aglycone » ou génine en français

Les glycosides sont hydrolysés par les glycosidases, ce qui conduit à la libération de l'alcool et du sucre

- **La glycosylation augmente la solubilité des métabolites secondaires, donc facilité leur transport dans la cellule : c'est l'exemple de d-neomenthyle-glycoside dans la menthe. Après sa synthèse dans les feuilles, il est acheminé dans les racines pour y être stocké.**
- **Les glycosides interviennent dans la défense des plantes contre les parasites, contre les attaques microbiennes : l'hydrolyse des glycosides comme suite à la déstructuration de la cellule libère des COV (effets répulsif, fongicide, bactéricide)**
- **Les glycosides sont aussi une forme de protection de la cellule contre la toxicité de certains métabolites secondaires, comme les terpènes.**

➤ **Les glycosides sont précurseurs d'arôme car sous cette forme les CA sont inodores**

De nombreux composés d'arôme sont présents sous forme glycosides dans plus de 200 plantes appartenant à 50 familles botaniques.

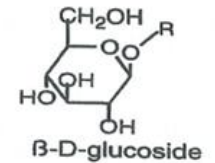
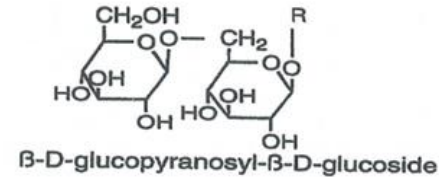
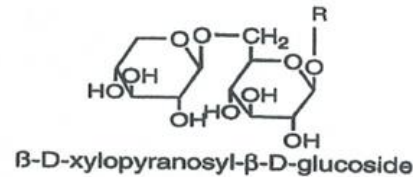
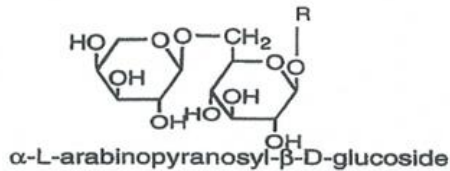
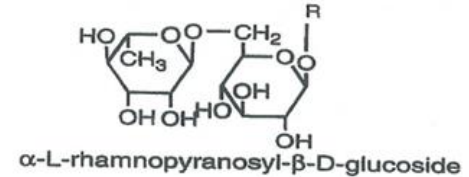
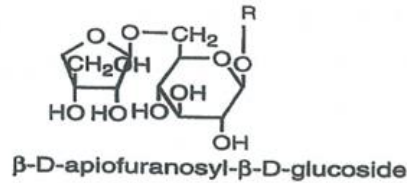
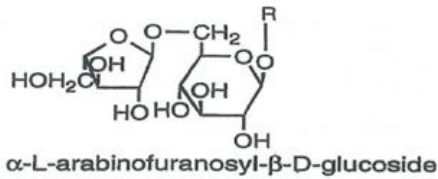
Le CA (ou aglycone ici) est toujours lié à une molécule de β -D-glucose :

Si le glycoside ne comporte que le glucose et l'aglycone, il s'agit de β -D-glucoside ou monoglucoside (ex: géranyl- β -D-glucoside)

Si le glycoside comporte 2 sucres, il s'agit de diglycosides (ex : géranyl- α -L-arabinofuranosyl- β -D-glucoside)

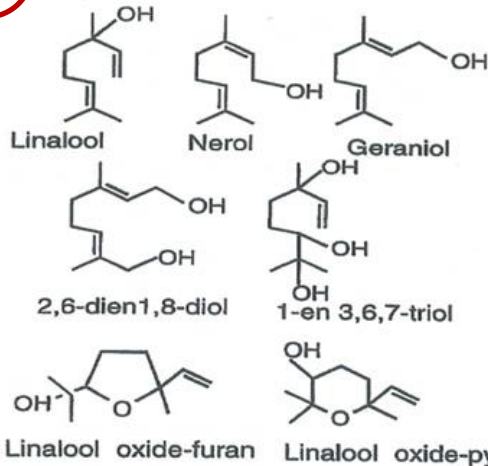
Aucun triglycoside portant comme aglycone de nature composés volatil n'a été détecté dans les plantes

Structure des glycosides, précurseurs d'arôme

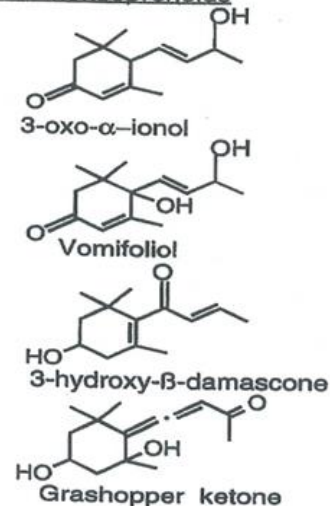


R=

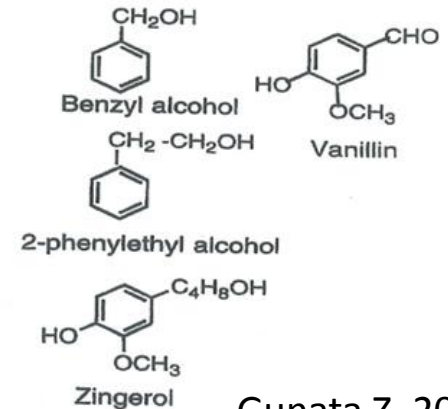
Monoterpenes (C₁₀)



C₁₃-norisoprenoids



Shikimates



Gunata Z, 2003

Le R correspond à l'aglycone. Comme aglycone, on trouve souvent des monoterpènes, les norisoprénoides à 13 atomes de carbone ainsi que les dérivés shikimiques (phénols)

Plus de 200 aglycones ont été détectés, seuls quelques aglycones sont présentés sur la figure

Les fruits sont souvent plus riches (3 à 5 fois) pour les mêmes composés volatils sous forme de précurseurs glycosylés que sous forme libre

| | Composés volatils libres (1) | (Glycosides)* Composés volatils liés (2) (aux sucres) | (2)/(1) |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|---------|
| Abricot cv Rouge du Roussillon | 1,5 | 7,6 | 5,1 |
| Précoce de Tyrinthe | 0,6 | 3,2 | 5,3 |
| Mangue non greffée Sénégal | 1,4 | 5,3 | 3,8 |
| Fruit de la Passion Zimbabwe | 6,5 | 21,6 | 3,3 |
| Muscat d'Alexandrie | 1,1 | 5,6 | 5,1 |
| Muscat de Hambourg | 1,4 | 6,3 | 4,5 |
| Riesling | 0,28 | 0,88 | 3,1 |
| Canada Muscat | 0,96 | 4,1 | 4,3 |

* Aglycones analysés souvent après libération enzymatique.

V.4. Production de terpènes et dérivés de terpènes

V.4.1. Hydrolyse des glycosides

L'hydrolyse acide ou enzymatique des glycosides permet de libérer les CA.

Hydrolyse acide :

L'hydrolyse acide, au pH normal du produit, peut intervenir au cours du stockage. Cette hydrolyse est accélérée lorsque le pH est bas et la température est élevée.

Lors de traitements thermiques (pasteurisation, concentration des jus de fruits) l'hydrolyse acide des glycosides est accélérée. **Le taux d'hydrolyse est dépendant de la température, de la durée du traitement thermique, du pH ainsi que la nature de glycoside.**

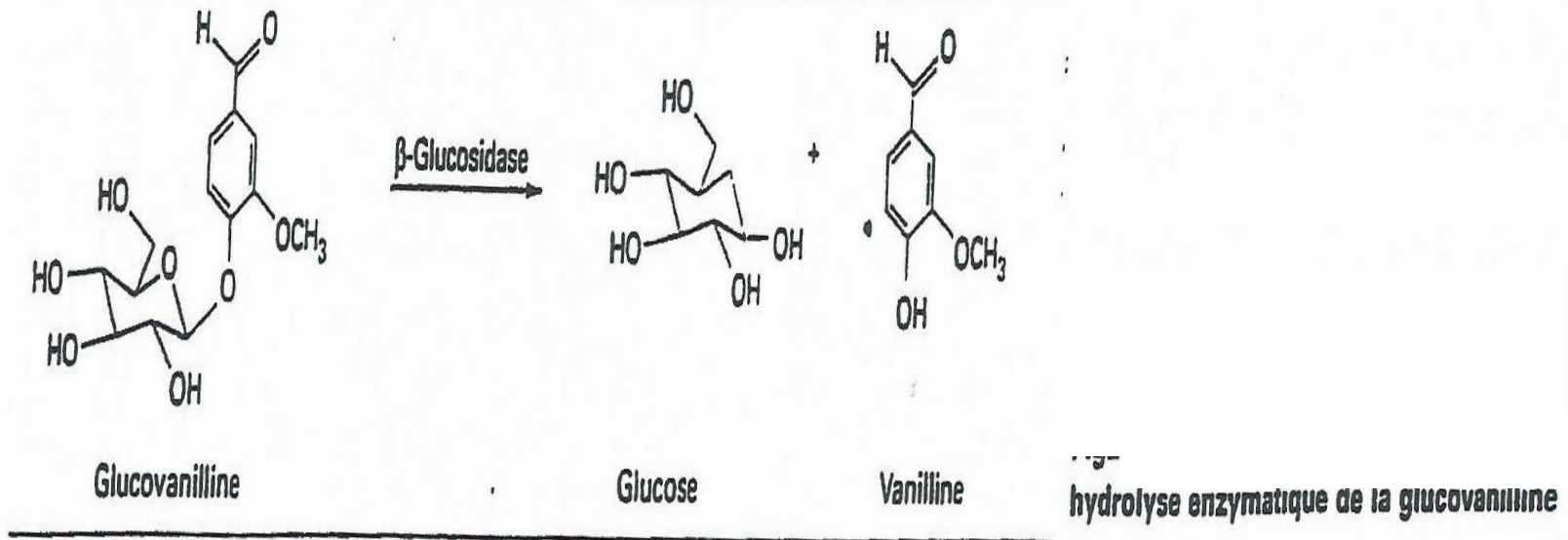
En hydrolyse acide les glycosides d'alcool tertiaire comme le linalool sont hydrolysés plus rapidement que ceux d'alcool primaire comme le géranol. En hydrolyse enzymatique, le phénomène contraire est observé.

En hydrolyse acide, les aglycones libérés peuvent subir ensuite des modifications, ce qui peut modifier les notes aromatiques, contrairement à l'hydrolyse enzymatique

Hydrolyse enzymatique :

Il est établi depuis des années 50 que l'hydrolyse de monoglucosides fait intervenir une β -glucosidase. C'est le cas de l'hydrolyse de la glucovanilline (β -D-glucoside de vanilline). Dans les gousses de vanille, pratiquement la totalité de vanilline est stocké sous forme de glucovanilline. Lors de traitement des gousses, l'enzyme et le substrat se mettent en contact, ce qui conduit à la libération de la vanilline.

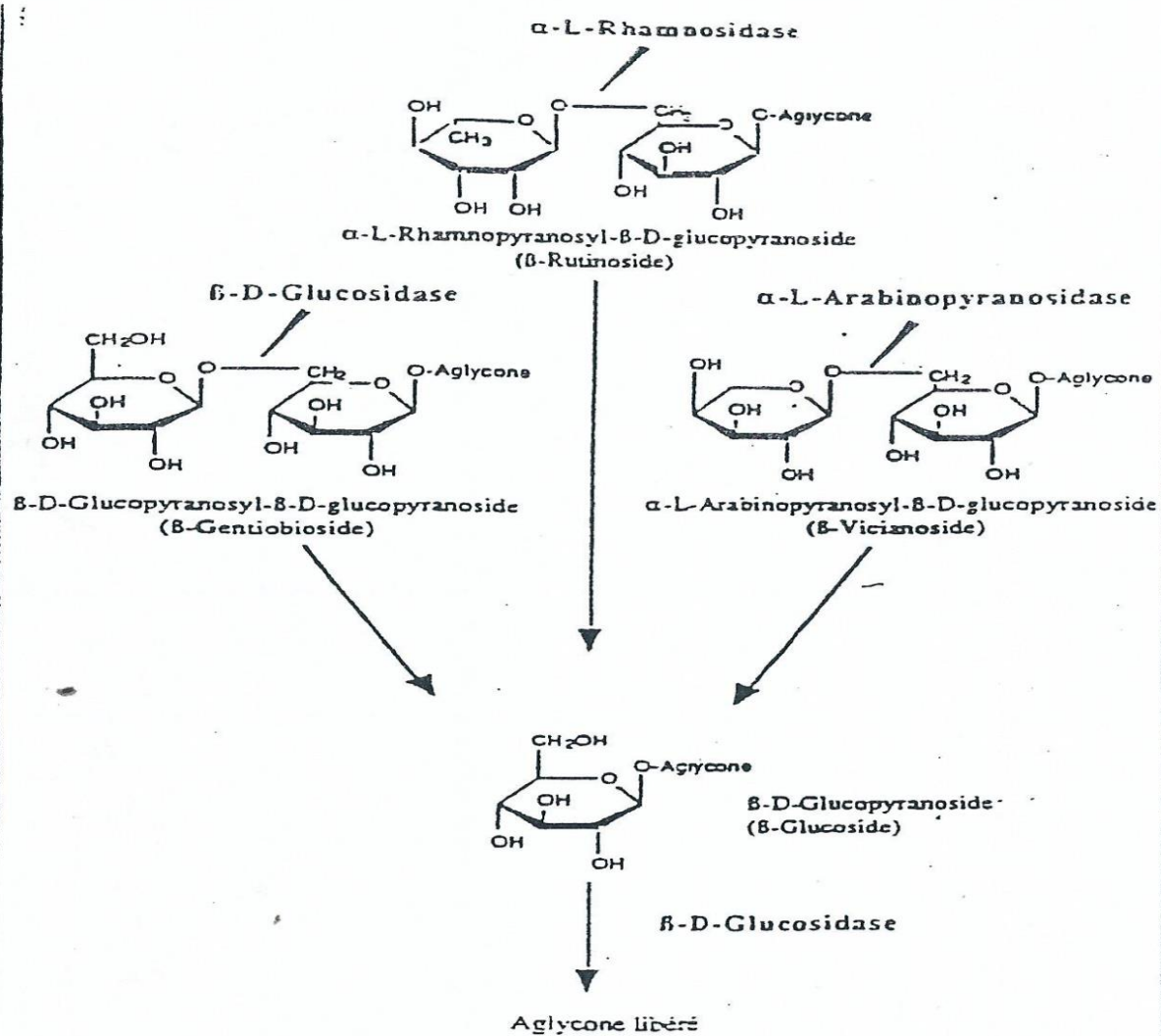
Hydrolyse de glucovanilline par la β -glucosidase : cas de gousses de vanille



L'arôme de gousses de vanille préparée (curing en anglais) est plus complexe que celui de la vanilline de synthèse. Des centaines de COV, plupart de type « phénol volatils », présent sous forme glycosylée dans les gousses vertes participent à la complexité de l'arôme des gousses préparées.

Cas des diglycosides

L'hydrolyse enzymatique des diglycosides s'effectue en 2 étapes : dans la 1^{ère} étape une enzyme qui porte le nom du sucre terminal (ex : rhamnose/rhamnosidase) hydrolyse la liaison disaccharide. Le β -D-glucoside libéré est hydrolysé par une β -glucosidase en 2^{ème} étape, ce qui conduit à la libération de l'aglycone (hydrolyse séquentielle)



Les enzymes impliqués dans l'hydrolyse des glycosides sont présents dans les plantes.

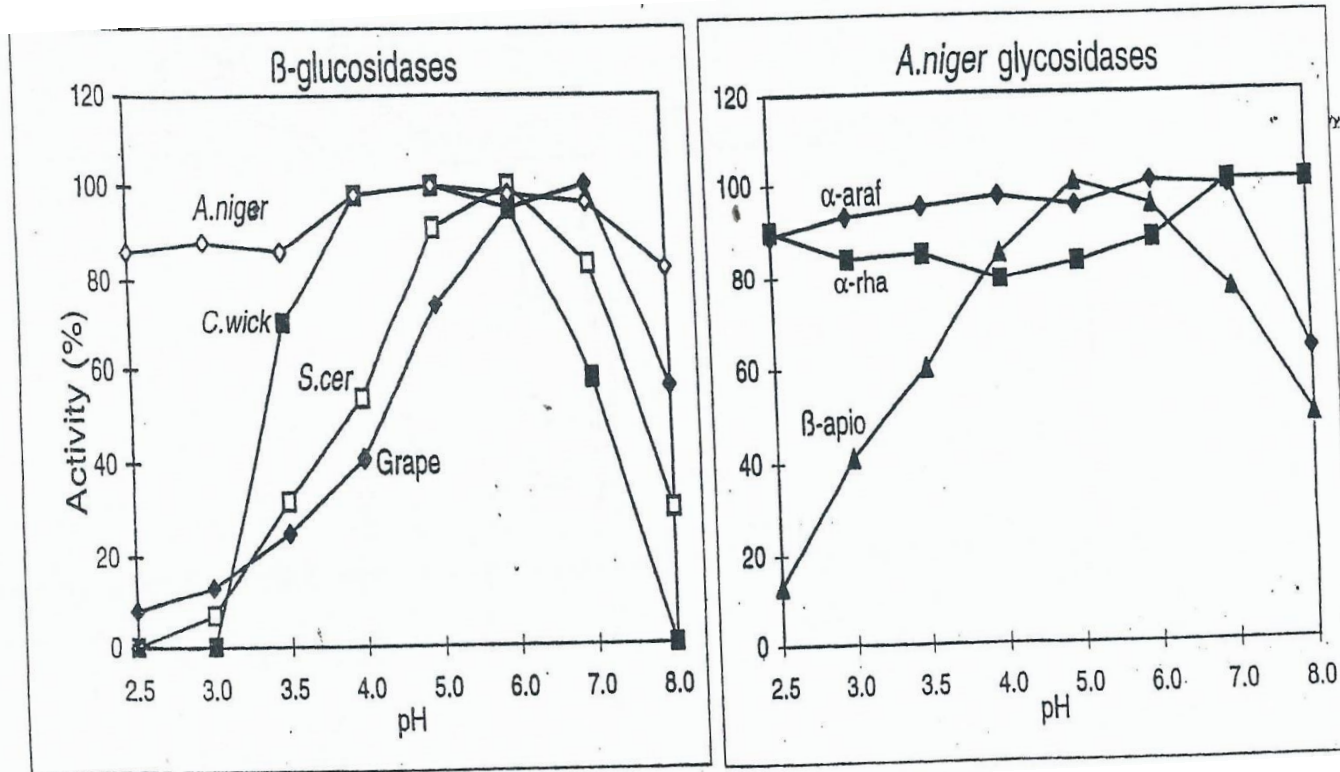
Par contre ils sont souvent peu efficaces, car inactivés rapidement suite à la désintégration des cellules, ou faiblement actifs.

Une exception : β -glucosidase de gousse de vanille

Les micro-organismes, comme les bactéries, les levures et les champignons filamenteux peuvent produire les enzymes impliqués dans l'hydrolyse des glycosides.

Glycosidases microbiennes présentent 2 intérêts majeurs de pour l'hydrolyse des glycosides :

1. Bonne stabilité de la plupart des glycosidases microbiennes au pH acide des jus de fruits et des vins



2. Certaines préparations enzymatiques d'origine en particulier *Aspergillus niger* peuvent être riches en activités glycosidases

Ex: AR 2000 et Novoferm 12 (voir le tableau)

Table 1-Glycosidase activities (nkat/mg product) in some enzyme preparations

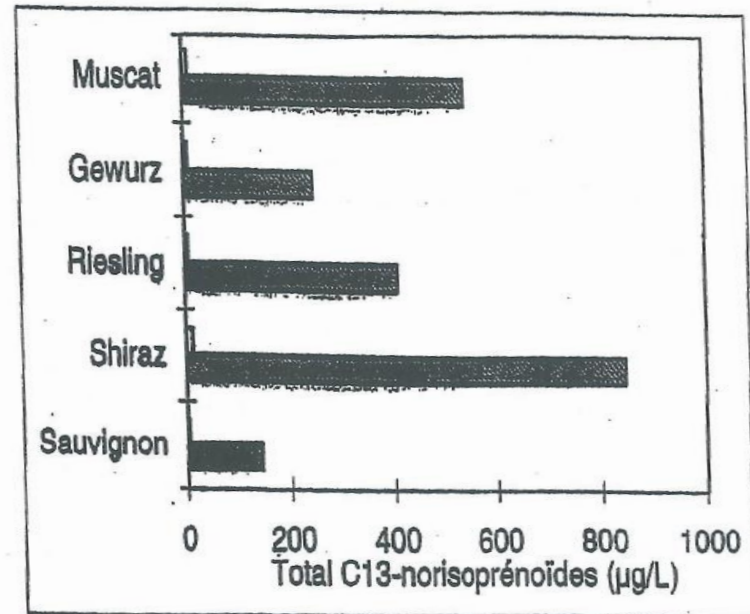
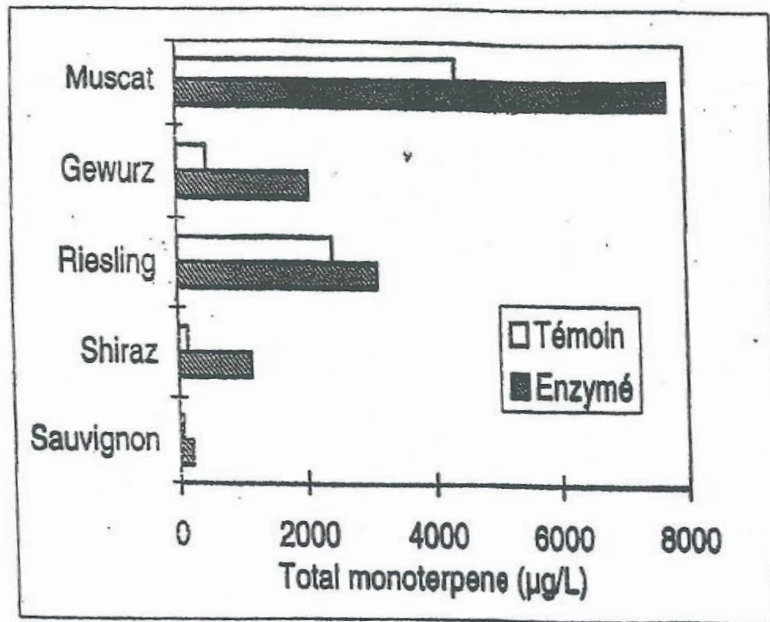
| | β -apiosidase | β -glucosidase | α -arabinofuranosidase | α -rhamnosidase |
|---------------|---------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------|
| Cellulase A | - | 6.1 | 0.6 | 0.007 |
| Hemicellulase | - | 7.1 | 7.0 | 0.9 |
| Pectinol VR | - | 0.2 | 0.1 | - |
| Rohament CW | - | 3.3 | 0.7 | 0.4 |
| Pectinol D5S | - | 0.5 | 0.7 | - |
| Pektolase 3PA | 0.3 | 1.5 | 3.8 | 0.04 |
| Ultrazym 100 | 0.03 | 0.5 | 0.1 | - |
| Pectinase 263 | 0.2 | 7.2 | 1.4 | 0.3 |
| AR 2000 | 1.08 | 5.7 | 14.7 | 0.3 |
| Novoferm 12 | 0.15 | 8.4 | 0.5 | 0.05 |

Commercial source : Gist Brocades (CellulaseA, Hemicellulase, Pectinase 263; AR 2000), Röhm (Pectinol VR, Rohament CW, Pectinol D5S), Ciba-Geigy (Ultrazym 100), Grindsted (Pektolase 3PA), Novo (Novoferm 12).

- : undetected.

L'utilisation des préparations enzymatiques riches en activités glycosidases permet d'enrichir rapidement (en quelques jours) le vin en CA (voir la figure ci-dessous). Or l'hydrolyse acide des glycosides au pH du vin prend plusieurs mois voir plusieurs années suivant les conditions de vieillissement (température notamment) et du pH

Hydrolyse des glycosides par une préparation enzymatique riche en activités glycosidases lors de la fabrication du vin



Influence de l'utilisation d'une préparation enzymatique riche en glycosidases sur la composition aromatique du vin de Riesling

| composés µg/l | vin témoin (Riesling) | | vin enzymé | |
|---|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 90 | 91 | 90 | 91 |
| analysés en | | | | |
| linalol | 111 | 84 | 153 | 95 |
| nérol | - | traces | - | traces |
| géraniol | - | traces | - | traces |
| À-terpinéol | 39 | 145 | 53 | 190 |
| citronellol | - | 12 | 28 | 11 |
| nérol | - | traces | - | traces |
| géraniol | - | traces | 24 | 58 |
| hydroxy-linalol | - | 86 | 29 | 92 |
| LOFtrans | - | 63 | 43 | 192 |
| LOFcis | - | - | 21 | 12 |
| ho-trienol | 52 | 45 | 57 | 170 |
| LOPtrans | 42 | 32 | 103 | 99 |
| LOPcis | - | 1 | 25 | 6 |
| 7-éthoxy-3,7-diméthyl-1,5-octadien-3-ol | 29 | 42 | 41 | 42 |
| 3,7-diméthyl-1,5-octadien-3,7-diol | 860 | 496 | 883 | 512 |
| 3,7-diméthyl-1,7-octadien-3,6-diol | 27 | 40 | 21 | 50 |
| 6,7-diH-8OHLinalol+6,7-7diH-7OHCitronellol | 58 | 30 | 94 | 182 |
| E 8-hydroxy-linalol diols | 1287 | 961 | 1399 | 1547 |
| terpine | 74 | 66 | 935 | 151 |
| p-menthène diol 7,8 | - | 23 | - | 14 |
| diol inconnu | - | 39 | - | 63 |
| | - | 64 | - | 436 |
| ∑ des terpénols | 2579 | 2229 | 3909 | 3922 |
| 3-OH-β-damascone | - | 48 | 132 | 138 |
| 3-oxo-À-ionol | - | 14 | 50 | 144 |
| 3OH-dihydro-6,7-Bionone | - | 47 | - | 68 |
| 3OH-dihydro-7,8-Bionol | - | 9 | - | 22 |
| 4oxo-dihydro-6,7-Bionol | - | - | - | 68 |
| 3oxo-dihydro-7,8-Àionol | - | 3 | - | 5 |
| ∑ des C13 norisoprénoides identifiés | - | 121 | 182 | 445 |
| 4-vinylgaiacol | 275 | 46 | 687 | 191 |
| 4-vinylphénol | 804 | 234 | 1354 | 244 |
| vanilline | - | 13 | 146 | 79 |
| tyrosol | - | 483 | - | 294 |
| phénol | - | 5 | - | 6 |
| ∑ des phénols | 1079 | 781 | 2187 | 814 |
| TOTAL | 3658 | 3131 | 6278 | 5181 |

On note que :

- La teneur totale en terpènes est de 2,6 mg/L dans le vin témoin (1990), contre 3,9 mg/L dans le vin enzymé (1990)
- Le vin témoin (1990) ne contient pas de norisoprénoides libres, alors que le vin enzymé (1990) en contient 0,18 mg/L
- La teneur totale en phénols volatils est de 1,1 mg/L dans le vin témoin (1990), contre 2,2 mg/L dans le vin enzymé (1990). A noter qu'une partie importante des phénols volatils formés, notamment 4-vinyl gaiacol et 4-vinylphénol proviennent de l'activité décarboxylase de la levure (voir cours sur l'arôme du vin)

En bref,

- Actuellement il est possible d'enrichir rapidement le vin sec en CA par l'utilisation des glycosidases d'origine microbienne
- Cette approche peut être mise à profit pour l'exploitation du potentiel aromatique des plantes, sous forme glycosylée
- Le procédé actuel n'est valable que pour les milieux qui ne contiennent pas de glucose car ce dernier inhibe fortement l'activité β -glucosidase
- Les β -glucosidases microbiennes peu sensibles à l'inhibition par le glucose sont décrites dans la littérature, mais pas d'enzyme commerciale actuellement

Production de la frambinone par l'hydrolyse d'un glucoside

La frambinone (raspberry ketone : cétone de framboise) est le composé qui participe amplement à l'arôme caractéristique de framboise. Très faibles concentrations dans la framboise (0,1-2 ppm). Seuil de détection de 1 à 10 ppb (dans l'eau)

La frambinone est très recherchée dans les formulations aromatiques (framboise, pêche, kiwi, fraise, ananas...), en parfumerie et cosmétique.

La molécule naturelle peut coûter plus de 10 000 €/kg

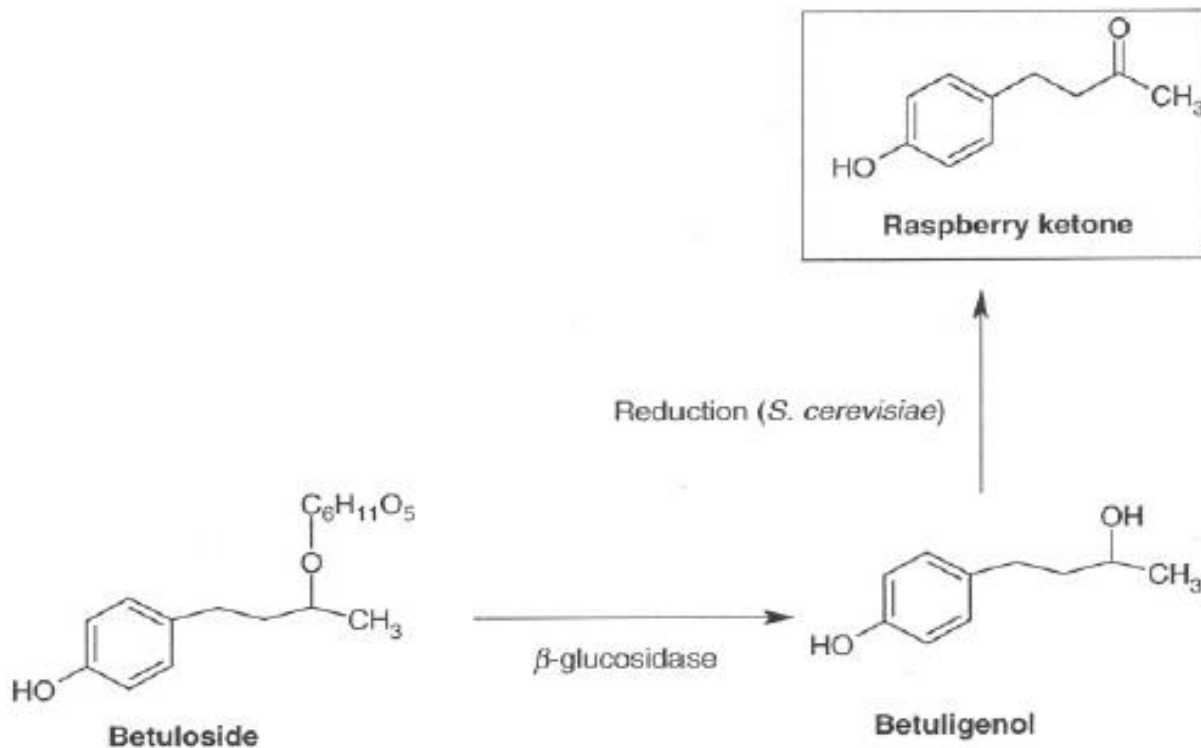
Différents brevets ont été déposés pour sa production. Elle peut être obtenue à partir du bétuloside (β -D-glucoside de frambinol ou du bétuligenol) présent dans l'écorce de bouleau blanc

Synthèse de frambinone à partir du bétuloside

La transformation du bétuloside en frambinone se fait en 2 étapes :

Le bétuloside extrait à partir des écorces de bouleau blanc est hydrolysé par une β -glucosidase.

Le betuligenol ou frambinol libéré est ensuite réduit par une ADH en frambinone (raspberry ketone) (voir le schéma ci-après)



Pour la production de frambinone, l'hydrolyse du bétuloside a été réalisée avec une β -glucosidase d'origine microbienne (*A.niger*) ou provenant d'amande douce .

Le frambinol formé a été réduit en frambinone grâce à une ADH spécifique pour des alcools secondaires présentes chez différents bactéries :Acetobacter, lactobacillus, Nocardia, Pseudomonas et quelques levures : Candia, Hansenula, Pichia, Torulopsis

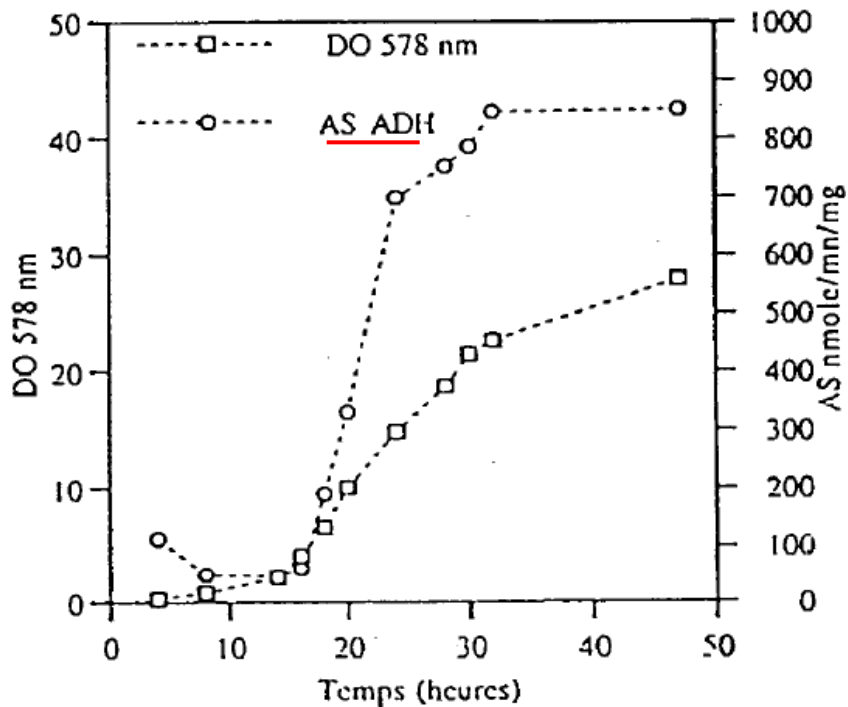
A noter que l'ADH de *S. cerevisiae* présente une affinité plutôt vers les alcools primaires, comme l'éthanol.

BREVET PERNOD RICARD 5FR2776301 (A1) — 1999-09-24° :

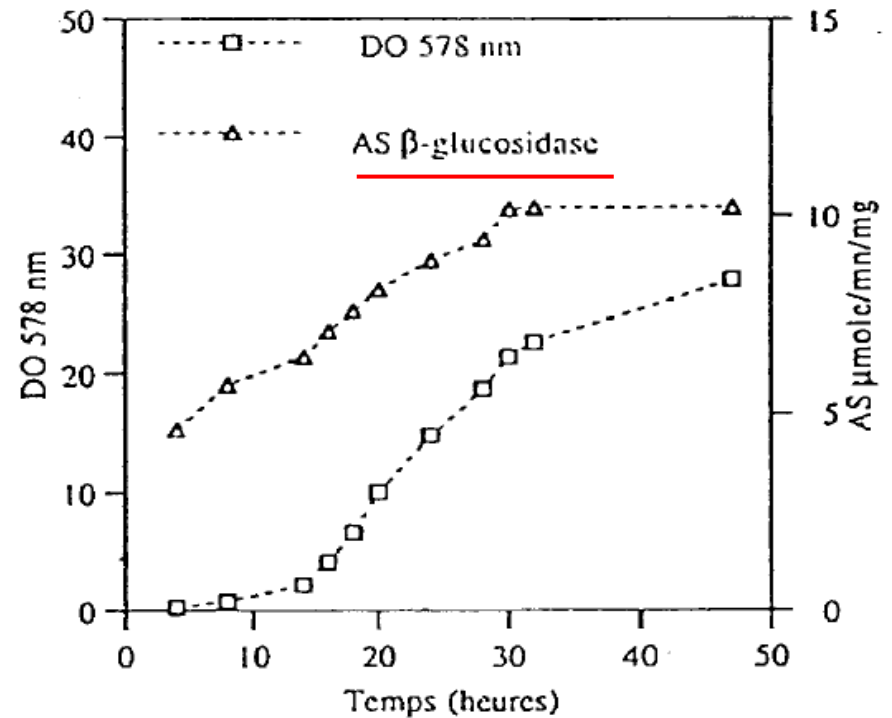
Frambinone production by bioconversion of a medium containing frambinol glucoside

Une souche de levure (*Pichia farinosa*) a été sélectionnée. Elle produit à la fois une β -glucosidase et une ADH pour les alcools secondaires .

Les cellules de levure sont récupérées en phase exponentielle où les activités β -glucosidase et ADH sont optimales. Elles sont mises en contact avec un extrait de betuloside provenant d'écorce de bouleau.

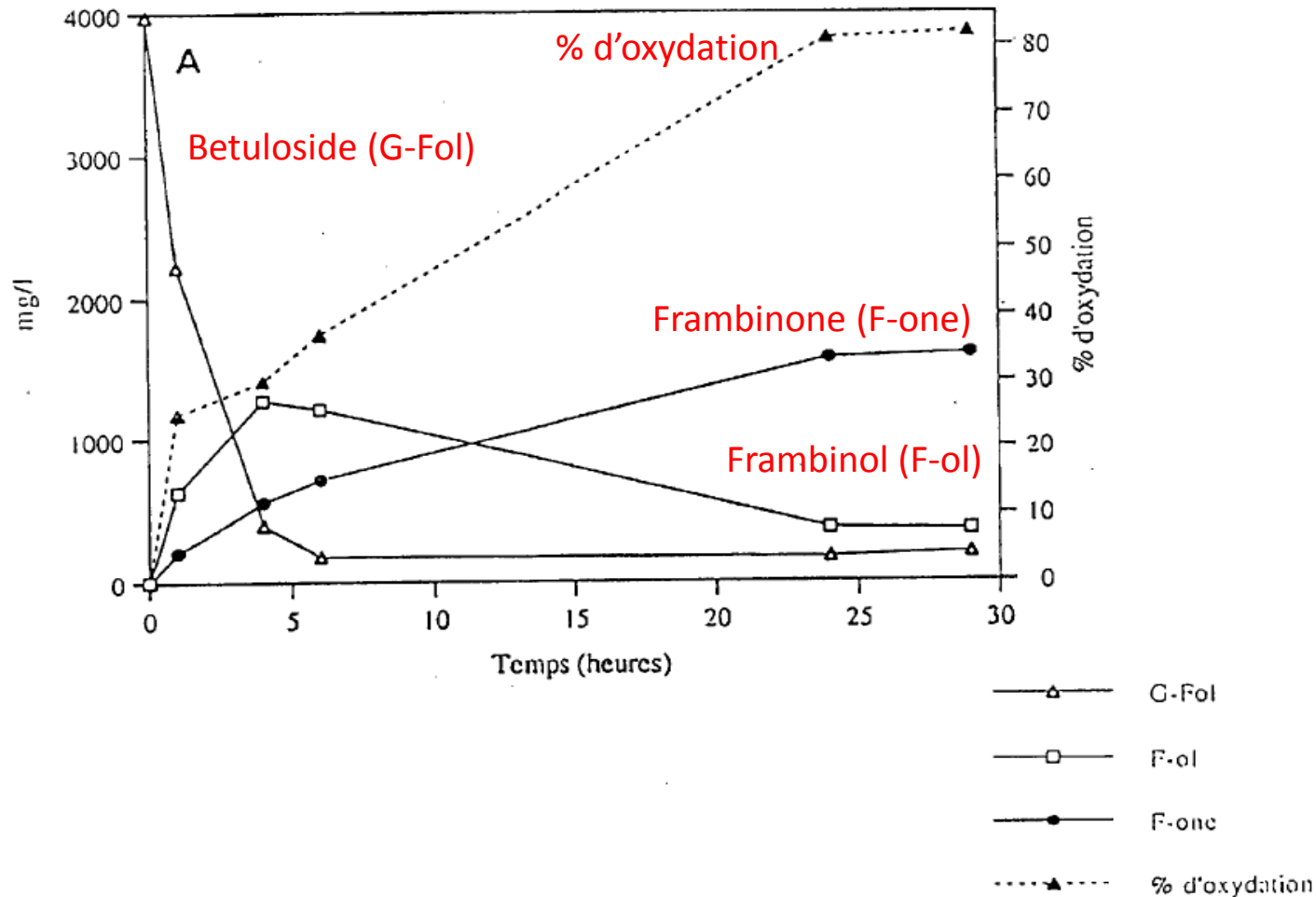


AS ADH= activité spécifique ADH



AS β -glucosidase=activité spéc. β -gluc.

Cinétique de bioconversion du frambinone à partir du bétuloside avec des cellules de *P. farinosa* récupérée en phase exponentielle de culture (brevet Pernod Ricard)



➤ Le bétuloside est efficacement hydrolysé ; 80% de frambinol formé est oxydé en frambinone (ca. 1,5 g/L frambinone après 25 h de bioconversion)

V.4.2. Production des terpènes par les microorganismes

Certains microorganismes, les levures ainsi que les champignons filamenteux (*Ceratocystis*, *penicillum*) peuvent conduire à la synthèse des terpènes

- La composition du milieu de culture (source d'azote, source de carbone...) joue un rôle important dans la synthèse de CA par *Ceratocystis moniliformis* (voir le tableau)

| Source de carbone ^a | Croissance ^b | Arôme |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Dextrose | ++++ | fruité, banane. |
| Galactose | +++ | agrumes, pamplemousse, citron. |
| Fructose | +++ | fruité. |
| Saccharose | +++ | fruité. |
| Glycerol | ++ | pêche et poire en conserve |
| Amidon de maïs | ++++ | melon, fleur tropicale, banane. |

a : la teneur en carbone est équivalente à 2,5% de dextrose dans un milieu de base renfermant 0.1% d'urée.

b : +++++ excellent , +++ bon , ++ moyen , + faible .

d'après E. LANZA, K.H. KO et J.A. PALMER J. Agric. Food Chem. , 1976, 24, 1247.

La production de terpénols par *Ceratocystis moniliformis* cultivé en batch : effet de la nature de source de carbone-azote

| Source de carbone et d'azote | Terpénols produits (mg/l) | | | Matière sèche (g/l) |
|------------------------------|---------------------------|---------|-------------|---------------------|
| | Nérol | Géranol | Citronellol | |
| Lactose-urée | 5,0 | 1,0 | 4,0 | 0,7 |
| Lactose-glycine | 1,8 | 0,1 | 3,0 | 0,2 |
| Saccharose-glycine | 4,0 | 16,1 | 12,0 | 2,0 |
| Glucose-urée | 30 | 130 | 200 | 5,9 |

La synthèse des terpènes par *Ceratocystis moniliformis* est très influencé par la nature de carbone-azote :

Les concentrations en nérol, géranol et citronellol, ainsi que leurs proportions sont très variables en fonction du couple carbone-azote

Le couple glucose-urée a permis d'obtenir les concentrations les plus élevées en terpénols. A noter que la production de biomasse (matière sèche) a été la plus élevée avec ce couple

Composition des huiles essentielles des plantes et de celles produites par les champignons filamenteux

| citronell oil | palmarosa oil | fungual oil |
|---------------------------------|---------------------------------|--|
| geraniol (60-85%) and esters | geraniol (70-95%) and esters | geraniol (40-75%) and esters |
| citronellol (15%) and esters | citronellol and esters | citronellol (10-43%) and esters |
| citronellal (5-35%) | citronellal (5-10%) | |
| | linalool and others | linalool (1-2%) |
| nerol and others | | nerol (1-6%) neral (1-2%) and others |

➤ On remarque que la composition de l'HE obtenue par la culture de champignon est assez proche de celle de l'HE de citronnelle et de palm

Les terpènes produits par les microorganismes lors d'une fermentation peuvent exercer une toxicité pour les cellules

Exemple :

Lors de la culture de *Ceratocystis variopara*, la consommation d'oxygène par ce champignon a été fortement inhibée par le géraniol et le linalool présents dans le milieu à raison de 0,1 à 0,33 %.

L'effet inhibiteur sur la croissance du champignon a pu être levé en ajoutant dans le milieu de culture un adsorbant hydrophobe (Amberlite XAD-2). La concentration en géraniol qui représente 80% des alcools terpéniques produits par *Ceratocystis variopara* est passé de 35 à 220 mg/L.

V.4.3. Biotransformations de monoterpènes par différentes souches microbiennes

En particulier des hydrocarbures monoterpéniques de faible prix de revient (α et β -pinène, limonène) sont convertis par différents micro-organismes en composés oxygénés possédant des caractéristiques odorants intéressants.

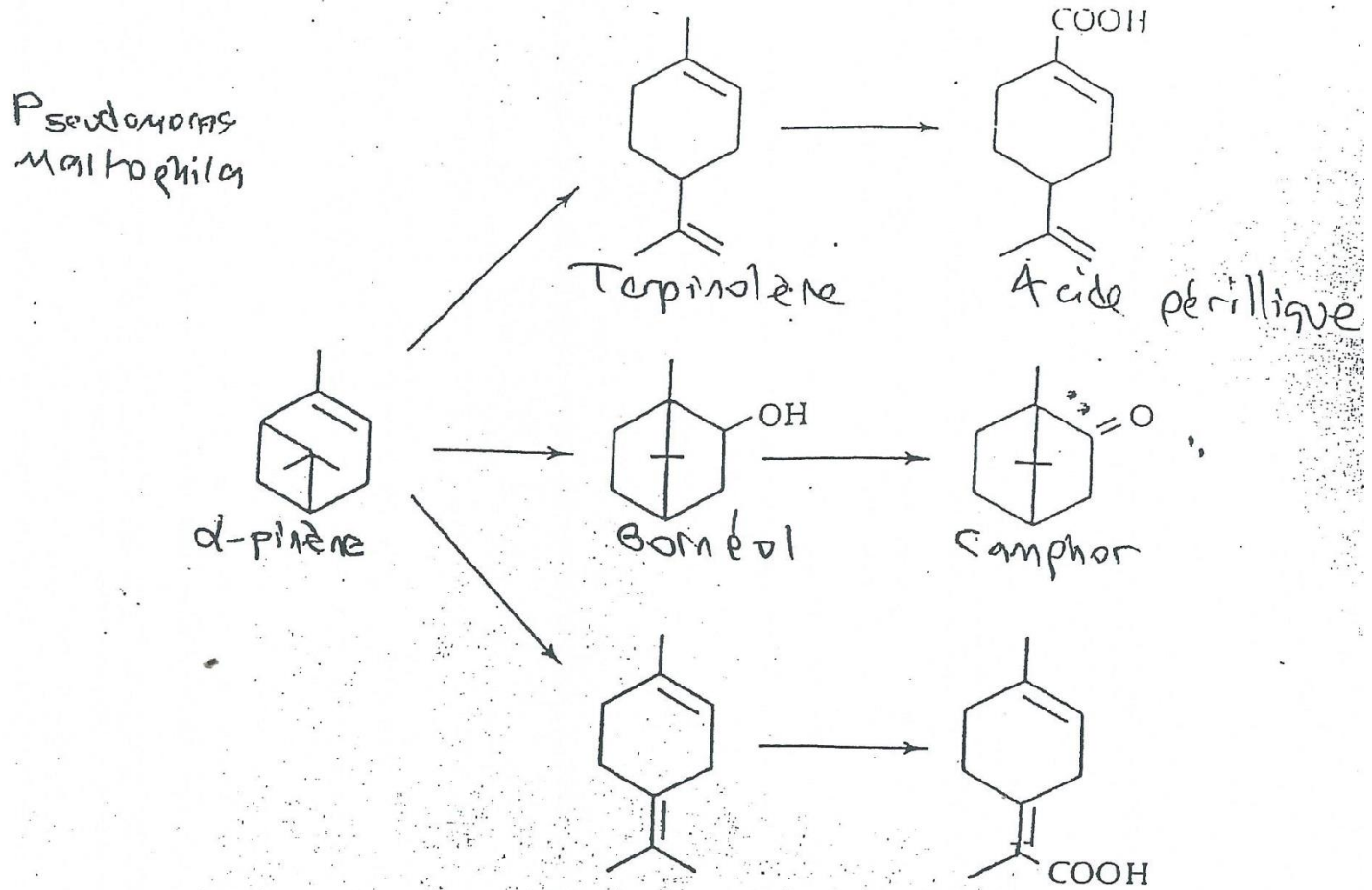
| Monoterpène | Microorganisme | Principaux composés formés |
|-------------------------------|---|---|
| α -pinène | <i>Aspergillus niger</i> | cis-verbénol, d-verbénone, d-trans sobréol |
| α -pinène | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas sp.</i> | acide citronellique, acide géranique |
| α -pinène | <i>Pseudomonas maltophilia</i> | limonène, camphre, bornéol, acide pirellique |
| β -pinène | <i>Pseudomonas sp.</i> | camphre, bornéol, isobornéol, α -terpinéol |
| β -pinène | <i>Aspergillus niger</i> | pinocarvéol, pinocarveone, myrtenol |
| α - ou β -pinène | <i>Pseudomonas sp.</i> | carvone-1 |
| α - ou β -pinène | <i>Pseudomonas</i> | myrtenol, acide myrtenique, bornéol, acide pirellique |

Remarque : la bioconversion des terpènes par des cellules végétales est possible mais les concentrations obtenues sont très faibles dues à la toxicité des métabolites par la cellule

| Espèces | Composé converti | Réactions |
|----------------------------|--|---|
| <i>Rosa</i> | géraniol | isomérisation, réduction, oxydation |
| <i>Cannabis sativa</i> | géraniol, nérol, verbéno | isomérisation, oxydation |
| <i>N. tabacum</i> | linalol, carvone, bornéol | hydroxylation, oxydation stéréosélective |
| <i>Mentha sp.</i> | pulégone, menthone, dérivés de la pulégone | isomérisation, réduction, hydrogénation |
| <i>Vitis vinifera</i> | géraniol, nérol | isomérisation, réduction, oxydation, <i>hydroxylation</i> |
| <i>Citrus sp.</i> | géraniol, nérol | isomérisation, réduction, oxydation |
| <i>Citrus sp.</i> | valencène | hydroxylation, oxydation |
| <i>Salvia officinalis</i> | bornéol | oxydation |
| <i>Melissa officinalis</i> | citronellal | réduction. |

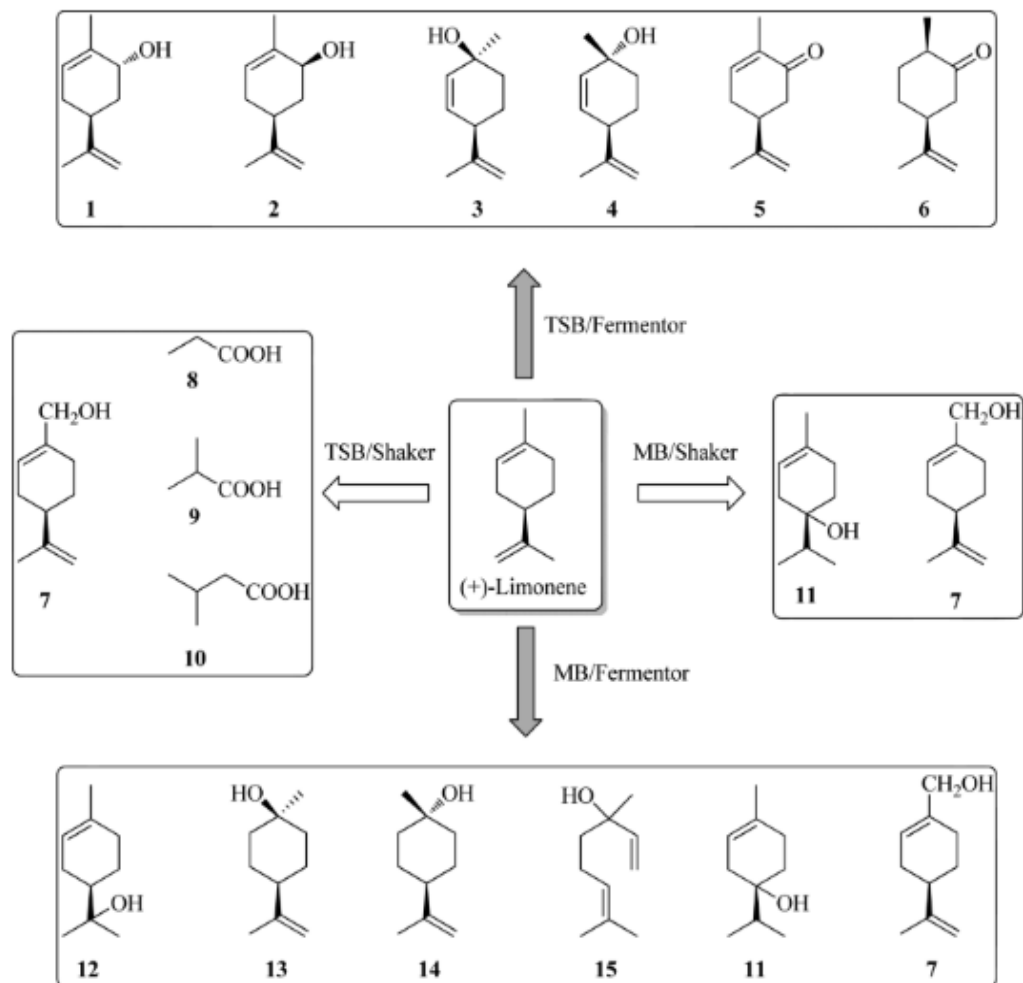
Bioconversion de α -pinène par *Pseudomonas maltophilia*

La bioconversion du α -pinène par *P.maltophilia* donne naissance à un mélange de composé dont l'arôme est complexe et recherché.



Bioconversion de (R)-(+)-limonène par *Aspergillus niger*

Dans la nature, le (R)-(+)-limonène est abondant, notamment dans les HE des agrumes. Sa bioconversion conduit aux nombreux composés aromatiques recherchés.



Scheme 1. Biotransformation products of (+)-limonene: *trans*-carveol (1), *cis*-carveol (2), *cis*-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol (3), *trans*-*p*-mentha-2,8-dien-1-ol (4), carveone (5), dihydrocarvone (6), perillyl alcohol (7), propanoic acid (8), isobutanoic acid (9), isopentanoic acid (10), terpinen-4-ol (11), α -terpineol (12), *cis*- β -terpineol (13), *trans*- β -terpineol (14), linalool (15). Shaker and fermentor correspond to the cultivation system, while TSB (tryptic soy broth) and MB (malt broth) are the culture media.

Les bactéries, les champignons filamenteux ont été utilisés pour la bioconversion du limonène.

➤ Sur le schéma ci-contre, on remarque que le limonène est converti en une quinzaine de composés oxygénés, comme le carveone, carveol...

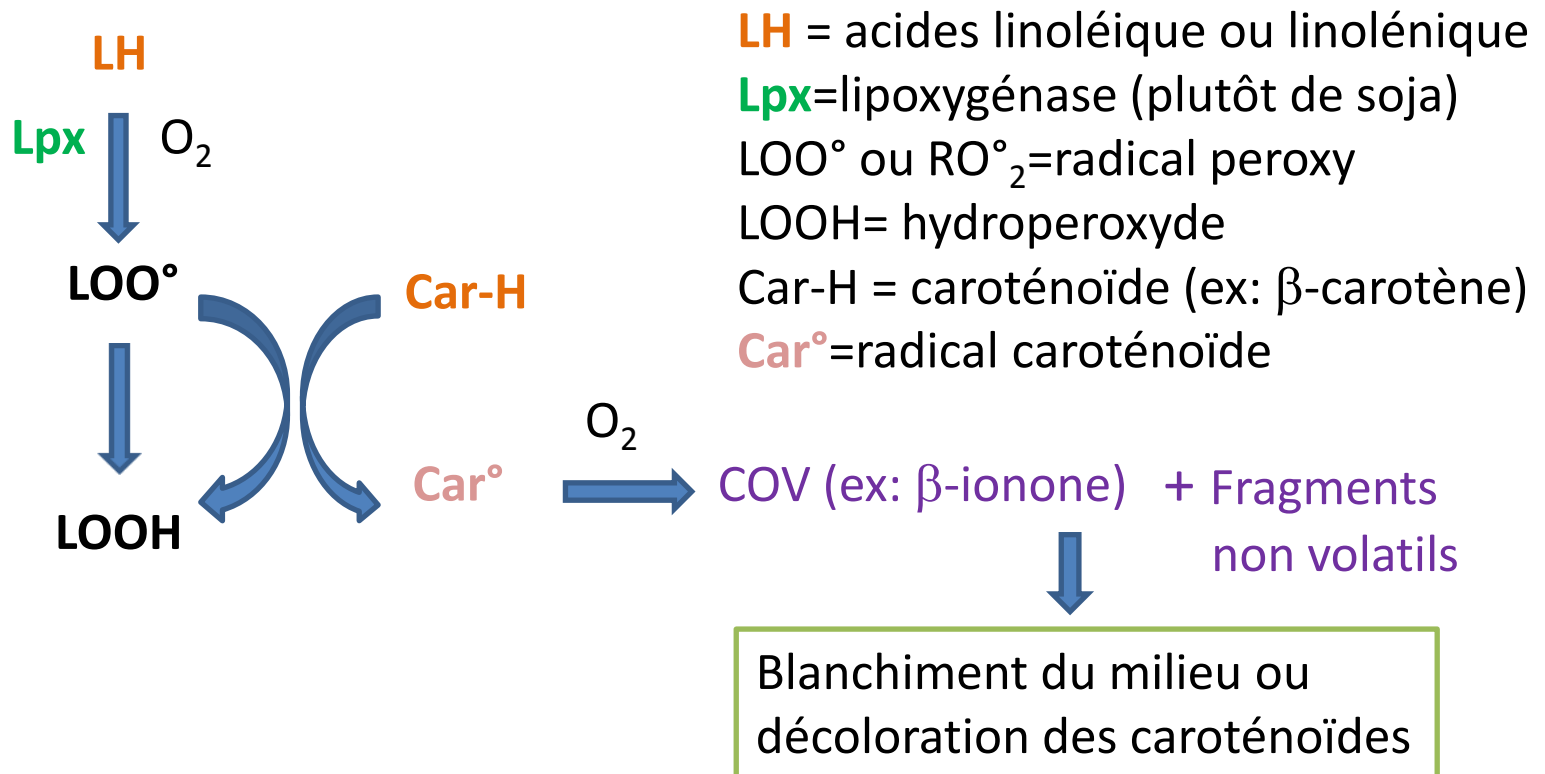
➤ Le nombre de composé formé dépend de milieu de culture et de conduite de fermentation (erlen, fermenteur)

➤ Le nombre de composé formé est plus élevé dans le cas du fermenteur qui permet un meilleur développement du champignon

V.5. Production de composés nor-isoprénoïdiques

V.5.1. Production de la β -ionone par co-oxidation (réaction enzymatique et chimique)

- Les caroténoïdes peuvent donner naissance aux COV par une réaction type co-oxidation . Le radical peroxy formé comme suite à l'action de lipoxygénase sur l'acide linoléique ou linoléinique va arracher un proton du caroténoïde. Le radical caroténoïde formé sera clivé par les espèces d'oxygène (réaction radicalaire), ce qui conduira à l'apparition de COV et à la décoloration du caroténoïde.



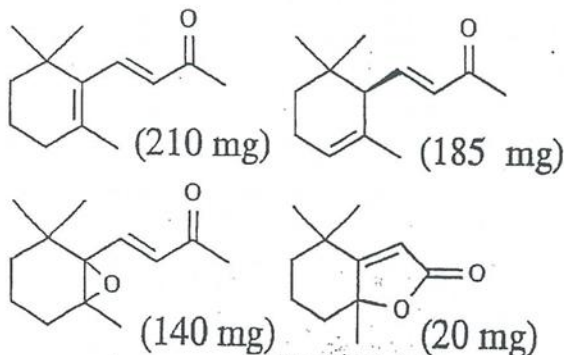
➤ Un brevet a été déposé pour la production de la β -ionone et autres COV impliquant le mécanisme de co-oxidation : le jus de carotte a été utilisé comme source du β -carotène la farine de soja comme source de lipoxygénase, une huile végétale comme source d'acides linoléique et linolénique. L'ensemble est agité dans un réacteur avec apport d'oxygène. Plusieurs COV ont été obtenus : β -ionone, R(+)- α -ionone..., les aldéhydes. Ils ont été extraits par le CO_2 super critique, puis séparés par distillation fractionnée

METHOD FOR THE ENZYMATIC PREPARATION OF AROMAS,
 PARTICULARLY IONONES AND C₆ TO C₁₀ ALDEHYDES
 INT. PATENT WO 94/08028 (14.04.94)

Example:

| Carotenoid | LOX | Linoleic acid |
|--------------|-----------|---------------|
| carrot juice | soy flour | vegetable oil |
| 65 % | 26 % | 7 % |

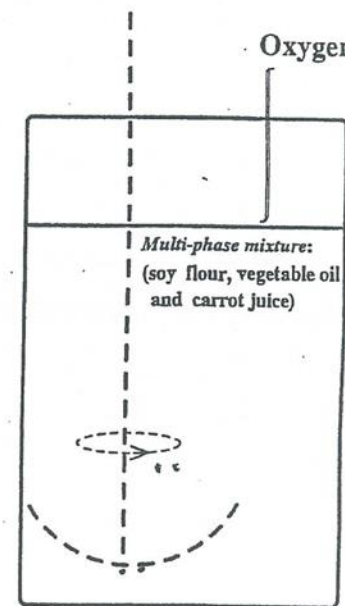
Yields (mg / kg reaction mixture)



n-Hexanal
(950 mg)

2,4-Decadienals
(1020 mg)

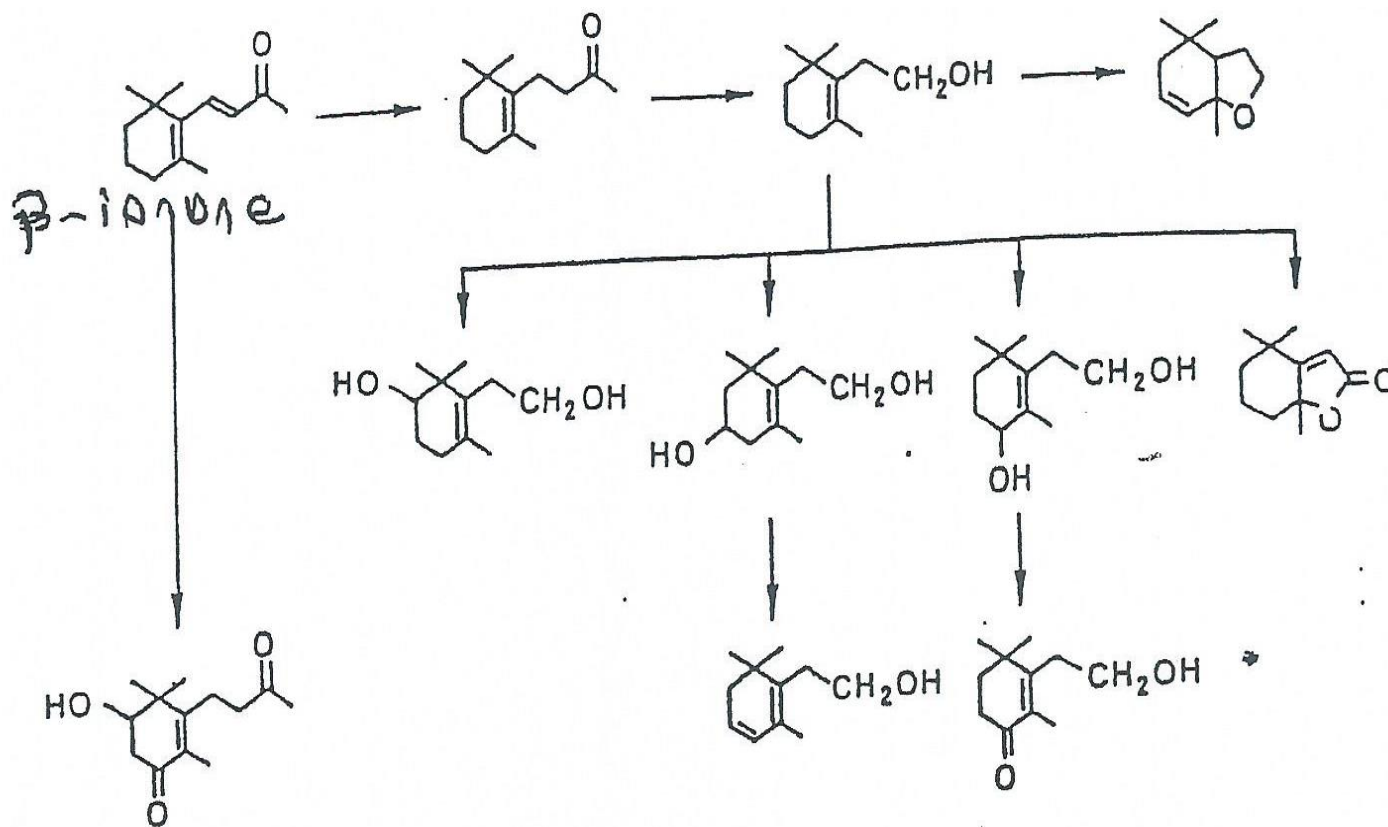
BIOREACTOR



Temp.: 20-40°C
 Time: 10 - 24 h

V.5.2. Production des amortissants de tabac par la bioconversion de la β -ionone

La β -ionone a été transformé en un mélange de composés à l'échelle industrielle par une souche de *Lasidioplodia*. Le mélange est utilisé pour l'aromatisation du tabac



VI. SYNTHÈSE ET PRODUCTION DE PHÉNOLS VOLATILS

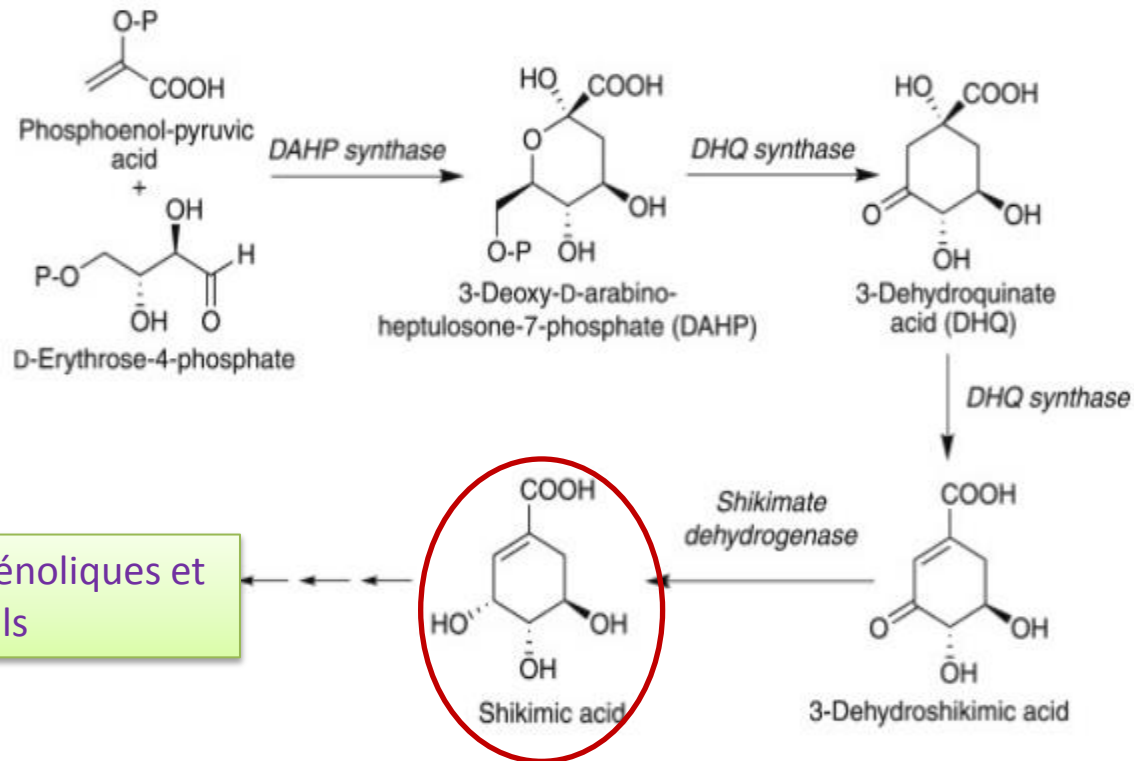
Les composés phénoliques sont parmi les métabolites secondaires abondants dans les plantes. Ils jouent le rôle de pigments. Ils ont des propriétés nutritionnelles (anti-oxydant)

Les phénols volatils, comme la vanilline, le benzaldéhyde, le phényl-2-ethanol participent à l'arome de nombreux produits alimentaires. Ils sont recherchés dans les formulations aromatiques. Ils sont utilisés en parfumerie.

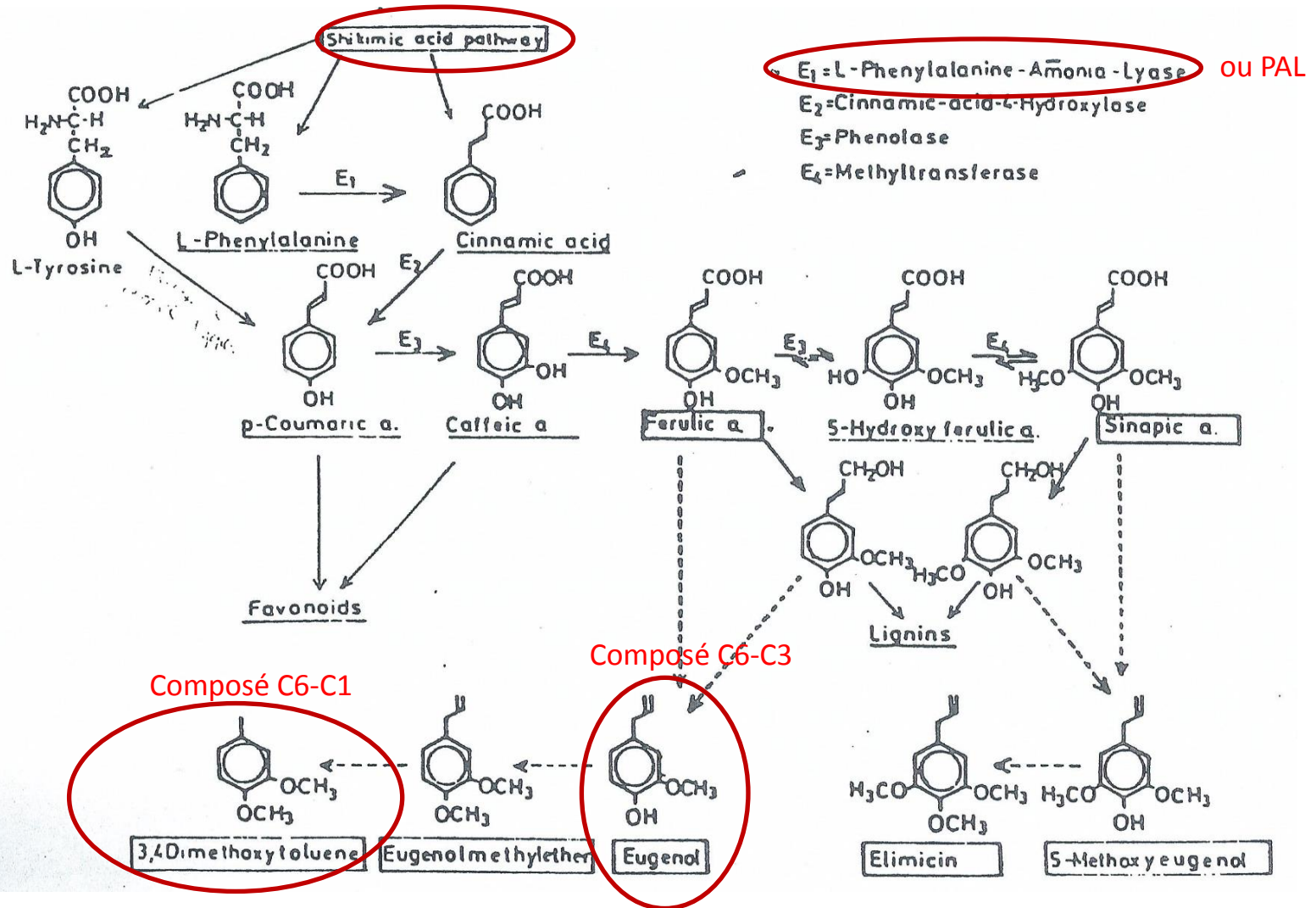
VI.1. Biosynthèse de composés phénoliques

La voie de biosynthèse de composés phénoliques « simple » et « complexe » comporte un nombre important d'étapes. L'acide shikimique est une molécule intermédiaire dans cette synthèse. Elle a été isolée la première fois dans une plante au japon, shikimi (*Illicium anisatum*) ou badiane de Japon. La voie de biosynthèse des composés phénoliques porte son nom « voie shikimique ». Cette voie est connue aussi sous le nom de « voie phénylpropanoïdes »

La synthèse de l'acide shikimique est initiée par la condensation d'acide phosphoenol-pyruvique et du D-erythrose-4-phosphate (voir le schéma ci-dessous).

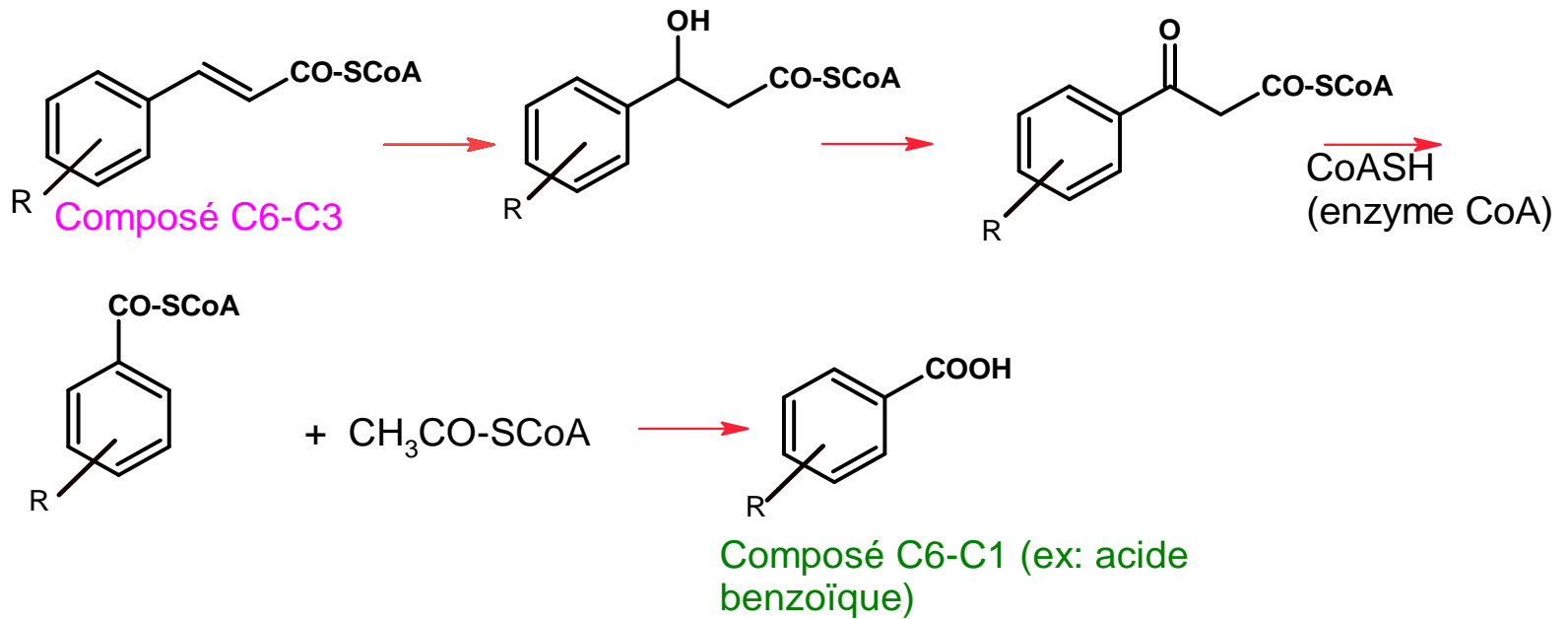


Biosynthèse des composés phénoliques : voie shikimique



Cette synthèse conduit aux phénols simples et complexe (flavonoïds). La phénylalanine lyase (PAL) est une enzyme clé dans cette synthèse. Des composés C6-C1 (ex : 3,4 dimethoxy toluene) et C6-C3 (ex : eugénol) sont parmi les composés synthétisés.

Le passage de composés C6-C3 à C6-C1 se fait par un mécanisme de β -oxydation :



VI.1. Production de la vanilline

La vanilline est l'arôme le plus utilisé en industrie alimentaire.

Les gousses de vanille (*Vanilia plantifolia*) contiennent 2 à 3 % de vanille (m.s).

Utilisée aussi en parfumerie, cosmétique, et industrie pharmaceutique

Dotée d'activités antioxydante et anti-microbienne

La consommation annuelle de vanilline de synthèse est de 12 000 tonnes (15 €/kg), celle d'extrait de vanille est de 50 tonnes (4 000 €/kg). Quant à la vanilline biotechnologique (biovanilline), sa consommation annuelle est de 5 tonnes (800 à 1000 €/kg).

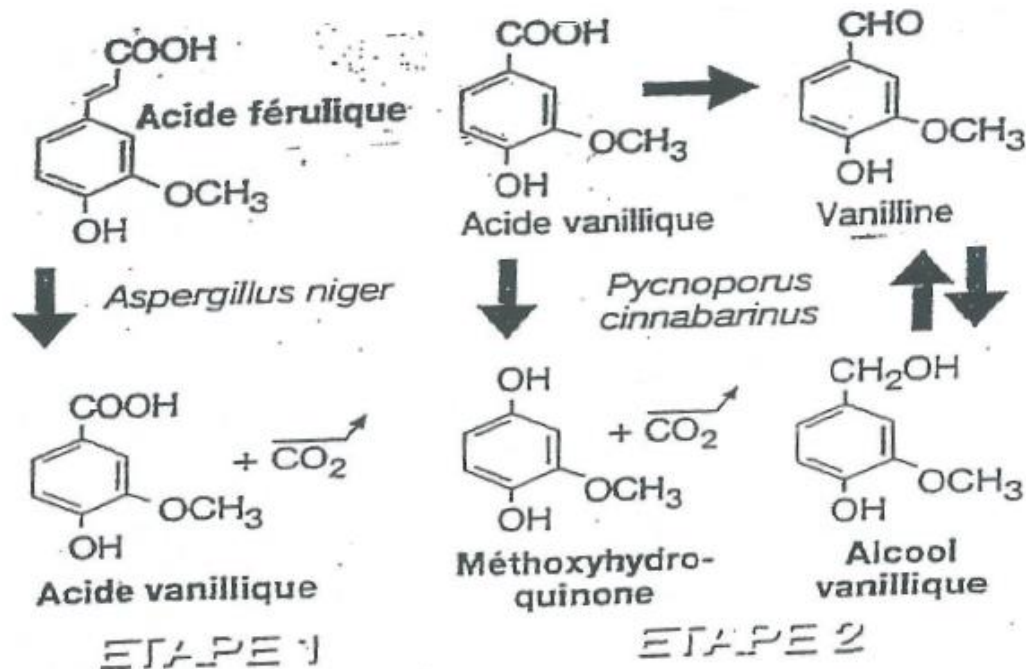
La production de la biovanilline a fait l'objet de nombreux travaux. Plusieurs brevets ont été déposés.

Dans la plupart des travaux l'eugénol, l'isoeugénol ou l'acide férulique ont été utilisés comme précurseur. Des bactéries, des champignons filamenteux, les microorganismes génétiquement modifiés ont été testés. Les gènes et les enzymes impliqués pour la synthèse ont été identifiés, séquencés et clonés.

Production de la vanilline par action combinée de 2 champignons

Des co-produits agricoles, comme son de blé, son de riz, son de maïs, pulpe de betterave ont été utilisés comme source d'acide férulique. L'acide férulique se trouve sous forme libre, sous forme estérifié ou lié aux polysaccharides, aux stérols dans les plantes. Avant sa transformation en vanilline par les micro-organismes, la matière première subit souvent des traitement enzymatiques ou chimiques pour libérer l'acide férulique .

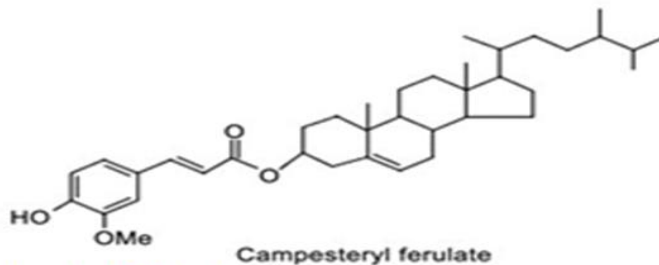
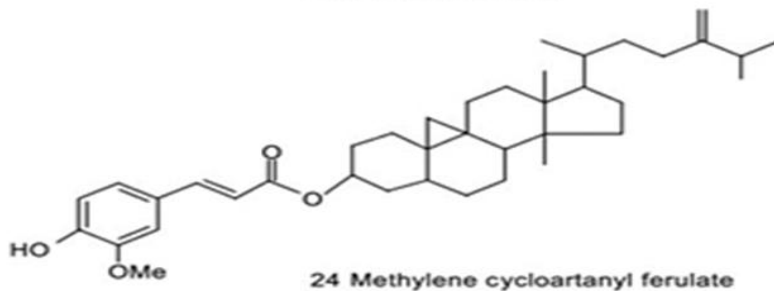
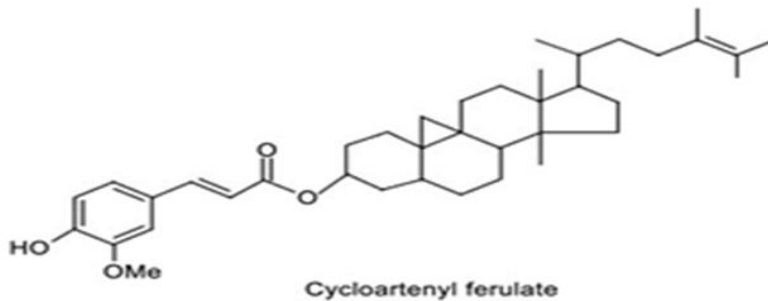
➤ Une bioconversion en 2 étapes d'acide férulique : une souche d'*Aspergillus niger* transforme l'acide férulique en acide vanillique. Ce dernier est convertit ensuite en vanilline par une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*. Dans les premiers travaux, des productions supérieures à 500 mg/L ont été obtenues.



Production de la vanilline à partir de l'huile de son de riz (Zheng et al., 2007)

L'huile de son de riz, obtenue par pression à froid ou extraction par solvant de la partie externe du grain de riz (le son) contient du γ -oryzanol, des phytostérols, de l'acide férulique et de la vitamine E. Utilisée pour des soins destinés à la peau et aux cheveux, à la prise de masse. En Chine chaque année 10.10^6 tonnes de riz subissent un raffinement, qui conduit à l'obtention de son de riz

- γ -oryzanol* est un mélange de 10 composés. Les dérivés d'acide férulique (ester avec les stérols) ci-dessous sont les 3 constituants majeurs. γ -oryzanol régule le taux des lipides sanguins, certains désordres métaboliques, efficace contre les tumeurs cancérigènes....



*Le nom de γ -oryzanol provient de *Oryza sativa* L.(riz)

Traitement de l'huile de son de riz pour la récupération de l'acide férulique :

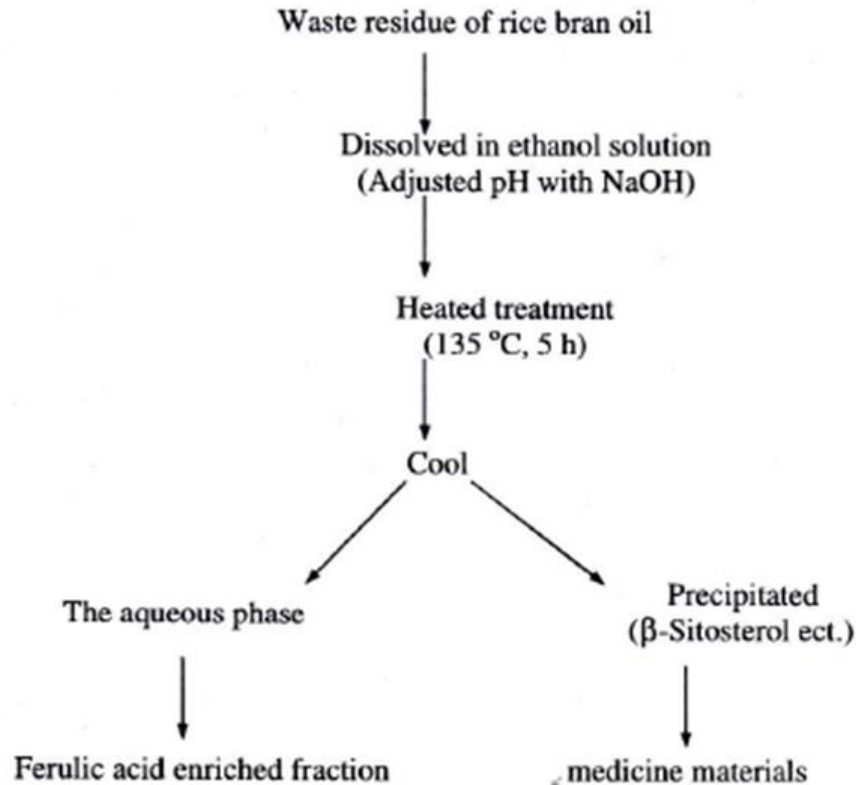


Fig. 1. Preparation of ferulic acid from waste residue of rice bran oil.

Les esters d'acide férulique sont extraits par l'éthanol et subissent une hydrolyse chimique

➤ 6,8 g. d'acide férulique obtenus par hydrolyse de 50 g. d'huile de son de riz.

1^{ère} étape : Bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique par *A. niger*

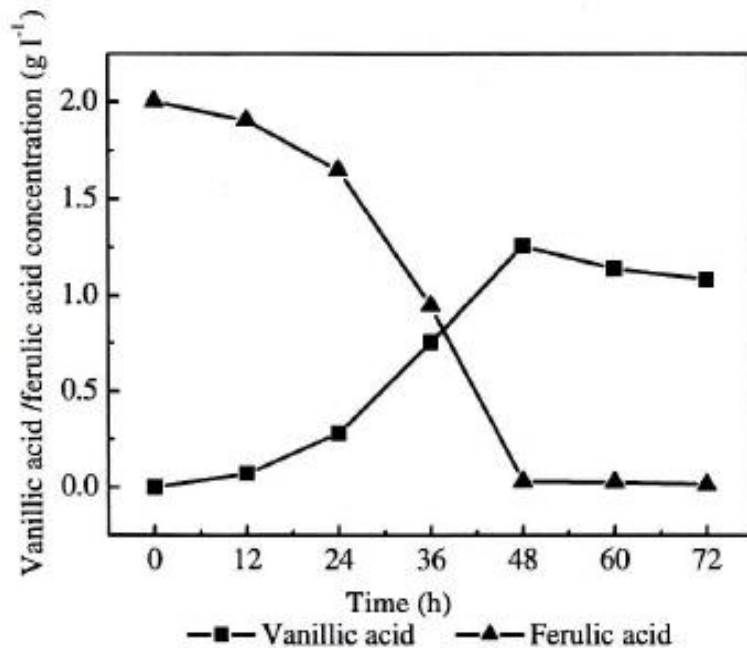


Fig. 2. The conversion time course when the initial ferulic acid concentration was 2.0 g l⁻¹. The bioconversion was carried out at 37 °C, with shaking speed of 150 rpm.

D'abord *A.niger* est cultivé sur le milieu de culture adapté pendant 48 h. Ensuite l'acide férulique est ajouté dans le milieu pour sa conversion en acide vanillique (figure ci-contre)

L'acide férulique ajouté (2 g/L) est efficacement converti en acide vanillique. Après 36 h, on atteint 1,3 g/L en acide vanillique (un rendement molaire de 63,5 %). En fin de culture, il ne reste plus d'acide férulique.

Après 72 h de culture, le milieu de culture est filtré. Le filtrat est incubé avec une des cellules d'une souche de *P.cinnabarinus*

2^{ème} étape : conversion de l'acide vanillique en vanilline par *P.cinnabarinus*

Le filtrat de la culture d'*A.niger* contenant de l'acide vanillique est incubé avec des cellules de *P.cinnabarinus* . Ces cellules ont été obtenus par la filtration d'une culture (30°C, 48 h) de *P.cinnabarinus*.

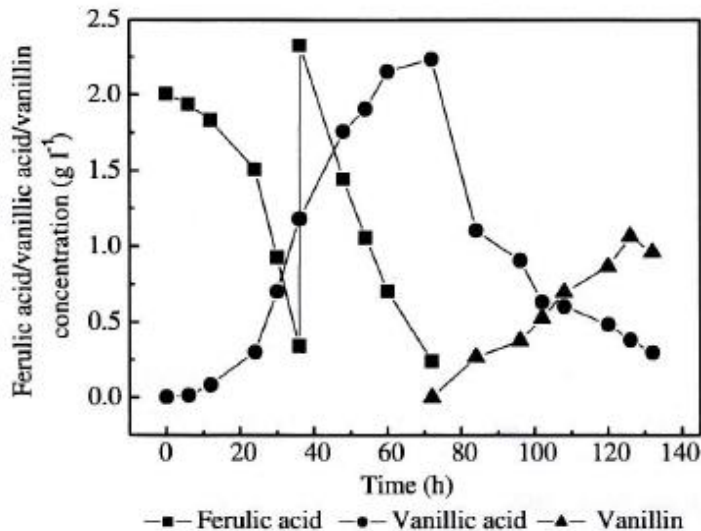


Fig. 3. The bioconversion course of vanillin production combining by *A. niger* CGMCC0774 and *P. cinnabarinus* CGMCC1115. Between 0 h and 72 h, ferulic acid was converted to vanillic acid by *A. niger* in a 25 l fermenter under 0.1 MPa pressure, 1 vvm aeration rate, 37 °C, and 200 rpm. From 72 h to 132 h, vanillic acid in above medium with treatment was further converted to vanillin by *P. cinnabarinus*. The bioconversion was performed at pH 5.0, 35 °C and 120 rpm, supplementing with 5 g l⁻¹ of glucose and 10% HZ802 resin.

Pour la bioconversion d'acide vanillique en vanilline, le milieu est additionné de résine HZ 802 afin d'adsorber la vanilline. En effet cette dernière a un effet toxique sur les cellules

- La présence de la résine pendant la bioconversion a permis d'augmenter le rendement en vanilline. La concentration en vanilline a atteint 1.09 g/L

Effet de la présence de résine HZ802 sur la formation de la vanilline lors de la bioconversion d'acide vanillique en vanilline par les cellules de *P. cinnabarinus*

Table 1
Effect of HZ802 resin on vanillin yield and vanillyl alcohol

| HZ802 resin (g) | Residual in conversion medium (g l ⁻¹) | | Adsorbed in HZ802 resin (g l ⁻¹) | |
|-----------------|--|------------------|--|------------------|
| | Vanillin | Vanillyl alcohol | Vanillin | Vanillyl alcohol |
| 0 | 0.63 | 0.32 | 0 | 0 |
| 4 | 0.29 | 0.15 | 0.79 | <0.01 |
| 6 | 0.20 | 0.12 | 0.86 | <0.01 |
| 8 | 0.10 | 0.12 | 0.92 | <0.01 |
| 10 | 0.04 | 0.12 | 1.05 | – |
| 12 | 0.03 | 0.12 | 1.06 | – |

The bioconversion was performed on 100 ml medium at 35 °C, pH 5.0, with shaking speed of 120 rpm. HZ802 resin was added after 12 h and conversion continued 54 h.

En l'absence de résine, la concentration en vanilline est de 0,63 g/L, en alcool vanillique 0,32 g/L

En présence de résine, la concentration en vanilline a atteint 1,09 g/L. La formation d'alcool vanillique est négligeable.

- La concentration en vanilline a pu atteindre 2,5 g/L lorsque la bioconversion a eu lieu avec des concertations plus élevées en acide vanillique (toujours en présence de résine HZ802)

Table 2

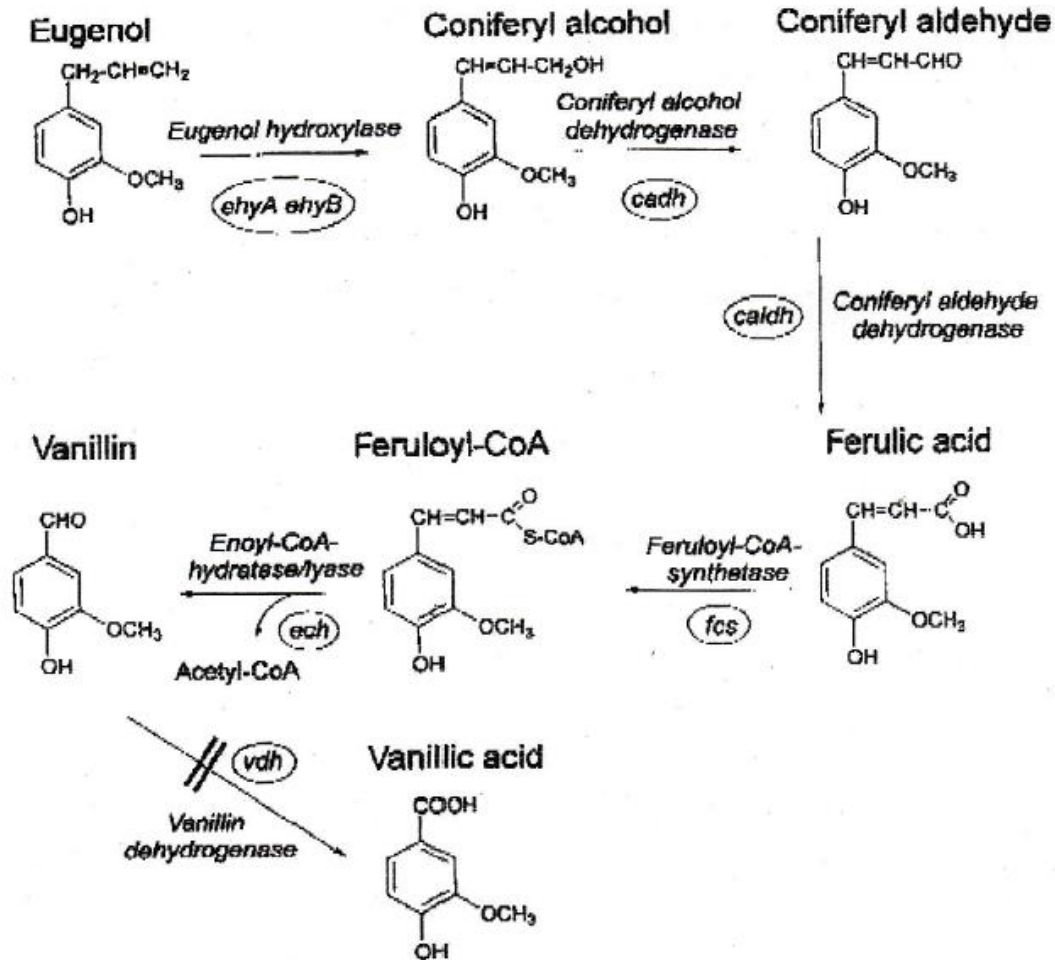
Effect of vanillic acid concentration on vanillin production

| Vanillic acid (g l ⁻¹) | HZ802 resin (g) | Vanillin (g l ⁻¹) | Molar conversion yield (%) |
|---------------------------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 2 | 10 | 1.1 | 60.8 |
| 3 | 15 | 1.7 | 62.6 |
| 4 | 20 | 2.2 | 60.7 |
| 5 | 25 | 2.5 | 55.2 |

The bioconversion was carried out at 35 °C, pH 5.0, with shaking speed of 120 rpm. HZ802 resin was added after 12 h and conversion continued 54 h.

Production de la vanilline par une bactérie génétiquement modifiée

La voie de biosynthèse de la vanilline étant connue, une bactérie (*Pseudomonas sp. HR 199*) a été modifiée pour bloquer l'enzyme qui transforme la vanilline en acide vanillique (voir le schéma) (tailor-made production)



On note que le passage de l'eugénol (C6-C3) à la vanilline (C6-C1) via l'acide férulique implique la β -oxydation

Fig. 1. Synthesis of vanillin from eugenol by genetically engineered *Pseudomonas sp. HR 199*. Relevant enzymes are indicated; the names of the corresponding genes are given within the ovals.

➤ Lors de la transformation de l'eugénole (un substrat peu coûteux) en acide férulique par *Pseudomonas sp. HR 199*, il a été nécessaire d'ajouter l'eugénole en plusieurs parties, dues à l'effet toxique de l'eugénole.

Après 75 h, la concentration en acide férulique a été de 5,8 g/L, soit un rendement molaire de conversion de l'eugénole en acide férulique de l'ordre de 50 %

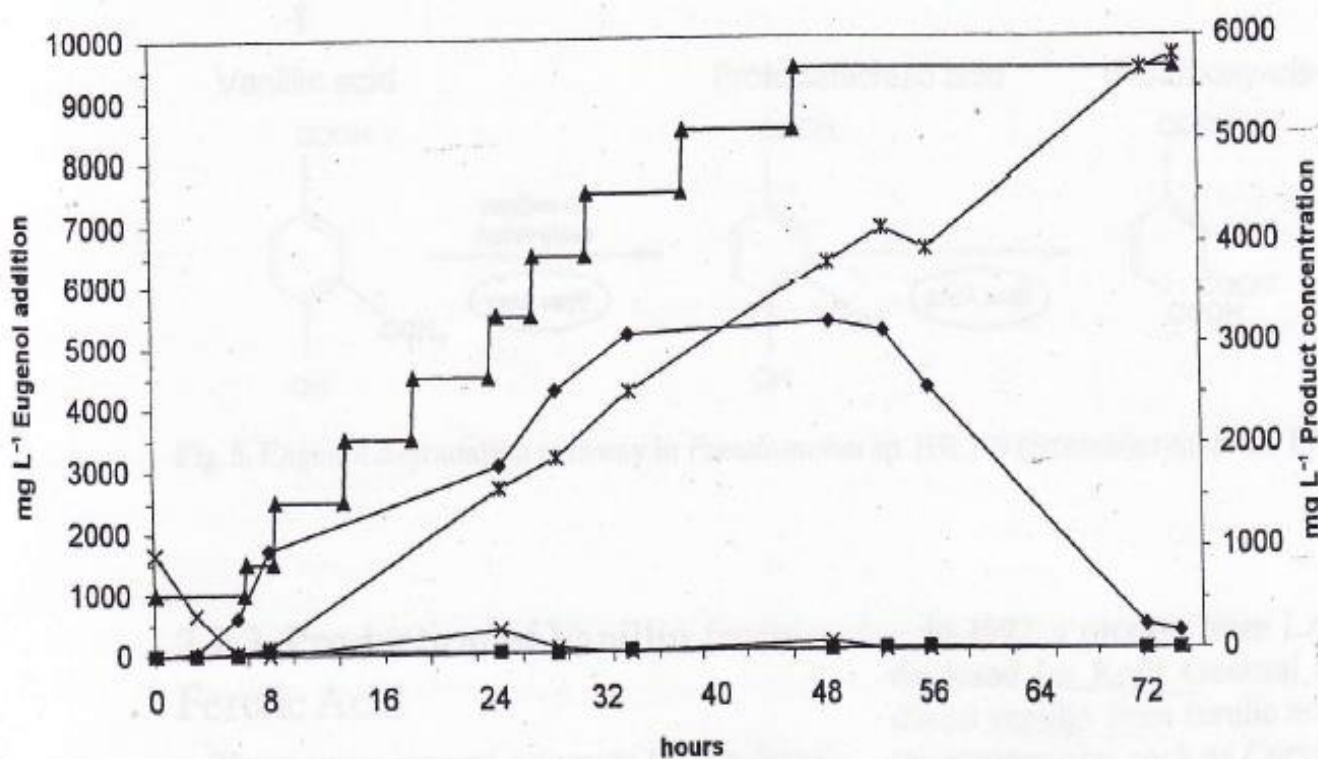
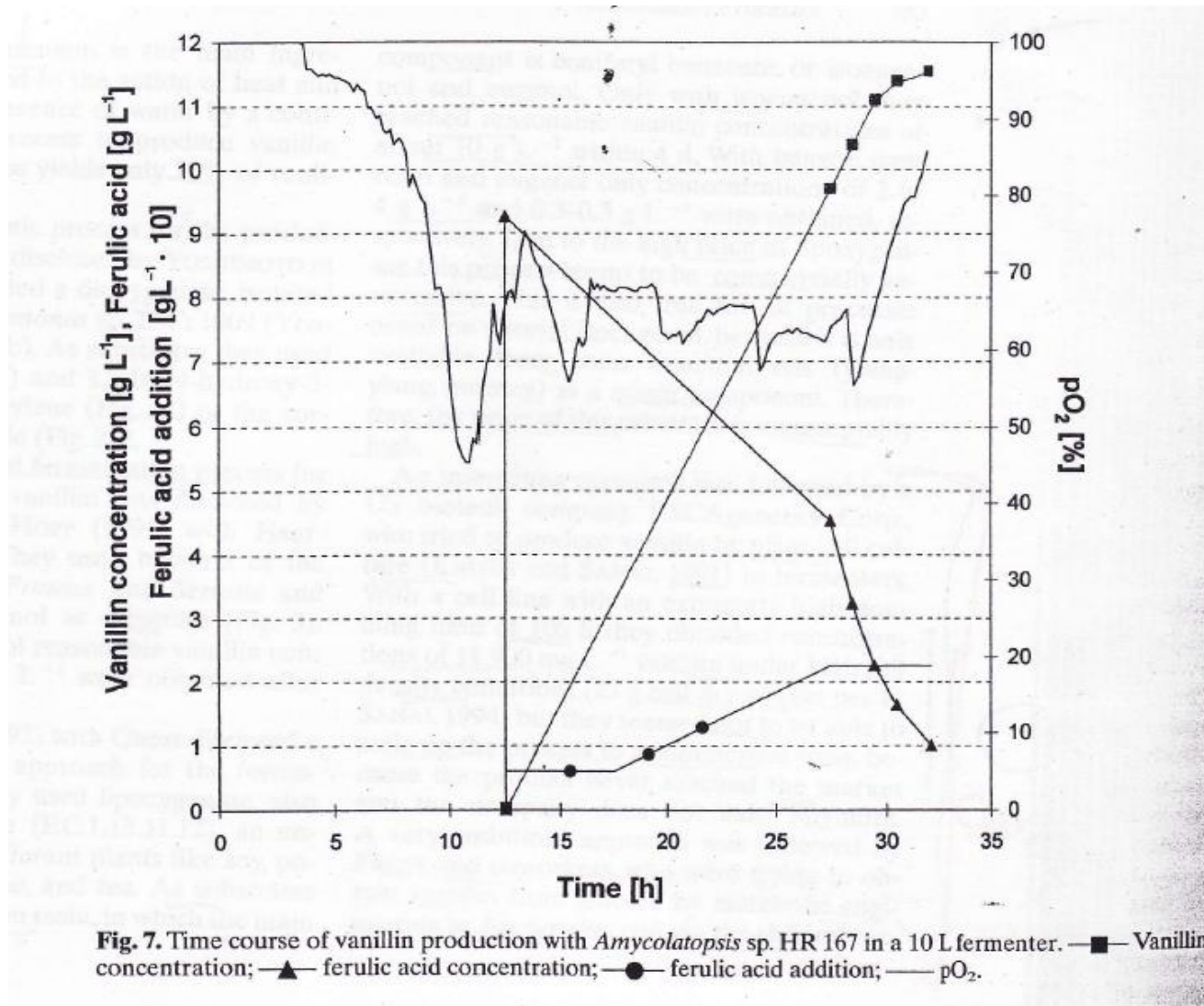


Fig. 4. Production of ferulic acid by *Pseudomonas sp. HR 199*. ▲ Eugenol addition; × eugenol concentration; * ferulic acid concentration; ◆ coniferyl alcohol concentration; ■ vanillic acid concentration.

- Il a été possible d'obtenir 12 g/L de vanilline à partir de l'acide férulique en 32 h avec une souche d'*Amycolatopsis* sp. HR 167 (rendement molaire de ca. 80 %) (Rabenhorst, 2000)



IV.2. Production du 2-phénylethanol

Le 2-phénylethanol (2-PE) avec son odeur « rose » est recherché en industrie alimentaire et parfumerie.

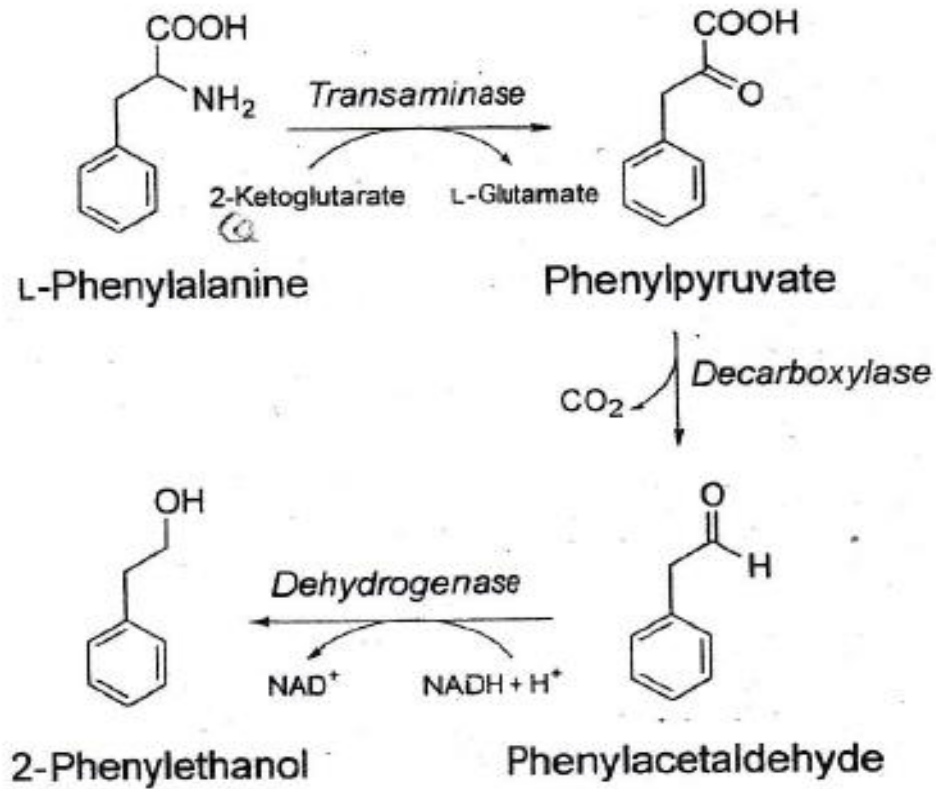
Le marché mondial de cette molécule est de l'ordre de 7000 tonnes/an.

Le composé de synthèse le plus utilisé de nos jours

L'HE de la rose peut contenir jusqu'à 60 % (v/v) en 2-phénylethanol.

➤ Le 2-phénylethanol peut être produit par des levures à partir de la phénylalanine

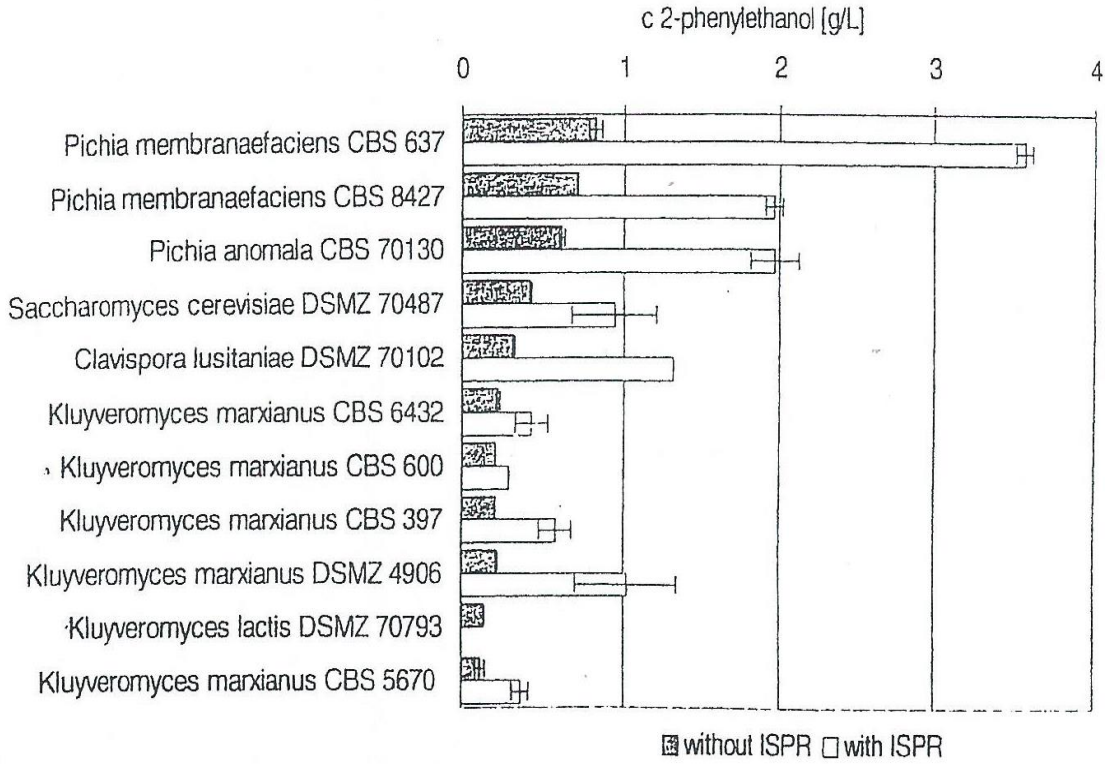
Biosynthèse de 2-phénylethanol à partir de l-phénylalanine (mécanisme Ehrlich)



Production du 2-PE par des levures (Etschmann et al., 2005)

1. Production en erlenmeyer

Plusieurs souches de levures (*Pichia, Saccharomyces, Kluyveromyces...*) ont été testés lors d'une fermentation dans les erlenmeyers. Afin d'éviter la toxicité de 2-PE formé, la fermentation a eu lieu aussi en 2-phases : 70 mL milieu de culture+30 mL d'alcool oléique (d=0,898). L'alcool oléique est utilisé pour piéger le 2-PE formé (voir figure : ISPR= in situ product removal, c.a.d le milieu+alcool oléique). légende without ISPR= le milieu de culture sans alcool oléique



En l'absence d'alcool oléique dans le milieu, la concentration en 2-PE a été de 0,1 à 0,8 g/L (voir les barres without ISPR)

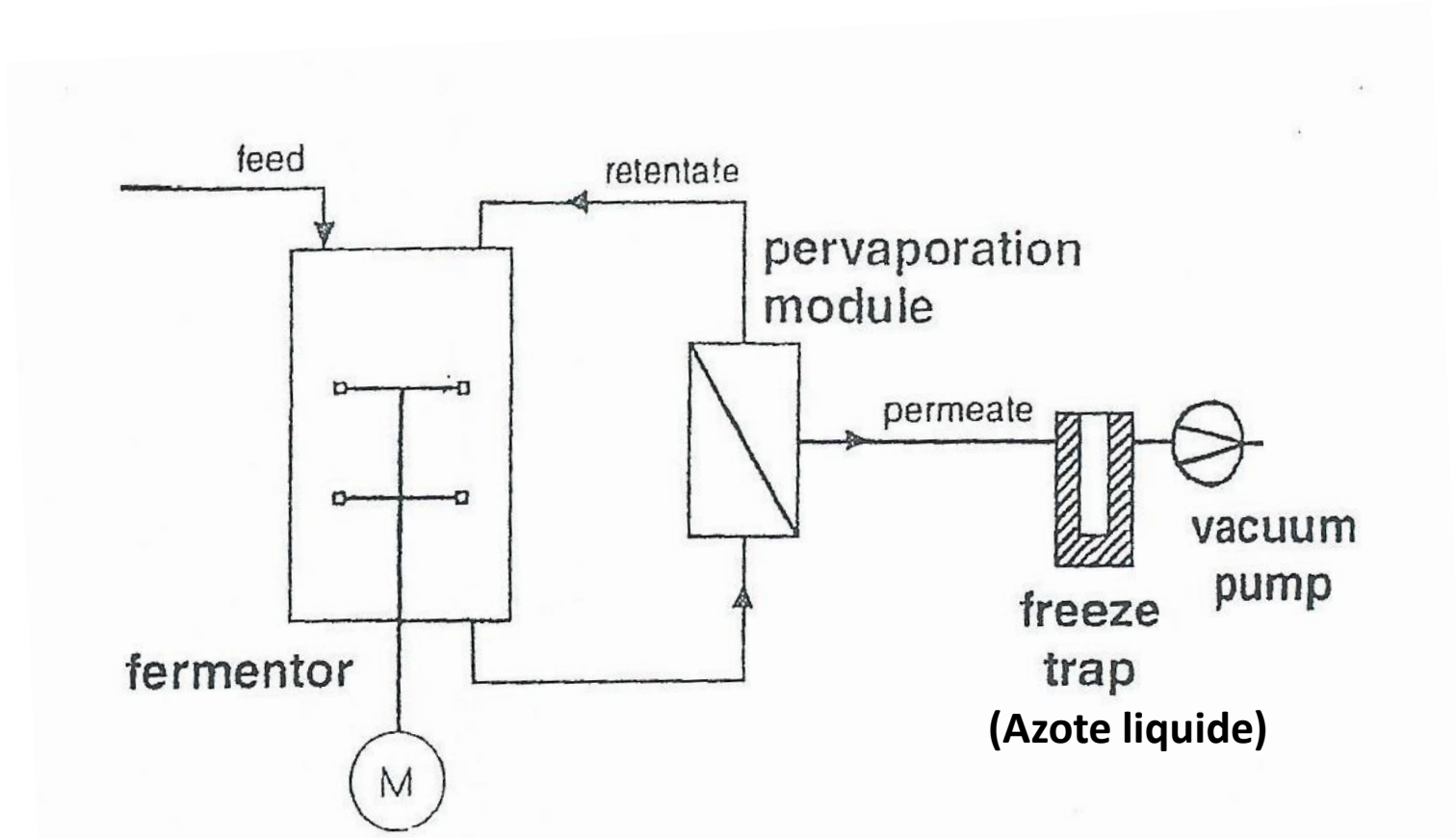
En présence d'alcool oléique, la synthèse de 2-PE a augmenté d'un facteur de 1 à 4.

K. Lactis DSMZ 70793 ne s'est pas développé en présence d'alcool oléique, donc pas de synthèse de 2-PE.

➤ **La meilleure synthèse a eu lieu avec *P. membranaefaciens* (3,6 g/L)**

Figure 2. Maximum concentration of 2-phenylethanol obtained by different yeast strains at 35°C in synthetic medium in shake-flasks.

2. Production du 2-PE par la levure *P.membranaefaciens* couplée à un module de « pervaporation »



- La membrane de pervaporation : polyoctylmethyloxane (POMS)

Effet de l'élimination du 2-PE formé au cours de la culture par pervaporation sur la croissance et sur la synthèse du 2-PE

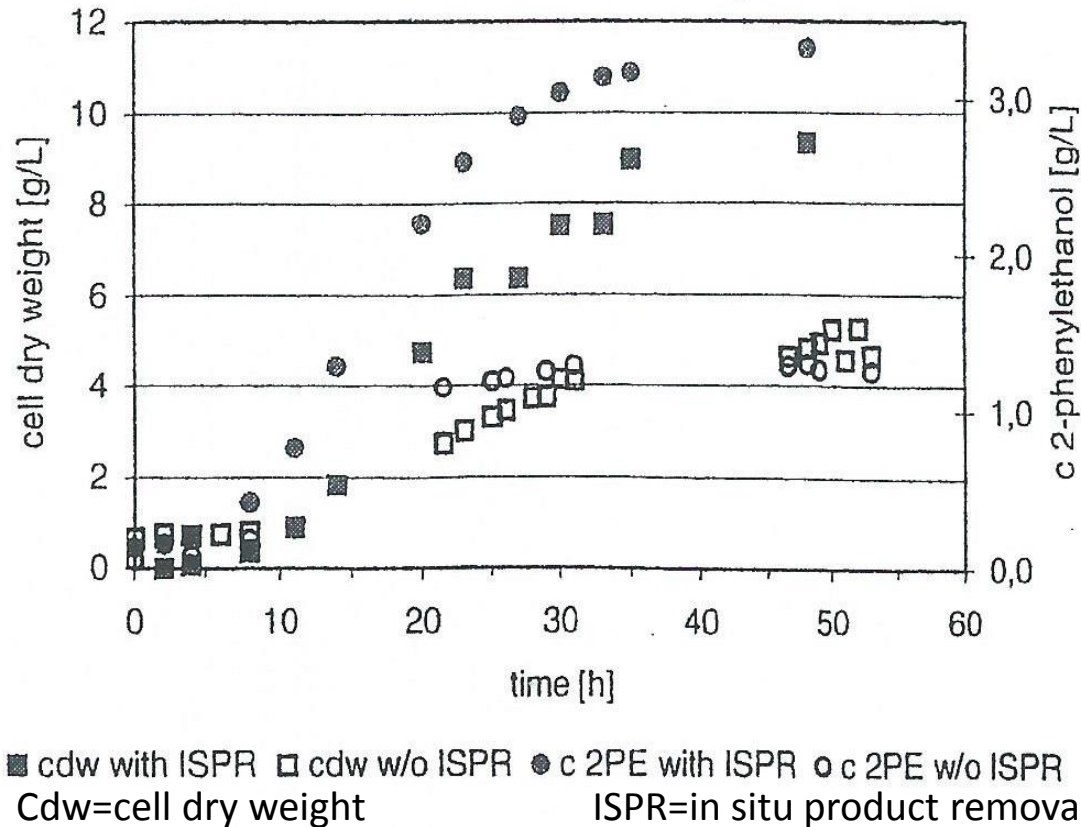


Figure 3. Growth and 2-phenylethanol production of *Pichia membranaefaciens* CBS 637 at 35°C in a bioreactor with and without ISPR by organophilic pervaporation.

L'élimination du milieu du 2PE par la technique de pervaporation a permis de doubler la biomasse (cdw) et d'augmenter la synthèse de 2PE par un facteur de 2.5.

➤ La concentration en 2PE est passée de 1,3 g/L à 3,3 g/L grâce à la technique de pervaporation.