



**HAL**  
open science

# Etudes sur la voie de dégradation de l'alpha-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide/ liquide

Denis Linares

► **To cite this version:**

Denis Linares. Etudes sur la voie de dégradation de l'alpha-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide/ liquide. Génie des procédés. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2008. Français. NNT : 2008CLF21840 . tel-00730189

**HAL Id: tel-00730189**

**<https://theses.hal.science/tel-00730189>**

Submitted on 7 Sep 2012

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

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

*ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA  
SANTÉ*

N° d'ordre : 482

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

**GÉNIE DES PROCÉDÉS**

soutenue le 09 juillet 2008

**DENIS LINARES**

---

**Etudes sur la voie de dégradation de l' $\alpha$ -pinène chez  
*Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide**

---

Président : **M. GROS Jean-Bernard, Professeur, Univ. Blaise Pascal**

Membres : **M. LARROCHE Christian, Professeur, Univ. Blaise Pascal**

**M. SAGORIN Gilles, Dérivés Résiniques et Terpéniques (DRT)**

Rapporteurs : **M. PANDEY Ashok, Professeur NIIST/CSIR, Trivandrum (Inde)**

**M. PAIN Jean-Pierre, Professeur, Univ. Montpellier II, Montpellier**



## REMERCIEMENTS

Les travaux présentés ont été réalisés au Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique de l'Université Blaise Pascal, dirigé par Monsieur Claude-Gilles DUSSAP. Je tiens à le remercier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Christian LARROCHE, professeur au CUST-Université Blaise Pascal et directeur de mon travail de thèse, pour l'aide et les conseils précieux qu'il m'a apporté tout au long de ma thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur Pierre FONTANILLE, maître de conférence au CUST-Université Blaise Pascal pour son soutien et ses conseils quotidiens ainsi que pour l'aide importante qu'il m'a apportée au cours de la réalisation de ce manuscrit et durant toutes ces années.

Je remercie Monsieur Jean-Pierre PAIN, professeur à l'Université de Montpellier II et Monsieur Ashok PANDEY, professeur à l'Université indienne de Trivandrum qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Monsieur Jean-Bernard GROS, professeur à l'Université Blaise Pascal et Gilles SAGORIN, responsable recherche et développement des dérivés terpènes chez Dérivés Résiniques et Terpéniques qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique ainsi que toutes les personnes qui ont participé à ce travail. Merci en particulier à Thierry GEFFLAUT, Philippe MICHAUD et Fabrice GROS, maîtres de conférence à l'Université Blaise Pascal pour leur implication et leurs conseils avisés. Merci également à David DUCHEZ, Bérangère FARGES, Céline LAROCHE, Daniela MARTINEZ, Laurent POUGHON et Damien VENT pour leur collaboration technique. Merci enfin à Akhilesh, Erell, Gwendoline, Issa, Juliano, Lamia, Maryline, Merhdad et tous les autres qui, par leur sympathie, ont créé une ambiance amicale durant mon travail de thèse.

Enfin je tiens à remercier l'ensemble des mes amis et de ma famille pour leur soutien sans faille. Merci tout particulièrement à mon père et à Caroline de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) tout au long de ma thèse.



# Sommaire

---



**Introduction ..... 1**

**Chapitre I. Etude bibliographique ..... 5**

<i>I.1. Les arômes et parfums</i> .....	7
I.1.1. Définitions.....	7
I.1.2. Structures moléculaires des arômes et parfums .....	9
I.1.3. Les terpènes et terpénoïdes .....	11
I.1.4. Biogenèse des molécules aromatiques.....	13
I.1.5. Production des arômes et parfums par voie biotechnologique .....	17
<i>I.2. Biotransformations- Bioconversions</i> .....	20
I.2.1. Définitions.....	20
I.2.2. Avantages des bioconversions .....	20
I.2.3. Les biocatalyseurs .....	21
I.2.3.1. Les transformations enzymatiques.....	21
I.2.3.2. Les biotransformations par les microorganismes .....	23
I.2.3.2.1. Intérêts - Caractéristiques .....	23
I.2.3.2.2. Choix du microorganisme.....	24
<i>I.3. Optimisation des procédés de bioconversion</i> .....	25
I.3.1. Présentation générale .....	25
I.3.2. Augmentation de la disponibilité en précurseur .....	27
I.3.2.1. Biodisponibilité.....	27
I.3.2.2. Enveloppe cellulaire et perméabilisation .....	27
I.3.3. Augmentation de la quantité et de l'activité du biocatalyseur .....	29
I.3.3.1. Production du biocatalyseur.....	29
I.3.3.2. Préservation du biocatalyseur .....	32
I.3.3.3. Augmentation de l'activité du biocatalyseur .....	33
I.3.4. Accumulation du produit de bioconversion .....	36
<i>I.4. Bioconversions et milieux non conventionnels</i> .....	37
I.4.1. Milieux comportant une phase gazeuse .....	37
I.4.2. Milieux comportant un fluide supercritique .....	38
I.4.3. Milieux comprenant un liquide ionique.....	39
I.4.4. Milieux biphasiques eau / solvant organique.....	41
I.4.4.1. Solvants organiques miscibles à l'eau .....	41
I.4.4.2. Solvants organiques non miscibles à l'eau .....	41
I.4.4.2.1. Principes .....	41
I.4.4.2.2. Transferts de masse et émulsion .....	43
I.4.4.2.3. Toxicité moléculaire du solvant organique.....	43
I.4.4.2.4. Inactivation interfaciale eau / solvant organique.....	45
<i>I.5. Biotransformation des terpènes et terpénoïdes.....</i>	51
I.5.1. Difficultés liées à la bioconversion des terpènes .....	51
I.5.2. Activité biologique des terpènes et terpénoïdes.....	52
I.5.3. Exemples de biotransformations.....	53
I.5.4. Biotransformation des pinènes.....	57
I.5.4.1. Les voies générales de dégradation des pinènes .....	57

I.5.4.2. La voie de dégradation de l'α-pinène en composés « novas ».....	59
I.5.4.3. Production de l'isonovalal .....	63
I.5.4.4. Production de l'acide novalique.....	65
<i>I.6. Généralités sur la famille des Pseudomonadaceae</i> .....	67
I.6.1. Introduction.....	67
I.6.2. Taxonomie du genre <i>Pseudomonas</i> .....	69
I.6.3. Métabolisme des terpénoïdes par <i>Pseudomonas</i> .....	70
I.6.4. <i>Pseudomonas rhodesiae</i> CIP 107491 .....	71
<b>Chapitre II. Matériels et Méthodes</b> .....	<b>73</b>
<i>II.1. Production, traitement et purification du biocatalyseur</i> .....	75
II.1.1. Conservation de la souche bactérienne.....	75
II.1.2. Production du biocatalyseur .....	75
II.1.2.1. Milieux de culture.....	75
II.1.2.2. Préculture.....	77
II.1.2.3. Culture en fiole Erlenmeyer.....	77
II.1.2.4. Culture en fermenteur .....	77
II.1.3. Analyses effectuées sur le milieu de culture.....	79
II.1.3.1. Estimation de la biomasse .....	79
II.1.3.2. Dosage des ions ammonium.....	79
II.1.3.3. Dosage des protéines .....	80
II.1.3.3.1. Méthode au bleu de Coomassie .....	80
II.1.3.3.2. Méthode de Lowry modifiée selon Peterson.....	80
II.1.3.4. Dosage des acides aminés.....	80
II.1.3.5. Dosage des sucres, des acides organiques et des alcools par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	82
II.1.3.6. Mesure du CO <sub>2</sub> dégagé .....	82
II.1.3.7. Dosage des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	83
II.1.4. Concentration de la biomasse .....	83
II.1.5. Traitements de la biomasse.....	84
<i>II.2. Purification de l'α-pinène oxyde lyase</i> .....	86
II.2.1. Principe de la séparation.....	87
II.2.2. Préparation de l'extrait brut.....	87
II.2.3. Chromatographie échangeuse d'ions .....	87
II.2.4. Chromatographie par gel filtration .....	88
II.2.5. Electrophorèse en conditions dénaturantes.....	89
II.2.6. Zymographie.....	89
II.2.7. Densitométrie.....	91
<i>II.3. Bioconversions en milieu biphasique</i> .....	91
II.3.1. Bioconversions en fiole Erlenmeyer.....	91
II.3.2. Bioconversions en bioréacteur.....	92
II.3.2.1. Production et récupération de l'isonovalal .....	92
II.3.2.2. Production et récupération de l'acide novalique .....	92
II.3.3. Analyses effectuées sur le milieu de bioconversion .....	93

II.3.3.1. Analyse de la phase organique .....	93
II.3.3.2. Analyse de la phase aqueuse .....	94
II.3.3.3. Identification des produits par spectrométrie de masse (MS) .....	94
II.3.3.4. Identification des produits par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	94
II.3.3.5. Evaluation de la perméabilisation des cellules .....	95
<i>II.4. Caractérisation de l'isonovalal</i> .....	95
II.4.1. Purification de l'isonovalal .....	95
II.4.2. Analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	95
II.4.3. Spectrophotométries ultraviolet (UV) et infrarouge (IR) .....	97
II.4.4. Mesure de la masse volumique .....	97
II.4.5. Mesure de la solubilité à 25°C .....	97
II.4.6. Mesure de la température d'ébullition .....	99
II.4.7. Mesure de l'indice de réfraction .....	99

## **Chapitre III. Propriétés physico-chimiques de l'isonovalal et influence sur les constituants du milieu réactionnel ..... 101**

<i>III.1. Introduction</i> .....	103
<i>III.2. Purification de l'isonovalal</i> .....	103
III.2.1. Production et purification de l'isonovalal .....	103
III.2.2. Contrôle de la pureté de l'isonovalal .....	107
III.2.2.1. Mise en évidence de la dégradation thermique de l'isonovalal .....	107
III.2.2.2. Correction de la méthode de quantification de l'isonovalal par CPG .....	109
III.2.3. Conclusions - Discussions .....	111
<i>III.3. Identification et caractérisation physico-chimique de l'isonovalal</i> .....	113
III.3.1. Spectrométrie .....	113
III.3.1.1. Analyses spectrophotométriques .....	113
III.3.1.2. Analyses par Spectrométrie de Masse (SM) .....	115
III.3.1.3. Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	117
III.3.1.4. Conclusions .....	117
III.3.2. Caractérisation physico-chimique de l'isonovalal .....	119
III.3.2.1. Mesure de la densité .....	119
III.3.2.2. Indice de réfraction .....	121
III.3.2.3. Température d'ébullition et température de fusion .....	121
III.3.2.4. Estimation de la pression de vapeur saturante .....	123
III.3.2.5. Estimation de la tension de surface .....	125
III.3.2.6. Détermination de la solubilité et du coefficient d'activité à dilution infinie dans l'eau .....	125
<i>III.4. Etude des réactions abiotiques</i> .....	131
III.4.1. Phénomènes de dégradation chimique .....	133
III.4.1.1. Dégradation chimique de l'isonovalal .....	133
III.4.1.2. Dégradation chimique de l' $\alpha$ -pinène oxyde .....	135
III.4.1.3. Stabilité de l' $\alpha$ -pinène oxyde en présence d'isonovalal .....	135
III.4.2. Caractérisation des phénomènes de perte par entraînement en fiole Erlenmeyer .....	137

III.4.2.1. Etablissement du modèle.....	137
III.4.2.2. Perte de l'isonovalal par entraînement .....	139
III.4.2.3. Perte de l' $\alpha$ -pinène oxyde par entraînement.....	139
III.4.3. Conclusions .....	141
<i>III.5. Etude de l'effet des produits de la réaction sur l'inactivation du biocatalyseur .....</i>	<i>143</i>
III.5.1. Stabilité du biocatalyseur dans les conditions de bioconversion .....	143
III.5.2. Effet des produits de dégradation abiotique et de l'isonovalal .....	145
<i>III.6. Conclusion générale.....</i>	<i>145</i>
<b>Chapitre IV. Purification et caractérisation de l'<math>\alpha</math>-pinène oxyde lyase de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> CIP 107491 .....</b>	<b>149</b>
<i>IV.1. Introduction .....</i>	<i>151</i>
<i>IV.2. Extraction de la lyase .....</i>	<i>151</i>
IV.2.1. Perméabilisation des membranes cellulaires par traitements mécaniques. <b>Erreur ! Signet non défini.</b> 153	
IV.2.2. Libération de la lyase dans le milieu extracellulaire.....	155
IV.2.3. Conclusions .....	155
<i>IV.3. Purification et caractérisation structurale de l'<math>\alpha</math>-pinène oxyde lyase .....</i>	<i>157</i>
IV.3.1. Purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase.....	157
IV.3.2. Estimation de la masse moléculaire .....	159
IV.3.3. Séquençage partiel de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase .....	161
IV.3.3.1. Séquençage des acides aminés N-terminaux de la lyase.....	161
IV.3.3.2. Analyse de la lyase par spectrométrie de masse Maldi-Tof.....	163
IV.3.3.3. Séquençage partiel d'un peptide de la lyase .....	163
IV.3.4. Conclusions - Discussions .....	165
<i>IV.4. Stabilité de l'<math>\alpha</math>-pinène oxyde lyase en condition biphasique.....</i>	<i>165</i>
IV.4.1. Stabilité de l'enzyme purifiée .....	165
IV.4.2. Quantification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par zymographie .....	167
IV.4.3. Activité de la lyase et niveau de purification .....	169
IV.4.4. Inactivation interfaciale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase .....	169
IV.4.5. Effet protecteur des constituants de la biomasse.....	171
IV.4.6. Conclusions .....	173
<i>IV.5. Caractérisation cinétique de l'<math>\alpha</math>-pinène oxyde lyase .....</i>	<i>173</i>
IV.5.1. Vitesses initiales et limitations par les transferts à l'interface .....	173
IV.5.1.1. Considérations préliminaires.....	173
IV.5.1.2. Correction des limitations par les transferts à l'interface.....	177
IV.5.2. Conclusions - Discussions .....	181
<i>IV.6. Caractérisation de l'inactivation de l'<math>\alpha</math>-pinène oxyde lyase.....</i>	<i>183</i>
IV.6.1. Estimation du turn-over de l'enzyme .....	183
IV.6.2. Inactivation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par l'isonovalal .....	185
IV.6.2.1. Effet de l'isonovalal sur l'activité initiale et sur le turn-over de la lyase purifiée .....	185

IV.6.2.2. Effet temps et concentration-dépendant de l'isonovalal sur l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase.....	187
IV.6.2.3. Effet interfacial-dépendant de l'isonovalal .....	189
IV.6.3. Conclusions - Discussions .....	191
<i>IV.6. Induction de l'<math>\alpha</math>-pinène oxyde lyase par la source de carbone.....</i>	<i>193</i>
IV.6.1. Quantification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase dans la biomasse .....	195
IV.6.2. Influence de la source de carbone en préculture .....	197
IV.6.3. Influence de la source de carbone utilisée en culture.....	199
IV.6.4. Influence des procédés de production du biocatalyseur.....	201
IV.6.5. Conclusions - discussions .....	202
<i>IV.7. Conclusions du chapitre .....</i>	<i>202</i>
<b>Chapitre V. Production des métabolites acides de la voie métabolique des composés « novas » .....</b>	<b>205</b>
V.1. Introduction .....	207
V.2. Etude de faisabilité .....	209
V.2.1. Bioconversions mettant en œuvre un biocatalyseur en phase de croissance.....	209
V.2.2. Bioconversions mettant en œuvre un biocatalyseur concentré en phase stationnaire .....	213
V.2.2.1. Introduction .....	213
V.2.2.2. Bioconversion de l' $\alpha$ -pinène par des cellules non proliférantes.....	213
V.2.2.3. Bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par des cellules non proliférantes.....	215
V.2.2.4. Identification et stabilité des métabolites produits .....	215
V.2.2.5. Déroulement d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde .....	221
V.2.3. Conclusions de l'étude de faisabilité.....	221
V.3. Croissance cellulaire et induction du biocatalyseur .....	223
V.3.1. Introduction .....	223
V.3.2. Choix de la source de carbone.....	223
V.3.3. Mise à l'échelle du procédé de culture .....	225
V.3.3.1. Etude préliminaire .....	225
V.3.3.2. Influence du temps culture .....	227
V.3.3.3. Effet de la limitation par l'oxygène.....	229
V.3.4. Conclusions - Discussions.....	229
V.4. Optimisation des conditions de bioconversion .....	233
V.4.1. Introduction .....	233
V.4.2. Concentration initiale en $\alpha$ -pinène oxyde.....	233
V.4.3. Activité et viabilité de la biomasse.....	235
V.4.4. Mise à l'échelle du procédé de bioconversion .....	235
V.4.4.1. Etude préliminaire .....	235
V.4.4.2. Effet de l'agitation.....	237
V.4.4.3. Conclusions .....	239
V.4.5. Nature du substrat de bioconversion .....	239
V.4.5.1. Utilisation de l'isonovalal .....	241
V.4.5.2. Utilisation du novalal .....	243

V.4.5.3. Conclusions - Discussions.....	243
V.4.6. Toxicité des métabolites et préservation de la viabilité du biocatalyseur .....	245
V.4.6.1. Toxicité des métabolites .....	245
V.4.6.2. Renouvellement du biocatalyseur .....	247
V.4.6.2.1. <i>Fed- batch de biomasse</i> .....	247
V.4.6.2.2. <i>Effet de la concentration initiale en biocatalyseur</i> .....	247
V.4.6.3. Renouvellement de la phase organique .....	249
V.4.7. Conclusions sur l'optimisation des conditions de bioconversion .....	249
V.5. <i>Conclusion générale</i> .....	251
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>257</b>
<b>Nomenclature.....</b>	<b>263</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>269</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>289</b>
<b>Publications.....</b>	<b>317</b>

## Liste des tableaux et figures

---



## Liste des tableaux

**Tableau I.a.** Nomenclature des composés terpéniques. P.12.

**Tableau I.b.** Extrait du décret du 11/04/1991, issu de la directive CEE numéro 88/388, relative aux arômes destinés à être employés dans les denrées alimentaires. P.16.

**Tableau I.c.** Forces motrices poussant à la production d'arômes par voie biotechnologique. P.18.

**Tableau I.d.** Exemples d'arômes produits par voie microbiologique par fermentation ou par biotransformation. P.22.

**Tableau I.e.** Les traitements de perméabilisation membranaire. P. 28.

**Tableau I.f.** Cofacteurs souvent requis pour les biotransformations et méthodes de régénération *in situ* couramment employées. P.34.

**Tableau I.g.** Résumé des paramètres enzymatiques et réactionnels ayant une influence sur les phénomènes d'inactivation interfaciale. P.48.

**Tableau I.h.** Solubilité dans l'eau à 25°C,  $S_w$ , coefficient d'activité à une dilution infinie dans l'eau,  $\gamma_w^\infty$ , et pression de vapeur de plusieurs terpènes et terpénoïdes. P. 50.

**Tableau I.i.** Caractéristiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de différentes souches bactériennes. P.64.

**Tableau I.j.** Liste des espèces du genre *Pseudomonas sensu stricto*. P.68.

**Tableau II.a.** Composition et élaboration du Milieu de Base pour *Pseudomonas* (MBP). P.74.

**Tableau III.a.** Etude préliminaire déterminant le choix de l'éluant utilisé au cours de la purification de l'isonovalal par chromatographie liquide sur gel de silice. P.104.

**Tableau III.b.** Taux de récupération de l'isonovalal au cours des étapes de production et de purification de l'isonovalal. P.110.

**Tableau III.c.** Longueur d'onde d'adsorption maximale dans l'UV de l'isonovalal dilué dans différents solvants. P. 112.

**Tableau III.d.** Déplacements chimiques par rapport au TMS obtenu lors de l'analyse par RMN du  $^{13}\text{C}$  de l'échantillon purifié. P.116.

**Tableau III.e.** Estimation de la densité de l'isonovalal par des méthodes de calcul empiriques. P.118.

**Tableau III.f.** Estimation de la température d'ébullition de l'isonovalal (1 atmosphère) par différentes méthodes de calcul empiriques. P.120.

**Tableau III.g.** Estimation du logarithme du coefficient de partition dans un système eau / octanol ( $\log K_{ow}$ ) de l'isonovalal à 25°C P.126.

**Tableau III.i.** Estimation de la solubilité de l'isonovalal dans l'eau ( $S_{w,1}$ ) à 25°C. P.126.

**Tableau III.j.** Détermination expérimentale de la solubilité de l'isonovalal et de la R(+)-carvone par mesure CPG. P 128.

**Tableau III.k.** Estimation des constantes physico-chimiques de l'isonovalal. P.130.

**Tableau III.l.** Analyses par RMN du  $^{13}\text{C}$  du produit de dégradation abiotique de l'isonovalal. P.132.

**Tableau III.m.** Propriétés physico-chimiques du substrat, du produit de bioconversion et du solvant organique employé. P.136.

**Tableau III.n.** Estimation des constantes de vitesse de dégradation abiotique (k) et de perte par entraînement ( $\alpha$ ) du substrat et du produit de la réaction biocatalytique. P.140.

**Tableau V.o.** Calcul des rendements apparents de la réaction de bioconversion en fonction des phénomènes abiotiques pris en compte. P. 142.

**Tableau III.p.** Liste des produits de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal mis en évidence et des inhibiteurs connus de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. P.144.

**Tableau III.q.** Influence des produits abiotiques et biotiques sur l'activité du biocatalyseur. P.144.

**Tableau IV.a.** Efficacité des procédés de perméabilisation de la biomasse. P.152.

**Tableau IV.b.** Efficacité des procédés d'extraction de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. P.154.

**Tableau IV.c.** Tableau de purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.158.

**Tableau IV.d.** Résultat du BLAST sur *Genbank* pour la séquence N-terminale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P. 160.

**Tableau IV.e.** Résultat du BLAST sur *Genbank* pour la séquence interne de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.162.

**Tableau IV.f.** Caractéristiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de différentes souches bactériennes.

**Tableau IV.g.** Activité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase (concentration relative maximale en isonovalal produit) selon son niveau de purification et après incubation dans les conditions de bioconversion (en présence ou non d'une phase organique). P.166.

**Tableau IV.h.** Activité spécifique de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée et en présence des constituants de la biomasse. P. 168.

**Tableau IV.i.** Estimation des coefficients de partage de l' $\alpha$ -pinène oxyde dans un système biphasique eau / hexadécane. P. 180.

**Tableau IV.j.** Comparaison des constantes cinétiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase provenant de différentes souches bactériennes et selon le procédé utilisé (enzyme purifiée ou au sein de la biomasse perméabilisée). P. 182.

**Tableau IV.k.** Effet de l'isonovalal sur le turn-over et sur l'activité initiale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. P.184.

**Tableau IV.l.** Turn-over de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de différentes souches de *Pseudomonas* selon le mode d'emploi. P. 190.

**Tableau IV.m.** Effets des conditions de préculture sur la production spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en fiole Erlenmeyer. P. 196.

**Tableau IV.n.** Effets des conditions de préculture et de culture sur la production spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en fiole Erlenmeyer. P.198.

**Tableau IV.o.** Effets des conditions de préculture et de culture sur la production spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en bioréacteur. P.200.

**Tableau V.a.** Identification par spectrométrie de masse des métabolites intermédiaires de la dégradation de l' $\alpha$ -pinène. P.211.

**Tableau V.b.** Résultats de l'analyse de la composition de la biomasse effectuée par le C.N.R.S après 9 h de croissance. P.212.

**Tableau V.c.** Bilan carbone au bout de 7 h de culture. P. 212.

**Tableau V.d.** Bilan azote au bout de 7 h de culture. P. 212.

**Tableau V.e** Analyses par RMN du  $^{13}\text{C}$  du produit acide de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par des cellules fraîches de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.218.

**Tableau V.f** Analyses par RMN du  $^1\text{H}$  des produits acides de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par des cellules fraîches de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.218.

**Tableau V.g.** Influence de la source de carbone utilisée en culture sur les paramètres de production de l'acide novalique par bioconversion. P.222.

**Tableau V.h.** Influence de la durée de la culture en bioréacteur sur l'aptitude de la biomasse à accumuler de l'acide novalique au cours de la bioconversion. P.226.

**Tableau V.i.** Influence de la limitation par l'oxygène en cours de culture sur l'induction de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase et sur l'aptitude de la biomasse à accumuler de l'acide novalique au cours de la bioconversion. P.230.

**Tableau V.j.** Comparaison des performances de production d'acide novalique lors de la mise à l'échelle du procédé. P. 236.

**Tableau V.k.** Bilans carbone établis au cours des bioconversions. P. 238.

**Tableau V.l.** Bioconversions de l'isonovalal réalisées en fiole Erlenmeyer. P. 240.

**Tableau V.m.** Bioconversions du novalal en fiole Erlenmeyer et en bioréacteur. P. 242.

## Liste des figures

- Figure I.1.** Exemples d'arômes aliphatiques. P.8.
- Figure I.3.** Molécule d'isoprène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). P.10.
- Figure I.2.** Exemples d'arômes de différentes classes chimiques. P.10.
- Figure I.4.** Les voies de biosynthèse des terpènes. P.12.
- Figure I.5.** Dégradation des acides gras par β-oxydation et formation de divers composés aromatiques dans les fruits et légumes. P.14.
- Figure I.6.** Dissolution et biodisponibilité d'un précurseur solide selon les conditions environnementales. P.26.
- Figure I.7.** Modèle actuel de la régulation des enzymes de la voie métabolique de dégradation des alcanes chez *Pseudomonas putida* GPo1. P.30.
- Figure I.8 :** Représentation schématique du déroulement d'une bioconversion en milieu biphasique avec un solvant organique non miscible à l'eau. P.40.
- Figure I.9 :** Activité d'un microorganisme au cours d'une réaction en milieu biphasique en fonction du log K<sub>OW</sub> du solvant organique utilisé. P.44
- Figure I.10.** Inactivation de la trypsine par le tridécane en fonction de l'aire interfaciale eau / tridécane. P.44.
- Figure I.11.** Représentation schématique du mécanisme d'inactivation interfaciale des enzymes à l'interface. P.46.
- Figure I.12.** Principales voies de biotransformations du limonène par des microorganismes. P.54.
- Figure I.13.** Biotransformation du valencène en nootkanone via l'α- et/ou le β-nootkatol par des cellules de *Gynostemma pentaphyllum*. P.56.
- Figure I.14.** Les voies générales de dégradation de l'α- et du β-pinène. P.58.
- Figure I.15.** Synthèse des voies de dégradation de l'α-pinène en composés de type « nova » par des souches de type *Pseudomonas*. P.60.
- Figure I.16.** Détail de l'étape de β-oxydation. P.62.
- Figure I.17.** Schéma réactionnel de décyclisation de l'α-pinène oxyde par l'α-pinène oxyde lyase. P.64.
- Figure I.18.** L'Acide novalique, une molécule structurellement proche de l'acide géranique, utilisée dans l'industrie des parfums. P.66
- 
- Figure II.1.** Schéma détaillé du réacteur B Braun. P.76.
- Figure II.2.** Schéma du montage expérimental utilisé pour la production du biocatalyseur. P.76.
- Figure II.3.** Schéma récapitulatif des étapes impliquées dans la mise en place des cultures de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Les bouchons obturant les fioles sont en mousse de polyuréthane. P.78.
- Figure II.4.** Résumé des différents traitements appliqués à la biomasse avant l'étape de bioconversion. P.84.
- Figure II.5.** Résumé des différents traitements appliqués à la biomasse congelée. P.86.
- Figure II.6.** Etapes de la purification de l'α-pinène oxyde lyase. P.88.
- Figure II.7.** Schéma récapitulatif des opérations impliquées lors de la mise en place des bioconversions en conditions biphasiques. P.90.
- Figure II.8.** Protocole utilisé pour la détermination de la solubilité dans l'eau de l'isonovalal. P.96.
- Figure II.9.** Appareillage utilisé pour la détermination de la température d'ébullition de l'isonovalal. P.98.

**Figure III.1.** Concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde consommé, en isonovalal produit et en produits totaux formés au cours d'une bioconversion par 25 mL de cellules congelées et perméabilisées à l'éther (6 % v/v) de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.102.

**Figure III.2.** Plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) de l'isonovalal. P. 104.

**Figure III.3.** Chromatogramme de l'isonovalal purifié pour une température de l'injecteur à 250°C et 85°C. P.106.

**Figure III.4.** Chromatogramme de l' $\alpha$ -pinène oxyde pour une température de l'injecteur à 250°C et 85°C. P.106.

**Figure III.5.** Corrélation entre les concentrations en isonovalal et en  $\alpha$ -pinène oxyde mesurées par CPG pour 2 conditions de températures de l'injecteur (85°C et 250°C). P.108.

**Figure III.6.** Corrélation entre la concentration en isonovalal théorique et la concentration en isonovalal expérimentale. P.108.

**Figure III.7.** Concentration en isonovalal produit en fonction de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde consommé sans prendre en compte la dégradation thermique de l'isonovalal et avec correction. P.110.

**Figure III.8.** Spectre d'absorption de l'échantillon purifié dans l'IR. P.112.

**Figure III.9.** Spectre de masse de l'échantillon purifié obtenu par impact électronique. P.114.

**Figure III.10.** Spectre de masse de l'isonovalal. P.114.

**Figure III.11.** Spectre de masse du novalal. P.114.

**Figure III.12.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'isonovalal purifié. P.116.

**Figure III.13.** Estimation de la densité de l'isonovalal. P.118.

**Figure III.14.** Estimation de la température d'ébullition de l'isonovalal par analyse CPG. P.122.

**Figure III.15.** Estimation de la température d'ébullition de l'isonovalal ( $T_b$ ) par distillation à travers une colonne de Vigreux. P.122.

**Figure III.16.** Détermination expérimentale de la solubilité de l'isonovalal et de la R(+)-carvone par lecture de l'absorbance à 242 nm. P.128.

**Figure III.17.** Evolution de la concentration en isonovalal au cours d'une incubation en condition biphasique tampon phosphate / hexadécane et production de l'acide. P.132.

**Figure III.18.** Dégradation de l' $\alpha$ -pinène oxyde au cours d'une incubation en condition biphasique et production de l' $\alpha$ -campholenal, du *trans*-carveol, du *trans*-sobrerol ainsi que des produits non identifiés possédant des temps de rétention de 9,5 et 11,2min. P.134.

**Figure III.19.** Concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde et en isonovalal au cours d'incubations séparées des 2 molécules ou combinées. P.134.

**Figure III.20.** Détermination de la constante  $\alpha$  de l'isonovalal. P.138.

**Figure III.21.** Détermination du rendement réel de la réaction de bioconversion. P.140.

**Figure III.22.** Activité de la biomasse perméabilisée après une période d'incubation à 30°C, agité à 200 rpm en présence et en absence d'hexadécane. P.142

**Figure III.23.** Inactivation du biocatalyseur au cours d'incubations en présence d'isonovalal. P.146.

**Figure IV.1.** Profil d'élution de la colonne DEAE Cephacel. Absorbance à 280 nm, dilution de l'éluant ( $\text{KCl } 1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). P.156.

**Figure IV.2.** Profil d'élution de la colonne Superdex 75. P.156.

**Figure IV.3.** Séparation par électrophorèse des extraits issus des étapes de purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en condition non dénaturante et en condition dénaturante. P.158.

**Figure IV.4.** Calibration de la colonne gel-filtration (Superdex 75). P.160.

**Figure IV.5.** Spectre Maldi-Tof d'une fraction obtenue suite à la séparation par CLHP des peptides issus de la digestion trypsique de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. P.162.

**Figure IV.6.** Exemple de courbe de calibration obtenue par zymographie et photo du gel associé. P.166.

**Figure IV.7.** Evolution de la concentration en lyase soluble au cours de l'incubation, en présence ou en absence d'hexadécane. P.170.

**Figure IV.8.** Evolution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase soluble et de la concentration en isonovalal produit au cours d'une bioconversion en condition biphasique. P.170.

**Figure IV.9.** Isonovalal produit au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde par 0,11 mg d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase contenue au sein d'un extrait cellulaire ou sous forme purifiée, en absence et en présence de SAB. P.172.

**Figure IV.10.** Schéma de la composition et des transferts entre phases au cours d'une bioconversion en condition biphasique liquide / liquide de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. P.174.

**Figure IV.11.** Evolution de la vitesse initiale de production de l'isonovalal en fonction de la quantité de lyase présente dans le milieu réactionnel. P.176.

**Figure IV.12.** Photographie de l'émulsion eau / hexadécane et vitesse initiale de production de l'isonovalal mesurées après 30 min de bioconversion en présence de Triton X100 5,7 % v/v et 11,4 % v/v. P.176

**Figure IV.13.** Masse spécifique d'isonovalal produit (en mg d'isonovalal produit par mg de lyase) au cours de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par de la biomasse perméabilisée et de la lyase purifiée en absence de Triton X100. P.178.

**Figure IV.14.** Détermination des constantes cinétiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491 par la méthode de Eadie-Hofstee. P.178.

**Figure IV.15.** Evolution de la quantité maximale d'isonovalal produit en fonction de la quantité de lyase présente dans le milieu réactionnel. P.184.

**Figure IV.16.** Effet de l'isonovalal sur l'activité de 0,05 mg d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en fonction du temps de contact et en fonction de la concentration initiale en isonovalal dans phase organique. P.186

**Figure IV.17.** Corrélation entre la vitesse d'inactivation de 0,05 mg d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase et la concentration en isonovalal dans la phase organique au cours de l'incubation précédant la bioconversion. P.186.

**Figure IV.18.** Production de l'isonovalal et perte d'activité théorique au cours d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par 0,05 mg de lyase purifiée. P.188.

**Figure IV.19.** Evolution de la concentration en protéines solubles dans la phase aqueuse et de la concentration en isonovalal dans la phase organique en condition biphasique eau / hexadécane avant et pendant la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par un extrait cellulaire filtré. P.188.

**Figure IV.20.** Evolution de la concentration en SAB soluble en fonction du temps, au contact d'une interface eau / hexadécane seul, eau / hexadécane contenant de l' $\alpha$ -pinène oxyde et eau / hexadécane contenant de l'isonovalal. P.190.

**Figure IV.21.** Corrélation entre les concentrations en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase mesurée dans la biomasse par deux méthodes différentes de quantification activité-dépendantes. P.194.

**Figure IV.22.** Exemple de courbe de calibration obtenue par la méthode du bleu de Coomassie et gel associé. P.194.

**Figure IV.23.** Corrélation entre la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase mesurée dans différentes biomasses perméabilisées par deux différentes méthodes de quantification. P.196.

**Figure IV.24.** Consommation des sources de carbone et production de biomasse pendant une culture en réacteur de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.200.

**Figure V.1.** Schéma de dégradation de l' $\alpha$ -pinène via les composés « novas ». Les flèches en pointillés représentent des étapes métaboliques encore mal définies. P.206.

**Figure V.2.** Consommation des sources de carbone, consommation de la source d'azote et production de biomasse au cours d'une culture en réacteur de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.208.

**Figure V.3.** Production de CO<sub>2</sub>, pression partielle en oxygène dissous et pH au cours de la culture présentée dans la figure V.2. P.208.

**Figure V.4.** Production d' $\alpha$ -pinène oxyde, d'isonovalal, de novalal et d'acide 3,4-diméthylpentanoïque au cours d'une culture en réacteur de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491. P.210.

**Figure V.5.** Accumulation des métabolites intermédiaires dans la phase organique après 24 h de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène par 25 mL de biomasse fraîche concentrée dans du milieu MBP ou dans du tampon phosphate. P.214.

**Figure V.6.** Accumulation des métabolites intermédiaires dans la phase organique après 24 h de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène-oxyde par 25 mL de biomasse fraîche concentrée dans du milieu MBP ou dans du tampon phosphate. P.214.

**Figure V.7.** Chromatogrammes obtenus par analyse de CPG de la phase organique au cours de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde après 8 h de bioconversion et après 24 h de bioconversion. P.216.

**Figure V.8.** Spectre de masse de l'acide 2-méthyle-5-isoproylhexa-2,5-dienoïque. P.216

**Figure V.9.** Stabilité de l'isonovalal, du novalal et de l'acide novalique en condition biphasique eau / hexadécane et en présence de biomasse inactive. P.219.

**Figure V.10.** Consommation de l' $\alpha$ -pinène oxyde et accumulation de l'isonovalal, du novalal, de l'ADMP et de l'acide novalique au cours d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde. P.220.

**Figure V.11.** Evolution des concentrations en biomasse, en azote minéral, en  $\alpha$ -pinène et de la pression partielle en oxygène PO<sub>2</sub> mesurées du cours du temps pour une croissance en bioréacteur de 4,5 L. P.224.

**Figure V.12.** Evolution des concentrations en biomasse, en azote minéral et en  $\alpha$ -pinène mesurées au cours d'une croissance en fiole Erlenmeyer de 2 L. P.224.

**Figure V.13.** Evolution de la concentration en biomasse et de la pression partielle en oxygène mesurées du cours du temps pour une série de cultures en bioréacteur. P.226.

**Figure V.14.** Evolution des concentrations en biomasse, en azote minéral, en  $\alpha$ -pinène et de la pression partielle en oxygène PO<sub>2</sub> mesurées du cours d'une croissance en bioréacteur de 4,5 L. P.228.

**Figure V.15.** Evolution des concentrations en biomasse, en azote minéral, en  $\alpha$ -pinène et de la pression partielle en oxygène PO<sub>2</sub> mesurées du cours du temps pour une croissance en bioréacteur. P.228.

**Figure V.16.** Proposition d'un schéma d'induction des enzymes de la voie métabolique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 selon les conditions de culture appliquées. P.230.

**Figure V.17.** Influence de la concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde sur la concentration maximale, la vitesse et le rendement de production de l'acide novalique. P.232.

**Figure V.18.** Evolution des concentrations en  $\alpha$ -pinène oxyde, en isonovalal, en novalal, en acide novalique et en ADMP mesurées au cours d'une bioconversion en fiole Erlenmeyer. P.232.

**Figure V.19.** Aspect des cellules de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491 non perméabilisées et perméabilisées après coloration au bleu de Méthylène. P.234.

**Figure V.20.** Influence de la concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde sur le temps de perméabilisation de cellules de *P.rhodesiae* dans des conditions de bioconversion en fiole Erlenmeyer. P.234.

**Figure V.21.** Evolution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde, en isonovalal, en novalal, en ADMP et en acide novalique au cours d'une bioconversion réalisée en bioreacteur de 1,5 L de volume utile. P.236.

**Figure V.22.** Influence de la vitesse d'agitation sur la concentration maximale, la vitesse et le rendement de production de l'acide novalique. P. 238.

**Figure V.23.** Bioconversion de l'isonovalal en novalal, en ADMP et en acide novalique en fiole Erlenmeyer de 250 mL. P. 240.

**Figure V.24.** Bioconversion de l'isonovalal en novalal , ADMP, en acide novalique et en CO<sub>2</sub>. P. 242.

**Figure V.25.** Concentration en acide novalique produit au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde en condition biphasique. P. 244.

**Figure V.26.** Evolution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde, en isonovalal , en novalal , en ADMP et en acide novalique au cours d'une bioconversion en réacteur pour laquelle des ajouts de biomasse sont effectuées. P. 244.

**Figure V.27.** Performances obtenues au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde en fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse à différentes concentrations initiales. P. 246.

**Figure V.28.** Accumulation de l'acide novalique dans la phase organique au cours des bioconversions décrites dans la figure. P.246.

**Figure V.29.** Accumulation de l'acide novalique au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde en fiole Erlenmeyer de 250 mL avec et sans renouvellement de la phase organique. P. 248.

**Figure V.30.** Schéma proposé de dégradation de l' $\alpha$ -pinène par *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. P.252.

**Figure V.31.** Bioconversion de l'acide novalique en ADMP. P.254.

# Introduction

---



L'utilisation de biocatalyseurs dans les processus d'obtention de produits finis à haute valeur ajoutée constitue un des domaines où les sciences du vivant sont susceptibles de trouver un aboutissement industriel. Dans le marché très convoité des arômes et des parfums, les biotransformations permettent de produire des composés possédant le label « naturel », à la plus-value commerciale indéniable. Dans le domaine pharmaceutique, elles interviennent dans la synthèse de molécules complexes, présentant une stéréochimie définie, dont l'obtention par des procédés chimiques classiques s'avère difficile. Les biotechnologies présentent enfin un intérêt grandissant dans le secteur de l'environnement, aussi bien dans le cadre de la dépollution des sols par certains microorganismes, que dans un souci de développement durable. En effet, contrairement à l'industrie chimique qui puise traditionnellement ses précurseurs de synthèse dans les ressources pétrolières épuisables, les biotechnologies utilisent des ressources naturelles renouvelées en permanence.

Les terpènes font partie de ces précurseurs renouvelables abondamment représentés dans la nature. On les trouve notamment en quantité importante dans les huiles essentielles extraites de plantes ou de fruits. En plus de leurs propriétés organoleptiques particulièrement intéressantes, de plus en plus d'études mettent en évidence des activités thérapeutique, antibactérienne, antivirale et anticancéreuse significatives. Ces propriétés sont en général encore plus marquées chez les dérivés oxydés que sont les terpénoïdes. L' $\alpha$ -pinène, extrait de l'écorce de pin, constitue la première source naturelle de terpènes présente sur le marché. Il apparaît ainsi, avec ses dérivés, comme un précurseur idéal dans les procédés de production biocatalytique de terpénoïdes, possédant une forte valeur ajoutée.

Dans cette optique, les travaux précédents de FONTANILLE et LARROCHE (2003), réalisés au Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, ont permis d'optimiser la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en *cis*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal ou isonovalal, une molécule aux propriétés aromatiques potentiellement intéressantes. Les bioconversions sont effectuées en milieu biphasique tampon phosphate / hexadécane. Le biocatalyseur utilisé est constitué de cellules perméabilisées de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, une souche bactérienne isolée et identifiée au cours de cette même étude, capable de dégrader l' $\alpha$ -pinène selon la voie métabolique encore mal définie des composés «novas ». Le procédé ainsi mis au point a permis une production particulièrement efficace de 400 g.L<sup>-1</sup> en 2,5 h de réaction avec un rendement alors estimé à 75 % (à partir de 25 g.L<sup>-1</sup> de biomasse). Les résultats ont montré que l'arrêt de la bioconversion était lié à une inactivation irréversible de l'enzyme responsable de la réaction de bioconversion, l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase.

Le travail présenté s'inscrit dans la suite des ces travaux. L'étude vise, dans un premier temps, à expliquer le mécanisme d'inactivation irréversible de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase et les 25 % manquant au bilan de bioconversion de façon à envisager des méthodes permettant une amélioration supplémentaire du procédé de bioconversion. Dans un deuxième temps, l'étude s'intéresse aux étapes suivantes de la voie métabolique, situées en aval de la décyclisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. L'objectif est d'étudier la faisabilité de l'utilisation de la même souche bactérienne pour la production d'autres métabolites intermédiaires appartenant à la voie des composés « novas », potentiellement intéressants pour l'industrie des parfums. Ces métabolites sont l'acide *trans*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoïque (acide novalique) et, dans une moindre mesure, l'acide 3,4-diméthylpentanoïque (ADMP).

Après une étude bibliographique (chapitre I), les techniques mises en œuvre pour la réalisation et le suivi des expériences sont présentées (chapitre II). Les deux chapitres suivants sont consacrés à l'étude des acteurs de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. La production, la purification et la caractérisation du produit de bioconversion (l'isonovalal) et de l'enzyme responsable de la réaction (l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase) sont présentées respectivement dans les chapitres III et IV. Une attention particulière est apportée à l'étude des interactions entre ces deux composés. Le chapitre V comporte une étude plus globale de la voie métabolique des composés « novas ». Parallèlement à l'identification des étapes initiales de cette voie, une étude de faisabilité de la production d'acide novalique et d'ADMP par des cellules fraîches de *P.rhodesiae* est réalisée. Cette étude est suivie de la mise au point et de l'optimisation d'un procédé de production de l'acide novalique.

# I. Etude bibliographique

---



## I.1. Les arômes et parfums

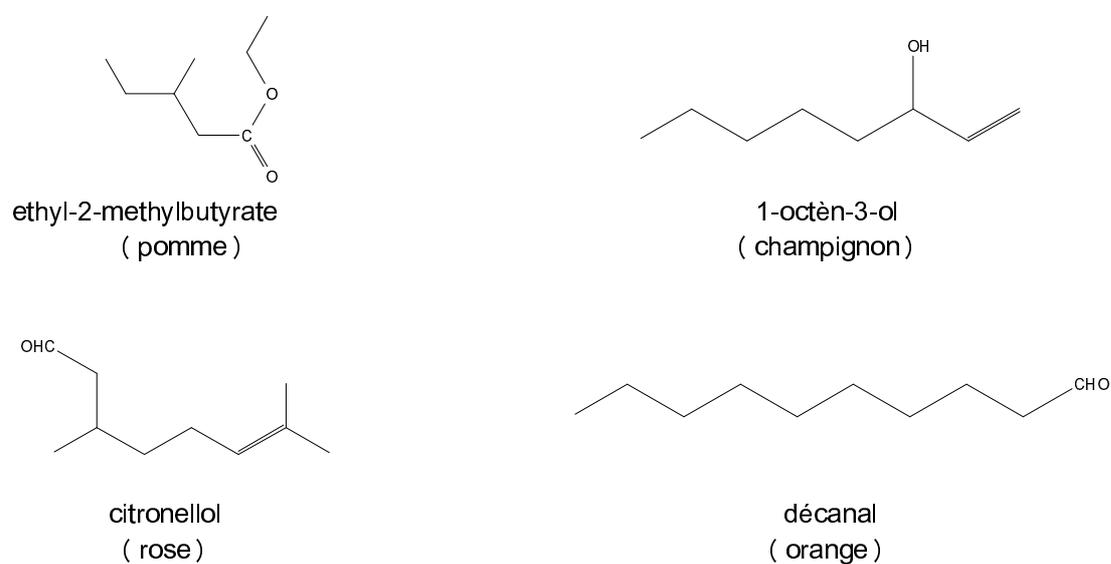
### I.1.1. Définitions

Un produit alimentaire contient de nombreux composés odorants, que l'on peut percevoir de deux manières, soit par voie nasale directe, ce qui caractérise l'odeur, soit par voie rétronasale lorsque l'aliment est placé dans la bouche, ce qui donne naissance à l'arôme. Ces composés, que l'on désigne sous le même nom d'arômes, sont des molécules organiques odorantes de faible masse moléculaire (<400 Da) dont la tension de vapeur à la pression atmosphérique et à la température ambiante est suffisamment élevée pour que ces dernières se retrouvent à l'état de vapeur dans l'atmosphère gazeuse à une concentration suffisante pour pouvoir, au contact de la muqueuse olfactive, provoquer un stimulus (RICHARD et MULTON, 1992). Les arômes n'apportent ni contribution nutritive ni effet vitaminique à un aliment. Ils ne représentent qu'une part infime de la composition des viandes, des fruits et des légumes où leur concentration est souvent de l'ordre de 50 ppm. Cependant, ils peuvent représenter 1 % massique de la composition de certaines herbes aromatiques et jusqu'à 20 % massique dans les épices et aromates.

Le terme parfum ou fragrance concerne plus spécifiquement les arômes agissant par voie nasale directe. Même si beaucoup de composés sont désignés à la fois comme arômes et parfums, une certaine distinction est communément reconnue ; les composés aromatiques sont généralement des molécules naturellement présentes dans les matières comestibles alors que beaucoup de parfums sont d'origine synthétique (FAHLBUSCH et al., 2005).

Il n'existe pas de marchés séparés des arômes d'une part et des parfums d'autre part mais un marché commun (« Flavors and fragrances market ») représentant plusieurs milliards d'euros. Les créateurs de molécules aromatiques, à l'origine confinés au domaine de l'industrie des parfums, ont rapidement élargi leurs compétences aux secteurs des cosmétiques, des préparations pharmaceutiques et surtout de l'industrie alimentaire (de nombreux exemples seront présentés dans la suite de l'étude). Ainsi, parmi les quelques 8000 arômes connus (NIJSSEN et al., 1999), environ 2500 sont utilisés comme additifs alimentaires dans les produits laitiers, les glaces, les confiseries, les biscuits, les salaisons, les sauces, les soupes, les plats cuisinés, etc...

Le terme *flaveur* est un néologisme issu de mot anglais « *flavour* », originellement défini comme l'impression résultant de la stimulation simultanée des sens de l'odorat mais



**Figure I.1.** Exemples d'arômes aliphatiques (FAHLBUSCH et al., 2005).

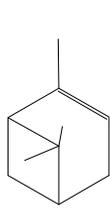
également du goût (WICK et al., 1965). Il possède aujourd'hui un sens plus large et concerne également le sens du toucher (texture des aliments, impression en bouche), de la vue (couleur et aspect des aliments) ainsi que d'autres impressions comme l'astringence, les sensations de fraîcheur et de pseudo chaleur (BERGER, 1995). L'étude présentée ne traitera que des molécules stimulant le sens de l'odorat (arômes et parfums).

### I.1.2. Structures moléculaires des arômes et parfums

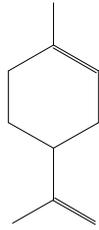
Le mélange chimique constituant l'arôme d'un aliment peut comporter jusqu'à 1000 molécules. Un grand nombre des composés contribuant à l'arôme global de l'aliment ne présente cependant pas toujours un rôle majeur. La note aromatique typique du produit alimentaire est souvent attribuée à seulement quelques uns de ces composés. Les paragraphes suivants donneront des exemples de molécules responsables d'un arôme ou parfum particulier. Ces composés peuvent être regroupés en cinq catégories selon leur structure chimique : les composés aliphatiques, cycliques, cycliques aromatiques, les phénols et les hétérocycles. Au sein de chaque catégorie, les molécules sont classées en fonction de leur groupe fonctionnel.

Les hydrocarbures aliphatiques sont abondamment présents dans les aliments mais contribuent peu à leur arôme (**figure I.1**), à l'exception de quelques molécules hautement insaturées. Le 1,3-*trans*-5-*cis*-undecatriène contribue notamment à la « note verte » de l'huile de *galbanum*. Les alcools aliphatiques sont généralement beaucoup plus utilisés ; le 1-octène-3-ol possède par exemple une forte odeur caractéristique de champignon. D'autres composés terpéniques comme le linalool, le géraniol et le citronellol sont appréciés pour leur odeur florale. Les aldéhydes aliphatiques à chaîne moyenne (C8-C13) sont utilisés dans la plupart des parfums et des arômes (le décanal, par exemple, possède une odeur d'orange). Le fait qu'ils possèdent des doubles liaisons ou qu'ils aient des chaînes carbonées branchées semble décupler leur arôme. Le 2-*trans*-6-*cis*-nonadiénal, composé dominant de l'essence de concombre, fait ainsi partie des arômes les plus puissants (WEE et al., 1994). La classe des cétones aliphatiques comprend l'acétoïne et la 2,3-butanedione (arôme de beurre) ainsi que les méthyl cétones, une famille de molécules responsables de l'arôme caractéristique des fromages à pâte persillée. Les acides aliphatiques accentuent certains arômes de fruits ou de fromages mais contribuent faiblement, du moins sous leur forme brute, à l'élaboration des arômes. Ils sont par contre une matière première de choix dans la production d'esters aliphatiques. Ces derniers permettent l'élaboration des arômes et parfums de la plupart des

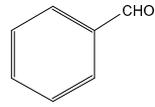
## I. Etude bibliographique



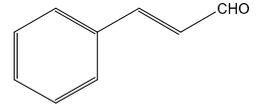
$\alpha$ -pinène  
( pin )



limonène  
( citron )

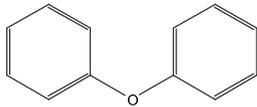


benzaldéhydes  
( amande amère )

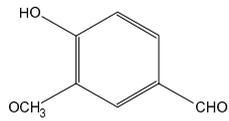


cinnamaldéhyde  
( cannelle )

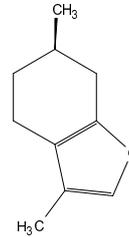
### composés cycliques



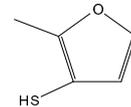
thymol  
( thym )



vanilline  
( vanille )



menthofurane  
( menthe )



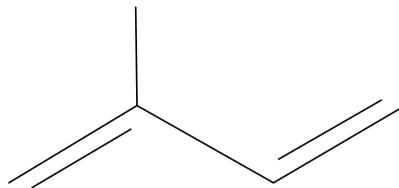
methyl-2-furanthiol  
-3 ( rosbeef )

### composés cycliques aromatiques

### composés phénolés

### hétérocycles

**Figure I.2.** Exemples d'arômes de différentes classes chimiques (FAHLBUSCH et al., 2005).



**Figure I.3.** Molécule d'isoprène ( $C_5H_8$ ).

fruits comme l'éthyle 2-*trans*-4-*cis*-decadienoate (poire Williams), l'éthyle 2-methylbutyrate (pomme) ou le 2-propenyl hexanoate (ananas) (FAHLBUSCH et al., 2005).

Les composés cycliques hydrocarbonés sont très présents dans les huiles essentielles et contribuent largement à leur odeur comme le limonène (essence de citron) ou les pinènes (essence de pin) (**figure I.2**). Les alcools cycliques sont généralement peu utilisés à l'exception de quelques molécules très recherchées comme le menthol (odeur de menthe) et le 5-(2,2,3-triméthyl-3-cyclopenten-1-yl)-3-methylpentan-2-ol (molécule synthétique imitant l'odeur du bois de santal). Les cétones cycliques occupent une place de choix dans l'industrie des parfums avec de nombreux composés comme la 1,7,7-triméthyle-bicyclo[2.2.1]heptan-2-one (ou camphre), la carvone (présent dans les graines de carvi), et la 3-methylcyclopentadec-4/5-en-1-one ou muscénone, imitant l'odeur d'un arôme d'origine animale très convoité, le musc.

Les composés cycliques aromatiques (**figure I.2**), sont également beaucoup employés. Les plus connus sont des aldéhydes comme le cinnamaldéhyde (arôme de cannelle) ou le benzaldéhyde (amande amère). Les alcools aromatiques comme le phenethyle (principal constituant de l'essence de rose), ou certains esters comme l'acétate de benzyle (odeur de jasmin), occupent une place importante dans l'industrie des arômes et des parfums.

Les phénols et leurs dérivés constituent un groupe particulier de composés au sein duquel se trouvent les molécules présentes dans les herbes aromatiques comme le thymol (thym) et l'anéthol (anis). Le composé phénolique le plus connu reste un aldéhyde, la vanilline présente dans les gousses de vanille.

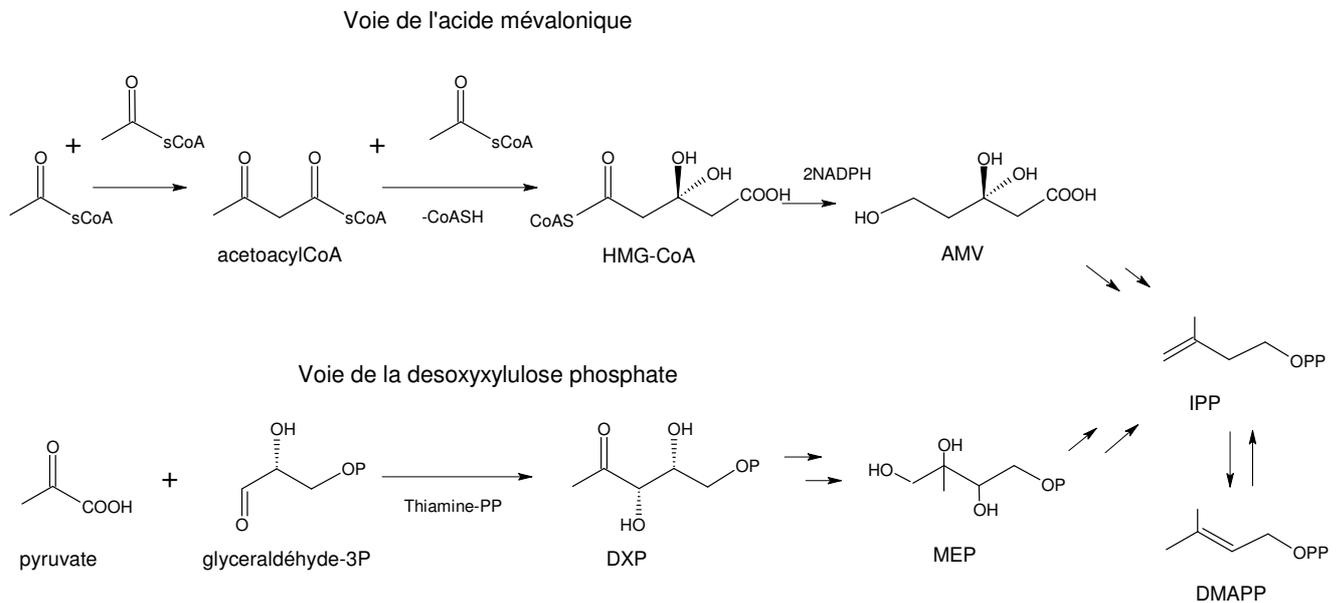
Les hétérocycles oxygénés peuvent être caractéristiques de l'odeur de certaines plantes comme le menthofurane (menthe) ou participer à la saveur globale d'un aliment comme les lactones présentes dans les fruits, les viandes et les produits laitiers. Les hétérocycles soufrés, azotés et mixtes proviennent souvent de réactions thermiques entre un composé de nature glucidique réducteur et un acide aminé ; ils sont généralement responsables des notes de cuit comme les pyrazines.

### I.1.3. Les terpènes et terpénoïdes

Parmi la grande diversité d'arômes et parfums qui viennent d'être présentés, une large proportion peut être regroupée sous le terme de terpènes. En effet, un grand nombre de ces composés possèdent une structure particulière qui peut être décomposée en unités d'isoprène (**figure I.3**). Cette particularité constitue la caractéristique commune à tous les terpènes qui

Valeur de n	Formule brute de dérivés non fonctionnalisés	Nomenclature
1	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	hémiterpènes-hémiterpénoïdes
2	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	monoterpènes-monoterpénoïdes
3	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	sesquiterpènes-sesquiterpénoïdes
4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	diterpènes-diterpénoïdes
5	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub>	sesterpènes-sesterpénoïdes
6	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>	triterpènes-triterpénoïdes
8	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>	tétraterpènes-tétraterpénoïdes
>8		polyterpènes-polyterpénoïdes

**Tableau I.a.** Nomenclature des composés terpéniques, n est le nombre d'unités d'isoprène présentes dans les molécules.



**Figure I.4.** Les voies de biosynthèse des terpènes (selon DEWICK 2002 ; THEIS et LERDAU, 2003).

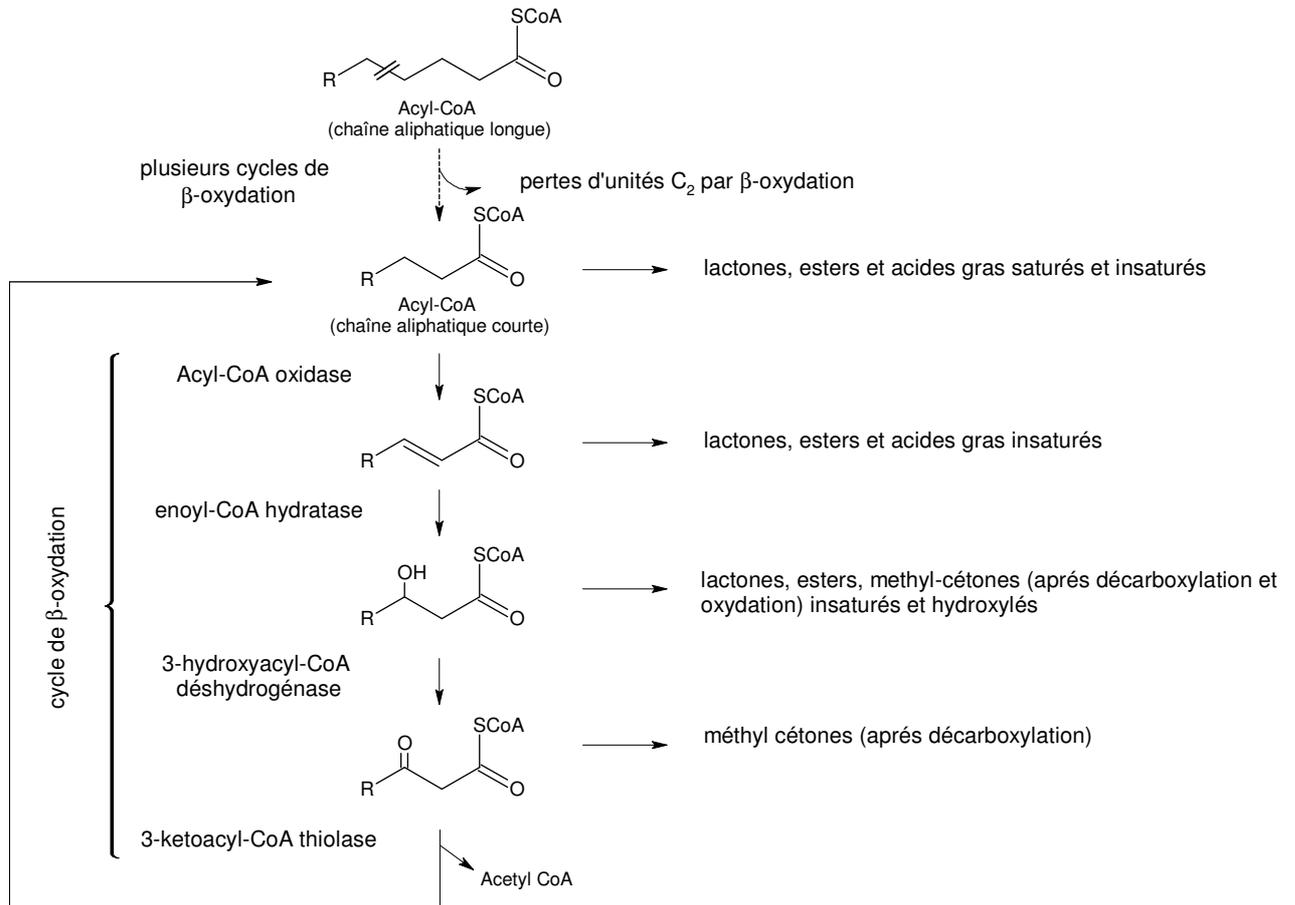
possèdent tous la formule générale  $(C_5H_8)_n$ . Par définition, le terme terpène est réservé aux hydrocarbures ne possédant pas de groupe fonctionnel. Leur classification est basée sur le nombre d'unités d'isoprène présentes dans la molécule (**tableau I.a**). Ils constituent un groupe important de composés carbonés insaturés, hydrophobes et dont la majorité se trouve dans le règne végétal. Ils sont cependant aussi présents chez les insectes (HEROUT, 1970), les microorganismes (COLLINS, 1976) et les organismes marins. Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont notamment très représentés dans les huiles essentielles tirées de fleurs, de fruits ou de feuilles, dont ils constituent le squelette de l'odeur (TESSEIRE, 1991).

Les monoterpènes ( $C_{10}$ ) acycliques, bicycliques voire tricycliques sont largement utilisés dans l'industrie des arômes et des parfums en tant que précurseurs pour la synthèse des terpénoïdes (HORST et PANTEN, 2006). Les terpénoïdes sont des dérivés oxydés des terpènes, contenant des fonctions alcool, aldéhyde, cétone, acide ou époxyde. Ils possèdent souvent des propriétés aromatiques encore plus intéressantes que leurs précurseurs hydrocarbonés.

#### I.1.4. Biogenèse des molécules aromatiques

Quatre grandes classes de mécanismes intervenant dans la formation de la flaveur dans les systèmes alimentaires peuvent être distinguées (SANDERSON et GRAHAM, 1973). La biosynthèse, l'action enzymatique directe, l'action enzymatique indirecte ou oxydative et l'action due à un traitement thermique.

Dans le cas des arômes de fruits et légumes, PERÉZ et al. (1992) suggèrent qu'une partie des arômes est formée au cours des premiers stades de la croissance par les voies de l'anabolisme des acides gras, des acides aminés et des terpènes. Les terpènes, par exemple, proviennent de deux molécules simples à cinq carbones, l'isopropenyl-diphosphate (IPP) et le diméthylallyldiphosphate (DMAPP), utilisés comme précurseurs universels pour la biosynthèse des terpènes. Ils sont biosynthétisés à partir de trois acétylcœzymes A se combinant en acide mévalonique (AMV) *via* la voie métabolique du même nom. Il y a environ une dizaine d'années, une seconde voie de la production de l'IPP et du DMAPP a été découverte menant au 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate (DXP) et au 2-C-méthyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP). Cette voie, appelée voie non mévalonique ou voie du deoxyxylulose phosphate démarre avec la condensation de glyceraldéhyde phosphate et de pyruvate menant au DXP. L'IPP et le DMAPP sont alors formés *via* une série de réactions illustrées dans **figure I.4** (DEWICK 2002 ; THEIS et LERDAU, 2003).



**Figure I.5.** Dégradation des acides gras par  $\beta$ -oxydation et formation de divers composés aromatiques dans les fruits et légumes (CHRISTENSEN et al., 2007).

Au cours de la phase de mûrissement des fruits, les voies du catabolisme deviennent prépondérantes et chaque intermédiaire peut conduire à la synthèse de composés volatils, souvent responsables de la note aromatique typique des fruits (CHRISTENSEN et al., 2007). La dégradation des acides gras *via* la  $\beta$ -oxydation est, par exemple, à l'origine de la formation de nombreux précurseurs de molécules aromatiques (**figure I.5**). Les esters comme l'acétate d'éthyle (possédant une odeur de pomme) sont produits le plus souvent par voie enzymatique à partir d'acyl CoA et d'alcools. Les méthyl-cétones possédant un nombre impair d'atomes de carbone, considérées comme caractéristiques de l'arôme des fromages à pâte persillée, sont également formées à partir de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (**figure I.5**).

Les réactions enzymatiques directes surviennent principalement au cours du processus de vieillissement des tissus. Les parois cellulaires deviennent plus perméables aux différents substrats, les structures se dégradent de telle sorte que les enzymes et leurs substrats peuvent venir en contact et conduire à la formation de composés d'arôme (CROUZET, 1992). Par exemple, l'arôme des plantes du genre *allium* (ciboulette, ail, échalote,...) est dû à la présence de composés soufrés qui n'existent pas dans la plante intacte, mais qui apparaissent lorsque les cellules subissent des processus de destruction (MAARSE, 1991).

Les composés volatils aromatiques produits par réactions enzymatiques indirectes sont issus de précurseurs tels que les acides aminés, les caroténoïdes ou les acides gras insaturés. Ces réactions ont été mises en évidence au cours de la fermentation du thé ou du tabac (SANDERSON et GRAHAM, 1973). La formation de ces composés est issue d'un couplage intervenant entre une réaction enzymatique et une réaction chimique. Ainsi, au cours de la fermentation du thé, le  $\beta$ -carotène peut être transformé en  $\beta$ -ionone et en composés encore non identifiés. Cette réaction ne se produit pas si les enzymes du thé ont été inactivées thermiquement.

La dernière classe de mécanismes comprend les traitements thermiques (cuisson, torréfaction) qui sont à l'origine de réactions chimiques complexes comme la réaction de Maillard ou la dégradation de Strecker. Ces phénomènes sont responsables de l'apparition d'arômes donnant une note de cuit aux aliments dont la majorité sont des hétérocycles inexistant dans les produits frais (MOTTRAM, 2007).

---

**Article 2**

On entend par arôme tout produit ou substance qui, étant destiné à être ajouté à des denrées alimentaires pour leur donner une odeur, un goût, ou une odeur et un goût, entre dans une des catégories suivantes (à l'exception des substances ayant exclusivement un goût sucré, acide ou salé).

**Article 3**

Les arômes sont compris dans les catégories suivantes :

- substances aromatisantes naturelles
- substances aromatisantes identiques aux naturelles
- substances aromatisantes artificielles

**Article 4**

Une substance aromatisante naturelle est une substance chimiquement définie qui est obtenue soit par des procédés physiques appropriés, y compris la distillation et l'extraction au solvant, soit par des procédés enzymatiques ou microbiologiques, à partir d'une matière d'origine végétale ou animale prise en l'état ou après sa transformation pour la consommation humaine par des procédés traditionnels de préparation des denrées alimentaires, y compris le séchage, la torréfaction et la fermentation.

**Article 5**

Une substance aromatisante identique à une substance aromatisante naturelle est une substance chimiquement définie qui est chimiquement identique à une substance aromatisante naturelle après avoir été obtenue par synthèse chimique ou isolée par des procédés chimiques.

**Article 6**

Une substance aromatisante artificielle est une substance chimique définie qui, ayant été obtenue par synthèse chimique, n'est pas chimiquement identique à une substance aromatisante naturelle.

---

**Tableau I.b.** Extrait du décret du 11/04/1991, issu de la directive CEE numéro 88/388, relative aux arômes destinés à être employés dans les denrées alimentaires (VIERLING, 1998).

### I.1.5. Production des arômes et parfums par voie biotechnologique

Pendant des milliers d'années, les hommes se sont servis sans le savoir de procédés microbiologiques pour améliorer la qualité aromatique de nombreux produits alimentaires comme le pain, les fromages, la bière, les vins, etc... Parallèlement, ils profitaient des voies de la biogenèse végétale (voir I.1.4) pour s'accaparer, par des techniques d'extraction rudimentaires, les huiles essentielles à la base des parfums. Les premiers travaux scientifiques relatant de la production d'arômes par des microorganismes datent de 1923 (OMELIANSKI, 1923) mais ce n'est que grâce à l'arrivée de la chimie organique en 1930 et des techniques de chromatographie en phase gazeuse que l'identification systématique des molécules aromatiques d'origine biologique démarre réellement. Dans un premier temps, la synthèse chimique est utilisée pour produire la plupart des molécules aromatiques car les technologies sont moins coûteuses et mieux maîtrisées.

La situation change brusquement au début des années 1980 avec l'apparition d'un engouement important de la part des consommateurs pour les produits dits « naturels ». Les arômes obtenus par voie chimique sont alors relégués en arrière plan, au profit des substances obtenues par voie biologique. Ce mouvement ouvrit la voie au développement des biotechnologies car les techniques dites traditionnelles de production de molécules aromatiques n'étaient pas susceptibles de répondre à cette demande trop importante. Ces dernières décennies, les avancées de la recherche destinées à la production d'arômes par voie microbiologique et enzymatique n'ont eu de cesse de se développer.

Avec plus de 100 molécules présentes sur le marché, la production d'arômes par voie biotechnologique est aujourd'hui reconnue comme étant une discipline arrivée à maturité. La force motrice de celle-ci demeure le label « naturel » et l'inébranlable addiction des consommateurs pour ces produits ; en 2001, le marché total des arômes est estimé à 16 milliard d'euros dont 77 % en moyenne sont représentés par des produits naturels (BERGER et al., 2001).

Il faut cependant remarquer que l'appellation « arôme naturel » attribuée aux produits biotechnologiques dépend directement des lois en vigueur dans les différentes régions du monde. Concernant la législation européenne, c'est la directive 88/388 CE du 22 juin 1988 qui définit la classe des arômes « artificiels », « nature-identiques » et « naturels » (**tableau I.b**). Les arômes produits par voie biotechnologique entrent clairement dans la catégorie des arômes dits « naturels ». Cette directive s'accompagne d'un règlement visant à créer une liste des molécules autorisées sur les différents territoires nationaux des états membres par

« Poussées du marché »	« Poussées technologiques »
Augmentation de la demande des consommateurs pour le « naturel », « bio », « santé »	Grande regio- et stéréo-sélectivité des biocatalyseurs
Dépendance de l'industrie envers les approvisionnements en matières premières naturelles	Les bioprocédés sont adaptés au concept du développement durable
Recherche d'un composé naturel caractéristique d'un fruit ou légume particulier	Optimisation des biocatalyseurs par l'évolution et par les avancées de la science
Recherche de composés aromatiques naturels avec des effets supplémentaires (exemple : antibactérien)	Optimisation des procédés en aval, spécialement les systèmes de récupération et de purification des produits

**Tableau I.c.** Forces motrices poussant à la production d'arômes par voie biotechnologique (SCHRADER, 2007).

l'intermédiaire d'une procédure d'évaluation. L'accèsion à cette dernière peut nécessiter un délai d'un an (règlement 2232/96 du 28 octobre 1996).

Les crises récentes concernant l'alimentation animale et humaine (encéphalite spongiforme bovine, dioxine,...) ont incité les législateurs à changer leurs priorités. Ces dernières, inscrites dans le « livre blanc sur la sécurité alimentaire », visent à regagner la confiance des consommateurs par l'établissement des principes de précaution et de lisibilité accrue (COM (1999) 719 final, non publié à ce jour). Concernant la législation sur les arômes, une mise à jour des listes positives et un durcissement des procédures d'autorisation sont à craindre. Le règlement 622/2002 CE stipule que si l'évaluation d'une molécule précédemment autorisée ne répond pas aux critères d'utilisation, elle sera supprimée du répertoire ; certains arômes comme l'acétamide ont ainsi déjà été retirés du marché (décision 2006/252 CE). De plus, les conditions d'apposition sur l'étiquette du terme « naturel » vont être modifiées par une nouvelle législation qui va abroger la directive 88/3988 CE. Le futur règlement réserve le terme « naturel » aux seules substances ou préparations dérivées directement d'une matière animale ou végétale. Il supprime la mention d'arôme « identique au naturel », qui pouvait créer une confusion chez le consommateur (proposition de règlement COM (2006) 407 final).

Le durcissement de la législation européenne, les pressions compétitives accrues et l'indifférence du marché des parfums aux valeurs du « naturel » poussent les entreprises à réévaluer à la hausse les coûts de production des arômes produits par voie biotechnologique. Ainsi, et malgré la valeur marchande des arômes naturels en moyenne deux fois plus élevée que celle des arômes artificiels ou nature-identiques, beaucoup d'entreprises hésitent encore à franchir le pas.

Récemment, les problèmes liés à la dégradation de l'environnement comme la pollution grandissante et le réchauffement climatique, ont et vont contraindre les industriels à se tourner vers des technologies utilisant des ressources renouvelables. L'industrie chimique, qui puise traditionnellement ses précurseurs de synthèse dans les ressources pétrolières, épuisables, vont devoir s'adapter à la nouvelle donne mondiale. Les biotechnologies, par contre, sont parfaitement adaptées à cette contrainte. En effet, les biocatalyseurs utilisés sont optimisés depuis des millions d'années par l'évolution et plus récemment par les récents progrès de la science (dans les domaines de la protéomique, de la métabolomique et du génie des procédés), à l'utilisation de précurseurs naturels renouvelables. Cette situation, combinant une augmentation de la demande pour les produits biotechnologiques d'une part et une poussée technologique d'autre part (**tableau I.c**), semble réserver un avenir favorable aux biotechnologies dans l'industrie des arômes et des parfums (SCHRADER, 2007).

## **I.2. Biotransformations- Bioconversions**

### **I.2.1. Définitions**

Les biotransformations, également appelées transformations microbiennes ou bioconversions, peuvent être définies comme étant l'utilisation d'un catalyseur biologique pour convertir un substrat ou précurseur en un produit donné selon un nombre limité d'étapes enzymatiques (LARROCHE et al., 2007). Les bioconversions sont utilisées aussi bien pour la synthèse d'arômes alimentaires (KRINGS et BERGER, 1998), que pour la production de molécules ayant un intérêt pharmaceutique (FAUCONNIER et al., 1999). Dans le cas de dégradation de polluants organiques, on ne cherche pas à obtenir un métabolite valorisable et on parle de biodégradation (TROQUET et al., 2003).

### **I.2.2. Avantages des bioconversions**

Les bioconversions, lorsqu'on les compare à des réactions chimiques ont l'avantage d'être régio et stéréo sélectives, ce qui conduit à des produits de forme énantiomérique donnée dont la demande dans les domaines pharmaceutique ou agroalimentaire est importante. Elles sont également très efficaces en terme d'énergie puisqu'elles peuvent avoir lieu à des températures, une pression et un pH modérés. La production des composés est généralement simplifiée par un nombre d'étapes plus restreint (CABRAL, 2001). Comme il a été vu précédemment (voir le paragraphe I.1.5), les bioconversions sont de plus particulièrement adaptées aux nouvelles normes mondiales relative au « développement durable » et au label « naturel » actuellement très recherchés par les institutions politiques et les consommateurs.

Pour obtenir un arôme naturel, les industries ont donc actuellement le choix entre deux systèmes de production que sont les procédés classiques d'extraction à partir de matières premières naturelles, et les bioconversions. La mise en œuvre de réactions de bioconversion permet d'éliminer certaines faiblesses inhérentes aux techniques classiques d'extraction. Il est en effet possible de s'affranchir de facteurs incontrôlables (climatiques, géographiques) qui agissent sur la quantité et la qualité d'arômes extraits de matières premières. Les bioconversions permettent également une autonomie vis-à-vis de l'approvisionnement en matières premières fortement influencé par les saisons notamment dans le cas de végétaux aromatiques. Elles permettent aussi de diminuer les volumes des résidus d'extraction. Enfin, le nombre de molécules constituant un bouquet aromatique naturel est souvent très important,

mais seul un nombre restreint est à l'origine de la sensation olfactive. Or la bioconversion permet d'obtenir spécifiquement ces molécules.

### **I.2.3. Les biocatalyseurs**

Le biocatalyseur employé peut être une cellule entière d'origine animale, végétale ou microbienne. Dans ce dernier cas il est possible d'utiliser des microorganismes eucaryotes comme les champignons filamenteux et les levures ou des organismes procaryotes comme les bactéries (SCHREIER, 1988). Le biocatalyseur peut également être une enzyme déterminée, présente au sein d'un extrait cellulaire ou sous forme purifiée.

La grande diversité des microorganismes autorise de nombreuses réactions enzymatiques au sein d'une large diversité de voies métaboliques. Leur utilisation simple, leur rapidité de croissance et leur facilité d'adaptation à des conditions imposées par des contraintes techniques et économiques sont des atouts supplémentaires qui favorisent leur emploi dans des procédés de biotransformation. L'utilisation de cellules végétales, même si elle comporte plus d'inconvénients que celle d'enzymes ou de microorganismes, peut néanmoins être avantageuse pour la production de métabolites secondaires complexes (SCRAGG, 1997 ; GIRI et al., 2001).

Avec les enzymes, les microorganismes représentent les principaux biocatalyseurs actuellement utilisés et étudiés. Les caractéristiques principales de ces deux catalyseurs sont développées dans les paragraphes suivants.

#### **I.2.3.1. Les transformations enzymatiques**

L'utilisation d'enzyme apparaît comme la plus simple des techniques pour la transformation de molécules aromatiques. On estime le nombre d'enzymes rencontrées dans la nature à 25000 (MENZEL et SCHREIER, 2007). Environ 400 sont commercialisées principalement pour la synthèse de composés organiques notamment dans l'industrie des arômes et des parfums. Un exemple d'application commerciale d'une transformation enzymatique est la production de benzaldéhydes naturels que l'on peut retrouver dans les abricots ou les pêches (CHEETHAM, 1993).

Les enzymes impliquées dans la synthèse de composés aromatiques peuvent être regroupées en six classes, les oxydo-réductases, les transférases, les lyases, les hydrolases, les isomérases et les ligases réparties en fonction de la nature de la réaction qu'elles catalysent. Ces enzymes sont généralement hautement sélectives pour leur substrat, qu'il soit naturel ou

Précurseur	Produit	Microorganisme(s)	Référence(s) bibliographique(s)
<b><i>Fermentation ou biosynthèse « de novo »</i></b>			
-	Acide glutamique	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	SCHMID (2003)
-	Acide citrique	<i>Aspergillus niger</i>	SCHMID (2003), KARAFFA et KUBICEK (2003)
-	Acide lactique	<i>Lactobacillus</i>	SCHMID (2003), BAI et al. (2003)
<b><i>Biotransformation</i></b>			
Ethanol	Acide acétique	<i>Acetobacter, Gluconobacter</i>	SCHMID (2003), EBNER et al. (1996)
Acide férulique	vanilline	<i>Amycolatopsis, Streptomyces</i>	SCHRADER et al. (2004), RABENHORST et HOPP (2000), MUHEIM et al. (1998)
Acide linoléique	(Z)-3-hexénol	Levure de boulanger	MULLER et al. (1995a) MULLER et al. (1995b)
Acide ricinolénique	4-décanoïde	<i>Yarrowia lipolytica</i>	GATFIELD et al. (1997), RABENHORST et GATFIELD (2000)
L-phénylalanine	2-Phényléthanol	<i>Saccharomyces</i>	ETSCHMANN et al. (2005)
Alcool de fusel	Acides carboxyliques à chaîne courte, 3-méthylbutyrate	<i>Gluconobacter, Acetobacter</i>	RABENHORST et al. (2001)

**Tableau I.d** : Exemples d'arômes produits par voie microbiologique par fermentation ou par biotransformation (d'après SCHRADER, 2007).

non, et stéréosélectives dans les réactions catalytiques. Elles peuvent agir dans des conditions expérimentales relativement simples. Mais l'utilisation d'enzymes isolées s'avère malgré tout relativement délicate. L'enzyme, souvent très instable, peut être inhibée par le substrat, les produits ou encore par les constituants du milieu. Les réactions catalysées sont quelquefois réversibles. Certaines enzymes, notamment les oxydases, utilisent des cofacteurs dont les prix sont extrêmement élevés (ce point sera repris plus en détails dans la partie consacrée à l'optimisation de la réaction de bioconversion). Enfin, l'enzyme utilisée doit être disponible commercialement ou purifiée, ce qui entraîne une élévation des coûts de production.

### **I.2.3.2. Les biotransformations par les microorganismes**

#### *I.2.3.2.1. Intérêts - Caractéristiques*

L'utilisation de microorganismes entiers permet de réaliser des transformations complexes sollicitant un ensemble d'enzymes, or il est difficile d'obtenir des résultats satisfaisants lorsque deux enzymes purifiées sont présentes dans le même milieu de bioconversion (FONTANILLE et al., 2005). La production de méthyl-cétones à partir des acides gras est, par exemple, uniquement réalisable à partir de microorganismes entiers (voir le paragraphe I.1.4). De plus, l'utilisation de cellules entières est particulièrement intéressante dans le cadre de réactions d'oxydation souvent réalisées par des enzymes cofacteurs-dépendantes ; le métabolisme cellulaire ou la chaîne respiratoire des microorganismes aérobies peuvent être efficacement employés comme outils de régénération des cofacteurs de type nicotinamide (ce point sera repris dans le paragraphe I.3.3.2). Les microorganismes possèdent également une enveloppe cellulaire ainsi que des constituants intracellulaires stabilisateurs permettant la protection des catalyseurs enzymatiques contre les phénomènes d'inactivation (LEROUX et al., 1997).

Les microorganismes ont longtemps été utilisés de manière empirique pour la production d'arômes par fermentation dans les produits alimentaires (MATHEIS, 1998). Le microorganisme est généralement une cellule en croissance, la production d'arômes a lieu au cours d'une chaîne de réactions complexes à partir d'un précurseur, qui n'est pas toujours identifié avec certitude. Bien que pour une multitude de microorganismes le potentiel métabolique pour cette biosynthèse « de novo » soit immense, les concentrations trouvées dans la nature sont généralement trop faibles pour être exploitées. De plus, la diversité du métabolisme microbien mène souvent à la production d'un large spectre de composés structurellement proches, difficile à séparer. L'exception à la règle concerne les produits issus

du métabolisme primaire des bactéries comme l'acide citrique, l'acide glutamique ou l'acide lactique pour lesquels des procédés de fermentation performants existent (**tableau I.d**).

En plus des problèmes liés à la diversité du métabolisme microbien, la toxicité des précurseurs, souvent rencontrée, constitue un obstacle de taille. Actuellement, la technique de bioconversion la plus utilisée consiste à convertir un précurseur clairement défini par un microorganisme préalablement sélectionné et dont l'activité est orientée vers la production du composé souhaité (SCHRADER, 2007). Cette stratégie, appelée également biotransformation, est employée dans de nombreux procédés industriels de fabrication d'arômes (**tableau I.d**). Elle permet notamment la mise en oeuvre de procédés de bioconversion utilisant des microorganismes non proliférants, ce qui est un avantage important lorsque le précurseur employé est toxique pour les cellules. Deux procédures peuvent alors être utilisées. Dans la première, le précurseur ou substrat est ajouté directement au milieu de croissance au bout d'un temps déterminé de culture. La deuxième technique conduit à la séparation de la biomasse du milieu de croissance par filtration ou centrifugation suivie d'une remise en suspension dans un nouveau milieu réactionnel, conventionnel ou non, où elle sera utilisée pour bioconvertir le précurseur (FONTANILLE, 2005). Le succès de ces techniques de biotransformation passe par une connaissance accrue des propriétés et des possibilités métaboliques du microorganisme utilisé. Il est donc primordial de sélectionner ce dernier avec soin.

#### I.2.3.2.2. Choix du microorganisme

Plusieurs stratégies peuvent être employées pour sélectionner le microorganisme le plus approprié pour la réalisation de la bioconversion. Il est possible de réaliser un « screening » de nouveaux microorganismes, d'utiliser un microorganisme connu déjà existant ou encore de modifier génétiquement une souche afin d'optimiser ses capacités pour la bioconversion.

La sélection de nouveaux microorganismes ayant des caractéristiques biochimiques intéressantes est encore une activité d'intérêt étant donné la grande diversité de souches encore méconnues présentes dans la nature. Les méthodes peuvent être de plusieurs natures. La résistance des microorganismes à des solvants organiques est par exemple un critère important pour la sélection des biocatalyseurs utilisés dans la bioconversion de substrats toxiques ou dans la dégradation des matières polluantes (bioremédiation). Beaucoup de souches de *Pseudomonas* ont ainsi été sélectionnées pour leur faculté à se diviser en présence de toluène, de composés aromatiques et aliphatiques ou encore d'alcools à longue chaîne (CABRAL, 2001).

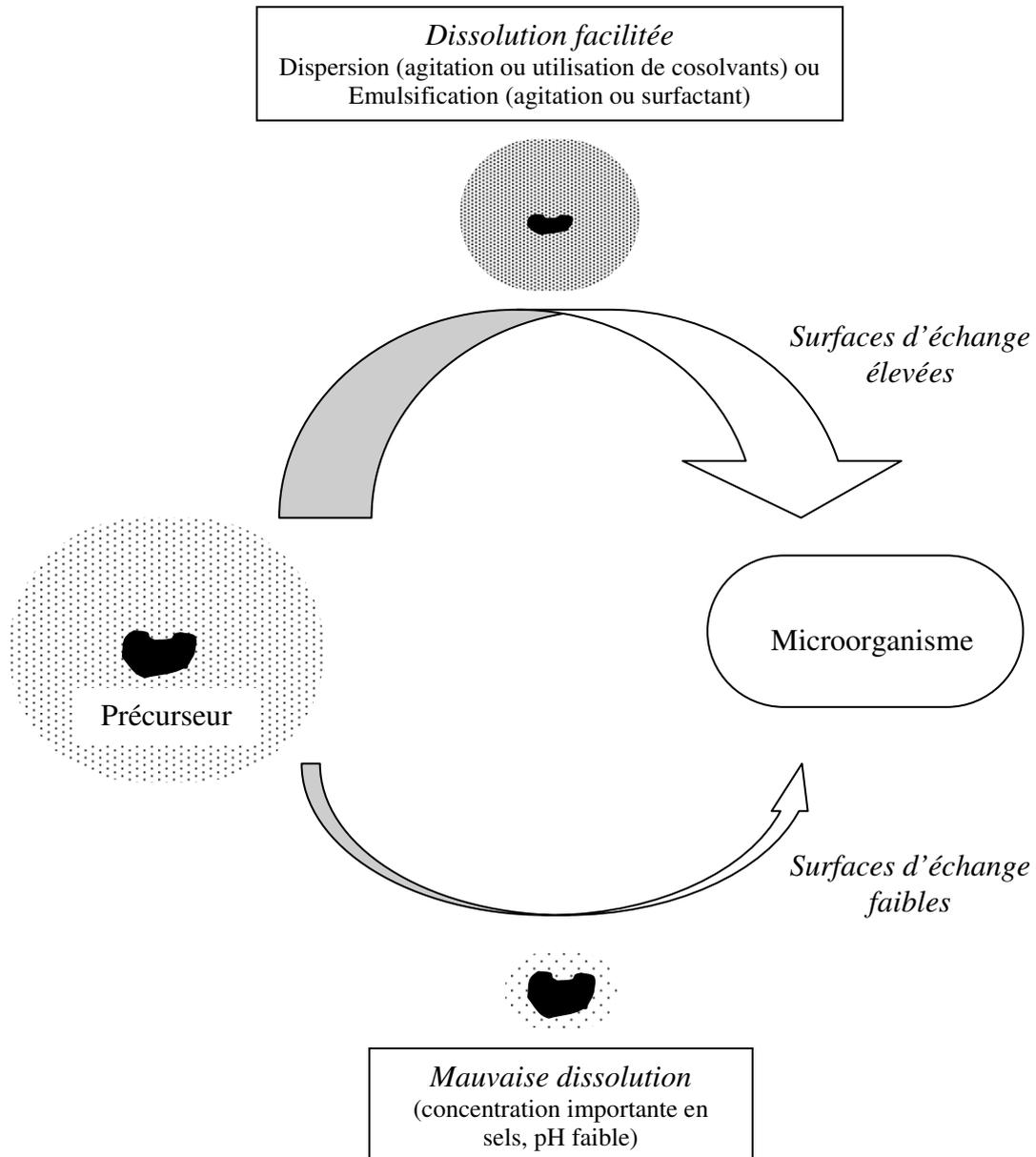
Il est également possible de modifier génétiquement un microorganisme déjà existant afin d'augmenter son efficacité. Trois grandes techniques existent. La première, simple mais fastidieuse, consiste en des mutations aléatoires par un agent mutagène (Ultra violets, N-nitrosoguanidine) suivies d'une sélection des mutants d'intérêt par criblage. Cette technique peut permettre l'accumulation d'un métabolite donné par répression des gènes codants pour les enzymes en aval. La deuxième technique utilisée, plus précise, est le clonage d'un gène par recombinaison génétique. Cette méthode permet, par exemple, d'apporter une fonction enzymatique supplémentaire à une souche bactérienne donnée. La troisième technique, la plus élaborée, part de l'étude de la relation structure / fonction des protéines pour ensuite modifier de façon ciblée sa séquence par mutagenèse dirigée (parfois au niveau d'un seul acide aminé). Cette technique permet de modifier de façon très précise l'activité, les propriétés ou la spécificité d'une enzyme. La mutagenèse dirigée au niveau de la séquence codant pour la monooxygénase P450 de *Bacillus megaterium* permet par exemple d'obtenir divers mutants capables de dégrader l' $\alpha$ -pinène selon divers schémas métaboliques, dont un conduit à une forte production d' $\alpha$ -pinène oxyde (BUDDE, 2007).

La méthode la plus classique pour réaliser une bioconversion consiste à utiliser un microorganisme déjà répertorié. La connaissance de la réaction souhaitée ainsi que des conditions opératoires éventuelles peut conduire l'utilisateur à choisir facilement la souche la plus efficace possible. Il existe des banques de données à entrées multiples disponibles sur Internet comme « Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes » (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>) capables de déterminer un ensemble de données à partir d'un seul des éléments suivants : substrat, souche bactérienne, métabolisme, enzyme, séquence génétique, produit.

### **I.3. Optimisation des procédés de bioconversion**

#### **I.3.1. Présentation générale**

Les principaux critères permettant d'évaluer la performance d'un procédé de bioconversion sont au nombre de trois. Il s'agit de la productivité en métabolites (ou vitesse de synthèse), de la concentration finale obtenue et du rendement de production. Ces critères vont être optimisés par une démarche comprenant deux grandes étapes. La première étape consiste à choisir le biocatalyseur le plus adapté à la réalisation de la réaction voulue. Les méthodes employées pour sélectionner les microorganismes ont été décrites dans le



**Figure I.6.** Dissolution et biodisponibilité d'un précurseur solide selon les conditions environnementales, d'après SIKKEMA et al. (1995).

paragraphe précédent (I.2.3.2.2). La seconde étape consiste à choisir les paramètres physico-chimiques et technologiques permettant de favoriser la réaction de bioconversion. Cette dernière met en jeu trois acteurs principaux, le précurseur ou substrat de bioconversion, le biocatalyseur (enzyme seule ou microorganisme entier) et le produit d'intérêt. Les paragraphes suivants présentent successivement les méthodes employées permettant la réalisation de trois actions essentielles : i) augmentation de la disponibilité du précurseur pour le biocatalyseur ii) augmentation de la quantité et de l'activité du biocatalyseur iii) accumulation du produit de bioconversion. Ces méthodes sont issues principalement des techniques employées par le génie des procédés.

Une attention particulière sera apportée aux cas où le précurseur et le produit de bioconversion présentent une toxicité pour le biocatalyseur utilisé et/ou une faible solubilité dans l'eau. Ces cas de figure sont en effet souvent retrouvés dans les procédés de biotransformation et notamment lors de la production d'arômes (voir le paragraphe I.2.3.2).

### **I.3.2. Augmentation de la disponibilité en précurseur**

#### **I.3.2.1. Biodisponibilité**

Dans la mesure où seule la partie du précurseur dissoute dans l'eau est susceptible d'interagir avec les microorganismes (WODZINSKI et BERTOLINI, 1972), la biodisponibilité du précurseur dépend largement de sa solubilité. Ce phénomène pose de sérieux problèmes lorsque le substrat utilisé est solide ou hydrophobe. La vitesse de la réaction dépend alors fortement de la surface d'échange entre ce composé et l'eau (SIKKEMA et al., 1995). Il est ainsi possible d'augmenter la biodisponibilité des substrats hydrophobes ou solides en augmentant la dispersion des particules de substrat par agitation mécanique ou par utilisation d'agents chimiques comme les cosolvants. La surface d'échange peut également être augmentée par émulsification *via* des surfactants (**figure I.6**). Ces points seront repris plus en détails dans la partie consacrée aux milieux non conventionnels (partie I.4).

#### **I.3.2.2. Enveloppe cellulaire et perméabilisation**

Le précurseur, afin de pouvoir interagir avec les enzymes intracellulaires, doit encore franchir l'obstacle de l'enveloppe cellulaire. Cette dernière est globalement constituée d'une paroi cellulaire et d'une ou deux membrane(s) lipidique(s) (BEVERIDGE et GRAHAM, 1991). La membrane plasmique, en raison de sa composition lipidique offre une perméabilité

Traitements	Exemples d'appareils ou de composés utilisés	Principes d'action
<i>Physiques</i>		
Thermique	Congélateur	Cristallisation de l'eau des cellules
Haute pression	Presse de French,	Ecrasement
Sonication	homogénéisateur	Cavitation
Choc osmotique	Sonicateur ou aiguille à soniquer Eau de mer	Plasmolyse
<i>Chimiques</i>		
Solvants organiques	Ether, ethanol, chloroforme,	Dissolution des composés lipophiles de la
Détergents	toluène	MC
Antibiotiques	Triton x100, Tween 20 ou 80	Encapsulation des composés lipophiles de la
Agents chélateur	Bacitracine, pénicilline	MC
	EDTA	Bloque la synthèse de la paroi cellulaire Détachement des LPS de la MC
<i>Enzymatiques</i>		
Protéases	Chymotrypsine	Dégradation des protéines de la MC
lipases	Phospholipidases	Hydrolyse des triglycérides de la MC

**Tableau I.e.** Les traitements de perméabilisation membranaire. EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique, LPS : lipopolysaccharides, MC : membrane cellulaire (les références bibliographiques sont indiquées dans le texte associé).

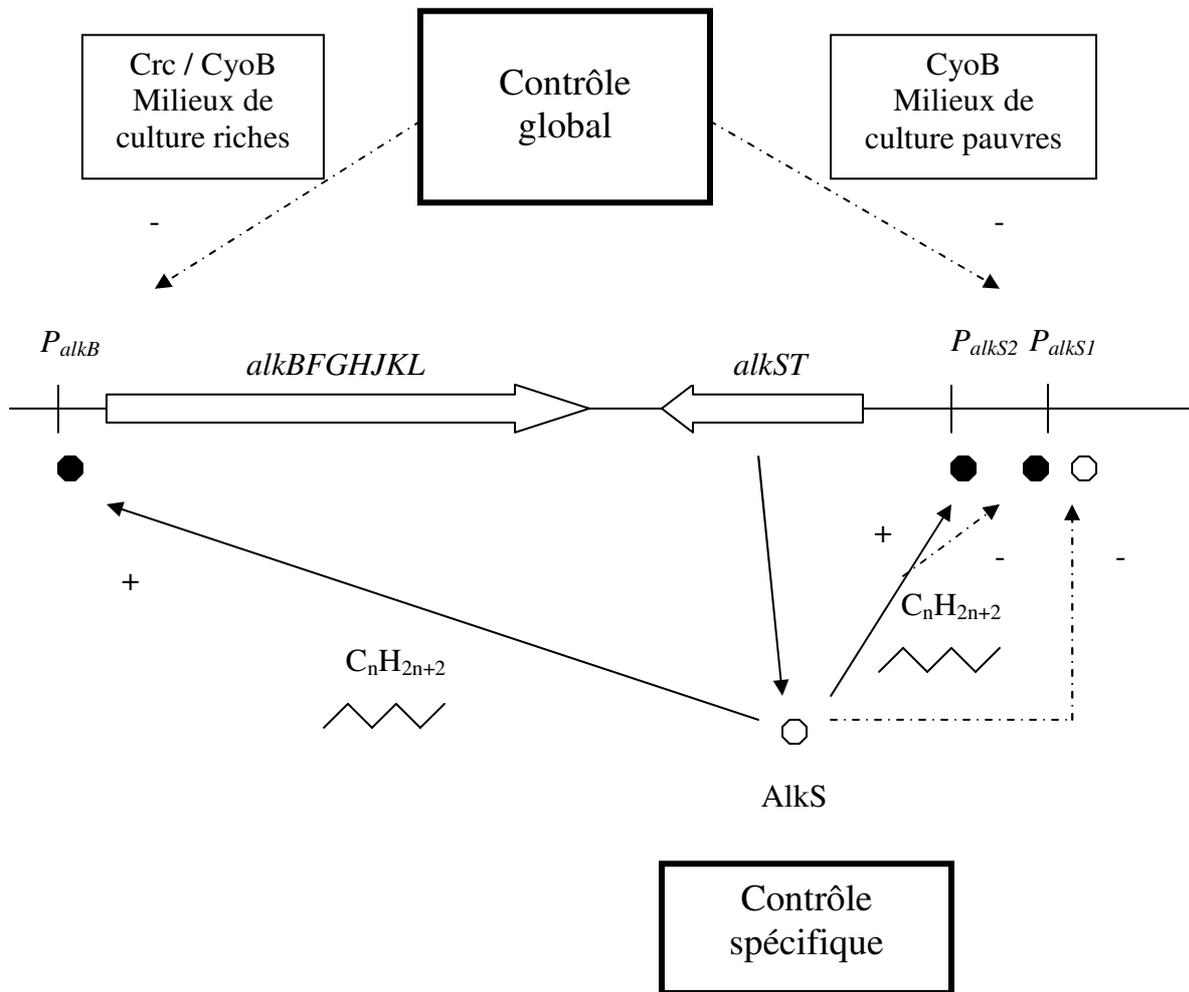
globalement forte pour les composés apolaires lipophiles. En conséquence, le transfert des composés hydrophobes à travers la membrane plasmique se fait vraisemblablement par simple diffusion, indépendamment de tout systèmes de transport énergétique ou spécifique (SIKKEMA et al., 1995). La membrane lipidique externe des bactéries gram négatives, par contre, constitue un véritable obstacle à l'entrée des molécules lipophiles. En effet, le rôle de cette membrane est comparable à celui d'un tamis moléculaire à travers lequel les composés de masse moléculaire supérieures à 1000 Da ne peuvent passer. De plus, elle se montre faiblement perméable aux composés hydrophobes et ce malgré la présence de porines peu spécifiques, probablement à cause de lipopolysaccharides lipophiles (NIKAIDO et al., 1983). Le transfert transmembranaire peut ainsi être responsable d'une limitation des vitesses de bioconversion.

Lorsque l'intégralité du microorganisme n'est pas nécessaire à la réalisation de la réaction de bioconversion, il est possible d'empêcher les limitations par les transferts transmembranaires en perméabilisant l'enveloppe cellulaire. Les traitements appliqués peuvent être de nature chimique, physique ou enzymatique. Les traitements physiques vont permettre d'obtenir des cellules perméabilisées par choc osmotique, par congélation ou encore par sonication (**tableau I.e**). Les méthodes chimiques regroupent principalement l'utilisation de solvants organiques polaires (éther, toluène...) (JACKSON et al., 1965), de détergents (CÁNOVAS et al., 2005 ; VAN DER WERF et al., 1995 ; FELIX, 1982), d'antibiotiques (HANCOCK et CHAPPLE, 1999) ou d'agents chélateurs (AYRES et al., 1999). Des enzymes peuvent être employées afin de dégrader les constituants de la membrane (NIWA et al., 2005). La combinaison de deux traitements permet parfois d'observer un effet additif (HANSRUEDI, 1981). Le protocole à utiliser demande une mise au point au cas par cas. Le type de microorganisme et la composition de ses parois et membranes cellulaires (Gram positif ou négatif) constituent un des paramètres déterminant dans le choix du traitement.

### **I.3.3. Augmentation de la quantité et de l'activité du biocatalyseur**

#### **I.3.3.1. Production du biocatalyseur**

Les enzymes sont produites par les cellules à partir de l'expression de leur matériel génétique grâce aux mécanismes de la transcription et de la traduction. Ces mécanismes peuvent se dérouler en absence de régulation (dans le cas d'enzymes dit constitutives) ou être régulés par des composés dits inducteurs ou répresseurs selon qu'ils augmentent ou diminuent



**Figure I.7.** Modèle actuel de la régulation des enzymes de la voie métabolique de dégradation des alcanes chez *Pseudomonas putida* GPO1. Ronds blancs : protéine AlkS. Ronds noirs : complexe protéine AlkS / alcane. Flèches pleines : inductions. Flèches en pointillées : répression. Crc : protéine de répression catabolique. CyoB : cytochrome *o* ubiquinol oxydase (d'après ROJO et DINAMARCA, 2004).

l'expression des gènes concernés. Ces composés vont agir au niveau d'une région de l'ADN située en amont du gène d'intérêt appelé région promotrice. Plusieurs gènes peuvent être sous le contrôle d'une même région promotrice, on parle alors d'opéron (JACOB et al., 1960). Il est ainsi possible d'augmenter considérablement la production de la ou des enzymes d'intérêt en favorisant l'induction ou en empêchant la répression des gènes correspondant. Plusieurs travaux ont montré que certains paramètres de croissance tels que la température, le pH, la pression partielle en oxygène (ARMSTRONG et BROWN, 1994), la nature de la source de carbone ou d'azote (LEMOS et al., 2001; BERMUDEZ et al., 1998) pouvaient avoir une influence positive ou négative sur la production du biocatalyseur.

Un exemple représentatif de régulation génétique dépendant de la source de carbone est celle de la « répression catabolique ». Cette dernière permet l'utilisation préférentielle d'une source de carbone par un microorganisme au cours de sa croissance ; les gènes codant pour les enzymes nécessaires à la dégradation métabolique de cette source sont induits uniquement si celle-ci est présente et si aucune autre source de carbone n'est présente (MAGASANIK, 1970). Ce système implique des phénomènes couplés d'induction et de répression dont les mécanismes diffèrent selon le microorganisme étudié. Le modèle le plus connu est celui de l'opéron lactose d'*Escherichia coli*.

Ces dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la connaissance des modèles de répression catabolique impliqués chez certaines souches de *Pseudomonas*. Les gènes codant pour les enzymes permettant la dégradation complète des alcanes par *Pseudomonas putida* GPo1 sont, par exemple, organisés en deux opérons transcrits à partir des régions promotrices  $P_{alkB}$  et  $P_{alkS2}$  en présence d'alcanes (**figure I.7**). L'opéron *alkST* est faiblement transcrit à partir du promoteur  $P_{alkS1}$  en absence d'alcanes. La voie métabolique est sujette à deux types de contrôle : i) un contrôle spécifique, dépendant du produit du gène *alkS* (la protéine AlkS), qui active la transcription des promoteurs  $P_{alkB}$  et  $P_{alkS2}$  et interdit la transcription du promoteur  $P_{alkS1}$  lorsque les alcanes sont présents ii) un contrôle plus global, prenant en compte les autres sources de carbone présentes et l'état physiologique de la cellule via des protéines de régulation comme la protéines de répression catabolique (Crc) et la cytochrome *o* ubiquinol oxydase (CyoB) (**figure I.7**). La protéine Crc semble correspondre à un signal de transduction dépendant de l'état nutritionnel du microorganisme (YUSTE et ROJO, 2001 ; MORALES et al., 2004 ; RUIZ-MANZANO et al., 2005). La CyoB, constituant de la chaîne respiratoire des bactéries aérobies, représente une connexion entre le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons et la répression catabolique de certaines voies métaboliques. Il semble donc que l'utilisation des sources de carbone dépend

également du niveau énergétique de la cellule (DINAMARCA et al., 2002 ; MARQUES et al., 2006).

D'autres modèles de répression catabolique ont été mise en évidence chez d'autres souches de *Pseudomonas* comme les opérons *liu* responsables de la dégradation des terpènes acycliques par le mutant PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* (DIAZ-PEREZ et al., 2004 ; FÖRSTER-FROMME et al., 2006 ) ou les opérons *xyl* responsables de la dégradation du toluène et du xylène par *Pseudomonas putida* KT2440 TOL (RAMOS et al., 1997). La régulation de leur expression fait intervenir des contrôles spécifiques et globaux dont les mécanismes sont similaires à ceux des opérons *alk*. La particularité est que les opérons codant pour les enzymes nécessaires à la réalisation des réactions supérieures de la voie métabolique sont régulés différemment des opérons codant pour les enzymes responsables des réactions cataboliques dites « basses » (DIÁZ-PÉREZ et al., 2004).

Dès lors, il est possible de contrer ces phénomènes par inactivation ou délétion des gènes responsables de la répression catabolique. L'inactivation du gène codant pour la protéine Crc de *Pseudomonas putida* GPo1 permet, par exemple, de lever la répression catabolique exercée par les casaminoacides présents dans certains milieux de culture riches (YUSTE et ROJO, 2001). Une autre alternative consiste à choisir judicieusement les conditions et les constituants du milieu de croissance utilisé, de façon à favoriser les phénomènes d'induction ou empêcher les phénomènes de répression catabolique du gène codant pour le ou les enzyme(s) d'intérêt.

### 1.3.3.2. Préservation du biocatalyseur

Les enzymes sont des molécules souvent instables et peuvent être rapidement dégradées de façon irréversible (RATLEDGE, 2001). Les conditions de bioconversion doivent être choisies avec soin ; le pH et la température du système doivent être parfaitement stabilisés et contrôlés afin de prévenir tous phénomènes de dénaturation des protéines. Le cas échéant, des agents protecteurs peuvent être ajoutés au milieu de bioconversion. Par exemple, des osmolytes sont additionnés lorsque la force ionique du milieu est trop élevée (ROY et HILL, 2001) ou des protéines de surface dans le cas d'inactivations interfaciales (BALDASCINI et al., 2005). Lorsque le produit est à l'origine de l'instabilité des enzymes, ces dernières peuvent être confinées dans une région du milieu de bioconversion à l'abri des produits inactivateurs par des techniques d'immobilisation. Ce procédé présente l'avantage supplémentaire de permettre des usages répétés du matériel biocatalytique.

Il est important d'assurer l'absence de protéases dans le milieu de bioconversion, ce qui peut être le cas lorsque le biocatalyseur utilisé est un extrait cellulaire protéique. De plus, certaines bactéries maintenues en phase stationnaire dans un milieu pauvre en source d'azote peuvent déclencher la synthèse de protéases (RATLEDGE, 2001). Ce phénomène peut entraîner des problèmes lors de bioconversions utilisant des populations hétérogènes de microorganismes ou dans le cas de contaminations bactériennes, d'où la nécessité d'assurer la stérilité du milieu de bioconversion.

Dans le cas de l'utilisation de microorganismes entiers, le maintien de l'activité biocatalytique passe par la préservation de la viabilité des cellules. Ceci implique des contraintes physiques et mécaniques douces (température et agitation modérées) et la limitation des éventuels effets toxiques du précurseur et/ou du produit de bioconversion. Dans ce dernier cas, les stratégies proposées consistent à utiliser des cellules en phase stationnaire plutôt qu'en phase de croissance (DE CARVALHO et al., 2005 ; ETSCHMANN et al., 2005 ; BOONTAWAN et STUCKEY, 2006) et à jouer sur le mode de conduite de la réaction (VANDAMME et SOETAERT, 2002). Dans le cas où le précurseur est toxique, on procède à des ajouts séquentiels de petites quantités de substrat (fed-batch) plutôt qu'à un ajout massif en début de bioconversion (batch). La toxicité du produit obtenu, quand à elle, peut être limitée grâce à son extraction continue par ultrafiltration, l'emploi d'un milieu biphasique eau / solvant organique ou l'ajout de milieux « pièges » comme les cyclodextrines ou des résines de type amberlite. De la même façon que pour les enzymes, les cellules peuvent être protégées par des techniques d'immobilisation.

### I.3.3.3. Augmentation de l'activité du biocatalyseur

#### *I.3.3.3.1. Activation et inhibition enzymatique*

La fonction et l'activité d'une enzyme dépendent directement de sa structure tridimensionnelle, elle-même dictée par sa séquence en acide aminée. Il est ainsi possible de jouer directement sur l'activité d'une enzyme par modification de sa structure tridimensionnelle ou indirectement par modification de sa séquence génétique. Par exemple, l'époxyde hydrolase d'*Agrobacterium radiobacter* AD1 devient résistante à son inactivation par le diol vicinal lorsque deux résidus tyrosine sont enlevés du site catalytique de l'enzyme (BALDASCINI, 2004).

L'activité des enzymes peut également être modifiée par l'action d'effecteurs. Tout composé qui augmente la vitesse de la réaction catalytique, quelque soit son mécanisme, est

## I. Etude bibliographique

Cofacteur	Réaction	Méthode de régénération	Référence bibliographique
NAD <sup>+</sup>	Transfert d'un proton et d'un électron (accepteur)	Glutamate déshydrogénase avec $\alpha$ -cétoglutarate	LEE et WHITESIDES (1986)
NADH,H <sup>+</sup>	Transfert d'un proton et d'un électron (donneur)	Formate déshydrogénase avec formate	WICHMANN et al. (1981)
NADP <sup>+</sup>	Transfert d'un proton et d'un électron (accepteur)	Glutamate déshydrogénase avec $\alpha$ -cétoglutarate	LEE et WHITESIDES (1986)
NADPH,H <sup>+</sup>	Transfert d'un proton et d'un électron (donneur)	Glucose déshydrogénase avec glucose	WONG et al. (1985)
ATP	Transfert d'un groupement phosphoryle	Acétate kinase avec acétyle phosphate	CRANS et WHITESIDES (1983)
Nucléotides	Transfert d'un groupement glycosyle	Couplage bactérien	KOIZUMI et al. (1998)
CoA	Transfert d'un groupement acyle	Phosphotransacétylase avec acyl phosphate	BILLHARDT et al. (1989)
PAPS	Transfert d'un groupement méthyle	Aryle sulfotransacétylase IV avec <i>p</i> -nitrophényl sulfate	BURKART et al. (1999)
Flavines	Oxygénation	Auto régénération <sup>a)</sup>	FABER (2000)
Pyridoxal phosphate	Transamination	Auto régénération	FABER (2000)
Biotine	Carboxylation	Auto régénération	FABER (2000)
Complexe métallo porphyrique	Peroxydation, oxygénation	Auto régénération	FABER (2000)

a- Beaucoup de mono- ou di-oxygénases flavine-dépendantes nécessitent le NAD(P)H comme agent réducteur indirect.

**Tableau I.f.** Cofacteurs souvent requis pour les biotransformations et méthodes de régénération *in situ* couramment employées (ZHAO et VAN DER DONK, 2003).

un activateur, et toute substance qui la diminue est un inhibiteur. Les inhibiteurs peuvent agir en se fixant de manière réversible sur le site catalytique de l'enzyme (inhibition compétitive) ou à d'autres endroits stratégiques entraînant un changement de la conformation de l'enzyme (inhibitions non compétitive et incompétitive) (FURLAN et PANT, 2005). L'inhibiteur peut également former un complexe stable avec l'enzyme et entraîner une inactivation permanente ; l'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme son substrat et entame le processus de modification de ce dernier. Intervient alors une étape au cours de laquelle l'inhibiteur modifié devient très réactif et se lie de façon irréversible à l'enzyme. Etant donné que l'enzyme contribue à sa propre inactivation, on parle d'inhibition « suicide » (GRIFFITHS, 1987a). Il arrive que l'inhibiteur soit le produit de la bioconversion, ce phénomène peut être la résultante d'un mécanisme de régulation appelé « feed back ». Dans ce cas, la solution peut consister à séparer le composé d'intérêt de son biocatalyseur par ultrafiltration ou par l'utilisation de milieux non conventionnels.

#### I.3.3.3.2. Apport en cofacteurs

Les cofacteurs sont des composés chimiques ou biologiques de faible masse molaire essentiels à la réalisation de nombreuses réactions enzymatiques. Certains cofacteurs, comme l'adenosylcobalamine et la biotine, sont fortement liés aux enzymes par des liaisons covalentes et interviennent dans la réaction de manière catalytique, un apport est donc nécessaire au début de la bioconversion à des concentrations similaires à celles de l'enzyme, après quoi ils s'auto-régénèrent dans la plupart des cas (WOODYER et al., 2005). D'autres cofacteurs, comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), sont liés à l'enzyme par des liaisons faibles et interviennent dans la réaction de manière stœchiométrique, ils sont consommés en même temps que le substrat et des apports conséquents sont donc nécessaires tout au long de la bioconversion (CHENAULT et al., 1988). Cette opération est difficilement réalisable à grande échelle en raison des prix élevés de ces composés. Les méthodes employées consistent à coupler la réaction de dégradation du cofacteur avec une réaction inverse de régénération (WOODYER et al., 2005). Les techniques de régénération *in situ* couramment employées dans les procédés industriels font intervenir une deuxième enzyme ou un microorganisme (**tableau I.f**).

A titre d'exemple, les réactions d'oxydoréduction sont catalysées par des enzymes dont le fonctionnement est généralement dépendant de cofacteurs de type nicotinamide (NAD(H)). L'apport stœchiométrique de ces cofacteurs au cours de la bioconversion est exclu en raison de leur instabilité et de leur prix élevé (30 € le mmol). Ils peuvent être régénérés par

des réactions couplées de nature chimique (LÜTZ, 2006), photochimique (JUILLARD et al., 2004), électrochimique (STECKHAN et al., 1991 ; HOLLMANN et al., 2006) ou enzymatique comme l'utilisation de la glutamate déshydrogénase et de la formate déshydrogénase, permettant respectivement la régénération du  $\text{NAD}^+$  et du  $\text{NADH,H}^+$  (**tableau I.f**). Ces dernières années, l'utilisation de NADH oxydases pour la régénération du  $\text{NAD}^+$  présente un intérêt grandissant (RIEBEL et al., 2002 ; RIEBEL-BOMMARIUS et al., 2007). Enfin, une autre alternative consiste à utiliser des microorganismes entiers ; le  $\text{NADH,H}^+$  peut être régénéré *via* certaines voies métaboliques de la cellule comme la glycolyse (HABERLAND et al., 2002 ; CHAMOULEAU et al., 2007) et le  $\text{NAD}^+$  par les enzymes de la chaîne respiratoire des microorganismes aérobies (RATLEDGE, 2001). Dans ce dernier cas, les impératifs seront de préserver l'intégrité de la membrane cellulaire et de garantir l'apport en oxygène dans le milieu de bioconversion.

#### **I.3.4. Accumulation du produit de bioconversion**

Pour que le composé d'intérêt s'accumule, il est nécessaire de favoriser sa production mais aussi de prévenir toute réaction entraînant sa dégradation, qu'elle soit de nature abiotique ou biotique.

Les caractéristiques physico-chimiques du produit comme sa volatilité et sa structure fonctionnelle peuvent être à l'origine de phénomènes de pertes par entraînement ou de pertes par dégradation chimique respectivement. Le premier cas de figure est rencontré dans les systèmes aérés (LARROCHE et al., 2007). Le deuxième cas est rencontré avec certains types de molécules instables, comme par exemple les terpènes (cette famille de molécules et leurs procédés de biotransformation seront étudiés dans la partie I.5).

D'autres phénomènes de dégradation abiotiques peuvent avoir lieu dans des conditions de bioconversion particulières. Les travaux de VILLIERE et GENOT (2004), par exemple, portent sur l'oxydation des lipides dans une émulsion de type eau dans huile par des cations métalliques présents sous forme de traces dans la phase aqueuse. Ce phénomène semble être conditionné par 2 facteurs principaux : les charges des composés présents à l'interface (principalement des surfactants et des protéines interfaciales), empêchant ou favorisant l'approche des cations à l'interface et les propriétés oxydantes, antioxydantes ou chélatrices des composés présents dans la phase aqueuse et/ou à l'interface d'origine protéique ou non (polyphénols, EDTA). Un tel phénomène peut être en partie responsable d'une dégradation abiotique accélérée du substrat et/ou du produit de bioconversion.

Dans le cas de l'utilisation de microorganismes entiers, le composé d'intérêt n'est pas obligatoirement le produit final de la voie métabolique de dégradation du précurseur. Il s'agit donc de favoriser les étapes enzymatiques situées en amont du produit d'intérêt et d'empêcher les étapes situées en aval. Une approche consiste à limiter le nombre d'étapes enzymatiques en amont par l'utilisation d'un précurseur métaboliquement plus proche du produit d'intérêt. Il est également possible d'empêcher l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des enzymes situées en aval de la réaction d'intérêt par silençage génique ou modification génétique (COLOCOUSI et al., 1996). Cette dernière méthode se heurte néanmoins aux problèmes de législation concernant des microorganismes génétiquement modifiés. Une autre alternative consiste, une fois de plus, à récupérer le ou les produit(s) d'intérêt par l'utilisation de milieux non conventionnels.

#### **I.4. Bioconversions et milieux non conventionnels**

Pendant de nombreuses années, l'idée que les biocatalyseurs (enzymes ou cellules entières) ne pouvaient être actifs que dans un milieu réactionnel aqueux et dans des conditions classiques a entravé le développement des bioconversions. Bien que l'utilisation d'un milieu aqueux puisse présenter certains avantages, il a été démontré à de nombreuses reprises que cette utilisation pouvait également être considérée comme une étape limitante dans certains procédés, en particulier lorsque les substrats sont peu solubles dans l'eau.

Récemment il a été montré que les biocatalyseurs pouvaient être fonctionnels dans des conditions drastiques, telles que des pH, des températures et des pressions extrêmes, ou de fortes concentrations en sels et autres additifs (MONSAN et COMBES, 1984). Ils peuvent être également actifs dans des milieux non conventionnels tels que les solvants organiques, les milieux biphasiques liquide / liquide, les milieux solides et les milieux comportant une phase gazeuse ou un fluide supercritique (TRAMPER et al., 1992). Ces observations ont alors considérablement augmenté les possibilités d'utilisation des bioconversions (VERMÜE et TRAMPER, 1995). Les avantages et inconvénients de ces milieux multiphasiques sont détaillés dans les paragraphes suivants. Une attention particulière sera apportée aux milieux biphasiques eau / solvant organique.

#### **I.4.1. Milieux comportant une phase gazeuse**

Il est possible de réaliser des biotransformations dans un milieu réactionnel comportant d'une part un biocatalyseur présent dans une phase aqueuse et d'autre part un substrat contenu dans une phase gazeuse. Un des premiers travaux mis au point de cette façon fut l'oxydation de l'éthanol par une alcool oxydase (CABRAL, 2001). Le substrat étant contenu dans la phase gazeuse, les réactions ont souvent lieu à des températures relativement élevées. Il est donc nécessaire d'utiliser des enzymes thermostables. La teneur en enzyme dans la phase aqueuse doit être également bien contrôlée pour obtenir ainsi les meilleures performances en termes d'activité et de stabilité.

#### **I.4.2. Milieux comportant un fluide supercritique**

L'utilisation de fluides supercritiques, comme le dioxyde de carbone, le fréon ( $\text{CHF}_3$ ), les hydrocarbures (éthane, éthylène, propane) ou certains composés inorganiques ( $\text{SF}_6$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ), constituent un milieu non conventionnel très prometteur pour la réalisation de biotransformations. Ces fluides ont en effet des propriétés très intéressantes puisqu'ils possèdent une tension de surface et une viscosité faible ainsi qu'une diffusivité élevée comparable aux gaz. Ils permettent ainsi d'obtenir des vitesses de transferts de masse très élevées et une séparation facilitée des produits de réaction. En changeant la température et la pression, il est en effet possible de modifier la solubilité du ou des solutés et de les purifier. Leurs propriétés, relativement similaires à celles de solvants non polaires, sont donc appropriées pour les biotransformations de composés hydrophobes. Ils possèdent diverses applications dont certaines concernent l'industrie des arômes et des parfums, comme la production d'esters (KUMAR et al., 2005).

Le choix du fluide supercritique est souvent limité aux composés ayant une température critique située entre 0 et 60°C, en dehors desquels la stabilité des enzymes peut être affectée. Le  $\text{CO}_2$ , étant donné sa faible température critique (31°C à 73,8 bars), est un des fluides les plus utilisés (AALTONEN et al., 1991 ; KAMAT et al., 1992). Il est, de plus, non toxique, ininflammable et peut être facilement séparé du produit après la bioconversion (VERMÛE et TRAMPER, 1995). Néanmoins, il peut avoir des effets négatifs sur l'activité des enzymes, comme la diminution du pH dans l'environnement immédiat de l'enzyme, la formation de carbamates qui entraînent des modifications covalentes des acides aminés libres à la surface des protéines et une inactivation durant les cycles de pressurisation et

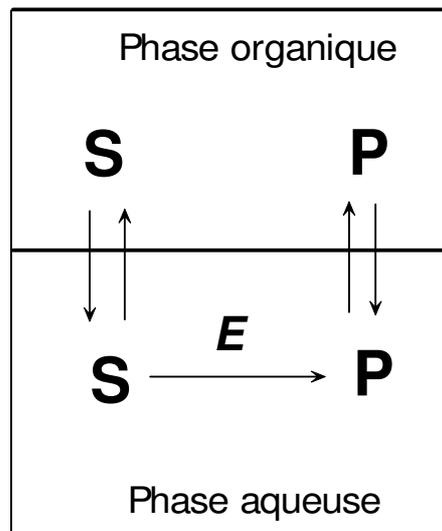
dépressurisation (KRIEGER et al., 2004). Le principal inconvénient de ce système reste les coûts élevés en énergie et en équipements nécessaires à l'établissement de fortes pressions.

### **I.4.3. Milieux comprenant un liquide ionique**

Depuis ces 5 dernières années, le développement le plus important dans le domaine des bioconversions en milieux non conventionnels consiste en l'utilisation de liquides ioniques. Les liquides ioniques sont des sels constitués d'un couple anion / cation faiblement coordonnés ; un des ions possède des charges délocalisées et l'autre est organique, ce qui prévient la formation de cristaux. Ils possèdent ainsi des points de fusion inférieurs à 100°C et souvent même inférieurs à la température ambiante. Ils sont employés de plus en plus comme substituts aux solvants organiques traditionnels dans les réactions chimiques et les bioconversions en condition biphasique eau / solvant organique (ce type de milieu est abordé dans le paragraphe suivant). Les plus courants d'entre eux sont composés de cations imidazolium ou pyridinium, mais ils peuvent être constitués également de cations phosphonium ou tétraalkylammonium.

Les liquides ioniques possèdent de nombreuses propriétés intéressantes, comme un fort pouvoir de dissolution de la plupart des composés organiques et inorganiques, une bonne stabilité thermique (même à des températures supérieures à 400°C) et une pression de vapeur quasiment nulle, ce qui en fait des solvants considérés comme protecteurs de l'environnement. Ces propriétés physiques peuvent être facilement modifiées par changement soit de l'anion, soit du cation, soit des deux (LOZANO et al., 2004 ; VAN RANTWIJK et al., 2003 ; BRENNECKE et MAGINN, 2001), il est ainsi possible de créer un liquide ionique sur mesure, spécifique à la réalisation d'une réaction donnée.

Une grande quantité d'enzymes, particulièrement celles qui tolèrent les solvants organiques, montrent d'excellentes performances en présence de liquides ioniques. L'activité et la stabilité enzymatique sont généralement comparables ou supérieures par rapport aux procédés utilisant les solvants organiques conventionnels. Des augmentations de la sélectivité et de la réactivité sont notamment observées lors de réactions thermodynamiquement non favorables en milieu aqueux (trans-estérifications) ou lors de biotransformations utilisant des substrats fortement polaires ((poly)saccharides, acide aminés ou nucléotides) pour lesquelles une utilisation de solvants organiques polaires conventionnels entraînerait une inactivation du biocatalyseur (PARK et KAZLAUSKAS, 2003).



**Figure I.8** : Représentation schématique du déroulement d'une bioconversion en milieu biphasique avec un solvant organique non miscible à l'eau.

Néanmoins, l'utilisation de ce type de système reste encore à l'état de prototype et ne possède pour l'instant qu'un petit nombre d'applications, notamment dans l'industrie des arômes et des parfums (KRIEGER et al., 2004 ; HOWARTH et al., 2001). Un des problèmes récurrent posé par l'utilisation de liquides ioniques est lié à la difficulté rencontrée lors de la séparation des produits non volatils ou faiblement volatils. Enfin, il est à noter que le coût moyen des liquides ioniques est aujourd'hui jusqu'à 800 fois plus élevé que celui des solvants organiques conventionnels (PARK et KAZLAUSKAS, 2003).

#### **I.4.4. Milieux biphasiques eau / solvant organique**

Les milieux biphasiques eau / solvant organique offrent un avantage certain pour la réalisation de bioconversions à partir de précurseurs faiblement solubles dans l'eau (ETSCHMANN et SCHRADER, 2006 ; RASOR et VOSS, 2001). L'ajout d'une phase organique dans les milieux réactionnels aqueux est couramment utilisé pour augmenter l'efficacité des procédés de biotransformation des composés hydrophobes par des cellules entières ou des enzymes isolées (DE CARVALHO et DA FONSECA, 2006). Il en existe deux types selon que le solvant organique utilisé soit miscible ou non dans l'eau.

##### **I.4.4.1. Solvants organiques miscibles à l'eau**

Les solvants organiques miscibles à l'eau (ou cosolvants) comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'acétone et l'éthanol, sont parfois ajoutés au milieu réactionnel pour augmenter la solubilité des précurseurs peu solubles dans l'eau. A des concentrations faibles, cette stratégie a l'avantage d'annuler les limitations par les transferts de masse étant donné que le système devient homogène. A fortes concentrations par contre, le biocatalyseur peut être sujet à des phénomènes d'inhibition ou d'inactivation, la concentration maximale de cosolvant utilisable est donc limitée. Un autre inconvénient de ce type de système homogène est qu'il ne facilite généralement pas la récupération du biocatalyseur ou du produit (HATTI-KAUL, 2001).

##### **I.4.4.2. Solvants organiques non miscibles à l'eau**

###### *I.4.4.2.1. Principes*

Dans ce type de procédé (**figure I.8**), les bioconversions sont généralement réalisées dans un milieu comportant une phase aqueuse contenant le biocatalyseur et un solvant

organique non miscible à l'eau qui contient les composés, substrat et/ou produits, hydrophobes (HALLING, 1987). Le solvant organique augmente la migration des composés hydrophobes dans le milieu réactionnel et joue le rôle de réservoir. On obtient dans ces conditions une alimentation constante de la phase aqueuse en substrat, de type fed batch, liée au coefficient de partage. Le substrat est alors utilisé par le biocatalyseur pour former le produit qui est à son tour continuellement extrait vers la phase organique.

L'utilisation d'un solvant organique apporte de nombreux avantages aux procédés de bioconversion utilisant un précurseur faiblement soluble dans l'eau et/ou toxique pour le biocatalyseur. En premier lieu, le système permet une diffusion du substrat dans la phase aqueuse en fonction de la demande métabolique, ce qui garantit un apport continu en substrat tout en restant à des concentrations inférieures aux concentrations inhibitrices pour le biocatalyseur (DAUGULIS, 1997). Le procédé permet ainsi d'optimiser la biodisponibilité des substrats hydrophobes toxiques. En second lieu, le fait que le produit soit extrait dans la phase organique au fur et à mesure de sa production permet de déplacer l'équilibre de la réaction en faveur du produit. Ce phénomène permet ainsi de prévenir la réaction inverse, de faciliter la récupération du produit de bioconversion, d'empêcher les phénomènes d'inhibition du biocatalyseur par le mécanisme du « feedback » (paragraphe I.3.3.3) et de protéger les microorganismes contre les effets toxiques du produit. Il en découle ainsi une élévation importante des rendements de bioconversion. Ce procédé permet enfin de limiter les phénomènes de pertes par entraînement des composés hydrophobes en diminuant leur activité thermodynamique.

Toutefois cette technique comporte des inconvénients. La vitesse de la réaction de biotransformation est limitée par les vitesses de transfert de masse entre les deux phases, elles mêmes reliées aux coefficients de partage eau / solvant organique du substrat et du produit. Le solvant organique est également susceptible de présenter une toxicité pour le biocatalyseur. Deux formes de toxicité existent. La première, appelée toxicité moléculaire, est liée à un effet direct des molécules de solvant dissoutes dans la phase aqueuse sur le biocatalyseur. Ce type de toxicité s'applique particulièrement aux cellules entières. La deuxième, appelée toxicité interfaciale, est créée par la présence d'une interface entre la phase aqueuse et le solvant organique et s'applique essentiellement aux enzymes (VERMÛE et TRAMPER, 1995 ; LÉON et al., 1998). Ces trois inconvénients (limitation par les transferts de masse, toxicité moléculaire et toxicité interfaciale) sont discutés dans les paragraphes suivants.

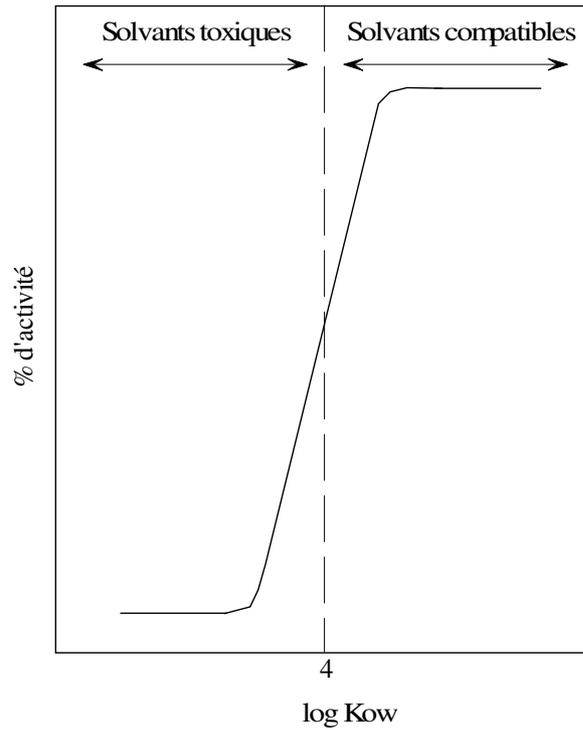
I.4.4.2 2. Transferts de masse et émulsion

Une émulsion peut être définie comme un système hétérogène contenant deux phases liquides non miscibles dans lequel une des phases va être dispersée dans l'autre phase sous forme de gouttes microscopiques. Ces émulsions sont généralement créées lorsqu'on applique au système une énergie mécanique. Sous cette force, l'interface entre les deux phases va être déformée jusqu'à la création de gouttes. Ces dernières vont ensuite être scindées et vont se transformer en gouttes plus petites. Cette dispersion des gouttes est une étape cruciale dans le procédé d'émulsification (BINKS, 1998 ; FLETCHER, 1998).

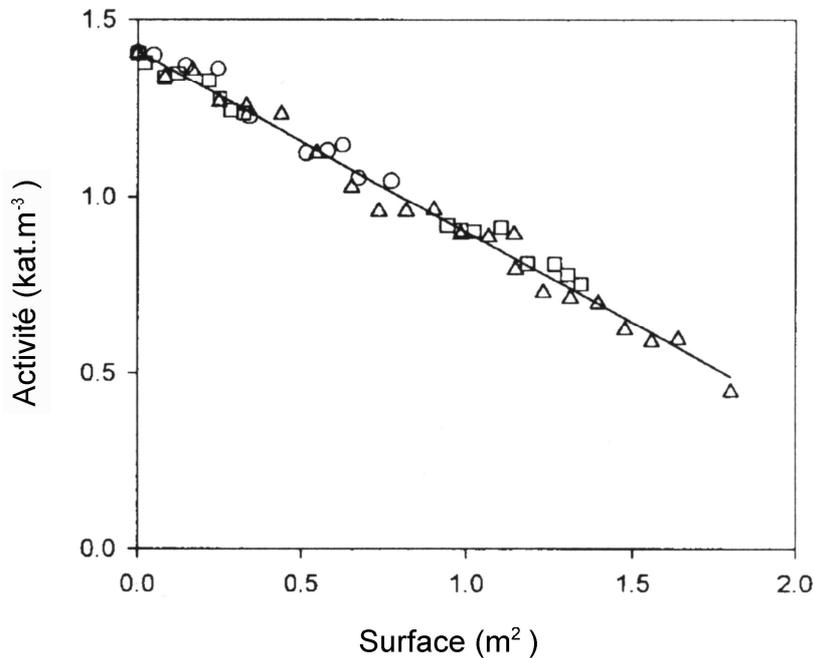
La création d'une émulsion au sein d'un système biphasique eau / solvant organique entraîne naturellement une augmentation de la surface d'échange autorisant ainsi des vitesses de transfert élevées du substrat et des produits. L'émulsion formée par agitation mécanique peut être également stabilisée par des tensioactifs également appelés surfactants (protéines de surface, Triton X100, Tween 80).

I.4.4.2.3. Toxicité moléculaire du solvant organique

Les solvants organiques apolaires et d'une façon générale les composés hydrophobes ou lipophiles (comme les terpènes et terpénoïdes) possèdent une toxicité cellulaire importante. Les mécanismes impliqués, encore mal identifiés à ce jour, semblent en grande partie liés à des phénomènes d'interactions hydrophobes favorisant l'accumulation de ces composés dans l'environnement proche de la membrane plasmique (KALEMBA et KUNICKA, 2003). Ces molécules interagiraient ensuite avec les systèmes de translocation des ions inorganiques. La fuite d'ions  $K^+$  est, par exemple, un signe d'endommagement de la membrane cellulaire souvent suivie au cours des bioconversions (WALSH et al., 2003). La dégradation des transporteurs d'ions  $H^+$  entraîne une dissipation de la force proton motrice diminuant les réserves d'ATP ce qui provoque la mort cellulaire (ULTEE et al., 2002). Une action localisée au niveau d'autres structures de la chaîne respiratoire comme le cytochrome *c* a également été mise en évidence (ANDREW et al., 1980 ; URIBE et al., 1985 ; SIKKEMA et al., 1994). En réponse, les bactéries sont capables de modifier la structure des acides gras présents dans leur membrane lipidique (saturation / insaturation, raccourcissement / élongation) *via* la régulation de certains gènes (PARVEEN et al., 2004 ; LUCINI, 2004) ou par des mécanismes d'adaptation plus rapides, utilisant des enzymes constitutives (isomérisation *cis-trans* ; HÄRTIG et al., 2005).



**Figure I.9 :** Activité d'un microorganisme au cours d'une réaction en milieu biphasique en fonction du log K<sub>OW</sub> du solvant organique utilisé (LAANE et al., 1987).



**Figure I.10.** Inactivation de la trypsin par le tridécane en fonction de l'aire interfaciale eau / tridécane. L'expérience a été réalisée pour différentes vitesses de passage des bulles de tridécane dans la phase aqueuse ; 25 gouttes.min<sup>-1</sup> (-□-), 62 gouttes.min<sup>-1</sup> (-○-) et 105 gouttes.min<sup>-1</sup> (-Δ-) (ROSS et al., 2000a).

La biocompatibilité des solvants organiques est le plus souvent évaluée grâce au log  $K_{OW}$  qui représente le logarithme décimal du coefficient de partage du solvant dans un système eau-octanol (HEIPIEPER et al., 1994 ; BERGER et al., 1999). C'est en effet ce système qui se révèle être le meilleur indicateur de la répartition du solvant entre les membranes cellulaires et le milieu environnant. On considère classiquement qu'une valeur du log  $K_{OW}$  supérieure à 4 est requise pour une bonne tolérance du solvant par un biocatalyseur utilisé sous forme de cellule entière (**figure I.9**). Plusieurs auteurs ont montré que le point d'inflexion de cette courbe dépendait du microorganisme étudié. Les caractéristiques de la membrane cellulaire peuvent influencer la tolérance du microorganisme pour le solvant (GRUBER et al., 2006). Les bactéries gram-négatives sont en général plus tolérantes que les bactéries gram-positives, vraisemblablement grâce à leur paroi cellulaire externe.

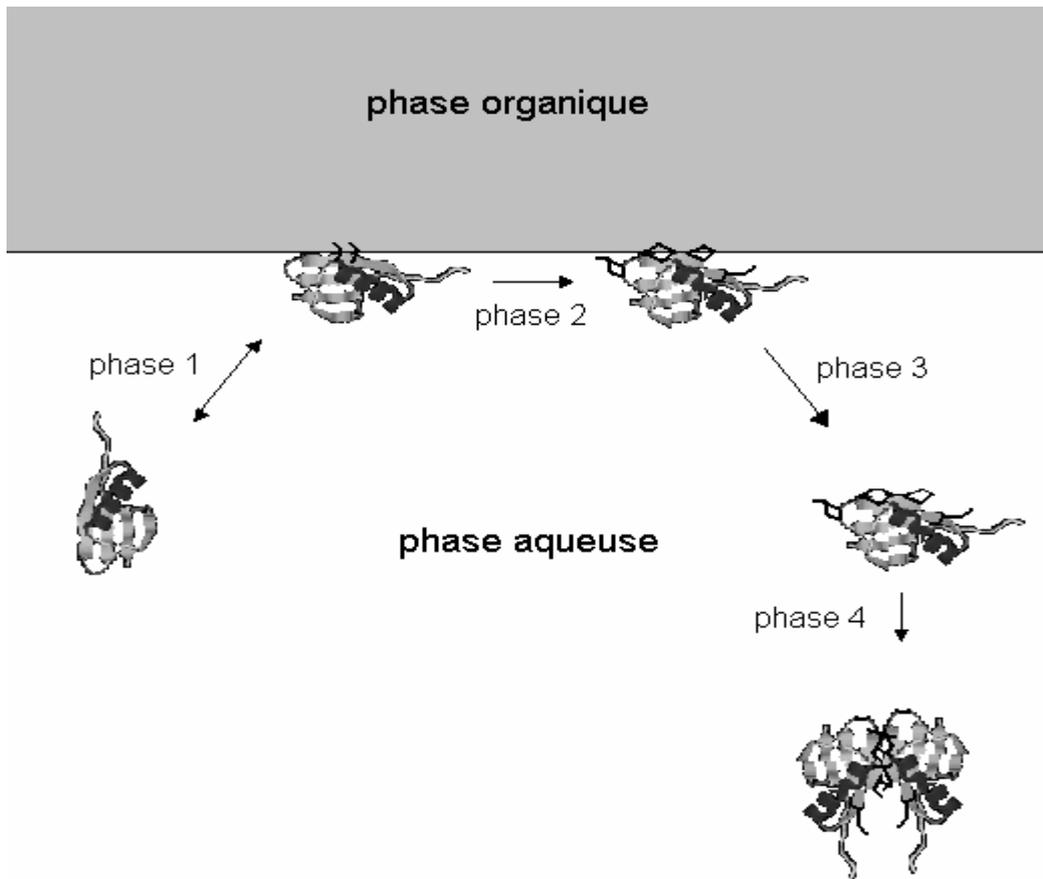
La discussion précédente concerne la membrane des microorganismes intacts. Dans le cas de biocatalyseurs acellulaires (enzymes purifiées ou présentes au sein d'un extrait de cellules perméabilisées), la validité du log de  $K_{OW}$  comme critère d'évaluation de la compatibilité est incertaine. C'est pourquoi d'autres paramètres, comme la tension de surface, ont été suggérés pour prédire l'effet des solvants sur la stabilité des enzymes (ROSS et al., 2000a).

#### *1.4.4.2.4. Inactivation interfaciale eau / solvant organique*

En plus de leur effet toxique sur les cellules, les solvants organiques peuvent également perturber le fonctionnement des enzymes. Il est assez difficile d'isoler les effets de la toxicité moléculaire (voir le paragraphe précédent) de la toxicité de type interfaciale ce qui explique la caractérisation tardive de ce phénomène.

Les travaux de ROSS et al. (2000a) portent sur l'inactivation de trois serine protéases en présence de tridécane. Afin de maîtriser la surface de l'interface, ils utilisent un dispositif de colonne à bulles (GHATORAE et al. 1994a et b) et montrent que l'inactivation des enzymes est majoritairement interfaciale car proportionnelle à la surface de l'interface (**figure I.10**). Les interactions moléculaires du solvant sont écartées étant donné les faibles différences d'activité entre une expérience où le solvant est dissous dans la phase aqueuse et un standard sans solvant. La formation d'un précipité blanc est observée et interprétée comme une agrégation à l'interface des protéines entre elles par mise en contact de leurs domaines hydrophobes.

Parmi les nombreux facteurs susceptibles d'intervenir sur l'inactivation interfaciale, le pH du milieu de bioconversion semble être un élément déterminant, surtout lorsqu'il



**Figure I.11.** Représentation schématique du mécanisme d'inactivation interfaciale des enzymes à l'interface. Phase 1 : adsorption réversible de l'enzyme à l'interface et réarrangement structural. Phase 2 : dépliement rapide. Phase 3 : désorption limitante de l'enzyme inactivée. Phase 4 : agrégation irréversible et précipitation des enzymes inactivées. Les segments hydrophobes exposés durant l'inactivation à l'interface sont représentés par des traits gras (BALDASCINI et al., 2005).

s'approche du pH isoélectrique (pHi) de l'enzyme. En effet, l'absence de charges minimise les interactions électrostatiques répulsives entre les protéines, permettant une agrégation plus compacte de celles-ci au niveau de l'interface, ce qui accélère le phénomène d'inactivation interfaciale (NORDE, 1986, SANDWICK et SHRAY, 1987). Le pH ne peut néanmoins être considéré comme le seul paramètre entrant en jeu car ces résultats n'ont pas été confirmés pour toutes les enzymes étudiées (ROSS et al., 2000a).

D'autres paramètres peuvent être pris en compte comme la flexibilité des protéines (HAYNES et NORDE, 1995). Cette dernière est estimée par la mesure de leur compressibilité adiabatique,  $\beta_s$  (capacité des protéines à diminuer leur volume molaire lorsqu'elles sont exposées à de fortes pressions, sans échange de chaleur) ou par leur aptitude à produire un foisonnement dans une colonne agitée (« foamability ») (TRIPP et al., 1995). Les protéines « rigides » adsorbées au niveau d'une interface eau / solvant organique sont considérées comme plus résistantes aux phénomènes de réarrangement, contrairement aux protéines plus « flexibles » (GHATORAE et al., 1994b). La flexibilité d'une protéine variant avec le pH (CHALIKIAN et al., 1995), la démonstration d'une corrélation flexibilité / pH / inactivation interfaciale a donc été tentée. De la même façon, seulement certaines enzymes étudiées semblent vérifier cette tendance (ROSS et al., 2000a).

Le choix du solvant organique est également un facteur potentiellement important, notamment en ce qui concerne le choix de son groupement fonctionnel. D'une manière générale, il semble que plus les solvants ont un caractère amphiphile, plus l'inactivation interfaciale est faible, alors que les solvants peu polaires présentent l'effet inverse. Il a été établi une relative proportionnalité entre la tension de surface eau / solvants organiques et l'inactivation interfaciale de l' $\alpha$  et de la  $\beta$ -chymotrypsine (ROSS et al., 2000b).

De la même façon, l'hydrophobicité des enzymes peut être considérée comme une force motrice dans les mécanismes d'adsorption à l'interface. Une faible corrélation avec l'inactivation interfaciale a néanmoins été mise en évidence, de même que pour la température de dénaturation témoignant de l'intégrité de l'enzyme (ROSS et al., 2000b).

Dernièrement, une étude effectuée sur l'époxyde hydrolase d'*Agrobacterium radiobacter* AD1 en milieu biphasique eau / octane montre que l'inactivation interfaciale se déroule en 4 étapes distinctes (**figure I.11**). L'enzyme est d'abord adsorbée à l'interface au niveau de sa portion hydrophobe. Elle subit ensuite des dépliements rapides de sa structure, ce qui la rend inactive avant d'être désorbée. Il se produit enfin une agrégation et une précipitation irréversible des enzymes ainsi inactivées (BALDASCINI et JANSSEN, 2005). Les auteurs insistent sur le fait que si l'adsorption se fait naturellement, la désorption elle au

<b>Paramètre</b>	<b>Référence(s) bibliographique(s)</b>
<i>Caractéristiques de l'enzyme</i>	
pH isoélectrique	ROSS et al. (2000a)
Flexibilité	ROSS et al (2000a)
Température de dénaturation	ROSS et al. (2000b)
Hydrophobicité	ROSS et al. (2000b)
<i>Conditions de bioconversion</i>	
Température	ROSS et al. (2000b)
pH	NORDE (1986) ; SANDWICK et SHRAY (1987) ; ROSS et al. (2000a)
Agitation - procédé	BALDASCINI et JANSSEN (2005)
Milieu aqueux	BALDASCINI et JANSSEN (2005)
Solvant organique	ROSS et al (2000b)
Concentration initiale en substrat	BALDASCINI et JANSSEN (2005)
Concentration initiale en enzyme	BALDASCINI et JANSSEN (2005)

**Tableau I.g.** Résumé des paramètres enzymatiques et réactionnels ayant une influence sur les phénomènes d'inactivation interfaciale.

contraire, est un phénomène thermodynamiquement non favorisé et constitue donc l'étape gouvernant les phénomènes d'inactivation interfaciale. Ils proposent une théorie du « renouvellement de l'interface » susceptible d'augmenter la désorption de l'enzyme inactive, accélérant le phénomène d'inactivation interfaciale. Les résultats montrent en parallèle une diminution de la concentration en protéines solubles dans la phase aqueuse en cours de bioconversion et prouvent par spectre de dichroïsme circulaire en UV lointain que celles-ci restent sous forme native. Ces données confirment les observations de ROSS et al. (2000a).

L'étude s'intéresse également au rôle de l'agitation. Une augmentation de cette dernière, pour des surfaces d'échanges identiques, entraîne une augmentation de l'inactivation interfaciale. L'explication apportée est que l'agitation provoquerait des mouvements circulaires au niveau de l'interface générant des « empiétements » favorisant le renouvellement de l'interface. Les auteurs ont également testé le rôle de l'agitation au sein de bioréacteurs dans lesquels la phase organique est sous forme d'émulsion. Ils ont mesuré une inactivation interfaciale jusqu'à 10 fois moins forte. Ceci prouve que la formation d'une interface sous forme d'émulsion, bien que comportant des surfaces d'échange considérablement plus élevées n'entraîne pas pour autant un « renouvellement » plus important de l'interface. Au contraire, les bulles de solvant « libres » dans la phase aqueuse semblent moins assujetties à ces mouvements circulaires.

Le rôle de la concentration initiale en protéine est également mis en avant. Une concentration initiale en protéines plus élevée entraînerait une précipitation plus compacte niveau de l'interface augmentant le potentiel d'adsorption. Les auteurs proposent l'utilisation de « protéines sacrificielles » susceptibles d'entrer en compétition avec l'adsorption de l'enzyme et ralentissant son inactivation.

BALDASCINI et JANSSEN (2005) montrent enfin qu'une concentration initiale en substrat élevée augmente le phénomène d'inactivation interfaciale. L'explication donnée recoupe les résultats de ROSS et al. (2000b) accusant une augmentation de la tension de surface par le substrat.

D'une manière générale, le devenir d'une enzyme au niveau d'une interface eau / solvant organique est conditionné par de nombreux facteurs. L'identification formelle du rôle joué par l'inactivation interfaciale au niveau de la bioconversion nécessite donc au préalable une étude systématique des caractéristiques de l'enzyme utilisée et de son comportement face aux conditions de bioconversion choisies (**tableau I.g**).

Composés	$S_w$ (mmol.L <sup>-1</sup> )	$\gamma_w^\infty$	$\gamma_w^\infty \cdot P^\circ$ (mm Hg)	$P^\circ$ (mm Hg)
(R)-(+)-limonène	0,150±0,015	3,7.10 <sup>5</sup> ±3,7.10 <sup>4</sup>	5,93.10 <sup>5</sup> ±5,93.10 <sup>4</sup>	1,60±0,22
(-)- $\alpha$ -pinène	0,037±0,004	1,5.10 <sup>6</sup> ±1,5.10 <sup>5</sup>	5,95.10 <sup>6</sup> ±5,95.10 <sup>5</sup>	3,97±0,55
(-)- $\beta$ -pinène	0,081±0,006	6,86.10 <sup>5</sup> ±5,14.10 <sup>4</sup>	ND	ND
myrcene	0,22±0,02	2,52.10 <sup>5</sup> ±2,52.10 <sup>4</sup>	4,75.10 <sup>5</sup> ±4,75.10 <sup>4</sup>	1,88±0,26
1-(S)-endo(-)-borneol	3,00±0,24	1,85.10 <sup>4</sup> ±1,48.10 <sup>3</sup>	8,55.10 <sup>2</sup> ±2,00.10 <sup>2</sup>	0,05±0,01
alcool endo-(+)-fenchyl	5,37±0,32	1,03.10 <sup>4</sup> ±0,62.10 <sup>3</sup>	1,17.10 <sup>3</sup> ±1,64.10 <sup>2</sup>	0,11±0,02
(-)- $\alpha$ -pinène-oxyde	2,55±0,48	2,18.10 <sup>4</sup> ±4,14.10 <sup>3</sup>	1,78.10 <sup>4</sup> ±3,38.10 <sup>3</sup>	0,82±0,15
(+)-limonène oxyde	4,61±0,16	1,20.10 <sup>4</sup> ±0,42.10 <sup>3</sup>	7,45.10 <sup>3</sup> ±3,72.10 <sup>2</sup>	0,62±0,04
(-)-carvéol	19±2	2,92.10 <sup>3</sup> ±2,92.10 <sup>2</sup>	ND	ND
(±)-linalool	10,11±0,61	5,49.10 <sup>3</sup> ±0,33.10 <sup>2</sup>	ND	ND
$\alpha$ -terpinéol	12,25±1,10	4,53.10 <sup>3</sup> ±0,41.10 <sup>2</sup>	ND	ND
(+)-carvone	8,80±0,22	6,31.10 <sup>3</sup> ±0,16.10 <sup>2</sup>	ND	ND

**Tableau I.h.** Solubilité dans l'eau à 25°C,  $S_w$ , coefficient d'activité à une dilution infinie dans l'eau,  $\gamma_w^\infty$ , et pression de vapeur de plusieurs terpènes et terpénoïdes (FICHAN et al., 1999).

## I.5. Biotransformation des terpènes et terpénoïdes

Les terpènes, avec quelques 20000 molécules connues actuellement parmi une estimation de 40000 existantes, représentent la famille de composés la plus abondamment représentée dans la nature (HILL, 1993 ; AHARONI et al., 2005). Les terpènes non fonctionnalisés possèdent généralement des propriétés organoleptiques limitées et peuvent, de plus, être à l'origine de la formation d'arômes indésirables (« off flavours »). A l'inverse, les dérivés oxydés des terpènes, les terpénoïdes, possèdent des propriétés organoleptiques uniques activement recherchées dans l'industrie des arômes et des parfums (voir la partie I.1) mais sont peu représentés dans la nature. Les terpènes hydrocarbonés apparaissent ainsi comme des précurseurs idéaux dans les procédés de production biocatalytique de terpénoïdes, ce qui leur confère une meilleure valeur ajoutée (SHRADER, 2007).

### I.5.1. Difficultés liées à la bioconversion des terpènes

Les biotransformations des monoterpènes en monoterpénoïdes sont communément reconnues comme étant très intéressantes économiquement mais difficiles à réaliser par des procédés conventionnels (SHRADER, 2007). Ce phénomène est essentiellement lié aux propriétés physico-chimiques de ces molécules.

Ce sont en effet des composés relativement instables, surtout dans les milieux aqueux et/ou oxygénés. Ils peuvent subir facilement un nombre important de réactions chimiques spontanées comme une autooxydation, une *cis-trans* isomérisation, une racémisation, une hydratation, une cyclisation ou encore un réarrangement ou une polymérisation (CLARK et CHAMBLEE, 1992). Ces phénomènes abiotiques peuvent d'une part entrer en compétition avec la réaction biologique, entraînant ainsi une diminution du rendement de bioconversion et peuvent d'autre part générer chimiquement les produits de la bioconversion, ce qui brouille l'estimation de son efficacité réelle. Enfin les produits de bioconversion eux-mêmes peuvent être la cible de réactions abiotiques.

Les monoterpènes sont également très peu solubles dans l'eau (**tableau I.h**). Selon l'affinité du système biologique pour le substrat, la vitesse de réaction peut donc être limitée par la biodisponibilité du substrat. Dans des conditions de fortes concentrations en biocatalyseur cette faible solubilité pourrait affecter la vitesse de biotransformation. La volatilité caractéristique des monoterpènes qui rend ces composés aromatiques si attrayants, peut également poser des problèmes au cours des procédés de bioconversion. En effet, les

biotransformations intéressantes sont souvent des réactions oxygène-dépendantes qui nécessitent une agitation et une aération importante provoquant des pertes de substrats et de produits par entraînement (GRIVEL, 1999). Par chance, les terpénoïdes produits sont généralement moins volatils que les substrats utilisés.

Une autre difficulté rencontrée lors de l'utilisation de terpènes est due à leur toxicité et à leur forte activité antimicrobienne (OKAMURA, 1974). Les mécanismes de toxicité des terpènes et terpénoïdes semblent en grande partie liés à leur caractère hydrophobe (voir le paragraphe I.4.4.2.3).

### **I.5.2. Activité biologique des terpènes et terpénoïdes**

Il est important de noter que si l'effet toxique des terpènes et terpénoïdes est dommageable lors des opérations de bioconversions, il est par contre d'un grand intérêt dans l'élaboration de produits antiseptiques industriels. Certains terpènes ou mélanges terpéniques comme la turpentine sont par exemple depuis longtemps incorporés dans des produits antibactériens (ROCKEMANN, 1922). Récemment, les propriétés antibactériennes des terpènes et terpénoïdes ont fait l'objet d'un nombre important d'études. L'objectif est de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques conventionnels pour lesquels les phénomènes de résistance microbienne sont de plus en plus observés (ESSAWI et SROUR, 2000). Le 1,8-cineole présente par exemple un effet toxique contre des souches de *Listeria monocytogenes* (MOUREY et CANILLAC, 2002) et contre certains champignons phytopathogènes (KORDALI et al., 2005), le terpinen-4-ol est actif contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (GRIFFIN et al., 1999). L'activité antibactérienne des terpènes et terpénoïdes semble en grande partie liée à leur groupement fonctionnel selon un ordre d'importance établi : phénols > aldéhydes > cétones > alcools > esters > hydrocarbures (KALEMBA et KUNICKA, 2003). Par exemple, l'activité inhibitrice du cinnamaldéhyde sur la croissance de nombreuses bactéries et champignons semble liée à sa fonction aldéhyde couplée à des doubles liaisons conjuguées suivies d'une longue chaîne carbonée (CHANG et al., 2001).

Certains terpénoïdes possèdent également une activité antivirale. L'isoborneol, par exemple, est capable d'inhiber le cycle viral de l'*Herpes simplex* (HSV) type 1 (ARMAKA et al., 1999). Le linalool montre une forte activité contre les adénovirus (CHIANG et al., 2005).

Récemment, une étude a démontré que l'apport de composés issus d'huiles essentielles dans l'alimentation de rats avait un effet contre l'ostéoporose (MÜHLBAUER et al., 2003). Il

a été observé que si certains monoterpènes comme l' $\alpha$ -pinène sont inactifs, certains des métabolites issus de leur dégradation *in vivo* présentent une activité. L'acide (2E,6R)-8-hydroxy-2,6-diméthyl-2-octénoïque, un monoterpénoïde découvert il y a une dizaine d'années, présente ainsi un effet réel contre l'ostéoporose (YAMAGUCHI et al., 1999).

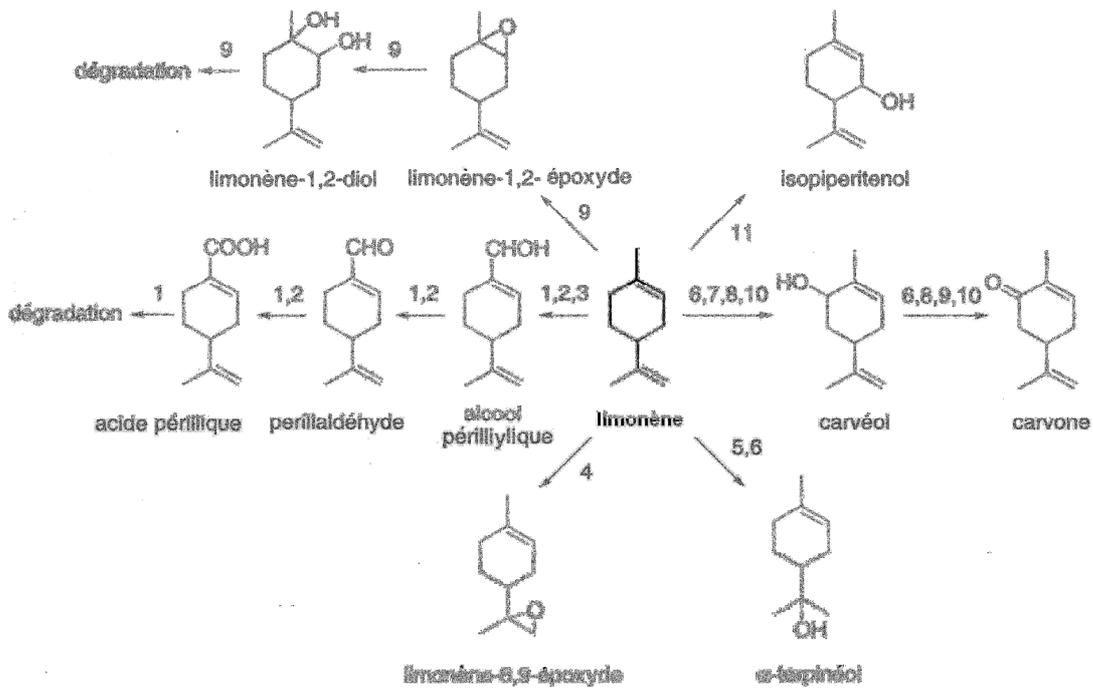
D'après des études épidémiologiques réalisées sur des populations consommant des monoterpènes dans leur alimentation habituelle, il semble que ces molécules possèdent un effet préventif contre le cancer (CROWELL, 1999 ; ELSON, 1995 ; BLOCK et al., 2004 ; ELSON et YU, 1994). Des études cliniques ont montré que certains monoterpènes comme le D-limonène et l'alcool perillylique, pouvaient être utilisés dans le traitement de certains cancers. Le limonène a des effets thérapeutiques sur le cancer de l'estomac (LU et al., 2004) alors que l'alcool perillylique montre un effet significatif contre le cancer du sein (STEARNS et al., 2004) et un effet potentiel contre les leucémies (CLARK et al., 2003).

Plusieurs autres activités ont été découvertes chez certains terpènes, comme des activités analgésiques (menthol), antioxydantes ( $\alpha$ -tocophérol), insectes-repulsives ou - attractives (linalool). Un grand nombre d'huiles essentielles possèdent également des propriétés anxiolytiques (WEI CHEN et al., 2004), des effets positifs sur le système immunitaire (ALEXANDER, 2002) et contre la maladie d'Alzheimer (PERRY et al., 2003). Le lien entre ces activités et les terpènes présents dans ces huiles essentielles n'a cependant pas encore été formellement établi.

### I.5.3. Exemples de biotransformations

Comme nous l'avons vu précédemment, les terpènes et terpénoïdes constituent la principale source de composés aromatiques que l'on trouve dans les huiles essentielles et les plantes supérieures. Leur biotransformation peut également conduire à l'obtention de composés intéressants pour l'industrie des arômes (partie I.1) et/ou pour l'industrie pharmaceutique (voir ci-dessus). Les microorganismes préférés pour ces réactions sont par ordre d'importance, les procaryotes, les levures et les champignons. Le nombre très important de ces biotransformations ainsi que leurs natures diverses constituent un domaine très vaste étudié par de nombreux auteurs.

Parmi les monoterpénoïdes acycliques, le linalool, le citronellol et le géraniol sont plus particulièrement étudiés. Le linalool peut être converti par *Aspergillus niger* ATCC 9142 en une mixture *cis* et *trans* de furanoïde linalool oxyde et pyranoïde linalool oxyde, composés possédant des notes de lavande très appréciées en parfumerie (DEMYTTENAERE et



**Figure I.12.** Principales voies de biotransformations du limonène par des microorganismes : 1 *Bacillus* et *Pseudomonas* ; 2 *Pseudomonas putida* DSM12264 ; 3 *Bacillus stearothermophilus* ; 4 *Xantholobacter* sp. C20 ; 5 *Penicillium digitatum* NRLL 1202 ; 6 *Pseudomonas aeruginosa* ; 7 *Rhodococcus opacus* PWD4 ; 8 *Rhodococcus globerulus* PWD8 ; 9 *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 ; 10 *Pleurotus sapidus* ; 11 *Hormonema* sp. UOFS-Y-0067 (selon SCHRADER, 2007).

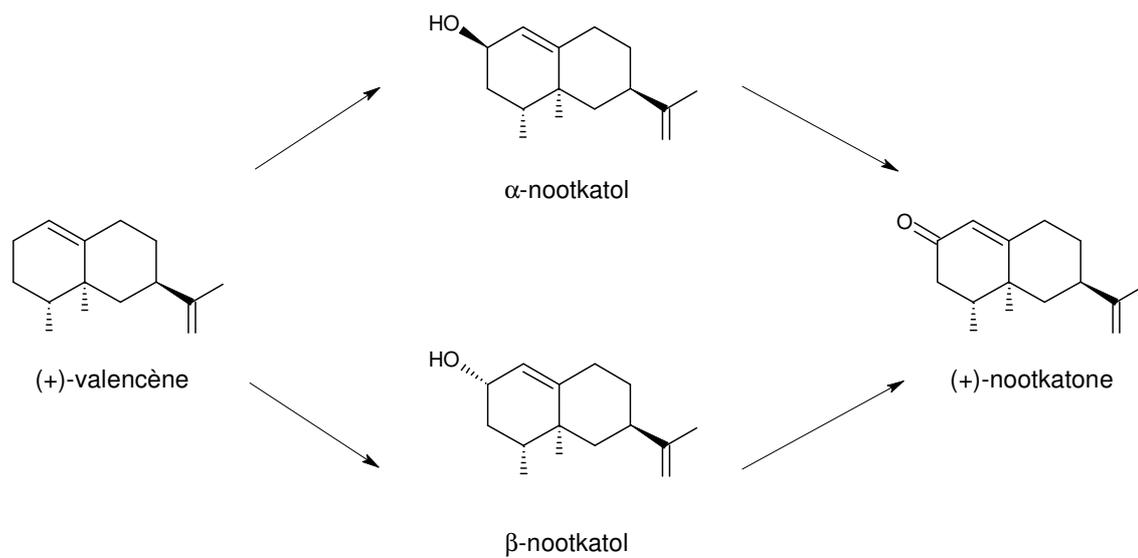
WILLEMEN, 1998). Le citronellol, abondant dans les huiles essentielles d'eucalyptus et de géranium, peut être biotransformé par le basidiomycète *Cystoderma carcharias* en *cis* et *trans*-2-isobutenyl-4-méthyltetrahydropyrane ou oxydes de rose (ONKEN et BERGER, 1999). Ce composé, bien que produit minoritairement au cours de cette bioconversion, est très recherché dans l'industrie des parfums.

Un des monoterpènes cycliques les plus étudiés est sans doute le limonène. Produit à plus de 50000 tonnes par an à partir de l'huile d'écorce d'orange dont il est le principal constituant, il fait partie des précurseurs d'origine naturelle les plus bon marché (LIMBERGER et al., 2007). Les différentes voies de bioconversion du limonène sont représentées dans la **figure I.12**. Elles conduisent notamment à la synthèse de l'alcool périllylique (CHATTERJEE et BHATTACHARYYA, 2001). Le menthol est également un des terpènes monocycliques les plus employés dans les industries pharmaceutiques et la parfumerie et fait également l'objet de nombreuses recherches (CROTEAU, 1980).

Le plus abondant des terpènes bicycliques présents dans la nature est l' $\alpha$ -pinène. Les principaux travaux sur ce composé seront exposés dans le paragraphe suivant. De nombreuses études ont également été réalisées sur 75 des terpénoïdes bicycliques tels que le 1-8 cinéole ou eucalyptol ou encore le 3-carène.

Les diterpénoïdes les plus étudiés comportent notamment les composés dérivant des labdanes, isolés de variétés de tabac qui présentent des propriétés aromatiques intéressantes. Le *cis*-abienol y est notamment présent de façon majoritaire. La biotransformation de ce composé par *Nocardia restrictica* JTS 162 et *Rhodococcus erythropolis* JTS 131 peut conduire à la production des composés utilisés dans l'aromatization du tabac (MIKAMI, 1988). Un autre diterpénoïde, l'Ambrox® (ambre gris oxyde), est l'un des composés les plus importants de l'ambre gris, une fragrance d'origine animale très convoitée. Cette molécule est issue chimiquement d'un diol obtenu par la bioconversion du sclareol, un diterpène présent dans des huiles essentielles d'origine végétale, par des levures (FARBOOD et WILLIS, 1989).

Les sesquiterpènes constituent la classe la plus diversifiée des terpènes et leurs dérivés fonctionnalisés jouent un rôle important dans l'industrie des arômes comme dans l'industrie pharmaceutique. Les difficultés liées à la synthèse de ces derniers par voie chimique et la présence importante de sesquiterpènes non fonctionnalisés dans les huiles essentielles (utilisable comme précurseur de bioconversion) ont stimulé la volonté de les obtenir par voie biocatalytique (LAMARE et FURTOSS, 1990). Par exemple, la bioconversion du valencène en nootkatone (**figure I.13**), une molécule possédant un parfum de pamplemousse, est très



**Figure I.13.** Biotransformation du valencène en nootkanone via l' $\alpha$ - et/ou le  $\beta$ -nootkatol par des cellules de *Gynostemma pentaphyllum*.

utilisée dans la confection d'aliments et de boissons aux arômes naturels (OHLOFF, 1994). Cette molécule a, de plus, trouvé une récente application dans l'industrie des fibres et des cosmétiques (FURUSAWA et al., 2005). Le patchoulol, constituant principal de l'huile essentielle de Patchouli (30 à 45 %), peut être transformé en 10-hydroxypatchoulol par plusieurs variétés de champignons. Ce produit d'hydroxylation ne pouvant être obtenu par synthèse chimique, les biocatalyseurs jouent ici un rôle prépondérant. Par la suite, il est possible de convertir chimiquement, en deux étapes, le 10 hydroxy-patchoulol en norpatchoulol, qui est le principal constituant du parfum de patchouli et par conséquent très recherché dans l'industrie des parfums (SUHARA et al., 1981).

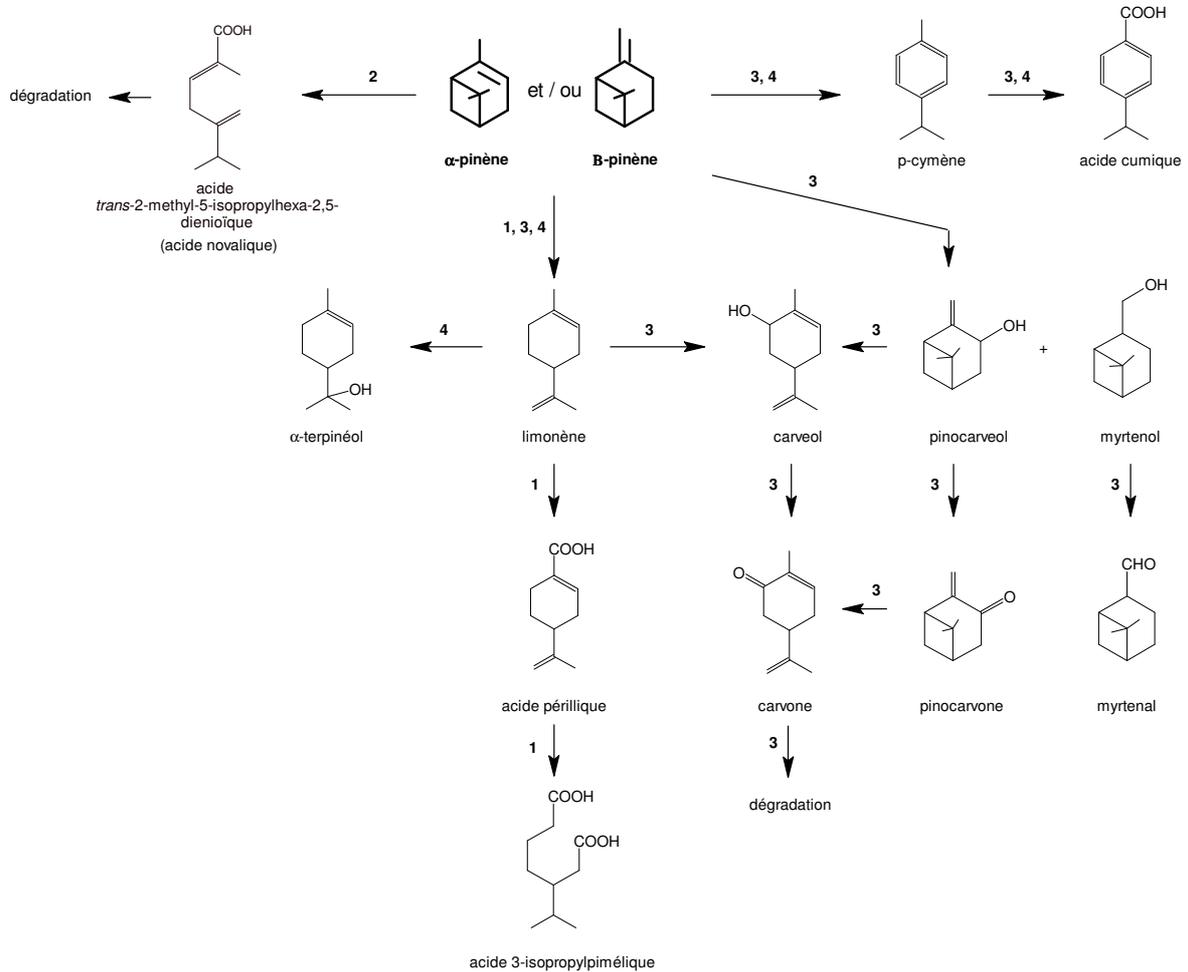
Les norterpènes ou ionones produits par la dégradation des terpénoïdes supérieurs tels que les caroténoïdes et les irones dérivés des triterpènes, sont des composés aromatiques non chimiquement synthétisables, c'est la raison pour laquelle le passage par un biocatalyseur est nécessaire. Des travaux ont montré que la biotransformation de ces composés pouvait être catalysée par des souches commerciales d'*Aspergillus* permettant notamment de produire la 2 et la 4 hydroxy- $\beta$ -ionone (LARROCHE et al., 1995a-b, GRIVEL, 1999) donnant un mélange de composés présentant un arôme de tabac (MIKAMI et al., 1981a-b ; MIKAMI, 1988).

#### **I.5.4. Biotransformation des pinènes**

Les pinènes ( $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -pinène) sont les terpènes les plus abondants dans la nature. Ils sont représentés à plus de 90 % dans la turpentine, l'huile essentielle issue de l'écorce de pin et à plus de 12 % dans les huiles essentielles d'agrumes (OHLOFF, 1994). Ils sont obtenus industriellement par distillation fractionnée de la turpentine (KRASNOBAJEV, 1984). Avec plus de 160 000 tonnes d' $\alpha$ -pinène et 26 000 tonnes de  $\beta$ -pinène produites par an, ils constituent la première source naturelle de terpènes présente sur le marché. De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence leur bioconversion en terpénoïdes par différents microorganismes. Les paragraphes suivants décrivent les principales voies de dégradation des pinènes par des souches bactériennes. Certains des métabolites d'intérêt qui en découlent seront ensuite présentés plus en détails.

##### **I.5.4.1. Les voies générales de dégradation des pinènes**

Le premier schéma métabolique est mis en évidence par les travaux de SHUKLA et BHATTACHARYYA (1968) portant sur une souche de *Pseudomonas PL* cultivée sur  $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone. L'étude montre que cette culture permet d'obtenir



**Figure I.14.** Les voies générales de dégradation de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -pinène. Les flèches correspondent à des réactions métaboliques observées en présence des souches bactériennes suivantes : 1. *Pseudomonas PL* (SHUKLA et BATTACHARYA, 1968) ; 2. *Pseudomonas PX1* (GIBON et PIRT, 1971) ; 3. *Bacillus pallidus* BR425 (SAVITHIRY et al., 1998) 4. *Pseudomonas PIN* (YOO et DAY, 2002).

plusieurs métabolites principalement associés à l'oxydation du groupement méthyle en C10 de la molécule d' $\alpha$ -pinène. Ils observent notamment la production d'acide périllique, précédemment identifié comme un métabolite produit par ce microorganisme à partir du limonène (DHAVALIKAR et al., 1966), ainsi que celle d'acides acycliques tels que l'acide 3-isopropylpimélique et l'acide 3-isopropénylpimélique. Un schéma métabolique a pu être défini au cours duquel le cycle cyclobutane est d'abord coupé pour former le limonène (ou 1-p-menthène), puis une oxydation du groupement méthyle en C7 (i.e C10 du pinène) suivie d'une décyclisation réalisée par une  $\beta$ -oxydation conduit à la formation d'acide 3-isopropylpimélique (**figure I.14**).

Un deuxième schéma métabolique de la dégradation de l' $\alpha$ -pinène par *Pseudomonas* PX1 aboutissant à la formation d'intermédiaires appelés composés « novas » (comme l'acide novalique), est initiée en 1971 par les travaux de GIBBON et PIRT. Cette voie ainsi que l'avancée des connaissances relatives à celle-ci seront détaillées dans le paragraphe suivant.

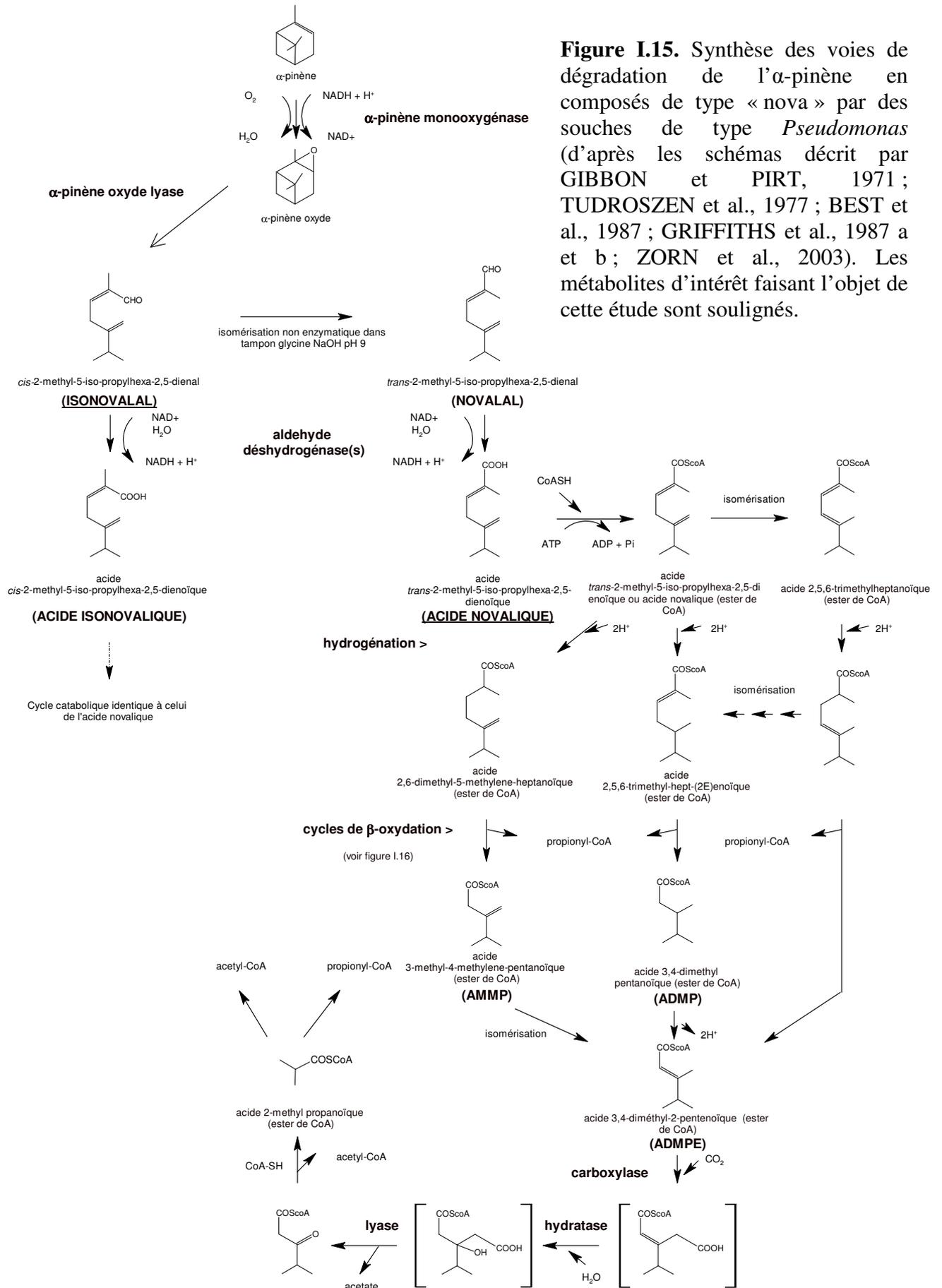
Par la suite, un troisième schéma métabolique est mis en évidence par SAVITHIRY et al. (1998) chez une bactérie aérobie thermophile identifiée comme étant *Bacillus pallidus* BR 425. Des cultures en conditions monophasiques et biphasiques de cette souche en présence d' $\alpha$ -pinène, de  $\beta$ -pinène ont permis d'observer la formation de nombreux monoterpènes oxydés identifiés comme étant des dérivés du carveol. Une voie métabolique de dégradation des pinènes aboutissant à la formation de carvone, de pinocarvone et de myrtenal a été proposée (**figure I.14**).

Dernièrement, YOO et DAY (2002) ont isolé une souche de *Pseudomonas* du sol, *Pseudomonas* PIN, capable de métaboliser à la fois l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène via des dérivés du p-menthène comme le limonène et le p-cymène. Les auteurs ont montré que le limonène pouvait conduire à la formation d'acide périllique, intégrant ainsi la voie découverte par SHUKLA et BHATTACHARYYA, mais également à des dérivés oxygénés tels que l' $\alpha$ -terpinéol, l' $\alpha$ -terpinène-4-ol et le p-cymène-8-ol. L'acide cumique peut également être produit à partir du p-cymène.

#### 1.5.4.2. La voie de dégradation de l' $\alpha$ -pinène en composés « novas »

Cette voie métabolique découle des travaux de GIBBON et PIRT (1971) qui observent, lors de la dégradation de l' $\alpha$ -pinène par une souche de *Pseudomonas* PX1, l'accumulation d'un nombre important de métabolites non retrouvés dans la voie de SHUKLA et BHATTACHARYYA. Parmi ces métabolites, trois acides sont identifiés comme

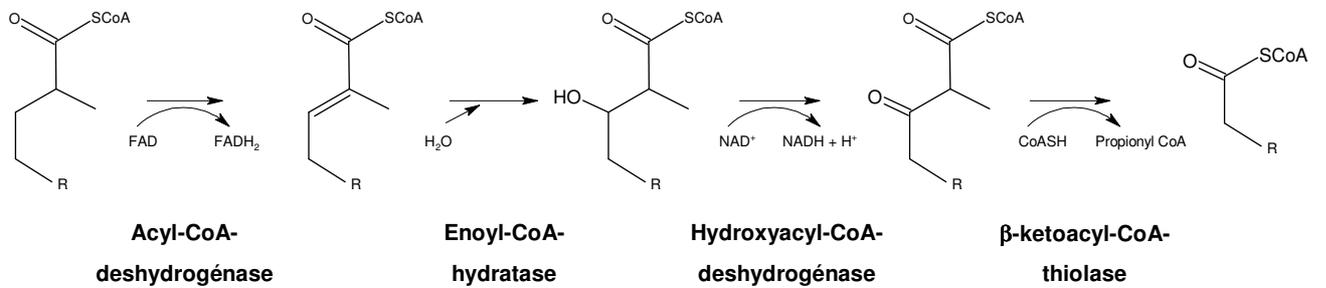
# I. Etude bibliographique



étant l'acide 3,4-diméthylpentanoïque (ADMP), l'acide 2,5,6-triméthylhept-3-énoïque et l'acide 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoïque. Quelques années plus tard, les travaux de TUDROSZEN et al. (1977) sur une souche de *Pseudomonas* PIN11 confirme l'identité de ces acides par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire  $^{13}\text{C}$ . L'utilisation de mutants de cette souche permet l'accumulation d'un nouvel intermédiaire identifié comme étant l'acide 3-méthyl-4-méthylène-pentanoïque (AMMP). L'utilisation de l'acrylate, un inhibiteur de la  $\beta$ -oxydation (THIJSSE, 1964), permet d'observer non pas un mais deux acides isomères de l'acide 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoïques de conformation *cis* et *trans*, baptisés acide isonovalique et acide novalique respectivement.

Cette voie métabolique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène est à nouveau observée par BEST et al. (1987) chez une souche de *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. Les auteurs montrent que cette dernière est capable de dégrader complètement l' $\alpha$ -pinène et de l'utiliser comme unique source de carbone et d'énergie. Dans un premier temps, l' $\alpha$ -pinène est dégradé en un époxyde, l' $\alpha$ -pinène oxyde par une réaction d'oxygénation NADH dépendante. L' $\alpha$ -pinène oxyde est alors transformé par un clivage de ses trois cycles par une enzyme, l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase qui ne nécessite ni énergie ni cofacteur. Le produit résultant est un aldéhyde, le 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal. Ce dernier est présenté comme étant un précurseur de la formation des 2 isomères de l'acide 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoïque précédemment identifiés par TUDROSZEN. Les auteurs proposent alors une voie enzymatique permettant de rompre le cycle de l' $\alpha$ -pinène en acides aliphatiques, dégradés ensuite par un métabolisme de type  $\beta$ -oxydatif (**figure I.15**). Ils suggèrent également des étapes d'isomérisation expliquant la présence conjointe des acides *cis* et *trans*.

La même année, GRIFFITHS et al. (1987a) montrent que des extraits cellulaires de *Nocardia* P18.3 isolée au cours de cultures sur  $\alpha$ -pinène ont également la capacité de dégrader l' $\alpha$ -pinène oxyde sans apport d'énergie ni de cofacteur. L'aldéhyde produit est identifié comme étant l'isomère *cis* du 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal ou isonovalal. Une rapide transition non enzymatique de l'isomère *cis* vers l'isomère *trans* (novalal) est mise en évidence lors de l'utilisation d'un tampon glycine/NaOH pH 9. Les auteurs mettent en évidence la présence de déshydrogénase(s)  $\text{NAD}^+$  dépendante(s) permettant l'oxydation des aldéhydes isomères en leurs acides respectifs, l'acide isonovalique et l'acide novalique. Conformément aux observations précédentes (GIBBON et PIRT, 1971 ; TUDROSZEN et al., 1977 ; BEST et al., 1987), ils proposent un schéma de dégradation de l' $\alpha$ -pinène comportant les étapes suivantes : i) oxydation de l' $\alpha$ -pinène en  $\alpha$ -pinène oxyde via une monooxygénase NADH dépendante ii) rupture de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase



**Figure I.16.** Détail de l'étape de  $\beta$ -oxydation (selon LATZA, 1999).

cofacteur indépendante iii) isomérisation de l'isonovalal en novalal iv) Déshydrogénation conjointe de l'isonovalal et du novalal en leurs acides respectifs v) Dégradation par  $\beta$ -oxydation des acides conduisant à l'accumulation d'AMMP (**figure I.15**).

Plus récemment, les travaux de ZORN et al. (2004) utilisant également une souche de *Pseudomonas fluorescens* et des méthodes de marquage isotopique, ont permis de confirmer l'existence d'un catabolisme ressemblant à la  $\beta$ -oxydation des lipides, partant de l'acide novalique. Celui-ci subirait une ou plusieurs hydrogénations puis une  $\beta$ -oxydation en acide 3,4-diméthyl-2-penténoïque (ADMPE) formant 2 molécules de propionyl-CoA (le détail de cette étape de type  $\beta$ -oxydatif est indiqué en **figure I.16**). Nous remarquons la présence des intermédiaires AMMP et de l'acide 2,5,6-triméthyl-hept-2-énoïque, très proche de l'acide 2,5,6-triméthyl-hept-3-énoïque précédemment mis en évidence par GIBBON et PIRT. Les auteurs suggèrent que l'ADMPE est carboxylé au niveau de son groupement 3-méthyl puis hydraté. L'intermédiaire produit serait ensuite clivé par une lyase libérant une nouvelle molécule de propionyl-CoA, deux molécules d'acétyl-CoA et de l'acétate. Cette voie métabolique globale (**figure I.15**) pourrait être la voie prédominante de la dégradation des terpènes et terpénoïdes par les bactéries du sol. Les auteurs mettent l'accent sur deux enzymes, une carboxylase et une lyase, qui ne font pas partie de la  $\beta$ -oxydation classique des acides gras et dont la présence conférerait aux souches bactériennes qui les possèdent la capacité de dégrader l' $\alpha$ -pinène.

Parmi l'ensemble des métabolites produits au cours de cette voie métabolique, l'isonovalal et l'acide novalique sont des intermédiaires particulièrement intéressants en raison de leur utilisation potentielle dans l'industrie des arômes et des parfums.

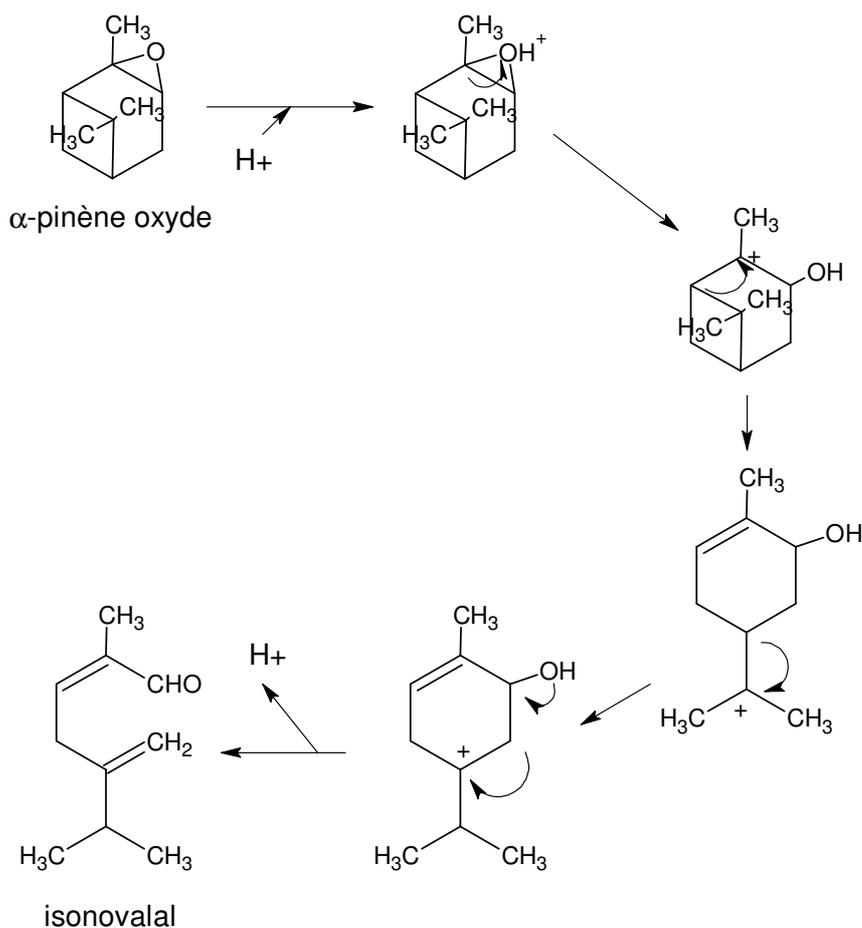
#### 1.5.4.3. Production de l'isonovalal

Le *cis*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal ou isonovalal possède une odeur unique et complexe comportant des notes citronnées, boisées et épicées, qui peuvent permettre d'envisager son emploi dans la parfumerie des produits ménagers. Ainsi, ce composé a déjà été inclus dans la composition de parfums, de poudres détergentes, de colognes de jacinthe, ou de pomme (BURFIELD et al., 1989). Une concentration de 1 à 5 % (v/v) est suffisante compte tenu de l'intensité olfactive de cette molécule. Sa production par voie biologique a fait l'objet d'un brevet (BURFIELD et al., 1989) qui n'est plus maintenu actuellement.

L'unique moyen connu à ce jour permettant l'obtention de l'isonovalal est un procédé biocatalytique utilisant l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase (EC 5.5.1.10). Cette enzyme, capable de

Souche bactérienne	<i>Nocardia</i> P18.3	<i>Pseudomonas putida</i> PX1 NCIMB10684
MM (KDa)	50	42
Sous-unités (KDa)	17 - 22	21 - 21
$K_S$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	9	210
$r_{S_{\text{max}}}$ ( $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ )	15	ND
Turn-over	11000	ND
pHi	4	ND
pH optimaux	7 - 10	ND
Référence bibliographique	GRIFFITHS et al. (1987b)	TRUDGILL (1994)

**Tableau I.i.** Caractéristiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de différentes souches bactériennes (MM : Masse molaire.  $K_S$  : constante de Michaelis.  $r_{S_{\text{max}}}$  : activité spécifique maximale. pHi : pH isoélectrique. Turn-over : moles de produit formées par une mole de lyase. ND : non déterminé).



**Figure I.17.** Schéma réactionnel de décyclisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase proposé par GRIFFITHS et al., 1987b.

décycliser l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal a été étudiée par GRIFFITHS et al. chez *Nocardia* P18.3 et *Pseudomonas putida* PX1. Les principales caractéristiques étudiées sont représentées dans le **tableau I.i**. Une inactivation de l'enzyme a été mise en évidence au cours du processus de bioconversion vraisemblablement liée à un phénomène de « catalyse suicide » (voir le paragraphe I.3.3.3.1) ou à une inhibition par un des intermédiaires de la réaction (**figure I.17**) qui reste fixé à l'enzyme et encombre le site catalytique, empêchant son fonctionnement (GRIFFITHS et al., 1987b).

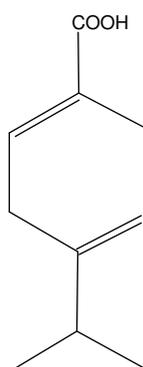
Les travaux de FONTANILLE et LARROCHE (2003) ont permis d'optimiser considérablement la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal dans une milieu biphasique eau / hexadécane, aboutissant à des rendements proches de 75 % encore jamais réalisés dans ce domaine. Ces résultats ont été obtenus grâce à la découverte d'une nouvelle souche bactérienne, *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, capable de dégrader l' $\alpha$ -pinène selon la voie des composés « novas ». Deux autres paramètres clefs ont été mis en évidence.

Le premier concerne les cellules et la nécessité de les perméabiliser par des traitements à la fois physiques (congélation, sonication) et chimiques (utilisation de solvants organiques tel que le chloroforme ou l'éther). Ces traitements permettent ainsi de favoriser le contact enzyme / substrat par trois phénomènes distincts. D'une part, le relargage d'une partie de l'enzyme d'intérêt, l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase, hors des cellules. D'autre part, l'amélioration de la diffusion du substrat et du produit à travers la membrane plasmique devenue perméable. Ces résultats ont permis d'augmenter considérablement à la fois les vitesses et les rendements de biotransformation.

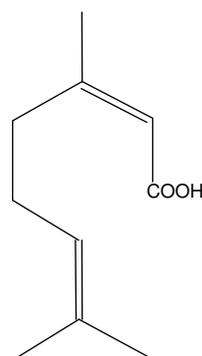
Le second paramètre concerne l'enzyme responsable de cette réaction, l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase, et son inactivation. Les auteurs ont montrés que l'enzyme présentait, de la même façon que chez *P.nocardia*, un turn-over constant (108 mmol.L<sup>-1</sup> d'isonovalal par g.L<sup>-1</sup> de biomasse) entraînant un arrêt rapide et irréversible de la bioconversion (FONTANILLE et LARROCHE, 2003). Les mécanismes impliqués dans cette inactivation, actuellement reconnue comme étant le principal facteur limitant de ce procédé, restent à définir.

#### I.5.4.4. Production de l'acide novalique

L'acide *trans*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-diénoïque ou acide novalique présente un intérêt potentiel pour l'industrie des parfums. En effet, un grand nombre de procédés permettant la bioconversion des monoterpènes en leur acide respectif ont été brevetés (WHITEHEAD et OHLEYER, 1997), ces acides constituant une matière première de choix



Acide novalique



Acide géranique

**Figure I.18.** L'Acide novalique, une molécule structurellement proche de l'acide géranique, utilisée dans l'industrie des parfums.

dans la production d'esters aux propriétés aromatiques souvent appréciées. A titre d'exemple l'acide géranique, dont la structure moléculaire est relativement proche de celle de l'acide novalique (**figure I.18**), est largement utilisée pour la production de molécules estérifiées aux notes aromatiques de rose, fruit, géranium et de lavande (FAHLBUSCH et al., 2005). Un procédé de bioconversion du géranol en acide géranique par une souche de *Rhodococcus* SP3 isolée du sol a récemment été mis au point. Le système a permis de produire 3,4 g.L<sup>-1</sup> en 96 h avec un rendement de 50 %. Des concentrations plus importantes de précurseur entraînent une diminution des rendements à cause des propriétés toxiques du géranol (CHATTERJEE, 2004). Ces résultats illustrent bien les problèmes généralement rencontrés dans ce type de procédé aérobie.

En effet, L'étude de FONTANILLE et LARROCHE (2003) a montré que l'utilisation de cellules congelées ne permettait pas de produire les métabolites acides de la voie de l' $\alpha$ -pinène (acide novalique, ADMPE) laissant supposer que la dégradation de l'isonovalal nécessiterait des cofacteurs vraisemblablement régénérés par des cellules entières non perméabilisées. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents de GRIFFITHS et al. (1987 a) qui ont montré que les aldéhydes (isonovalal et novalal) étaient oxydés en leurs acides 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoïque respectifs par une ou plusieurs déshydrogénase(s) NAD<sup>+</sup> dépendante(s) produisant du NADH,H<sup>+</sup>. Ce dernier peut être réoxydé en NAD<sup>+</sup> par la chaîne respiratoire d'une bactérie aérobie à condition que sa membrane plasmique soit intacte. La mise au point d'un procédé permettant la production de l'acide novalique par *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 nécessiterait donc de trouver les conditions permettant l'accumulation de ce métabolite, habituellement minoritaire, tout en restant soucieux de préserver la viabilité des cellules.

## I.6. Généralités sur la famille des Pseudomonadaceae

### I.6.1. Introduction

La famille des *Pseudomonadaceae* appartient à un vaste groupe de bactéries ayant dans le passé, par simple convention, reçu la dénomination de " non-fermentant". Le genre-type de cette famille est celui des *Pseudomonas*. Il constitue l'un des plus complexes parmi les genres de bactéries à Gram négatif. Sa création par MIGULA remonte à 1894. Défini sur des caractères de morphologie cellulaire et de métabolites, il n'a cessé depuis de subir des remaniements. Son histoire mouvementée résulte inévitablement des difficultés rencontrées

---

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	
<i>P. agariri</i>	<i>P. marginalis</i>
<i>P. alcaligenes</i> *	<i>P. meliae</i>
<i>P. amygdali</i>	<i>P. mendocina</i> *
<i>P. anguiliseptica</i>	<i>P. micidolens</i>
<i>P. asplenii</i>	<i>P. oleovorans</i>
<i>P. balearica</i> *	<i>P. stutzeri</i> *
<i>P. caricapapayae</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i> *
<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. putida</i> ( 2 biovars)*
<i>P. cichorii</i>	<i>P. resinovorans</i>
<i>P. citronellolis</i>	<i>P. savastanoi</i>
<i>P. coronafaciens</i>	<i>P. stanieri</i>
<i>P. corrugata</i>	<i>P. stutzeri</i> *
<i>P. ficuserectae</i>	<i>P. synxantha</i>
<i>P. flavescens</i>	<i>P. syringae</i> (différents biovars)
<i>P. fluorescens</i> (différents biovars)*	<i>P. avellanae</i>
<i>P. fragi</i>	<i>P. taetrolens</i>
<i>P. fuscovaginae</i>	<i>P. tolaasii</i>
<i>P. lundensis</i>	<i>P. viridiflava</i>

---

\* : Espèces ayant un intérêt en bactériologie médicale

**Tableau I.j.** Liste des espèces du genre *Pseudomonas* sensu stricto selon KERSTERS et al. (1996).

par une taxonomie balbutiante, longue à s'établir. La définition trop évasive à ses débuts accusait un manque de caractères spécifiques au genre et a ainsi conduit à son extension inconsidérée. Beaucoup d'espèces mal caractérisées ont été apparentées au genre *Pseudomonas*, alors même que celui-ci arborait un statut précaire qui devait connaître des changements dans sa définition.

### I.6.2. Taxonomie du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont caractérisées par leur ubiquité : eaux (eaux douces polluées et non polluées, stagnantes ou courantes, eaux de mer), sol, végétaux... Elles peuvent être présentes sur les poussières en suspension dans l'air. La contamination des aliments et des denrées alimentaires (végétaux crus) par ces bactéries n'est pas exceptionnelle et peut constituer un mode de contamination. Leurs exigences nutritives modestes leur permettent de survivre et de se multiplier sur des surfaces humides. De ce fait elles seront fréquemment rencontrées en milieu hospitalier chez des patients immunodéficients.

Les propriétés des colonies de *Pseudomonas* telles que la taille, la forme la couleur, l'aspect du contour et de la surface sont des indices très précieux pour l'identification de l'espèce. Les colonies sont généralement plates et d'un aspect crémeux. Certaines espèces sont capables de produire de l'alginate rendant les colonies visqueuses (EVANS et al., 1973 ; GOVAN et al., 1981 ; PEQUIGNOT et al., 1998).

D'un point de vue morphologique, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont définies actuellement comme des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, généralement mobiles grâce à des flagelles en position polaire monotriche ou multitriche, chimio-organotrophes (capacité de tirer leur énergie de réactions d'oxydo-réduction et dont les substrats oxydables sont des composés organiques), à métabolisme oxydatif, catalase et oxydase positives. Les souches se cultivent facilement sur des milieux usuels et se développent entre 4°C et 41°C. Le contenu en guanine +cytosine (GC%) de leur ADN est compris entre 58 et 71 % (HUSSON et al., 2000).

Cependant, ces critères ne répondent pas aux exigences d'une définition suffisamment exclusive, et entre l'édition de Bergey's Manuel de 1948 et celle de 1984, cent vingt trois espèces ont été exclues du genre. Le genre *Pseudomonas* ne comprend actuellement plus qu'une quarantaine d'espèces (**tableau I.j**). Cette classification repose sur des critères phénotypiques, génotypiques, et plus récemment sur la comparaison des gènes codant pour les ARN ribosomiaux. Cette technique largement exploitée par PALLERONI et al. (1973 ; 1984) a clairement séparé les espèces du genre *Pseudomonas* en 5 groupes d'homologie. Puis,

progressivement, la taxonomie contemporaine (VANDAMME et al., 1996) a restreint le genre *Pseudomonas* à un des 5 groupes d'ARN définis par PALLERONI (1984). Tous ces travaux montrent que le genre *Pseudomonas* a été pendant des années un rassemblement d'espèces n'ayant que peu de parenté, si ce n'est de partager la propriété d'être des bacilles à Gram négatif, à métabolisme oxydatif. Il demeure encore difficile à l'heure actuelle de délimiter le genre *Pseudomonas "sensu stricto"* à l'aide des caractères phénotypiques conventionnels, ce qui rend difficile l'identification des espèces à l'aide des méthodes traditionnelles. En fait la phénotypie n'offre d'intérêt que lorsqu'elle est couplée à un logiciel informatique ou à des techniques de biologie moléculaire. Néanmoins, il a été démontré que le genre *Pseudomonas* pouvait inclure des espèces fluorescentes, espèces qui produisent un pigment fluorescent ou pyoverdine et par opposition des espèces non fluorescentes. Récemment, de nouvelles espèces de *Pseudomonas* appartenant au groupe fluorescent ont été décrites, notamment *Pseudomonas rhodesiae*, isolée à partir d'eau minérale naturelle (COROLER et al., 1996).

### **I.6.3. Métabolisme des terpénoïdes par *Pseudomonas***

Les terpénoïdes posent des problèmes très spécifiques aux microorganismes capables de les utiliser comme unique source de carbone et d'énergie. Dans le cas de dégradation d'hydrocarbures simples il est nécessaire d'activer un groupement carboné méthyl ou méthylène généralement par l'action d'une monooxygénase (hydroxylase) qui entraîne la production d'un groupement hydroxyl. Les terpènes apparentés, alcool, aldéhydes et cétones possèdent déjà ce groupement fonctionnel ce qui ne semble pas favoriser leur transformation. Dans ces cas là, l'addition d'une autre fonction hydroxyl est nécessaire. Les monoterpènes acycliques sont généralement attaqués par une oxygénation du groupement méthyl terminal.

Plusieurs oxydations peuvent être nécessaires pour que la molécule puisse par la suite subir une  $\beta$ -oxydation pour être dégradée partiellement ou totalement. Néanmoins, la structure de ces molécules peut bloquer la  $\beta$ -oxydation et d'autres étapes métaboliques sont alors nécessaires pour régler ce problème.

Les terpènes mono et bicycliques posent des problèmes supplémentaires puisque leurs transformations nécessitent de couper le ou les cycles. Les études sur ce sujet ont montré que des monooxygénases ou des lyases jouaient un rôle important dans ces réactions de décyclisation.

Les *Pseudomonadaceae* sont réellement bien adaptées pour dégrader les terpènes. En effet, leur faculté de se développer sur une large gamme de composés organiques comme

unique source de carbone (STANIER et al., 1966) leur permet d'être largement représentés dans la nature. Ils possèdent également l'information génétique nécessaire permettant la synthèse d'une large gamme d'oxygénases et d'enzymes associées indispensables à l'activation et au clivage des liaisons carbone-carbone des terpènes.

#### **I.6.4. *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491**

FONTANILLE et al. (2002) ont caractérisé une nouvelle souche de *Pseudomonas rhodesiae* qu'ils ont déposé auprès de la collection de l'institut Pasteur avec comme numéro de référence CIP 107491. La séquence du gène rrs codant pour l'ARNr 16S de cette souche a également été déposée dans une banque génomique (GenBank) sous la référence AJ496564. Cette espèce, qui appartient au groupe " fluorescent " des *Pseudomonas*, a déjà été isolée à partir d'eau minérale naturelle et caractérisé par COROLER et al.(1996) comme un bacille Gram négatif mobile, activité arginine dihydrolase, activité dénitrifiante, lécithinase +, D-ribose +, saccharate +, malonate +, sorbitol +, meso-inositol +, L-valine +, L-arginine+. Les colonies sur milieu solide Nutrient Agar se présentent sous forme circulaire, convexe, de couleur jaune pâle et mesurent environ 1 mm après deux jours de culture. Une production de catalase, d'arginine hydrolase et de cytochrome oxydase est observée.



## II. Matériels et Méthodes

---

## II. Matériels et Méthodes

Solution ou milieu	Composé	Quantité
<b>MBP</b> (pour 100 mL)	Solution A	4 mL
	Solution B	96 mL
<b>A</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,56 g
	H <sub>2</sub> O	Qsp 500 mL
<b>B<sup>a)</sup></b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
	Solution de Hutner	2 mL
	H <sub>2</sub> O	Qsp 96 mL
<b>Hutner</b>	Acide nitrilotriacétique	2,5 g
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8,2 g
	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,23 g
	(Na) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	3,9 mg
	FeSO <sub>4</sub> , 1,5H <sub>2</sub> O	19,6 mg
	Solution métallique	13,9 mL
<b>Métallique</b>	H <sub>2</sub> O	Qsp. 250 mL
	Na <sub>2</sub> EDTA	250 mg
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	680 mg
	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	356 mg
	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	154 mg
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	39,2 mg
	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	20,3 mg
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , 10H <sub>2</sub> O	17,7 mg
H <sub>2</sub> O	Qsp. 100 mL	

a- La solution B est préparée dans le contenant de préculture ou de culture. Les proportions sont exprimées par rapport au volume final de MBP qui doit contenir 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfate d'ammonium et 2 mL.L<sup>-1</sup> de solution de Hutner. Lorsque le glucose est la source de carbone, le volume d'eau distillée est diminué de 50 mL (cf par. II.1.2.1).

**Tableau II.a.** Composition et élaboration du Milieu de Base pour *Pseudomonas* (MBP).

## II.1. Production, traitement et purification du biocatalyseur

### II.1.1. Conservation de la souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée, *Pseudomonas rhodesiae*, a été déposée auprès de la Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) sous le numéro CIP 107491. Au laboratoire, la souche est conservée à  $-75^{\circ}\text{C}$  dans des cryotubes contenant des billes de céramique poreuses et un liquide protecteur (Technical Service Consultants, Heywood, Grande-Bretagne). Une oëse stérilisée à la flamme est utilisée pour extraire une bille du flacon et la frotter à la surface d'un milieu gélosé Nutrient Agar (NA) (Fluka) disposé dans une boîte de Pétri. Après 48 h à  $30^{\circ}\text{C}$ , une colonie est prélevée et étalée sur une deuxième boîte NA par épuisement. Cette boîte est conservée dans une étuve à  $30^{\circ}\text{C}$  et repiquée régulièrement chaque semaine et 24 h avant chaque préculture.

### II.1.2. Production du biocatalyseur

#### II.1.2.1. Milieux de culture

Les milieux, aussi bien de préculture que de culture utilisés sont élaborés à partir du Milieu de Base pour *Pseudomonas* (MBP) (COHEN-BAZIRE et al., 1957). Les différentes solutions qui le composent sont décrites dans le **tableau II.a**. Ces dernières sont préparées et autoclavées 20 min à  $120^{\circ}\text{C}$  séparément. La solution B est classiquement préparée dans le contenant de culture ou de préculture.

La préparation de la solution de Hutner est délicate. Elle doit être limpide et de couleur jaune tendant vers le vert. L'acide nitrilotriacétique doit d'abord être dissous dans 200 mL d'eau distillée et le pH de la solution amené à une valeur supérieure ou égale à 8 par addition de pastilles de KOH (environ 15 pastilles). Après dissolution complète, les autres sels ainsi que la solution métallique sont ajoutés successivement, le pH est alors ramené à une valeur de 7,2 de la même façon que précédemment (environ 7 pastilles de KOH sont nécessaires). Le volume de la solution est ensuite ajusté à 250 mL avec de l'eau distillée.

Différentes sources de carbone et d'énergie ont été utilisées au cours de cette étude (glucose, lactate de sodium,  $\alpha$ -pinène et mélange glucose/ $\alpha$ -pinène). La nature et les quantités employées sont précisées lors de la présentation des essais. Dans le cas de l'utilisation de l' $\alpha$ -pinène, de l'hexadécane est ajouté à la solution B (5 % v/v). Le terpène est ajouté stérilement

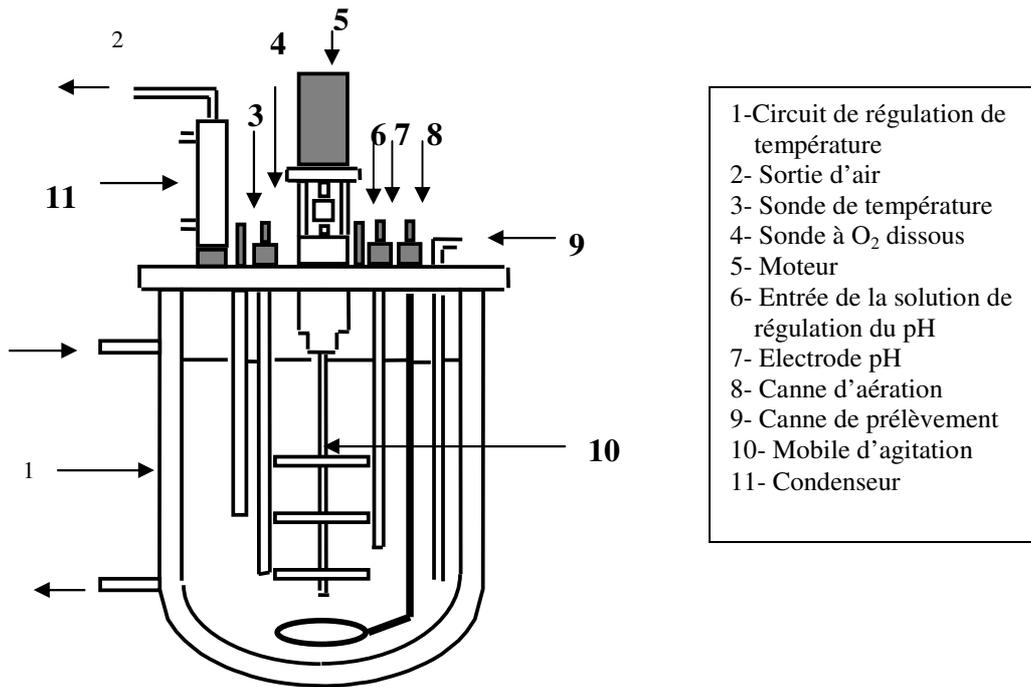


Figure II.1. Schéma détaillé du réacteur B Braun.

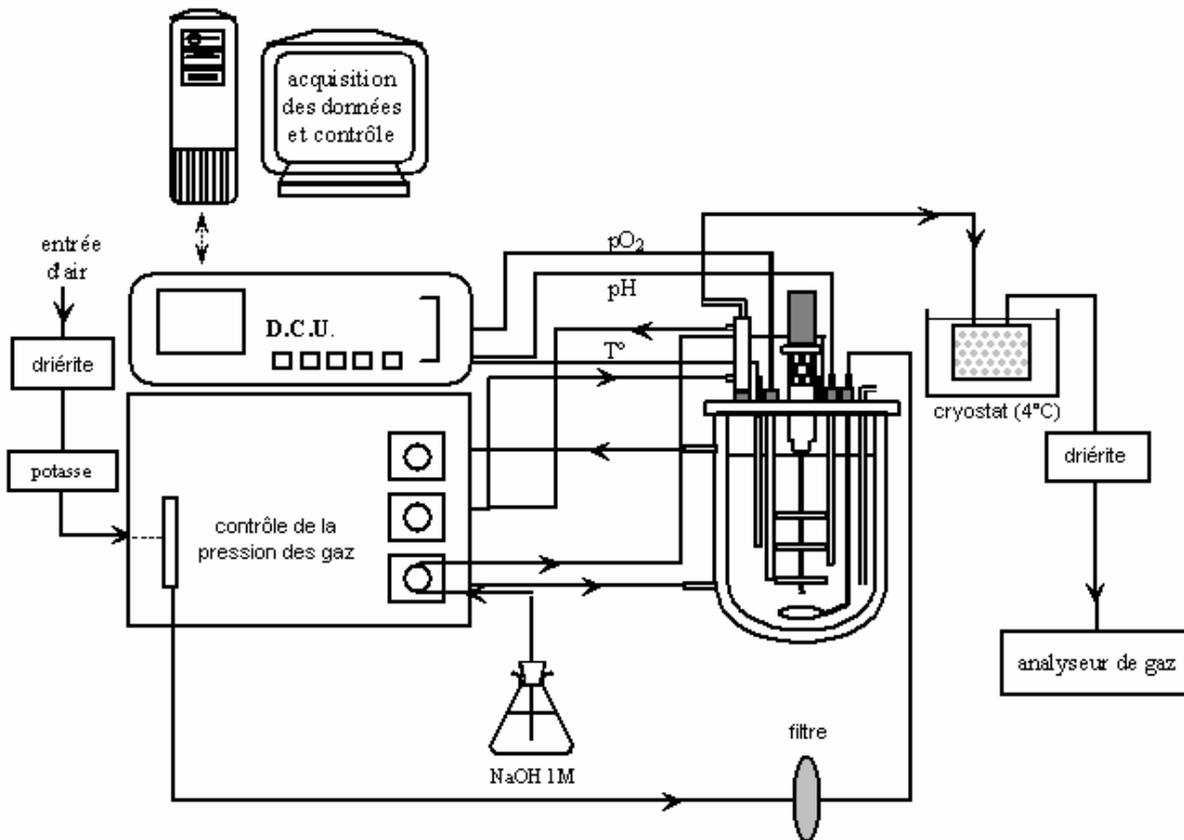


Figure II.2. Schéma du montage expérimental utilisé pour la production du biocatalyseur.

après autoclavage. Dans le cas de l'utilisation du lactate de sodium, celui-ci est dissous dans la solution B avant autoclavage. Dans le cas de l'utilisation du glucose, celui-ci est dissous dans 50 mL d'eau distillée et autoclavé séparément de la solution B. Le mélange est ajouté stérilement à la solution B, après autoclavage.

#### II.1.2.2. Préculture

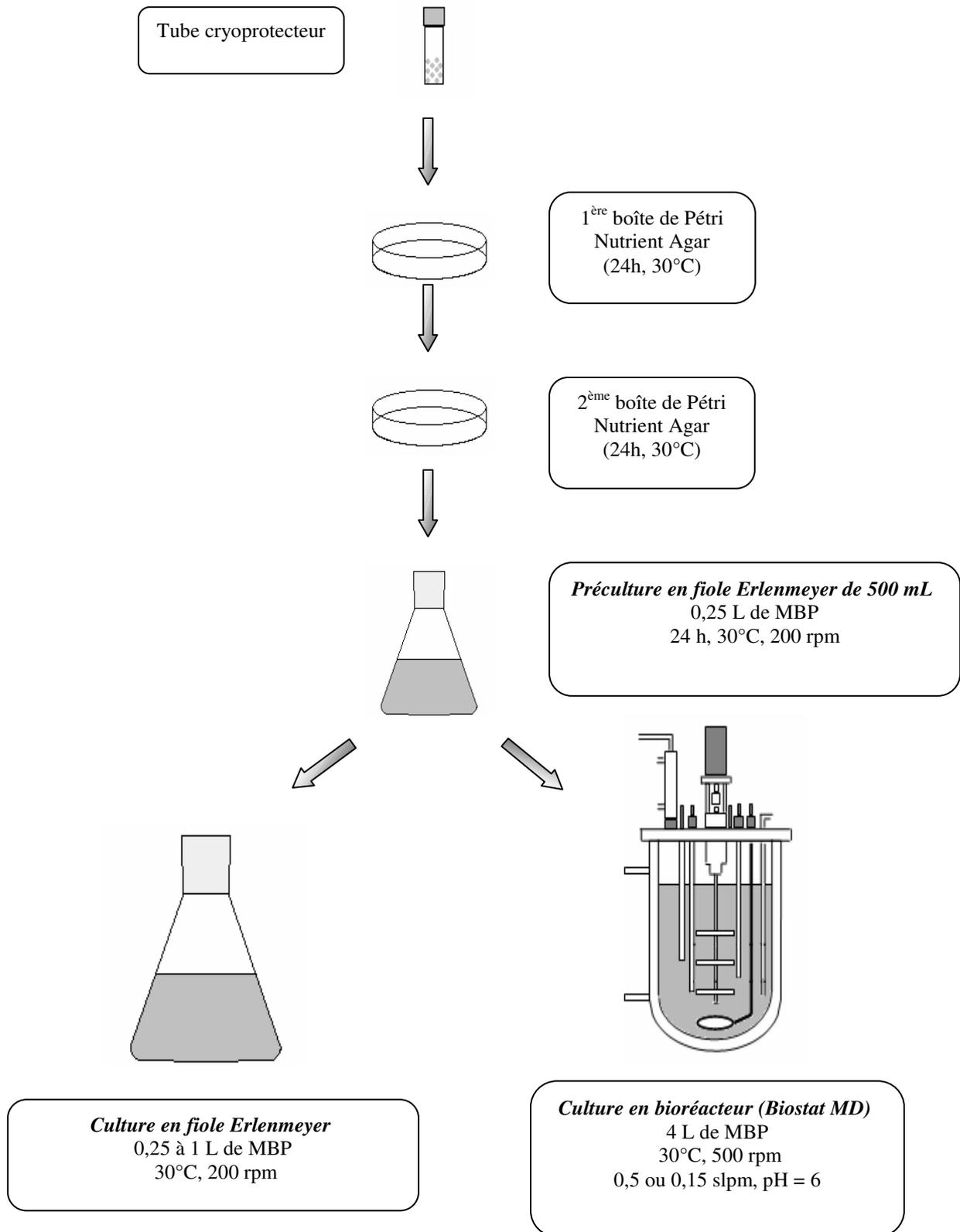
La préculture est réalisée en fiole Erlenmeyer de 500 mL contenant 250 mL de MBP (voir ci-dessus). La source de carbone diffère selon les expérimentations. La préculture est inoculée avec 3 oëses pleines prélevées sur une boîte de Pétri NA repiquée 24 h auparavant. La fiole est alors incubée 24 h à 30°C dans un bain marie agité à 200 rpm. L'absorbance à 600 nm du milieu après 24 h doit être proche de 2.

#### II.1.2.3. Culture en fiole Erlenmeyer

Les cultures en fioles Erlenmeyer sont réalisées avec des volumes compris entre 0,25 et 1 L de MBP (voir le paragraphe II.1.2.1). La source de carbone et d'énergie diffère selon les expérimentations. L'*inoculum* de préculture est fixé à 8 % (v/v). La fiole est incubée à 30°C dans un bain marie agité à 200 rpm.

#### II.1.2.4. Culture en fermenteur

Un bioréacteur de 7 L de volume utile (BIOSTAT MD, Sartorius-B.Braun) est employé (**figure II.1**). Il contient 4 L de MBP (voir le paragraphe II.1.2.1) et 200 mL d'hexadécane. L'hexadécane est autoclavé séparément dans 2 fioles contenant chacune 100 mL d'hexadécane et 200 mL d'eau distillée. La source de carbone et d'énergie est soit l' $\alpha$ -pinène soit un mélange  $\alpha$ -pinène / glucose (dans ce dernier cas, le glucose est dissous dans une des 2 fioles Erlenmeyer contenant l'hexadécane). Le bioréacteur est équipé d'une sonde pH, d'un régulateur de température ainsi que d'une sonde mesurant la pression partielle en oxygène ( $pO_2$ ). Il est alimenté en air déshydraté et débarrassé de  $CO_2$  par passage sur une colonne de pastilles d'hydroxyde de potassium à un débit de 9 ou 30  $L \cdot h^{-1}$  selon le type de culture. L'agitation est fixée à 500 rpm et est augmentée manuellement en cas de survenue d'une limitation par l'oxygène dissous, le pH est maintenu à 6 par ajout d'une solution de soude à  $1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  et la température est régulée à 30°C. L'appareillage est connecté à une unité de contrôle digital (DCU) elle-même reliée à un système informatique de contrôle



**Figure II.3.** Schéma récapitulatif des étapes impliquées dans la mise en place des cultures de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Les bouchons obturant les fioles sont en mousse de polyuréthane.

et d'acquisition de données (MFCS/Win 2.0, B.Braun) fonctionnant sous Windows NT 4.0 (**figure II.2**). Les étapes impliquées dans la mise en place d'une culture sont résumées dans la **figure II.3**.

### II.1.3. Analyses effectuées sur le milieu de culture

#### II.1.3.1. Estimation de la biomasse

Une méthode rapide de quantification de la biomasse par turbidimétrie a été mise au point. Pour cela, une corrélation entre la concentration en biomasse  $C_x$  et l'absorbance des échantillons à 600 nm  $DO_{600}$  a été établie. La mesure directe de la biomasse est effectuée par détermination de la masse du résidu sec obtenu après filtration sous vide d'un échantillon à travers un filtre prépesé (Millipore HAWP, porosité 0,45  $\mu\text{m}$ , diamètre 47 mm) puis séché 24 h à 110°C. L'expression obtenue s'écrit comme suit:

$$C_x = 0,447 \times DO_{600}$$

où  $C_x$  est exprimée en  $\text{g.L}^{-1}$  et  $DO_{600}$  lue contre un témoin constitué d'eau distillée.

#### II.1.3.2. Dosage des ions ammonium

Les échantillons sont préalablement filtrés sur une membrane (Millipore HAWP, porosité 0,45  $\mu\text{m}$ , diamètre 47 mm), puis la concentration en azote minéral du filtrat est déterminée selon la méthode colorimétrique de PATTON et CROUCH (1977). En présence de javel et de phénol, les ions ammonium développent une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de ces ions.

Les réactifs de travail sont le phénol nitroprussiate (SIGMA 640-1) et la javel (SIGMA 640-3)

Dans un tube en verre, sont introduits :

- 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon
- 500  $\mu\text{L}$  de javel
- 500  $\mu\text{L}$  de phénol nitroprussiate
- 3 mL d'eau distillée

Après homogénéisation, le tube est incubé 1 h à température ambiante. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 570 nm contre de l'eau traitée comme les échantillons. L'étalonnage est effectué à partir de solutions de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dont la teneur en azote varie de 0 à 80  $\text{mg.L}^{-1}$ .

### II.1.3.3. Dosage des protéines

#### II.1.3.3.1. Méthode au bleu de Coomassie

Les protéines ont été dosées par coloration au bleu de Coomassie (BRADFORD et al., 1976). Le réactif, d'abord rouge, devient bleu par liaison aux protéines en milieu acide. L'absorbance à 595 nm mesurée est proportionnelle à la concentration en protéines. Sa composition est la suivante :

- 100 mg de bleu de Coomassie G 250
- 50 mL d'éthanol absolu
- 100 mL d'acide orthophosphorique ( $H_3PO_4$ ) à 85 %
- Eau distillée qsp. 1L

5 mL de réactif sont ajoutés à 100  $\mu$ L d'échantillon. L'absorbance est lue à 595 nm après 5 min. La méthode est calibrée avec des solutions aqueuses de sérumalbumine bovine (SAB) dont la concentration varie de 0 à 0,5  $g.L^{-1}$ . C'est cette méthode qui a été utilisée le plus souvent.

#### II.1.3.3.2. Méthode de Lowry modifiée selon Peterson

Comme dans la méthode de Lowry originale, la réaction du biuret est assurée par un réactif cupro-alcalin, puis le réactif de Folin réagit avec les acides aminés tyrosine et tryptophane pour donner une coloration bleue verte (PETERSON, 1977). La densité optique est lue à 750 nm.

Trois solutions stocks sont préparées :

- solution 1: cuivre - tartrate - carbonate (CTC)

Une solution de carbonate de sodium est ajoutée lentement à une solution de sulfate de cuivre de manière à obtenir les concentrations finales suivantes :

- Tartrate de potassium 0,2 % (m/v)
- Sulfate de cuivre pentahydré 0,1 % (m/v)
- Carbonate de sodium 10,0 % (m/v)

Cette solution est stable pendant au moins 2 mois à 4°C.

- solution 2: NaOH 0,8 mole. $L^{-1}$

- solution 3: réactif au Phénol de Folin- Ciocalteu (titré à 2 moles. $L^{-1}$ )

Les réactifs de travail sont au nombre de deux :

- solution A: solution de CTC diluée avec la soude  $0,8 \text{ mole.L}^{-1}$  et de l'eau dans les proportions respectives 1 : 1 : 2.
- solution B: réactif de Folin - Ciocalteu dilué au 1/6.

Dans un tube en verre, sont introduits :

- 850  $\mu\text{L}$  d'eau
- 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon
- 1000  $\mu\text{L}$  de solution A

Le tube est agité et laissé 10 minutes à  $20^\circ\text{C}$ .

- 500  $\mu\text{L}$  de solution B sont ajoutés.

Le tube est de nouveau agité. L'absorbance est lue, après 30 minutes, à une longueur d'onde de 750 nm contre un témoin sans extrait. La coloration est stable pendant 2 h. L'étalonnage est réalisé avec des solutions de SAB de 0 à  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Cette approche a été mise en œuvre de façon ponctuelle lors des travaux présentés.

#### II.1.3.4. Dosage des acides aminés

Il est effectué selon la méthode spectrophotométrique de LEE et TAKAHASHI (1966). Celle-ci est basée sur la formation de pourpre de Ruhemann, un composé obtenu après réaction des acides aminés avec la ninhydrine. Ce processus correspond à une oxydation provoquant une désamination et une carboxylation de l'acide aminé. La concentration en chromophore formé, de couleur pourpre, est mesurée par lecture de l'absorbance à 570 nm.

Le réactif a la composition suivante :

- 0,25 g de ninhydrine
- 128 mL de glycérol
- Tampon citrate de sodium  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 5,5 qsp. 200mL

3,8 mL de réactif et 0,2 mL d'échantillon sont portés à  $100^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes, puis la réaction est stoppée dans de l'eau glacée. La densité optique est lue à 570 nm contre de l'eau traitée comme les échantillons. L'étalonnage est réalisé avec des solutions de leucine de 0 à  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ .

#### II.1.3.5. Dosage des sucres, des acides organiques et des alcools par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La chaîne utilisée est constituée de deux colonnes d'exclusion ionique (Phénomenex Rezex ROA 300 x 7,8 mm) montées en série et placées dans un four thermostaté à 50°C. L'éluant est une solution d'acide sulfurique 2 mmol.L<sup>-1</sup> dans de l'eau ultrapure (Millipore, MilliQ plus) dégazée à l'aide d'un dégazeur (Ney, Ultrasonik 300) intégré à l'appareillage. Le débit est fixé à 0,7 mL.min<sup>-1</sup> à l'aide d'une pompe (HP série 1100, Agilent Technologies). L'appareil est muni d'un injecteur automatique. La détection des divers composés est assurée par un réfractomètre (HP série 1100). L'acquisition et l'intégration sont réalisées grâce à un logiciel (HPChem, Agilent Technologies) fonctionnant sous Windows NT 4.0. La durée totale d'une analyse est de 40 min.

Les échantillons doivent être déprotéinisés avant leur injection afin d'éviter l'encrassement de la colonne. Ce traitement est effectué avec de la baryte (Ba(OH)<sub>2</sub>) et du sulfate de zinc (ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O). Ces deux composés entraînent la précipitation des protéines présentes dans le milieu de culture (SLEIN, 1965). 1 mL d'échantillon à analyser est traité par addition de 0,25 mL de Ba(OH)<sub>2</sub> (0,3 M) puis de 0,25 mL de ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (5 % m/v). Le surnageant obtenu après centrifugation 5 minutes à 10000 g (Sigma 3MK ou 3K30, Bioblock Scientific), est filtré au travers d'un filtre membrane en ester de cellulose (Millipore HAWP, porosité 0,45 µm), et 10 µL sont injectés en CLHP.

#### II.1.3.6. Mesure du CO<sub>2</sub> dégagé

La sortie d'air du fermenteur est reliée, après passage dans un condenseur (bouteille en Pyrex de 250 mL remplie de billes de verre de 3 mm de diamètre), à un analyseur de gaz Servomex Xentra 4100 (Servomex Company Inc., Nerwood, USA). Cet appareil mesure la fraction molaire de CO<sub>2</sub> (YCO<sub>2</sub>) dans le gaz issu du fermenteur. La détection s'effectue par mesure de l'absorption du rayonnement infrarouge issu d'un émetteur infra rouge pulsé par un détecteur pyro-électrique. Un débitmètre, intégré à l'analyseur, permet de contrôler en continu le débit du prélèvement qui est de 150 mL.min<sup>-1</sup>. L'étendue de mesure du CO<sub>2</sub> pour cet appareil est comprise entre 0 et 25 %. La cellule de mesure est étalonnée régulièrement. Pour cela, une bouteille de gaz étalon contenant 15 % d'O<sub>2</sub> et 8 % de CO<sub>2</sub> est utilisée. L'injection d'air débarrassé en CO<sub>2</sub> par passage sur une colonne de pastilles d'hydroxyde de potassium (KOH) permet de régler le zéro de l'appareil.

La vitesse de production du CO<sub>2</sub> ( $r_{CO_2}$ ) est calculée à partir du débit volumique entrant ( $G_v$  en L.h<sup>-1</sup>), régulé par le débitmètre massique de l'unité de contrôle. Ce dernier affiche les données dans les conditions standard de température et de pression (25°C, 1 atmosphère), ce qui correspond à un volume molaire de 24,5 L.mol<sup>-1</sup> pour un gaz parfait. Le volume de liquide ( $V_L$ ) résiduel dans la cuve est défini au cours du temps en tenant compte des prélèvements effectués et de l'ajout de soude. Cette vitesse (mol.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) est exprimée par la relation suivante :

$$r_{CO_2} = \frac{G_v \cdot Y_{CO_2}}{24,5 \cdot V_L} \quad (\text{II.1})$$

La quantité de CO<sub>2</sub> produit au cours de la culture  $I_{CO_2}$  correspond à l'intégrale de la courbe  $r_{CO_2} = f(t)$ . Ce calcul est effectué selon l'équation suivante :

$$I_{CO_2} = \int_0^t r_{CO_2} dt \quad (\text{II.2})$$

La production de CO<sub>2</sub> à un temps  $t$  s'écrit donc :

$$I_{CO_2}^{t_n} = I_{CO_2}^{t_{n-1}} + r_{CO_2}^{t_n} \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad (\text{II.3})$$

$I_{CO_2}$  est exprimé en mol.L<sup>-1</sup>.

#### II.1.3.7. Dosage des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les concentrations en solutés volatils sont mesurées dans la phase aqueuse et dans la phase organique par injection (directement ou après extraction) dans un chromatographe en phase gazeuse. Les analyses sont effectuées de la même façon que pour les échantillons provenant des bioconversions, dont le protocole est détaillé dans la partie consacrée aux bioconversions en conditions biphasiques (paragraphe II.3.3).

#### II.1.4. Concentration de la biomasse

La biomasse est récupérée et centrifugée dans des pots de 500 mL à 5000 g pendant 10 min à 20°C. Le culot est repris dans du tampon phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5) de façon à obtenir une concentration finale en biomasse de 7 g.L<sup>-1</sup> (**figure II.4**). L'intégralité du matériel utilisé est stérilisé par autoclavage.

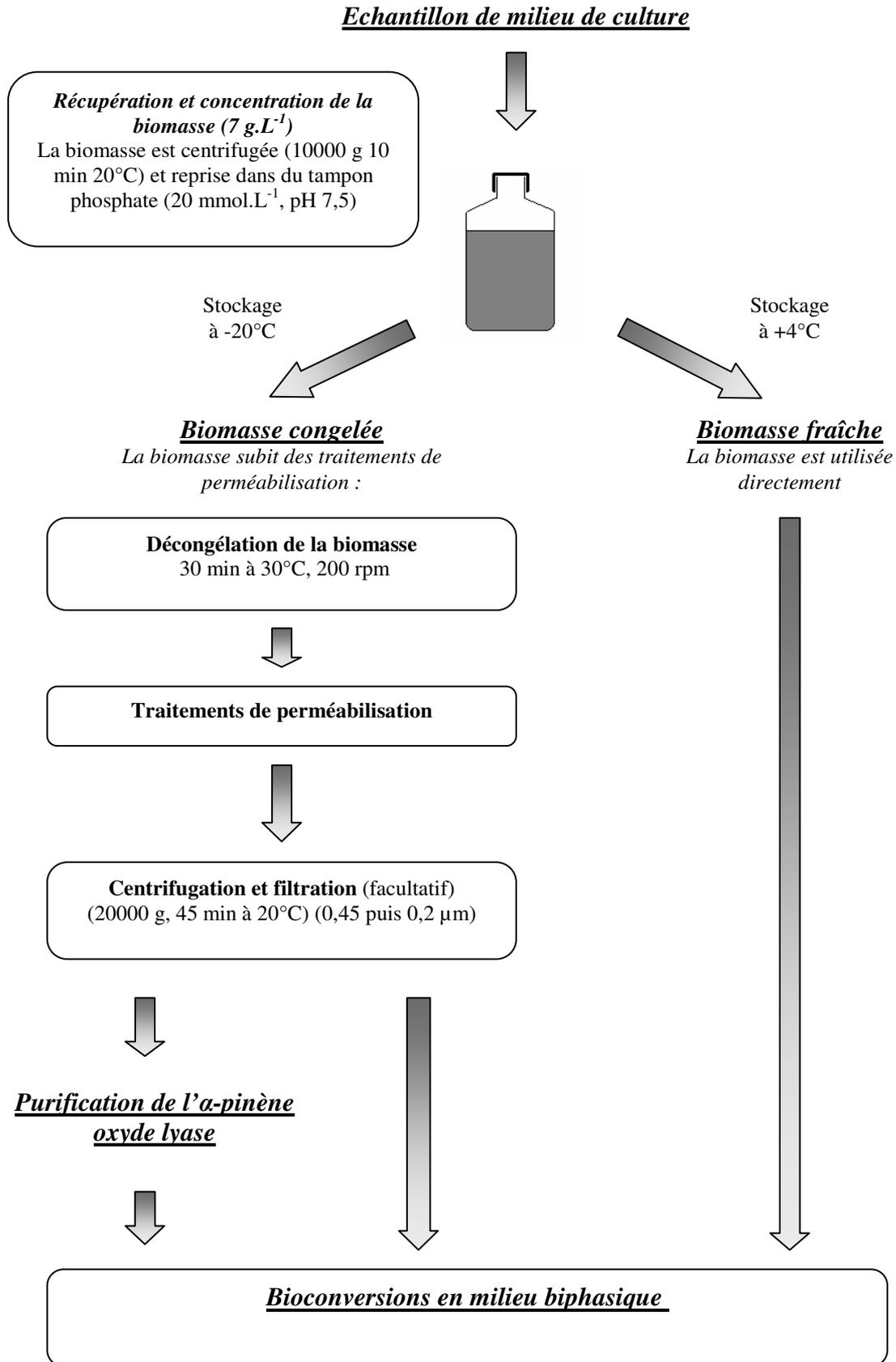


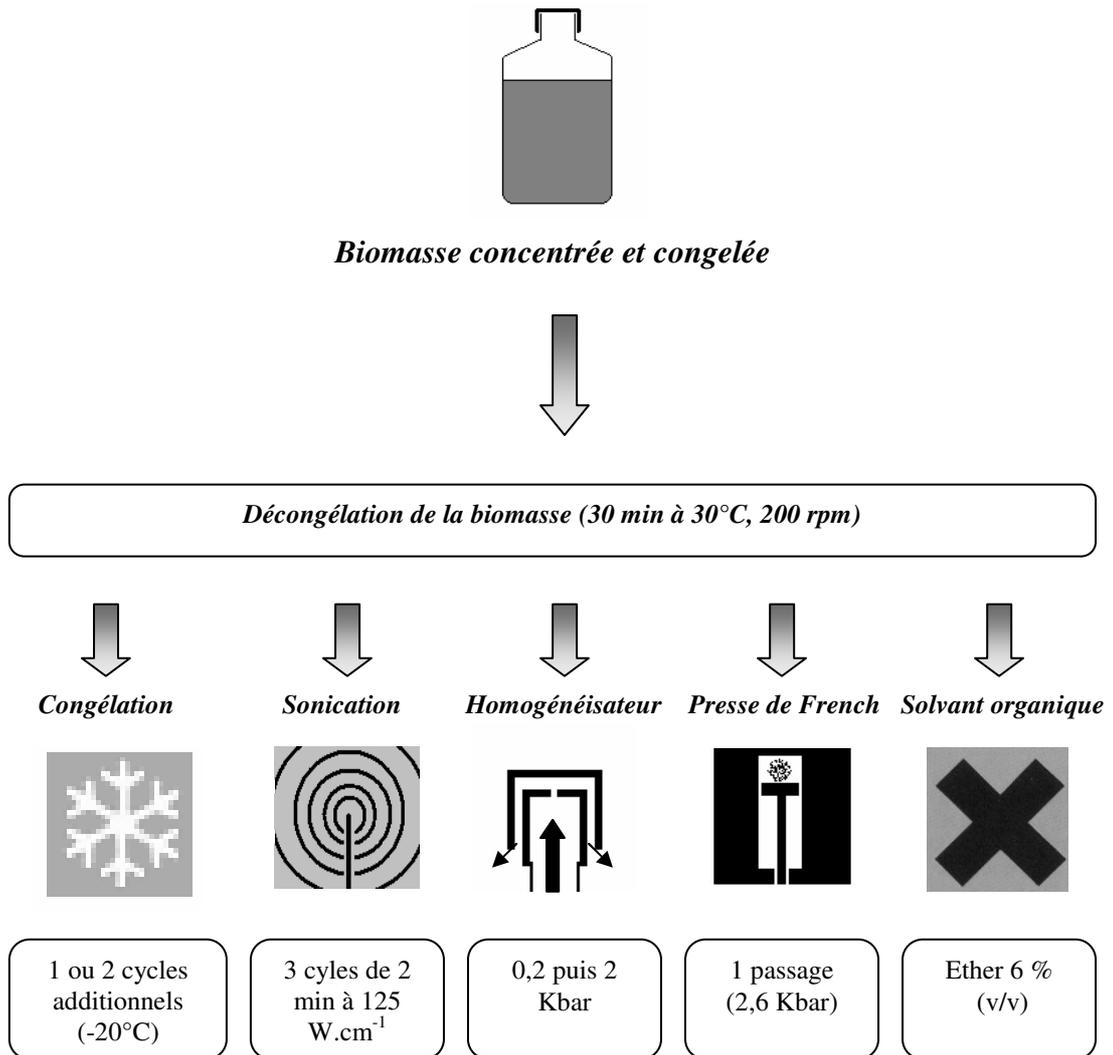
Figure II.4. Résumé des différents traitements appliqués à la biomasse avant l'étape de bioconversion.

### II.1.5. Traitements de la biomasse

Une fois concentrée, la biomasse peut être utilisée sous forme intacte directement après la croissance (biomasse dite « fraîche ») ou sous forme perméabilisée (**figure II.4**). Dans ce dernier cas, le milieu concentré (par. II.1.4) est réparti en échantillons de 25 mL et congelés à -20°C. Au moment de leur traitement, les cellules sont décongelées à 30°C dans un bain marie agité à 200 rpm pendant 30 min. A ce stade, la biomasse n'est considérée que comme partiellement perméabilisée. Pour compléter la perméabilisation, la biomasse est soumise à d'autres cycles de congélation / décongélation (jusqu'à 3) ou d'autres types de traitements physiques et chimiques (**figure II.5**).

Parmi les traitements physiques, l'homogénéisation à haute pression, le passage dans une presse de French et la sonication ont été testés. Dans le dernier cas, la biomasse est perméabilisée grâce à une aiguille à soniquer (Ikasonic, U50H) réglée à 125 W.cm<sup>-1</sup>. Trois cycles de 2 min sont appliqués avec un temps de refroidissement de 5 min entre chaque cycle. Ce délai est nécessaire en raison de l'échauffement local qui est constaté bien que les tubes soient maintenus dans la glace tout au long du traitement. Comme déjà signalé, la biomasse a également été traitée par simple passage dans une presse de French (One Shot Model Disruptor, CDS, Montreal, Canada) délivrant une pression de 2,7 Kbar ou encore dans un homogénéisateur haute pression APV 2000 (Invensys APV, Evreux, France) équipé de 2 étages réglés respectivement à 0,2 et 2 Kbar. Un agent chimique, l'éther, a été utilisé à 6 % (v/v) pour perméabiliser 25 mL de biomasse dans une fiole Erlenmeyer de 250 mL incubée 1 h à 30°C avec une agitation de 200 rpm.

Afin de se débarrasser des débris cellulaires, les échantillons perméabilisés peuvent être centrifugés 2 fois à 20000 g pendant 45 min à 20°C. Les surnageants obtenus sont ensuite filtrés au travers de 2 membranes d'ester de cellulose (Millipore HAWP, porosité 0,45 µm puis 0,2 µm). Le dernier filtrat obtenu est dénommé "extrait brut".



**Figure II.5.** Résumé des différents traitements appliqués à la biomasse congelée.

## II.2. Purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

### II.2.1. Principe de la séparation

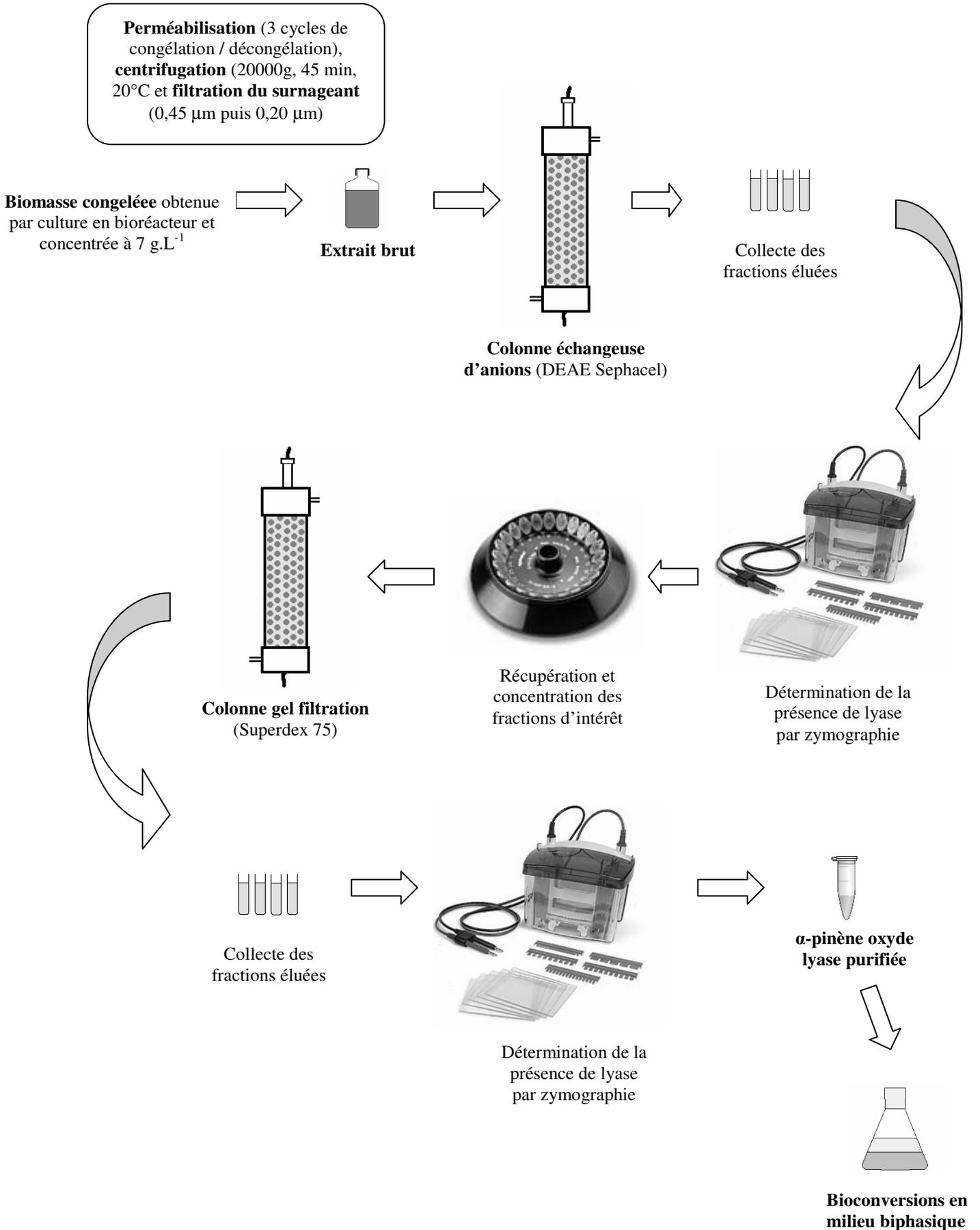
L' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491 est purifiée à partir d'un extrait brut (voir par. précédent) par passage successif dans 2 colonnes de chromatographie (**figure II.6**). Toutes les étapes sont réalisées à froid (4°C) et les solutions utilisées sont filtrées sur une membrane de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  puis dégazées au préalable par mise sous vide partiel. L'ensemble de chromatographie est contrôlé par un système automatique FPLC (Äkta purifier P-900) équipé d'un détecteur UV (UV-900) et d'un collecteur de fractions (Frac-920), relié à un système informatique de contrôle et d'acquisition (Unicorn v5.10), tous provenant d'Amersham Biosciences (Freiburg, Allemagne).

### II.2.2. Préparation de l'extrait brut

L'extrait cellulaire brut est obtenu à partir d'une biomasse issue d'une culture en réacteur de *Pseudomonas rhodesiae* avec un mélange  $\alpha$ -pinène / glucose comme sources de carbone (les conditions de culture sont détaillées dans le paragraphe II.1.2.4). Cette biomasse est concentrée à 7  $\text{g.L}^{-1}$  (voir II.1.4) puis perméabilisée par 3 cycles successifs de congélation à -20°C / décongélation à 30°C pendant 30 min et sous une vitesse d'agitation de 200 rpm. La suite du traitement est indiquée dans le paragraphe II.1.5.

### II.2.3. Chromatographie échangeuse d'ions

50 mL d'extrait brut (dont la concentration en protéines est de l'ordre de 4 g/L) sont chargés sur une colonne DEAE-Sephacel (2,5 x 18 cm) (Amersham Pharmacia Biosciences). 140 mL de tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  20  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 7,1 sont injectés à un débit de 1,5  $\text{mL.min}^{-1}$  sur la colonne afin d'éliminer les protéines non retenues. Les protéines adsorbées sont progressivement éluées, toujours à 1,5  $\text{mL.min}^{-1}$ , en appliquant un gradient de 0 à 1  $\text{mol.L}^{-1}$  de KCl dans le même tampon phosphate. Des fractions de 3,16 mL sont collectées et analysées par zymographie (voir chapitre II.2.5). Les fractions contenant l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase sont regroupées et concentrées par centrifugation à 5000 g pendant 30 min sur membranes d'ultrafiltration (tubes Ultra-15YM, Millipore, Guyancourt, France) de façon à obtenir un volume final de rétentat de 1,8 mL. Ce concentré est utilisé dans l'étape suivante.



**Figure II.6.** Etapes de la purification de l'α-pinène oxyde lyase.

#### II.2.4. Chromatographie par gel filtration

La solution concentrée de protéines provenant de la colonne DEAE-Sephacel est chargée sur une colonne Superdex 75 (1.6 x 60 cm) (Amersham Pharmacia Biosciences). L'éluant utilisé est une solution de KCl (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) dans un tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,1 injectée à raison de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Des fractions de 1,6 mL sont collectées et analysées comme précédemment. Celles qui contiennent l' $\alpha$ -pinene oxyde lyase sont regroupées et conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Les étapes de purification sont résumées dans la **figure II.6**.

Il est à noter que la colonne a été préalablement calibrée en masse molaire à l'aide de Bleu Dextran 2000 (1 mg), d'albumine (25000 Da, 5 mg) et de ribonucléase A (13700 Da, 10 mg) (Amersham Pharmacia Biosciences).

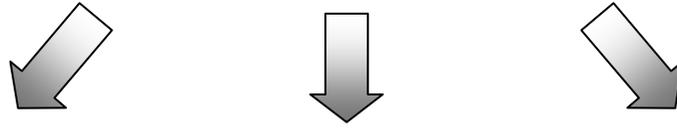
#### II.2.5. Electrophorèse en conditions dénaturantes

La pureté des fractions est déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les solutions protéiques sont solubilisées dans un tampon Tris/HCl pH 6,8 contenant 4 % (m/v) de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 0,2 % (m/v) de bleu de bromophénol, 10 % (m/v) de glycérol, puis portées 4 min à 95°C. Les échantillons sont déposés sur des gels de polyacrylamide obtenus à partir d'une solution contenant 10 % de mélange acrylamide/bisacrylamide 37,5 : 1 dans du tampon Tris/HCl pH 8,3 contenant 0,1 % (m/v) de SDS. Les dimensions du gel sont de 8 cm de long par 6 cm de large et l'épaisseur vaut 1 mm. La migration est réalisée en mode vertical dans un appareil Bio-Rad protean II (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) en présence de tampon Tris / glycine pH 8,9 et de 0,1 % (m/v) de SDS (tampon de migration). La migration est réalisée après dépôt de 10  $\mu$ L d'échantillon dans les puits, à 150 V pendant 1 h, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à environ 5 mm du bord du gel. Les gels sont alors révélés par coloration 30 min au bleu de Coomassie Biosafe® (Bio-Rad). La décoloration est effectuée par immersion dans l'eau distillée pendant 1 h.

#### II.2.6. Zymographie

La présence de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase dans les différentes fractions est vérifiée à partir d'électrophorèses en conditions non dénaturantes. Les conditions de migration sont

**Biomasse fraîche, biomasse perméabilisée ou  
 $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée**  
(voir figure II.3 et II.4)

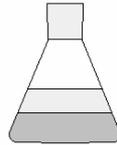


**Bioconversions en condition biphasique :**



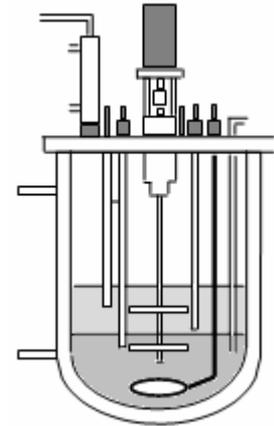
**Fiolle Erlenmeyer de 50 mL**

- 2 mL de lyase purifiée ou d'extraits cellulaires
- 5 mL d'hexadécane contenant l' $\alpha$ -pinène oxyde (95 g.L<sup>-1</sup>)



**Fiolle Erlenmeyer de 250 mL**

- 25 mL de biomasse fraîche ou perméabilisée
- 25 mL d'hexadécane contenant divers précurseurs



**Bioréacteur**

- **Production de l'isonovalal :**
  - 500 mL de biomasse perméabilisée à l'éther
  - 500 mL d'hexane contenant l' $\alpha$ -pinène oxyde
  - 30°C, 800 rpm, pas d'aération ni de régulation pH
- **Production de l'acide novalique :**
  - 400 mL de biomasse fraîche
  - 400 mL d'hexadécane contenant divers précurseurs
  - 30°C. Aération, agitation et pH contrôlés

**Figure II.7.** Schéma récapitulatif des opérations impliquées lors de la mise en place des bioconversions en conditions biphasiques.

identiques à celles effectuées en conditions dénaturantes (voir ci-dessus), mais les différentes solutions utilisées ne contiennent pas de SDS et l'échantillon à déposer ne subit aucun chauffage. La révélation se fait par immersion des gels dans un tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  20  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 7,1 contenant de l' $\alpha$ -pinène oxyde (0,1 % v/v). Après 30 min d'agitation à 75 rpm (20°C), la bande protéique correspondant à l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase devient visible par suite de l'apparition d'une couleur blanche.

### **II.2.7. Densitométrie**

L'intensité de la bande blanche apparaissant au niveau des zymogrammes peut être quantifiée par densitométrie. Le gel est d'abord photographié par un appareil Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) en mode lumière blanche. Les images sont sauvegardées sous un format numérique (jpeg), puis sont analysées par le logiciel Quantity One<sup>®</sup> v4.2.1 (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis). La lecture de densité se fait au milieu des spots et le bruit de fond est ôté de la valeur lue grâce au système du « rolling-disk circle » réglé à une valeur de 11. La densité est exprimée en intensité par unité de surface (mode « Trace density »). L'enzyme purifiée est utilisée pour calibrer la méthode.

## **II.3. Bioconversions en milieu biphasique**

### **II.3.1. Bioconversions en fiole Erlenmeyer**

25 mL de biomasse fraîche ou perméabilisée et 25 mL d'hexadécane sont classiquement versés dans une fiole Erlenmeyer de 250 mL (**figure II.7**). Le précurseur est ensuite ajouté dans la phase organique. Le substrat principalement utilisé est l' $\alpha$ -pinène oxyde mais d'autres précurseurs comme l' $\alpha$ -pinène, l'isonovalal ou le novalal ont également été employés. Les concentrations utilisées seront précisées au cours des expérimentations. Les fioles Erlenmeyer sont placées dans un bain marie thermostaté à 30°C, agité à 200 rpm. Le premier prélèvement (100  $\mu\text{L}$  de phase organique) est réalisé après 2 min d'agitation.

Les bioconversions utilisant l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée sont effectuées dans des volumes réduits à 2 mL de phase aqueuse (tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  20  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 7,5) et 5 mL de phase organique constituée d'hexadécane contenant 95  $\text{g.L}^{-1}$  d' $\alpha$ -pinène oxyde. La bioconversion se déroule dans une fiole Erlenmeyer de 50 mL dans un bain marie thermostaté à 30°C et agité à 200 rpm (**figure II.7**).

### II.3.2. Bioconversions en bioréacteur

#### II.3.2.1. Production et récupération de l'isonovalal

La bioconversion s'effectue selon les conditions décrites par FONTANILLE et LARROCHE (2003). 500 mL de suspension concentrée de biomasse décongelée sont déposés dans un réacteur Applikon de 1,5 L de volume utile. La biomasse est alors perméabilisée *in situ* par un traitement à l'éther (6 % v/v) 1 h à 30°C, 200 rpm. La phase organique, constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans 500 mL d'hexane (82,4 g.L<sup>-1</sup>), est ensuite ajoutée. La bioconversion se déroule alors à 30°C, 800 rpm sans aération ni contrôle du pH.

Une fois la biotransformation terminée, l'intégralité du milieu est récupérée dans des pots de 500 mL et les phases sont séparées par centrifugation 10 min à 10000 g, 20°C (centrifugeuse JOUAN KR 22i). La phase organique est prélevée par pipetage en surface des pots. La solution d'isonovalal obtenue est filtrée sous vide à travers un filtre en PVDF hydrophobe de 0,45  $\mu$ m de porosité (Durapore, Millipore HVHP) puis l'hexane est éliminé par évaporation à 40°C. L'appareil utilisé est un évaporateur rotatif (BÜCHI) muni d'une colonne de distillation réfrigérée maintenue sous vide.

#### II.3.2.2. Production et récupération de l'acide novalique

La bioconversion s'effectue dans un réacteur B.BRAUN (modèle Biostat B-DCU Quattro) de 2 L de volume utile. La phase aqueuse est constituée de 400 mL de biomasse fraîche concentrée. La phase organique est constituée de 400 mL d'hexadécane contenant le précurseur. Le réacteur est équipé d'une sonde pH et est aéré à un débit de 18 L.h<sup>-1</sup>. Le fermenteur est directement connecté à l'unité de contrôle digital (DCU). À partir des informations provenant des différents capteurs, la DCU régule et contrôle les différents paramètres (température, vitesse d'agitation, aération et pH), par l'intermédiaire d'une interface. L'acquisition des paramètres de fermentation est pilotée par un logiciel, Multi Fermentor Computer System (MFCS Win, version 2.0.3, B.BRAUN).

Pour récupérer les acides produits, la phase organique est d'abord séparée de la phase aqueuse et de la biomasse par centrifugation à 10000 g, 10 min à 20°C. Les acides sont ensuite extraits de la phase organique par 2 extractions consécutives. Dans un premier temps, un volume de phase organique est mis en contact avec un même volume d'une solution de soude (0,2 mol.L<sup>-1</sup>) dans une ampoule à décanter. Cette dernière est agitée pendant 1 min. Les acides sont alors sous forme dissociée, ce qui déplace fortement leur coefficient de partage et permet une extraction sélective des acides vers la phase aqueuse. Cette phase aqueuse est

ensuite récupérée puis acidifiée par ajout d'acide sulfurique concentré (2 % v/v). Les acides organiques sont alors protonés et redeviennent hydrophobes ce qui rend possible leur extraction par ajout d'un volume d'hexane et agitation pendant 1 min. La phase organique ainsi obtenue est récupérée puis concentrée par évaporation sous vide de l'hexane à 40°C à l'aide de l'évaporateur rotatif BÜCHI déjà mentionné.

### **II.3.3. Analyses effectuées sur le milieu de bioconversion**

#### **II.3.3.1. Analyse de la phase organique**

Un prélèvement de la phase organique est réalisé par pipetage de la phase supérieure du milieu de culture ou de bioconversion. Si le milieu est sous forme d'émulsion, on procède à une centrifugation à 10000g pendant 5 min à 20°C (centrifugeuse SIGMA 3MK BIOBLOCK SCIENTIFIC). 1 µL est injecté dans un chromatographe en phase gazeuse (CPG).

L'appareil (HP 6890, Agilent Technologies équipé d'un injecteur automatique) utilisé dans cette étude est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire apolaire SPB-5 (Supelco) de 30 mètres de long, de diamètre interne 0,32 mm et dont l'épaisseur du film est de 0,25 µm. Le gaz vecteur est l'azote (pression en tête de colonne 0,8 bar) et l'injection s'effectue par l'intermédiaire d'un injecteur split / splitless fonctionnant en mode division, le rapport étant de 1 : 5.

L'appareillage est relié à un système informatique d'acquisition et de traitement des données (HPChem, Agilent Technologies). Le programme de température du four est le suivant : température initiale 80°C pendant 5 min, puis augmentation à la vitesse de 20°C/min pour atteindre 200°C, valeur maintenue pendant 3 min. L'injecteur et le détecteur sont tous deux maintenus à 250°C.

La quantification des résultats est effectuée par la méthode de l'étalon interne. Ce dernier est représenté par une impureté de l'hexadécane, l'heptadécane (présent à 1% v/v dans la phase organique). Le logiciel HPChem calcule le rapport de la surface du pic d'intérêt sur celle de l'étalon interne, puis convertit cette valeur en concentration à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie. Cette approche permet de s'affranchir des variations de volumes injectés. La courbe de calibration est effectuée avec des solutions de 5 à 200 g.L<sup>-1</sup> d' $\alpha$ -pinène oxyde dans l'hexadécane. Les concentrations indiquées sont en g/L d'hexadécane et sont exprimées en équivalent  $\alpha$ -pinène oxyde.

### II.3.3.2. Analyse de la phase aqueuse

Dans un premier temps, 1 mL de phase aqueuse est prélevé dans un tube à hémolyse et acidifié avec 20  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide sulfurique concentrée ( $12 \text{ mol.L}^{-1}$ ) afin de protoner les acides et permettre leur passage dans la phase organique. Cette phase aqueuse est ensuite extraite par un mélange hexane / éther 50 % (v/v) contenant un étalon interne, le nonanoate de méthyle (1 % v/v). Le tube est agité au Vortex pendant une minute. 2  $\mu\text{L}$  de phase organique sont prélevés et injectés dans un appareil de CPG (voir par II.3.3.1). La courbe de calibration est effectuée avec des échantillons obtenus dans les mêmes conditions d'extraction.

### II.3.3.3. Identification des produits par spectrométrie de masse (MS)

Le chromatographe en phase gazeuse (HP 6890-plus, Agilent Technologies) est muni d'une colonne capillaire apolaire Equity 5 (Supelco) de 30 mètres de long, d'un diamètre interne de 0,25 mm, et d'une épaisseur de film de 0,25  $\mu\text{m}$ . Le gaz vecteur est l'hélium. Le programme de température et les températures du détecteur et de l'injecteur sont les mêmes que pour l'analyse en FID (voir II.3.3.1).

Cet appareil est couplé à un spectromètre de masse (HP 5973 network Agilent Technologies). Le détecteur SM opère en mode impact avec un courant d'émission de 35  $\mu\text{A}$ . Il possède un analyseur de type quadripolaire. Les températures respectives du quadripôle, de la source ionique, et de l'interface (ligne de transfert) sont respectivement de 150°C, 230°C et 280°C. L'intensité du signal, mesurée au niveau du détecteur, est enregistrée par un logiciel d'acquisition et de traitement des données permettant d'identifier les spectres des molécules séparées par comparaison avec des bases de données (NIST v1.7a).

### II.3.3.4. Identification des produits par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'appareil utilisé est un spectromètre (Bruker AC-400) fonctionnant à 400 MHz en  $^1\text{H}$  et 100 MHz en  $^{13}\text{C}$ . Environ 10 mg d'échantillon sont dilués dans 0,5 mL de  $\text{CDCl}_3$ . Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en parties par million (ppm) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence. Les spectres obtenus sont comparés à ceux de la littérature (GRIFFITHS et al., 1987a ; BEST et al., 1987 ; TUDROSZEN et al., 1977).

### II.3.3.5. Evaluation de la perméabilisation des cellules

La viabilité des cellules au cours des bioconversions avec des cellules fraîches est évaluée par coloration au bleu de méthylène (GRIFFIN et al., 2001). Un volume de 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon (phase aqueuse) est rajouté à 800  $\mu\text{L}$  d'une solution de bleu de méthylène (bleu de méthylène : 0,025 g ; NaCl : 0,9 g ; KCl : 0,042 g ;  $\text{CaCl}_2$  : 0,048 g ;  $\text{NaHCO}_3$  : 0,02 g ; glucose : 1 g ; eau distillée : 100 mL). La suspension est agitée au Vortex et laissée 10 min à température ambiante. L'observation microscopique ( $\times 1000$ ) permet de distinguer les cellules incolores viables des cellules non viables qui sont colorées en bleu.

## II.4. Caractérisation de l'isonovalal

### II.4.1. Purification de l'isonovalal

La solution d'isonovalal concentrée obtenue précédemment (voir II.3.2.1) est purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice (60  $\text{\AA}$  - 40-60  $\mu\text{m}$ , Silicagel). L'éluant est un mélange pentane / éther (98/2 v/v). La colonne utilisée est une colonne en verre de 2 L de volume utile (50 cm de hauteur, 7,5 cm de diamètre) équipée d'une ouverture inférieure. En premier lieu, un coton est placé au fond de la colonne et humecté avec quelques mL d'éluant, puis 800 g de gel de silice en suspension dans 1,2 L d'éluant sont versés dans la colonne. Ensuite, 1,2 L d'éluant sont passés à travers la colonne afin de tasser le gel et d'éliminer les impuretés. L'échantillon (23 mL) est alors délicatement déposé en surface du gel à l'aide d'une pipette Pasteur puis "chargé" par environ 60 mL d'éluant. La collecte des fractions (30 mL) est démarrée après passage de 400 mL de solution d'éluant. La présence d'isonovalal dans celles-ci est déterminée par CCM (voir le paragraphe suivant), l'éluant utilisé étant le même que celui de la purification. Les fractions pures sont regroupées et l'hexane est éliminé par évaporation à 40°C. L'appareil utilisé pour cette opération est un évaporateur rotatif (BÜCHI) utilisant une colonne de distillation réfrigérée maintenue sous vide.

### II.4.2. Analyses par chromatographie sur couche mince (CCM)

La phase stationnaire utilisée est composée d'une feuille de silice / aluminium (F254, Silicagel) de 2,5 x 9 cm. L'échantillon (voir par. II.4.1) est déposé à 1 cm du bord inférieur du support à l'aide d'un tube capillaire. Le dépôt est séché puis la plaque est placée

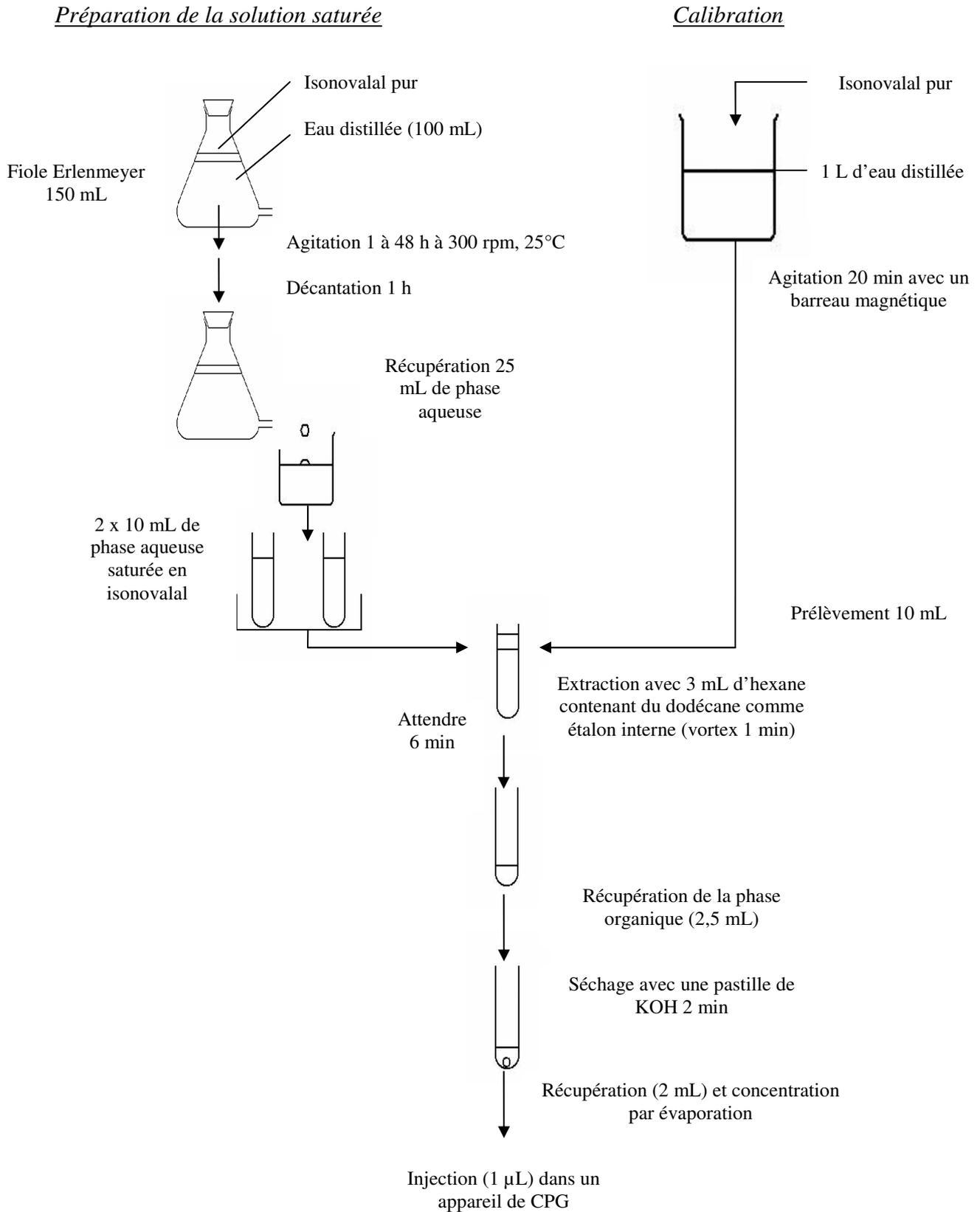


Figure II.8. Protocole utilisé pour la détermination de la solubilité dans l'eau de l'isonovalal

dans une enceinte fermée de 500 mL contenant 5 mL d'éluant (pentane/éther 98:2 v/v). La migration se déroule jusqu'à ce que le front de migration soit à 1 cm du bord supérieur de la plaque. Cette dernière est alors révélée par immersion dans une solution de vanilline (7,5 g de vanilline dans 146 mL d'éthanol et 4 mL d'acide sulfurique concentré) puis séchée sous flux d'air chaud 5 à 10 secondes.

### II.4.3. Spectrophotométries ultraviolet (UV) et infrarouge (IR)

Pour l'obtention du spectre UV, 2 mL d'échantillons purifiés sont versés dans une cuve optique en quartz possédant un trajet optique de 10 mm. L'absorbance est lue pour une gamme de longueur d'onde allant de 150 à 500 nm, l'appareil utilisé est un spectrophotomètre (UV mc<sup>2</sup>, Safas, Monaco) relié à un système d'acquisition informatique (Safas). La ligne de base est réglée au préalable avec du méthanol.

Pour l'obtention du spectre IR, une goutte d'échantillon purifié est placée entre 2 pastilles de NaCl placées ensuite dans l'enceinte d'un spectromètre infrarouge (Acculab 4, Beckman). L'absorbance est lue entre 600 et 4000 cm<sup>-1</sup> (2,5 à 16 μm).

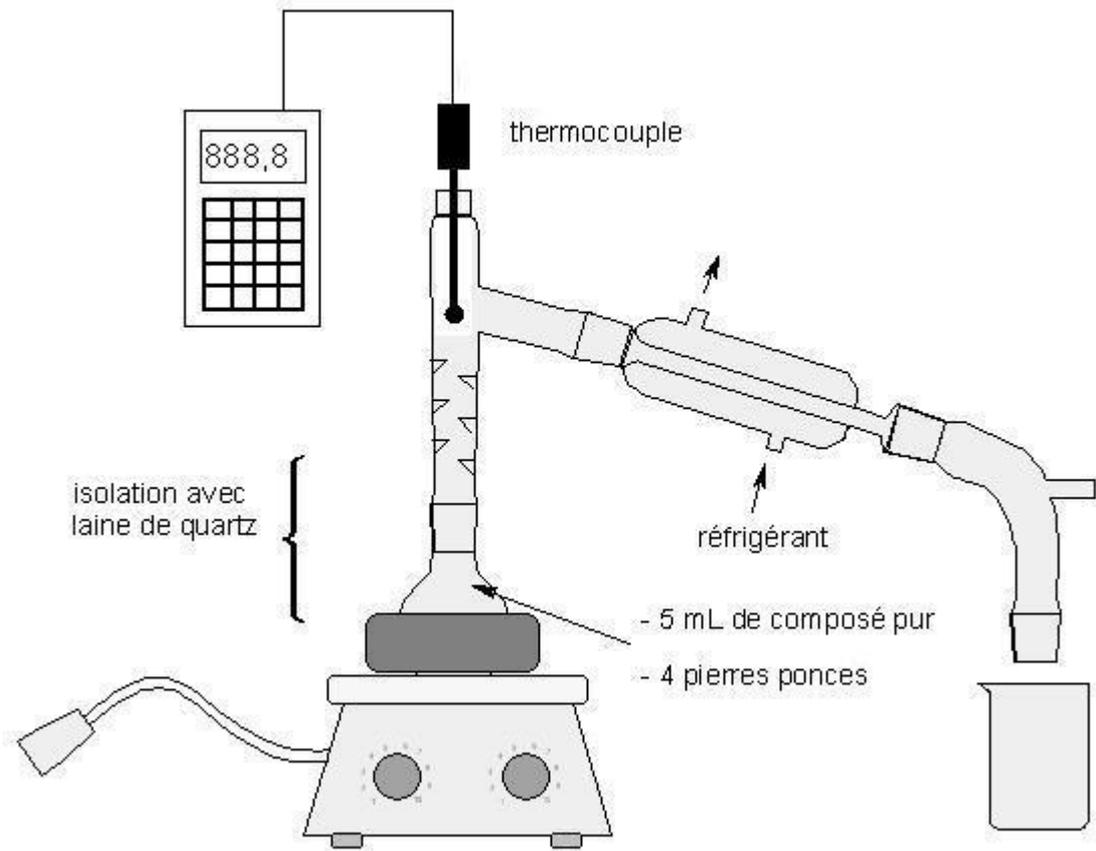
### II.4.4. Mesure de la masse volumique

1 mL de produit est pesé avec une balance de précision (Precisa 120A). Les volumes sont prélevés avec une micropipette (P1000 research, Eppendorf) dont la calibration a été vérifiée au préalable. Les mesures sont effectuées à 20°C et pour des composés dont la température est équilibrée à cette valeur. La mesure est réalisée 4 fois. La méthode de mesure est testée avec des composés de densité connue, tels que l' $\alpha$ -pinène, l' $\alpha$ -pinène oxyde, l'hexane, le cyclohexane 99 % et l'hexadécane.

### II.4.5. Mesure de la solubilité à 25°C

La solubilité de l'isonovalal est déterminée par la mesure de la concentration en soluté d'une solution aqueuse saturée et maintenue à 25°C. Cette dernière est obtenue par mise en contact d'eau distillée avec un excès d'isonovalal selon la méthode de FICHAN et al. (1999) décrite dans la **figure II.8**. La quantification de l'isonovalal est effectuée par extraction liquide / liquide de solutions aqueuses non saturées puis analyse par CPG (**figure II.8**).

L'étape finale de concentration de la phase organique est effectuée à l'aide d'un évaporateur sous vide (Speed Vac concentrator, Savant).



**Figure II.9.** Appareillage utilisé pour la détermination de la température d'ébullition de l'isonovalal.

#### **II.4.6. Mesure de la température d'ébullition**

5 mL d'isonovalal purifiée sont versé dans un ballon de 20 mL auxquels sont ajoutés 4 pierres ponce puis distillé à travers une colonne de Vigreux (20 cm de hauteur et 2 cm de diamètre) équipé d'une sortie supérieure réfrigérée (**figure II.9**). Le produit est porté à ébullition avec un chauffe-ballon utilisé à sa puissance maximale (100 w). La base de la colonne est isolée au 1/3 de sa longueur avec de la laine de quartz. La température (en °C) est mesurée au niveau de la sortie de la colonne par un thermocouple relié à un boîtier de mesure électronique testo 922 (Testo). Après que le composé ait commencé à distiller, la température affichée se stabilise pendant quelques minutes à une valeur maximale, cette dernière correspond à la température d'ébullition,  $T_b$ . L'appareillage est testé avec 4 composés dont la température d'ébullition est connue ( $T_b$  en °C à 1 atmosphère) : hexane (68,6), cyclohexane (80,9),  $\alpha$ -pinène (156) et dodecane (216,4).

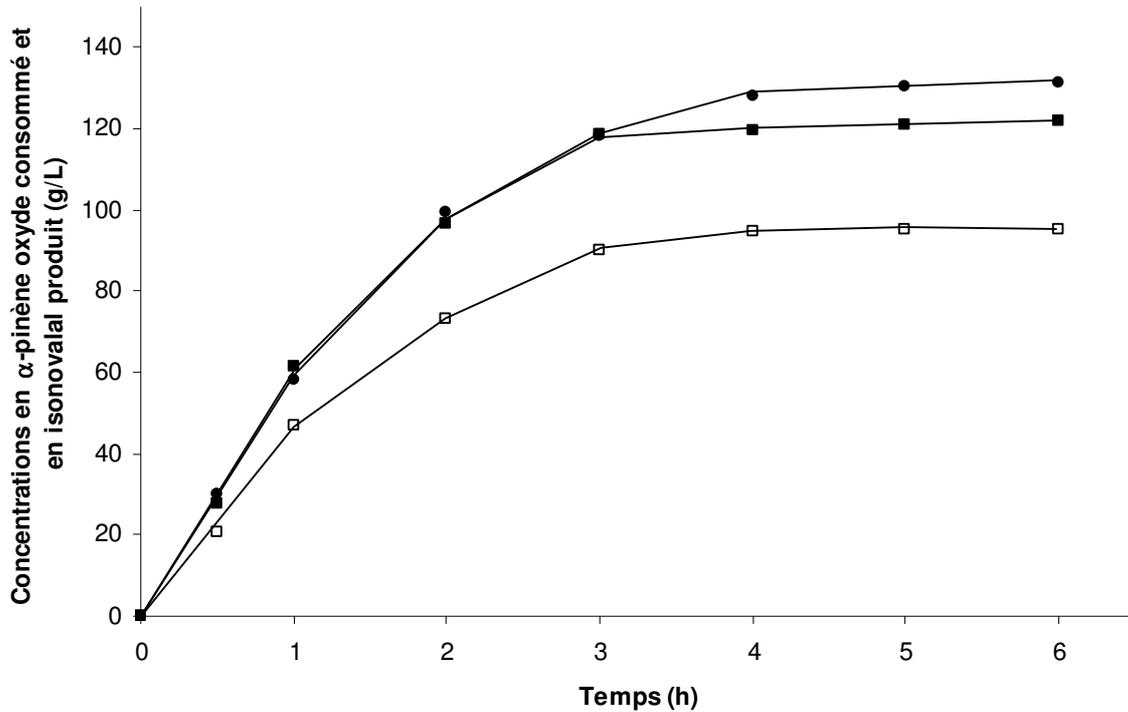
#### **II.4.7. Mesure de l'indice de réfraction**

L'indice de réfraction de l'isonovalal est mesuré grâce à un réfractomètre « NAR-1T liquid » (ATAGO) équipé d'une source de lumière en ligne D du sodium (589 nm). 4 gouttes d'échantillon purifié sont déposées dans l'appareil. La température est mesurée par un appareil de détection thermique RE-1159 (ATAGO). La mesure est effectuée 2 fois.



### III. Propriétés physico-chimiques de l'isonovalal et influence sur les constituants du milieu réactionnel

---



**Figure III.1.** Concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde consommé (-●-), en isonovalal produit (-□-) et en produits totaux formés (-■-) au cours d'une bioconversion par 25 mL de cellules congelées et perméabilisées à l'éther (6 % v/v) de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, concentrées à 7 g.L<sup>-1</sup>. La bioconversion se déroule en fiole Erlenmeyer de 250 mL en condition biphasique. La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans 25 mL d'hexadécane (concentration initiale : 165 g.L<sup>-1</sup>). La température est réglée à 30°C et la vitesse d'agitation à 200 rpm. Les concentrations sont mesurées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) selon la méthode décrite dans le chapitre II.3.3.1.

### III.1. Introduction

L'optimisation de la synthèse du *cis*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal à partir de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 en condition biphasique a déjà fait l'objet d'une étude dont les points principaux sont rappelés dans le chapitre I.5.4.3. La **figure III.1** présente la cinétique obtenue lors d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par des cellules perméabilisées de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. La vitesse initiale de production atteint  $40 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  permettant d'obtenir une concentration maximale de  $95 \text{ g.L}^{-1}$  d'isonovalal en 4 h de bioconversion pour un rendement proche de 75 % (FONTANILLE et LARROCHE, 2003).

Néanmoins, deux phénomènes limitent les performances de ce procédé. D'une part, la bioconversion entraîne la production de métabolites secondaires provoquant une diminution du rendement de 26 %. L'origine précise de ces produits reste à déterminer. D'autre part, le biocatalyseur est inactivé progressivement, aboutissant à un arrêt total de la bioconversion 4 h après l'ajout du substrat. Il a été montré que l'origine de cette inactivation était liée à l'un des produits de la réaction (FONTANILLE et LARROCHE, 2003).

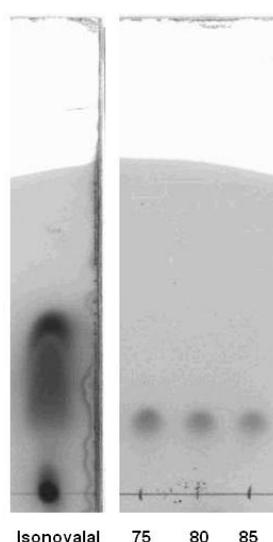
L'objectif de ce chapitre est de purifier l'isonovalal afin tester la stabilité de cette molécule dans le milieu réactionnel utilisé (milieu non conventionnel eau / solvant organique) et de mettre en évidence d'éventuels effets négatifs de l'isonovalal ou de ses produits de dégradation sur l'activité du biocatalyseur.

La mise au point d'un protocole de purification de l'isonovalal présente également le double avantage de faciliter l'utilisation de cette molécule dans le cadre d'une valorisation industrielle et d'envisager sa caractérisation physico-chimique.

### III.2. Purification de l'isonovalal

#### III.2.1. Production et purification de l'isonovalal

L'isonovalal est produit par une bioconversion en réacteur, en condition biphasique eau /solvant organique. La phase aqueuse est constituée de 500 mL de biomasse concentrée à  $7 \text{ g.L}^{-1}$  et perméabilisée à l'éther (6 % v/v). La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde ( $82,4 \text{ g.L}^{-1}$ ) dans 500 mL d'hexane. Les détails du protocole de production de l'isonovalal sont présentés dans le paragraphe II.3.2.1.



**Figure III.2.** Plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) de l'isonovalal. L'éluant utilisé est un mélange pentane / éther 98 / 2 (v/v). « isonovalal » : solution d'isonovalal concentrée (voir II.3.2.1). « 75, 80 et 85 » : exemples de fractions considérées comme pures issues de la purification de l'isonovalal par chromatographie liquide sur gel de silice.

Eluant	Composition (v/v)	R <sub>f</sub> <sup>a)</sup>
Chloroforme / méthanol	99 / 1	0,76±0,07
	90 / 10	0,83±0,04
Ether de pétrole / toluène	100 / 0	0,34±0,17
	90 / 10	0,34±0,17
Ether de pétrole / éther	80 / 20	0,36±0,21
	70 / 30	0,57±0,1
Ether de pétrole / acétone	99 / 1	0,27±0,15
	98 / 2	0,41±0,16
Hexane / acétate d'éthyle	99 / 1	0,15±0,11
	97 / 3	0,31±0,17
<b>Pentane / éther</b>	99 / 1	0,19±0,07
	<b>98 / 2</b>	<b>0,25±0,06</b>

a- « Response Factor » de l'isonovalal (ratio de la distance parcourue par l'isonovalal sur la distance parcourue par l'éluant) selon les mélanges de solvants utilisés lors de séparations par chromatographie sur couche mince (le protocole est détaillé dans le chapitre II.4.2).

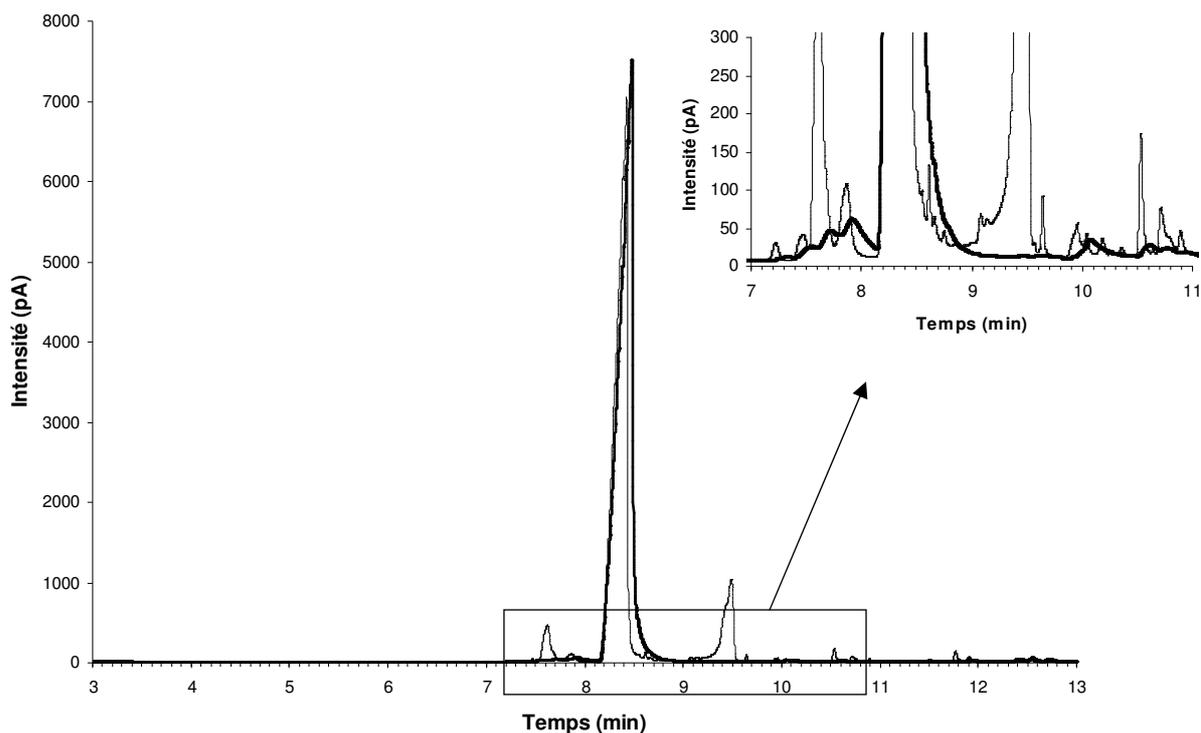
**Tableau III.a.** Etude préliminaire déterminant le choix de l'éluant utilisé au cours de la purification de l'isonovalal par chromatographie liquide sur gel de silice.

L'hexadécane classiquement utilisé est remplacé par de l'hexane afin de faciliter l'élimination ultérieure du solvant organique. Une étude a montré que l'utilisation de l'hexane ne changeait pas les performances de la bioconversion (FONTANILLE, 2002).

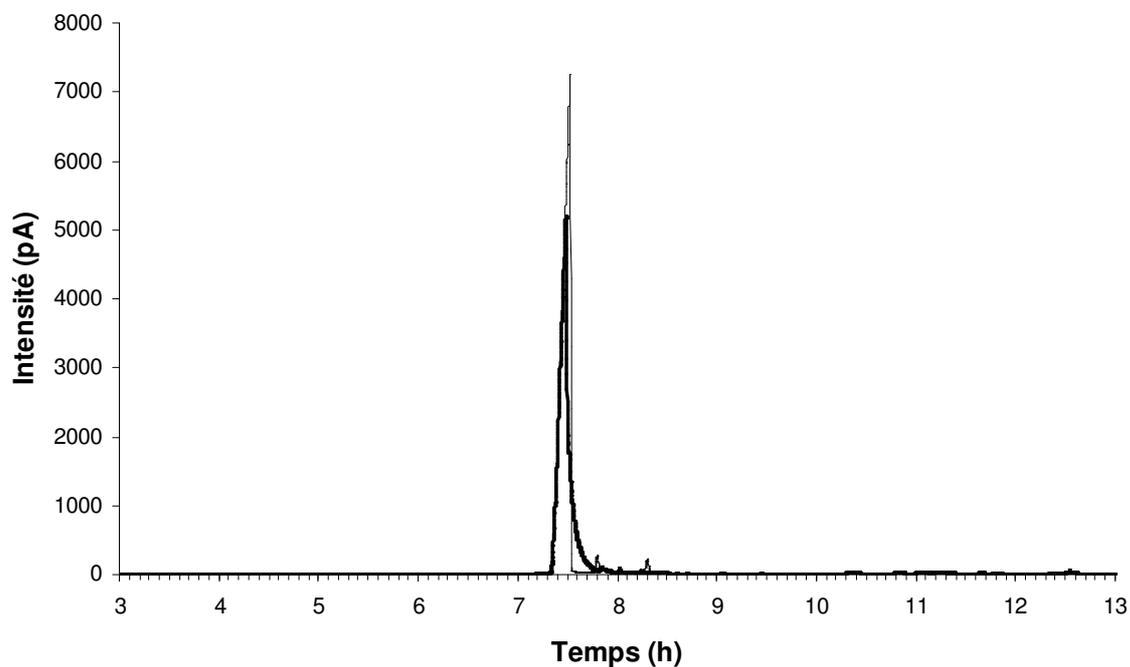
La bioconversion est stoppée lorsque l'intégralité de l' $\alpha$ -pinène oxyde est consommé, ceci est mis en évidence par analyse de la phase organique dans un appareil de CPG (voir II.3.3.1). Les 41,2 g d' $\alpha$ -pinène oxyde sont bioconvertis en moins de 2 h. Les phases sont ensuite séparées par centrifugation de la totalité du milieu. La formation d'une émulsion stabilisée et la présence de précipités à l'interface empêchent la récupération de l'intégralité de la phase organique ; 280 mL sont récupérés sur les 500 mL initialement présents. Cette solution d'isonovalal dans l'hexane est filtrée puis l'hexane est éliminé par évaporation (Cf paragraphe II.3.2.1). La masse de l'échantillon concentré obtenu est de 17,95 g.

La chromatographie liquide sur gel de silice est choisie comme technique de purification. Une étude préliminaire est réalisée afin d'identifier l'éluant le plus approprié. Pour cela, la solution concentrée d'isonovalal produite précédemment est analysée par des techniques de chromatographie sur couche mince (CCM). La présence d'isonovalal, révélée par coloration à la vanilline, est reconnaissable par la formation d'un spot bleu foncé (**figure III.2**). L'efficacité de la séparation est donnée par le calcul du Rf (Response factor), correspondant au rapport de la distance parcourue par ce spot sur la distance parcourue par l'éluant (front de migration). Idéalement, ce Rf doit être de  $0,25 \pm 0,05$  car un temps de contact minimum avec la phase stationnaire est requis pour obtenir une bonne résolution lors de la séparation sur colonne (ISCO inc., 2003). Les résultats obtenus montrent qu'une combinaison de solvants organiques à faible pouvoir éluant (globalement très faiblement hydrophiles) permet d'obtenir des Rf satisfaisants (**tableau III.a**), ce qui met en évidence le caractère particulièrement hydrophobe de la molécule d'isonovalal. Le mélange pentane / éther (98 / 2) est finalement retenu.

La solution d'isonovalal concentrée est alors purifiée par chromatographie liquide sur gel de silice. La colonne utilisée est de 2 L de volume utile, le protocole utilisé pour préparer cette colonne est détaillé dans le paragraphe II.4.1. La présence de l'isonovalal dans les fractions recueillies est mise en évidence par CCM. Les résultats obtenus montrent que le produit présente une pureté maximale dans les fractions 75 à 85 (**figure III.2**), ce qui correspond à un volume d'élution moyen de 2,65 L. Les fractions d'intérêt sont récupérées et l'éluant est éliminé par évaporation. Au final, 13,18 g d'isonovalal considérés comme purs sont recueillis.



**Figure III.3.** Chromatogramme de l'isonovalal purifié pour une température de l'injecteur à 250°C (trait fin) et 85°C (trait épais). En haut à droite : détail du chromatogramme. Les conditions de température du four et du détecteur sont détaillées dans le paragraphe II.3.3.1.



**Figure III.4.** Chromatogramme de l' $\alpha$ -pinène oxyde pour une température de l'injecteur à 250°C (trait fin) et 85°C (trait épais). Les conditions de température du four et du détecteur sont détaillées dans le paragraphe II.3.3.1.

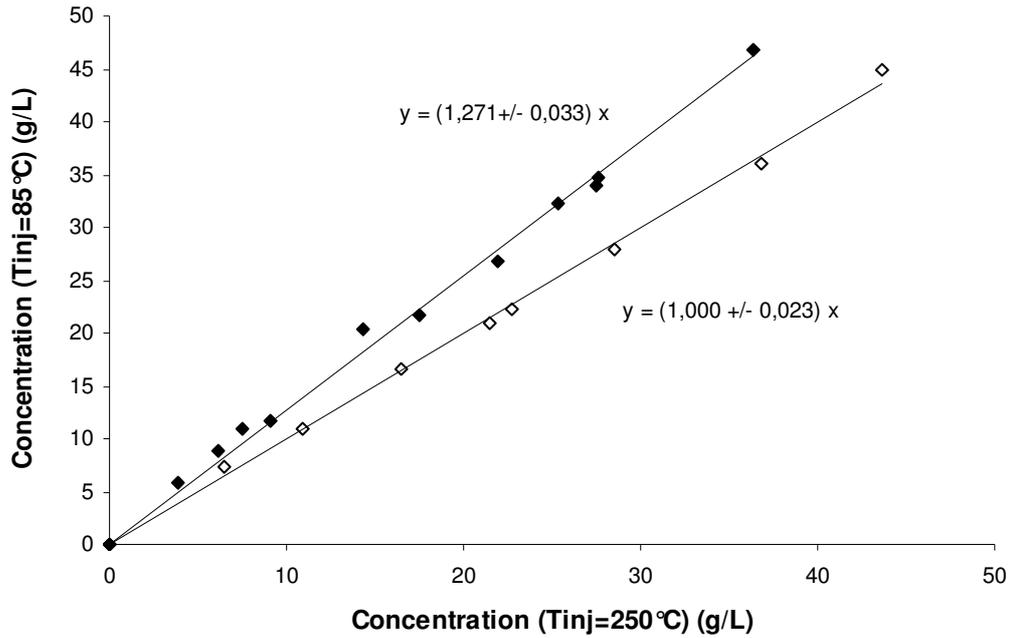
### III.2.2. Contrôle de la pureté de l'isonovalal

#### III.2.2.1. Mise en évidence de la dégradation thermique de l'isonovalal

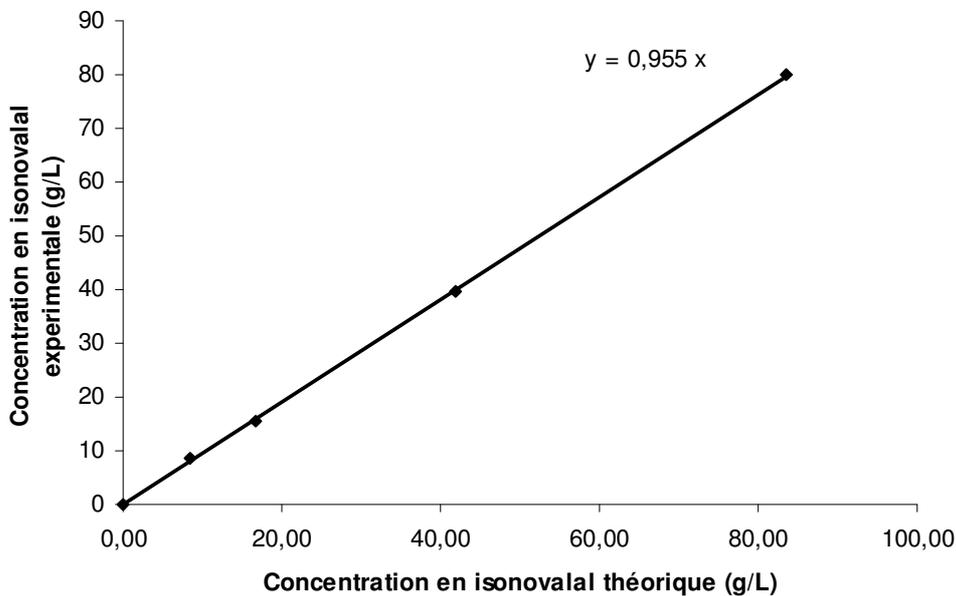
L'isonovalal purifié est injecté dans un appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le chromatogramme obtenu affiche le pic caractéristique de l'isonovalal dont le temps de rétention est de 8,2 min (**figure III.3**). Cependant, le chromatogramme montre également la présence de 4 autres pics à des temps de rétention de 7,6, 7,8, 9 et 9,5 min (les spectres de masse de ces composés sont présentés en **annexe D**). Au final, la pureté de l'échantillon (estimée par le calcul du rapport de l'aire du pic d'isonovalal sur la somme des aires des pics répertoriés) ne serait que de 76 %. Ce résultat est en contradiction avec les résultats obtenus en CCM (voir le paragraphe précédent).

L'hypothèse apportée est que l'isonovalal est instable dans les conditions de température imposées par l'injecteur de l'appareil de CPG (250°C), entraînant ainsi la formation de produits de dégradation thermique. L'échantillon est donc réinjecté avec une température de l'injecteur plus basse (85°C). Le programme de température du four n'est pas changé, permettant ainsi de préserver les valeurs des temps de rétention. La température du détecteur reste également la même. Le chromatogramme obtenu (**figure III.3**) montre la disparition de la plupart des pics parasites, ce qui confirme l'hypothèse précédente. La pureté de l'échantillon est finalement estimée à 95,3 %. Les impuretés restantes sont identifiées comme étant des traces de substrat et de solvants organiques (hexane, hexadécane et pentane).

Une comparaison des profils CPG d'un échantillon d' $\alpha$ -pinène oxyde est réalisée. Les chromatogrammes obtenus sont similaires (**figure III.4**) et montrent que l' $\alpha$ -pinène oxyde n'est pas sujet à des phénomènes de dégradation thermique à 250°C. La méthode de quantification de l'isonovalal utilisée jusque là n'est applicable uniquement si, pour une même concentration, le signal émis par l'isonovalal est identique à celui de l' $\alpha$ -pinène oxyde (concentration en équivalent  $\alpha$ -pinène oxyde). Ces résultats montrent que la méthode utilisée entraîne une sous-estimation de l'isonovalal produit et conduit à un biais lors des calculs de pureté et de rendement de bioconversion.



**Figure III.5.** Corrélation entre les concentrations en isonovalal (-♦-) et en  $\alpha$ -pinène oxyde (-◇-) mesurées par CPG pour 2 conditions de températures de l'injecteur (85°C et 250°C). Les concentrations sont exprimées en  $\text{g.L}^{-1}$  de phase organique et en équivalent  $\alpha$ -pinène oxyde à partir de courbes de calibration effectuées dans les 2 conditions de température de l'injecteur. Les températures du four et du détecteur sont précisées dans le paragraphe II.3.3.1.



**Figure III.6.** Corrélation entre la concentration en isonovalal théorique et la concentration en isonovalal expérimentale pour des solutions d'isonovalal dans 5 mL d'hexane. La concentration expérimentale est mesurée par analyse de CPG (voir le paragraphe II.3.3.1), Le phénomène de dégradation thermique de l'isonovalal dans l'injecteur est corrigé ( $F_c=1,271$ ). La concentration en isonovalal théorique des échantillons est obtenue par le calcul grâce aux données suivantes :  $d_1$  (densité de l'isonovalal) =  $0,88 \pm 0,01$ ,  $V_I$  (volume d'isonovalal) = 0, 50, 100, 250 et 500  $\mu\text{L}$ , pureté = 95 %.

### III.2.2.2. Correction de la méthode de quantification de l'isonovalal par CPG

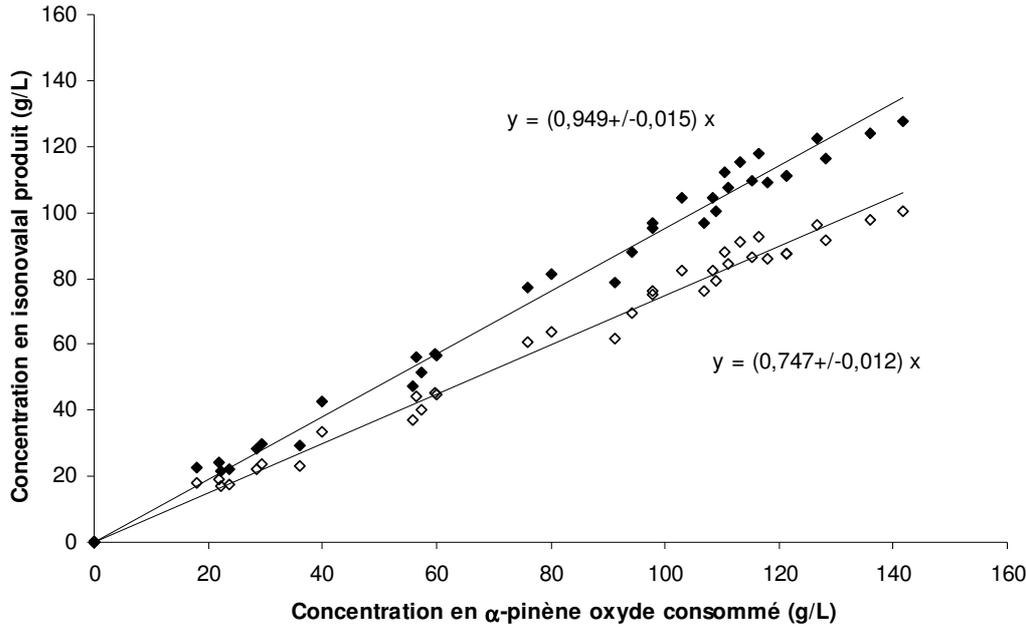
L'objectif de ce paragraphe est d'arriver à déterminer une corrélation entre la concentration en isonovalal dans la phase organique,  $C_{IO}$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), réellement présente dans un échantillon et la concentration mesurée dans ce même échantillon par analyse de CPG, pour une température de l'injecteur maintenue à  $250^\circ\text{C}$ ,  $C_{IO,250}$ . Cette corrélation permettrait ainsi de corriger les résultats précédents.

L'hypothèse de la méthode de quantification utilisée est que, pour des concentrations identiques, les signaux de l' $\alpha$ -pinène et de l'isonovalal présentent des aires identiques, à condition que les conditions d'analyses soient non dénaturantes pour les deux molécules. Une courbe de calibration d' $\alpha$ -pinène oxyde est alors à nouveau effectuée par injection dans un appareil de CPG à une température de l'injecteur maintenue à  $85^\circ\text{C}$ , température pour laquelle les composés quantifiés ne subissent pas de dégradation thermique (voir le paragraphe précédent). La nouvelle méthode obtenue permet alors de mesurer la concentration en isonovalal dans un échantillon donné,  $C_{IO,85}$  (en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de phase organique et en équivalent  $\alpha$ -pinène oxyde).

Les concentrations de différents échantillons d'isonovalal mesurées avec l'ancienne méthode,  $C_{IO,250}$ , sont comparées avec celles obtenues avec la nouvelle méthode,  $C_{IO,85}$ . La corrélation obtenue est de type  $y = Fc \cdot x$  (**figure III.5**). Le facteur correctif ( $Fc$ ) est estimé à  $1,271 \pm 0,033$  par régression linéaire (l'erreur sur la pente est calculée selon la loi de Student inversée pour un intervalle de confiance de 95 %). La concentration corrigée en isonovalal,  $C_{IO}$ , est donc obtenue à partir de la concentration en isonovalal mesurée avec l'ancienne méthode grâce à la relation suivante :

$$C_{IO} = C_{IO,85} = (1,271 \pm 0,033) \cdot C_{IO,250} \quad (\text{III.1})$$

La correction apportée à la méthode d'origine est testée par l'injection d'échantillons d'isonovalal de concentrations connues dans un appareil de CPG dont l'injecteur est maintenu à  $250^\circ\text{C}$ . Ces échantillons sont obtenus par solubilisation d'un volume déterminé d'isonovalal purifiée dans 5 mL d'hexane. Les concentrations sont calculées grâce à la connaissance de la pureté de l'isonovalal purifiée précédemment (voir le paragraphe III.2.2.1) et de la densité de l'isonovalal (les méthodes employées pour mesurer cette constante physico-chimique seront exposées dans le paragraphe III.3.2.1). Les résultats obtenus montrent que la corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques est proche de 1 (**figure III.6**). Dans la



**Figure III.7.** Concentration en isonovalal produit en fonction de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde consommé sans prendre en compte la dégradation thermique de l'isonovalal (-□-) et avec correction (-■-). Les mesures de CPG sont effectuées pendant les 5 premières heures de bioconversion réalisées par 25 mL de biomasse perméabilisée, en fiole Erlenmeyer de 250 mL. La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans 25 mL d'hexadécane (180 g.L<sup>-1</sup>). Agitation : 200 rpm. Température : 30°C. Fc=1,271.

Etape	Pureté (%) <sup>a)</sup>	Masse d'isonovalal (g)	Taux de récupération de l'étape (%)	Taux de récupération (%)
Bioconversion <sub>b)</sub>	/	39,2	100	/
Centrifugation <sub>c)</sub>	/	21,9	56	56
Evaporation – filtration <sub>d)</sub>	89,4	16,0	73	41
Chromatographie liquide sur gel de silice	95,3	12,6	79	32

a- La pureté des échantillons est déterminée par analyse de CPG pour une température de l'injecteur maintenue à 85°C. Le programme de température du four et la température du détecteur sont décrits dans le paragraphe II.3.3.1.

b- La bioconversion se déroule en réacteur dans les conditions décrites dans le paragraphe II.1.2.4. La quantité d'isonovalal est calculée en estimant une consommation totale de l' $\alpha$ -pinène oxyde initialement présent pour un rendement de bioconversion de 95 %. La masse d' $\alpha$ -pinène oxyde initiale est calculée avec les valeurs suivantes : V<sub>S</sub> (volume d' $\alpha$ -pinène oxyde)= 45 mL, d<sub>S</sub> (densité de l' $\alpha$ -pinène oxyde)= 0,964, pureté = 95 %. On considère que l'isonovalal produit s'accumule entièrement dans la phase organique.

c- Après l'étape de production, la phase organique est récupérée par centrifugation (voir par. II.1.4). La quantité d'isonovalal est estimée en fonction de la perte de volume de phase organique, considérée comme homogène.

d- Les protocoles employés dans ces étapes sont décrits dans le paragraphe II.1.5. Les masses d'isonovalal sont calculées à partir de la masse totale de l'échantillon et de sa pureté.

**Tableau III.b.** Taux de récupération de l'isonovalal au cours des étapes de production et de purification de l'isonovalal.

suite de l'étude, les concentrations en isonovalal mesurées par analyse de CPG seront systématiquement corrigées.

### III.2.3. Conclusions - Discussions

La mise au point du protocole de purification de l'isonovalal par chromatographie liquide sur gel de silice a permis de mettre en évidence une instabilité de cette molécule à forte température. Sa dégradation thermique en métabolites secondaires entraînait un biais dans les méthodes de quantification par CPG précédemment utilisées. Ces observations ont permis de corriger les résultats de FONTANILLE et LARROCHE (2003) grâce au facteur correctif déterminé dans le paragraphe précédent. La vitesse initiale de production de l'isonovalal d'une bioconversion type en condition biphasique (**figure III.1**) augmente de 40 à 50 g.L.h<sup>-1</sup>, la concentration maximale obtenue passe de 95 à 120 g.L<sup>-1</sup> et le rendement de bioconversion est augmenté de plus de 20 % pour atteindre 95±1 % (**figure III.7**). Une grande partie des diminutions de rendement préalablement observées étaient donc liées à des artefacts analytiques et non aux conditions expérimentales réelles du milieu réactionnel. Ces résultats, associés à la possibilité d'obtenir un produit d'une pureté supérieure à 95 % renforcent l'intérêt de cette réaction.

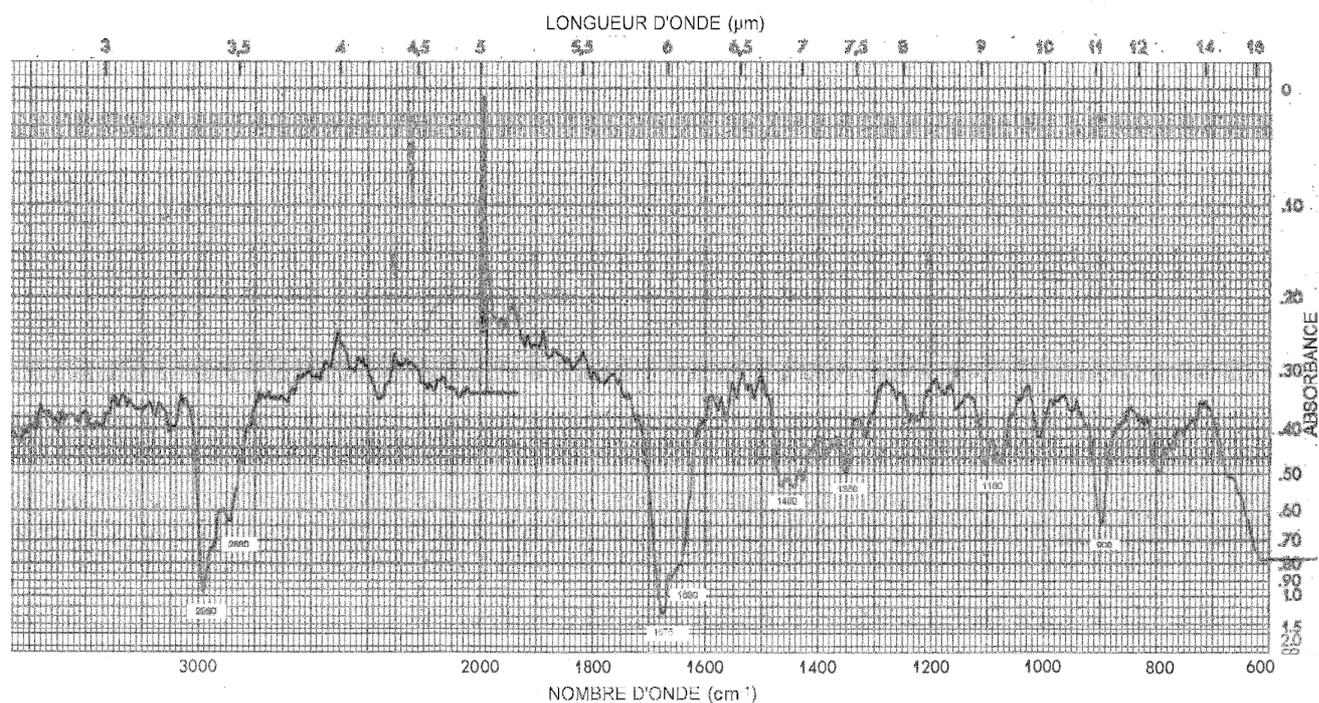
Même si l'objectif de cette étude était d'obtenir un échantillon d'isonovalal possédant une pureté maximale et non d'optimiser les étapes de purification, les taux de récupération de l'isonovalal ont été calculés à chaque étape et donnent des informations intéressantes pour une éventuelle valorisation industrielle du procédé (**Tableau III.b**).

Le protocole de purification sur colonne présente un taux de récupération appréciable de 79 % qui indique une faible réactivité de l'isonovalal avec le gel de silice. Cette étape est uniquement nécessaire si l'on souhaite obtenir une pureté supérieure à 95 %, la pureté de l'isonovalal récupéré après concentration étant déjà de 90 %. L'étape d'élimination de l'hexane par évaporation entraîne une perte non négligeable d'isonovalal ; ce phénomène, lié principalement à des pertes par entraînement dues à une forte volatilité de l'isonovalal peut difficilement être contourné. Enfin, l'étape qui contribue le plus au faible taux final de récupération de l'isonovalal reste l'étape de séparation des phases par centrifugation. Dans l'optique d'une production à plus grande échelle cette étape devra sans aucun doute être améliorée. A l'échelle du laboratoire, la séparation des phases pourra être optimisée par une augmentation des vitesses et des conditions de centrifugation. De même l'élimination dans le milieu réactionnel des composés responsables de la formation de précipités à l'interface et/ou

### III. Caractérisation de l'isonovalal

Solvant	$\lambda_{\max}$ (nm)
Méthanol	238
Hexane	236
Eau	242

**Tableau III.c.** Longueur d'onde d'adsorption maximale dans l'UV de l'isonovalal dilué dans différents solvants (1/14000 v/v).



**Figure III.8.** Spectre d'absorption de l'échantillon purifié dans l'IR. Les conditions d'analyses sont décrites dans le chapitre II.4.3.

de la stabilisation de l'émulsion eau / hexadécane (protéines et/ou débris cellulaire provenant de la biomasse perméabilisée) pourra être envisagée après les étapes de concentration et de perméabilisation de la biomasse.

A une échelle supérieure, l'utilisation de réacteurs à gros volume devrait naturellement faciliter la séparation des phases, l'émulsion restant très stable uniquement au niveau de l'interface liquide / liquide. Enfin, l'utilisation d'un réacteur comprenant une membrane à l'interface eau / solvant organique est envisageable même si cette solution aboutit nécessairement à une diminution des vitesses réactionnelles.

Cette purification a aussi et surtout permis de produire et d'isoler un échantillon d'isonovalal dont la pureté dépasse les 95 % qui est un pré requis pour la réalisation d'une caractérisation physico-chimique complète de cette molécule. Ce point fait l'objet de la partie suivante.

### **III.3. Identification et caractérisation physico-chimique de l'isonovalal**

Une recherche préliminaire est effectuée dans les principales banques de données physico-chimiques et spectrométriques disponibles sur Internet (la liste des sites et leur adresse sont indiquées dans les références bibliographiques). Le nom de la molécule entrée correspond à l'isonovalal ou à ses différents synonymes (*cis*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal, 2,6-diméthyl-5-méthylène-hept-(2Z)-enal et CAS 112164-19-9). Aucune données relatives à cette molécule n'ont été mises en évidence dans ces banques.

Cette partie s'attache à confirmer l'identité et la pureté de l'échantillon purifié dans la partie précédente. Pour cela, différentes analyses sont effectuées par spectrométrie (UV-Vis, IR, SM, RMN du <sup>13</sup>C et du proton). Une estimation des principales constantes physico-chimiques de la molécule est ensuite réalisée.

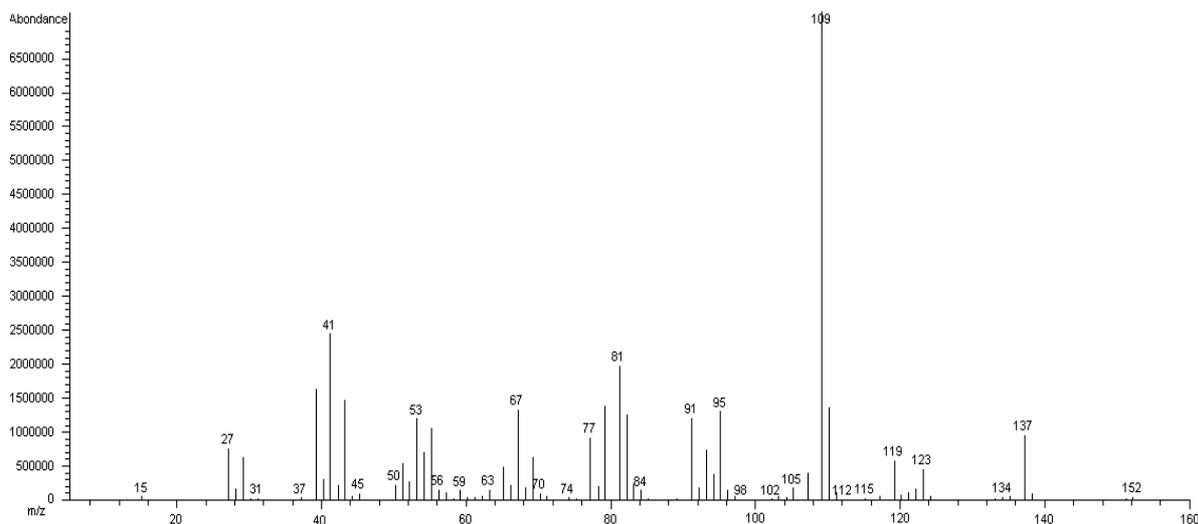
#### **III.3.1. Spectrométrie**

##### **III.3.1.1. Analyses spectrophotométriques**

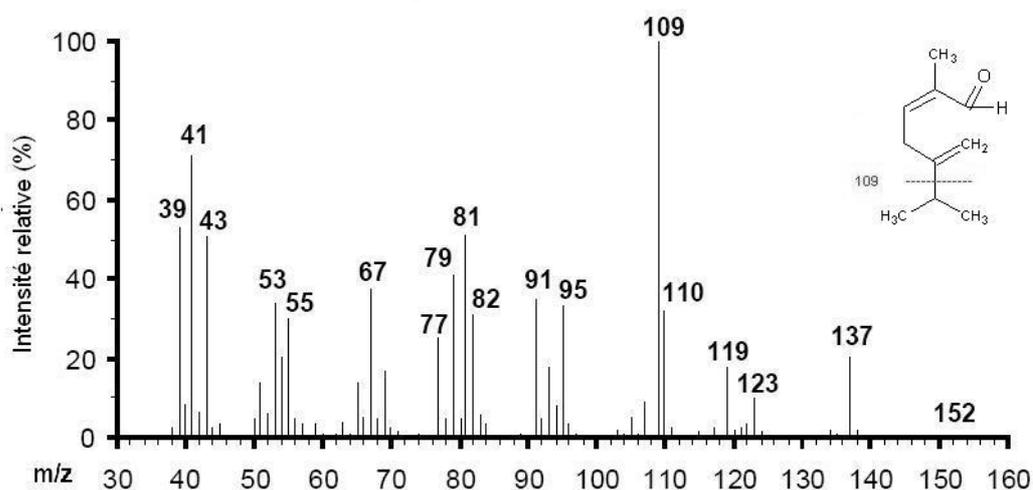
###### *III.3.1.1.1. Absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-Vis)*

La structure moléculaire de l'isonovalal comprend des doubles liaisons conjuguées susceptibles de jouer le rôle de groupement chromophore (C=C-C=O). Les règles empiriques

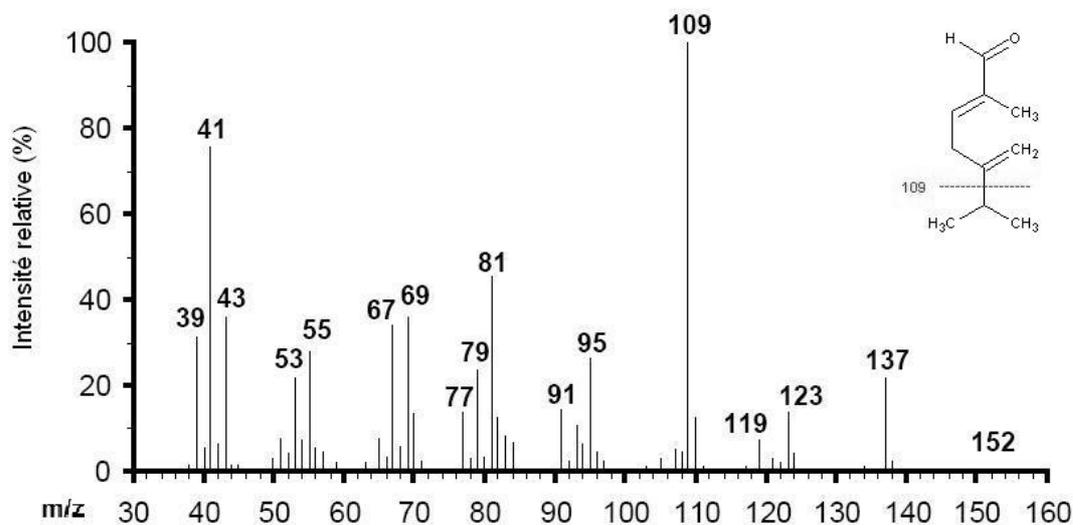
### III. Caractérisation de l'isonovalal



**Figure III.9.** Spectre de masse de l'échantillon purifié obtenu par impact électronique selon les conditions décrites dans le chapitre II.3.3.3.



**Figure III.10.** Spectre de masse de l'isonovalal ou *cis*-2-méthyl-isopropylhexa-2,5-dienal (LATZA, 2002).



**Figure III.11.** Spectre de masse du novalal ou *trans*-2-méthyl-isopropylhexa-2,5-dienal (LATZA, 2002).

de WOODWARD et FIESER permettent de calculer une longueur d'onde d'adsorption maximum théorique dans l'UV,  $\lambda_{\max}=232$  nm (voir le document **annexe F**).

L'échantillon purifié est dilué dans différents solvants et analysé par spectrophotométrie pour des longueurs d'onde allant de 190 à 900 nm (**tableau III.c**). La  $\lambda_{\max}$  observée est proche de celle déterminée théoriquement par la méthode de WOODWARD-FIESSER (232 nm) et de celle précédemment mise en évidence par LATZA (2002) lors de l'analyse de l'isonovalal dans du méthanol (236 nm). Cette longueur d'onde correspond également avec celles précédemment choisies par GRIFFITHS et al. (1987a) pour doser l'activité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par spectrophotométrie (235 nm dans l'hexane et 242 nm dans l'eau). Bien que l'isonovalal présente une couleur jaune pale, aucune absorption n'a été observée dans le visible, même avec le produit pur (résultats non présentés).

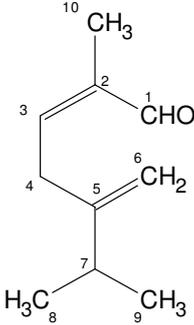
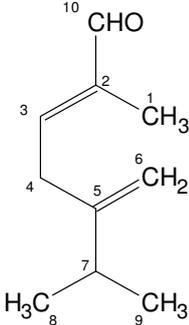
#### III.3.1.1.1.2. Absorption dans l'infrarouge (IR)

Le spectre obtenu par analyse de l'échantillon purifié dans un spectrophotomètre infrarouge (IR) est présenté dans la **figure III.8**. Les pics d'adsorptions à 2980 et 2880  $\text{cm}^{-1}$  ne possèdent pas la forme caractéristique des larges bandes d'adsorption liées à la présence d'une fonction alcool. Ils semblent plutôt correspondre à des vibrations d'élongation de liaisons C-H. Le signal à 1675  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la présence d'une double liaison C=O, ce qui indique que la molécule possède au moins un groupement carbonyle. Le pic à 1660  $\text{cm}^{-1}$  représente une ou plusieurs double(s) liaison(s) C=C dans la molécule. D'autres pics ou bandes d'absorption, plus difficilement attribuables à des liaisons particulières, sont observées dans la région du spectre dite « empreinte digitale » pour les nombres d'ondes suivants : 1450, 1350, 1100 et 900  $\text{cm}^{-1}$ .

#### III.3.1.2. Analyses par Spectrométrie de Masse (SM)

L'échantillon purifié est injecté dans un appareil de CPG couplé à un spectromètre de masse. Le chromatogramme obtenu affiche un pic caractéristique de l'isonovalal (au temps de rétention 8,2 min). Le spectre de masse obtenu comporte les pics majoritaires suivants : m/z 109 (100), 81 (26,5), 95 (18), 67 (17,5), 91 (16,6), 53 (14,4), 137 (13,4), 55 (13), 119 (8), 123 (6,5),  $M^{*+}$  ; 152 (0,5) (**figure III.9**). Ce spectre ne correspond à aucune molécule répertoriée dans la banque de spectre associée au logiciel d'acquisition (NIST v1.7a). Il correspond toutefois en tous points à celui obtenu par LATZA (2002) lors de l'analyse de l'isonovalal par

### III. Caractérisation de l'isonovalal

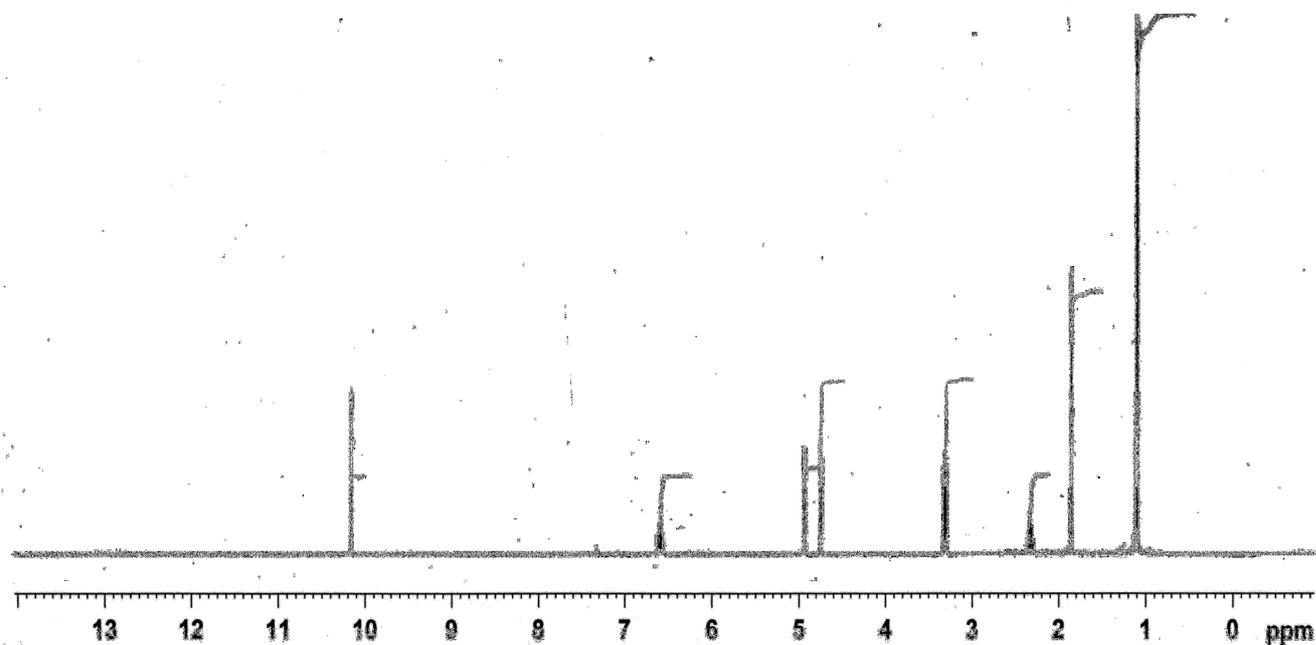
	C n°	$\delta$ (ppm) <sup>a)</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>b)</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>c)</sup>	
 Isonovalal	1	191,3	191,2	195,3	 Novalal
	2	136,8	136,8	140,1	
	3	146,8	146,7	152,5	
	4	31,2	31,2	33,7	
	5	153,1	153,1	152,1	
	6	109,4	109,4	109,0	
	7	34,2	34,1	34,3	
	8	21,5	21,5	21,5	
	9	21,5	21,5	21,5	
	<b>10</b>	<b>16,4</b>	<b>16,4</b>	<b>9,1</b>	

a- Spectre de l'isonovalal (selon GRIFFITHS et al. ,1987a).

b- Résultats de cette étude.

c- Spectre du novalal (selon GRIFFITHS et al. ,1987a).

**Tableau III.d.** Déplacements chimiques par rapport au TMS obtenu lors de l'analyse par RMN du  $^{13}\text{C}$  de l'échantillon purifié. Les conditions analytiques sont présentées dans le chapitre II.2.3.4.



**Figure III.12.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'isonovalal purifié. Les conditions d'analyses sont présentées dans le chapitre II.2.3.4.

CPG-SM dans des conditions similaires (**figure III.10**). Parmi les pics obtenus, le pic moléculaire à  $m/z$  152 correspond à la masse molaire de l'isonovalal ( $C_{10}H_{16}O$ ), les pics à  $m/z$  123 ( $M^+-29$ ) et 151 ( $M^+-1$ , non visible sur la figure) sont typiques de la perte d'un fragment aldéhyde ( $M^+-CH=O$ ) (SILVERSTEIN et al., 1998), le pic à  $m/z$  137 ( $M^+-15$ ) est issue de la perte d'un fragment méthyle ( $M^+-CH_3$ ), le pic de base à  $m/z$  109 ( $M^+-43$ ) correspond au départ du groupement isopropyle ( $M^+-CH-(CH_3)_2$ ) et les pics à  $m/z$  95 et 81 à la perte de groupements méthylènes ( $M^+-CH_2-$ ).

Ces pics ont également été mis en évidence au cours de l'analyse par CPG-SM de l'isomère *trans* de l'isonovalal, le novalal (GRIFFITHS et al., 1987a ; LATZA, 2002). Le spectre de masse obtenu par LATZA montre une disparité dans l'abondance relative de certains pics (**figure III.11**), notamment pour les pics à  $m/z$  69 et 110. Le spectre SM issu de l'analyse de l'échantillon purifié au cours de cette étude se rapproche plus vraisemblablement de celui de l'isomère *cis*.

#### III.3.1.3. Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'échantillon purifié est analysé par RMN du  $^{13}C$  : ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) : 191,2 ( $C_1$ ) ; 136,8 ( $C_2$ ) ; 146,7 ( $C_3$ ) ; 31,2 ( $C_4$ ) ; 153,1 ( $C_5$ ) ; 109,4 ( $C_6$ ) ; 34,1 ( $C_7$ ) ; 21,5 ( $C_8$  et  $C_9$ ) ; 16,4 ( $C_{10}$ ) (le spectre est présenté en **annexe A**). Les pics répertoriés correspondent à ceux précédemment observés lors de l'analyse de l'isonovalal et du novalal par GRIFFITHS et al. (1987a) (**tableau III.d**). Les résultats obtenus montrent clairement que la molécule produite et purifiée au cours de cette étude correspond à l'isomère *cis* du 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal, ceci est particulièrement mis en évidence par le signal du carbone n°10 (**tableau III.d**).

Le composé purifié est analysé par RMN sur le proton, les principaux pics obtenus sont attribués aux atomes d'hydrogène de l'isonovalal de la façon suivante : RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) : 10,2 (s, 1H,  $H_1$ ) ; 6,6 (t, 1H,  $J=7Hz$ ,  $H_3$ ) ; 4,9 (s, 1H,  $H_6$ ) ; 4,7 (s, 1H,  $H_6$ ) ; 3,3 (d, 2H,  $J=8,5Hz$ ,  $H_4$ ) ; 2,3 (m, 1H,  $J=7Hz$ ,  $H_7$ ) ; 1,8 (s, 3H,  $H_1$ ) ; 1,1 (d, 6H,  $J=7,5Hz$ ,  $H_8$  et  $H_9$ ). Les autres pics présents sont quasiment inexistantes (**figure III.12**) ce qui montre l'absence de contaminants hydrogénés dans l'échantillon et confirme ainsi sa pureté.

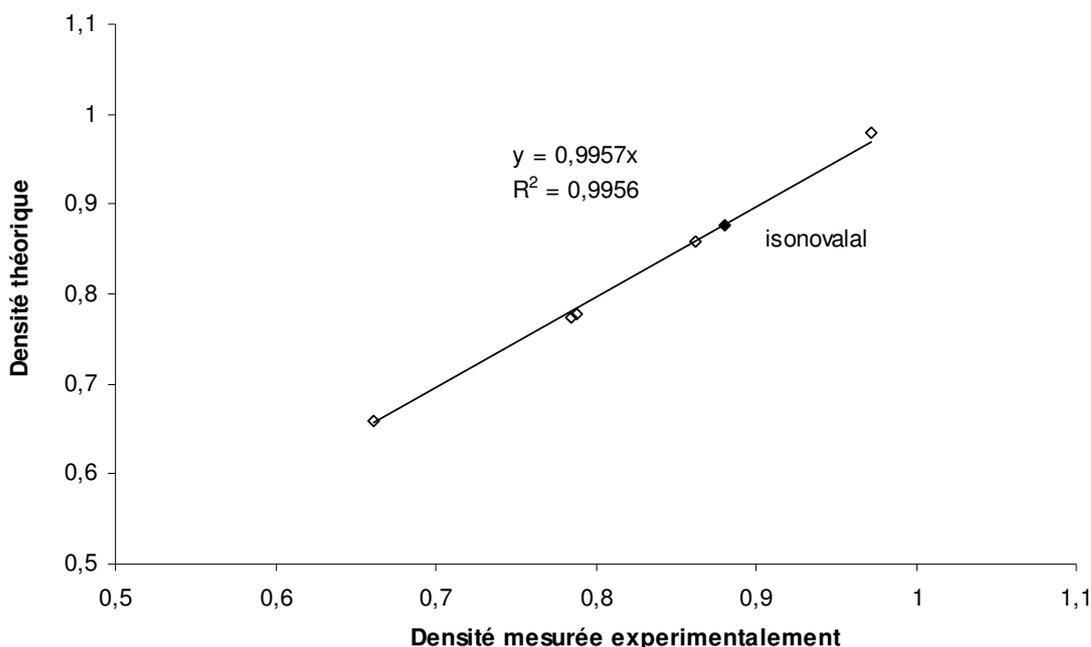
#### III.3.1.4. Conclusions

Les analyses de spectrométrie effectuées permettent de confirmer sans ambiguïté l'identité de l'échantillon purifié comme étant de l'isonovalal. Les spectres MS, UV-Vis et

Méthode	Température d'application (°C)	$\rho$ (g.mL <sup>-1</sup> )	$d^a$
GIROLAMI (1994)	25±5	0,80±0,05	<b>0,80±0,05</b>
CANSTANTINOU et al. (1995)	25	0,87±0,01	<b>0,87±0,01</b>
GRAIN (1979)	20	0,86±0,03	<b>0,86±0,03</b>

a- Densité de l'isonovalal, calculée à partir de la masse volumique liquide estimée grâce à la relation III.2.  $\rho_w$  (20°C, 1 atmosphère) = 0,9982 g.mL<sup>-1</sup>,  $\rho_w$  (25°C, 1 atmosphère) = 0,9971 g.mL<sup>-1</sup>.

**Tableau III.e.** Estimation de la densité de l'isonovalal par des méthodes de calcul empiriques (les détails des calculs sont présentés en annexe G).



**Figure III.13.** Estimation de la densité de l'isonovalal. La densité expérimentale est calculée à partir de la relation III.1 et de la mesure de la masse volumique expérimentale. La méthode est calibrée selon les conditions décrites dans le paragraphe II.4.4 avec l' $\alpha$ -pinène (0,8577), l' $\alpha$ -pinène oxyde (0,9802), l'hexane (0,6590), le cyclohexane (0,7780) et l'hexadécane (0,7734).  $\rho_{eau}$  (20°C, 1 atmosphère) = 0,9982 g.mL<sup>-1</sup>.

RMN du  $^{13}\text{C}$  obtenues recourent parfaitement les données de la littérature préexistantes (GRIFFITHS et al., 1987b ; LATZA, 2002) auxquels s'ajoutent 2 spectres nouvellement définis ; les spectres IR et RMN  $^1\text{H}$ . Ce dernier a permis de confirmer la pureté de l'échantillon par une méthode analytique non dénaturante.

### III.3.2. Caractérisation physico-chimique de l'isonovalal

Dans un premier temps, Les constantes physico-chimiques de l'isonovalal sont estimées par des modèles théoriques empiriques ou semi-empiriques. La plupart des modèles utilisés dans cette étude sont exposés dans les ouvrages de LYMAN et al. (1990) et de BAUM (1998). Ces valeurs sont ensuite confirmées par des méthodes expérimentales utilisant l'échantillon d'isonovalal purifié et identifié dans les paragraphes précédents.

#### III.3.2.1. Mesure de la densité

La densité de l'isonovalal,  $d_I$ , est obtenue par l'estimation de sa masse volumique,  $\rho_I$  (en  $\text{g.mL}^{-1}$ ), pour une température donnée grâce à la relation suivante :

$$d_I = \frac{\rho_I}{\rho_w} \quad (\text{III.2})$$

$\rho_w$  représente la masse volumique de l'eau à la température du système.

4 méthodes de calculs empiriques sont couramment utilisées pour estimer la masse volumique d'un composé. Il s'agit des méthodes de GIROLAMI (1994), de GRAIN (1979), de CANSTANTINO et al. (1995) et de BHIRUD (1978). La dernière méthode n'est actuellement pas applicable car elle nécessite la connaissance de la température et de la pression critique de l'isonovalal. Les densités estimées par les autres méthodes sont présentées dans le **tableau III.e**. Les résultats des calculs obtenus donnent des valeurs comprises entre 0,75 et 0,91.

La masse volumique de l'isonovalal à 20°C est mesurée expérimentalement par gravimétrie (voir II.4.4). La méthode est calibrée avec 4 composés de densité connue (**figure III.13**). Les résultats obtenus montrent une corrélation linéaire du type  $y = a.x$  entre les valeurs expérimentales et théoriques selon la relation suivante :

$$d_{théo} = d_{exp} \cdot 0,996 \pm 0,012 \quad (\text{III.3})$$

L'incertitude sur la pente est calculée par la loi de Student inversée pour un intervalle de confiance de 95 %. La mesure expérimentale de la masse volumique de l'isonovalal est de  $0,879 \text{ g.mL}^{-1}$ , la densité de l'isonovalal est ainsi estimée à  $0,88 \pm 0,01$  (20°C, 1 atmosphère).

Méthode	T <sub>b,I</sub> (°K)	T <sub>b,I</sub> (°C)
JOBACK et REID (1987)	475,15±15,20	<b>202,00±6,46</b>
MEISSNER (1949)	485,00±24,24	<b>211,88±10,59</b>
LYDERSEN-FORMAN-THODOS (décrite par RECHSTEINER, 1990)	640,19±32,00	<b>367,00±18,35</b>
MILLER (1980)	421,13±25,27	<b>147,98±8,88</b>

**Tableau III.f.** Estimation de la température d'ébullition de l'isonovalal (1 atmosphère) par différentes méthodes de calcul empiriques (le détail des calculs est présenté en annexe H).

Cette valeur est proche de celles initialement estimées par les méthodes de GRAIN (1979) et de CANSTANTINO et al. (1995) ( $0,86\pm 0,03$  et  $0,87\pm 0,01$ , respectivement).

### III.3.2.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction molaire ( $R_D$ ) est estimé par la méthode empirique d'EISENLOHR (1910). Cette dernière consiste à sommer la contribution de chaque atome et des doubles liaisons présents dans la molécule. La molécule d'isonovalal comprend 10 atomes de carbone, 16 liaisons C-H, 1 liaison oxygène (de type carbonyle) et 3 doubles liaisons. Les contributions correspondantes sont respectivement de 2,418, 1,100, 2,211 et 1,733. L'indice de réfraction molaire de l'isonovalal est ainsi estimé à  $49,19\pm 2,46$ .

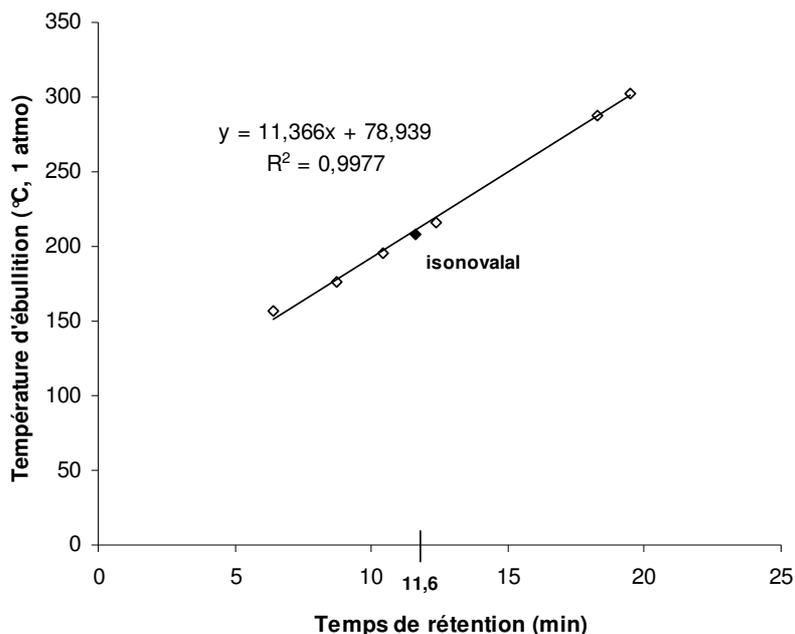
Dans un deuxième temps, l'indice de réfraction de l'isonovalal,  $n_D$ , est mesuré expérimentalement par réfractométrie (le protocole est détaillé dans le paragraphe II.4.7). La valeur obtenue est de 1,482. L'indice de réfraction molaire est défini par la relation suivante :

$$R_D = \left( \frac{M_I}{\rho_I} \right) \cdot \left( \frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \right) \quad (\text{III.4})$$

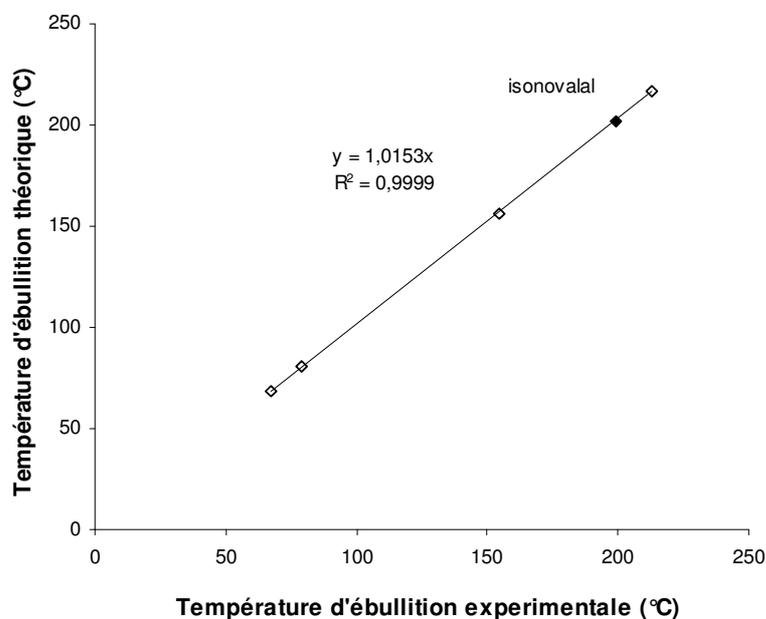
$M_I$  est la masse molaire de l'isonovalal ( $152 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et  $\rho_I$  sa masse volumique. Cette dernière a été estimée à  $0,88\pm 0,01 \text{ g.mL}^{-1}$  (voir le paragraphe précédent). Le  $R_D$  expérimental de l'isonovalal est ainsi déterminé à 49,22. Cette valeur correspond à celle obtenue par la méthode d'EISENLOHR ( $49,19\pm 2,46$ ).

### III.3.2.3. Température d'ébullition et température de fusion

Les 8 méthodes les plus appliquées sont celles de JOBACK et REID (1987), de MEISSNER (1949), de LYDERSEN-FORMAN-THODOS (décrite par RECHSTEINER, 1990), de MILLER (1980), d'OGATA et TSUCHIDA (1957), de SOMAYAJULU et PALIT (1957), de KINNEY (1940) et de STIEL et THODOS (1962). L'isonovalal présente une fonction aldéhyde et une chaîne hydrocarbonée complexe qui empêche l'application des 4 dernières méthodes. Les températures d'ébullition calculées avec les 4 premières méthodes sont indiquées dans le **tableau III.f**. Les méthodes de JOBACK et REID et de MEISSNER donnent des températures de l'ordre de  $200^\circ\text{C}$  alors que les méthodes utilisant le calcul de la température critique ( $T_c$  en  $^\circ\text{K}$ ) donnent des valeurs nettement plus élevées ou plus basses (**tableau III.f**).



**Figure III.14.** Estimation de la température d'ébullition de l'isonovalal par analyse CPG. L'appareil utilisé est décrit dans le paragraphe II.3.3.1. Le programme de température du four est le suivant : 60°C 5 min, 10°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 280°C puis 5 min à 280°C. L'injecteur et le détecteur sont maintenues à 65 et 250°C, respectivement. La méthode est calibrée avec les composés suivants (température d'ébullition en °C à 1 atmosphère) :  $\alpha$ -pinène (156,3), R-limonène (176,2),  $\alpha$ -pinène oxyde (195,3), dodécane (216,4), hexadécane (287) et heptadécane (302,3).



**Figure III.15.** Estimation de la température d'ébullition de l'isonovalal ( $T_b$ ) par distillation à travers une colonne de Vigreux. La méthode (détaillée dans le paragraphe II.4.6) est calibrée avec les composés suivants (température d'ébullition en °C à 1 atmosphère) : hexane (68,6), cyclohexane (80,9),  $\alpha$ -pinène (156), dodécane (216,4).

Une première estimation expérimentale de la température d'ébullition de l'isonovalal est effectuée à partir de son temps de rétention suite à une analyse de CPG. L'appareil utilisé est le même que celui employé précédemment pour l'analyse de la phase organique (Cf paragraphe II.3.3.1). Le programme de température du four et la température de l'injecteur ont été modifiés par rapport aux conditions classiquement utilisées. La méthode est calibrée avec différents composés dont la température d'ébullition à 1 atmosphère est connue (**figure III.14**). Les résultats obtenus montrent une corrélation linéaire du type  $y = a \cdot x + b$  entre les températures d'ébullition théoriques à 1 atmosphère des composés ( $T_b$  en °C) et leur temps de rétention dans les conditions d'élutions appliquées ( $Rt$  en min) selon l'équation suivante :

$$T_{b,I} = 11,37 \pm 0,79 \cdot Rt + 78,94 \pm 10,26 \quad (\text{III.5})$$

L'incertitude sur la pente et sur l'ordonnée à l'origine est calculée par la loi de Student inversée pour un intervalle de confiance de 95 %. Le temps de rétention de l'isonovalal étant de 11,6 min (**figure III.14**), sa température d'ébullition à 1 atmosphère est estimée grâce à la relation III.5 à  $211 \pm 19^\circ\text{C}$ .

La température d'ébullition de l'isonovalal est finalement déterminée expérimentalement par distillation de l'isonovalal dans une colonne de Vigreux (l'appareillage est détaillé dans le paragraphe II.4.6). La valeur obtenue est de  $202,05 \pm 1,30^\circ\text{C}$  (**figure III.15**), ce qui correspond à l'estimation faite grâce à la méthode de JOBACK et REID ( $202,00 \pm 6,46$ ).

La méthode de JOBACK et REID (1987) est également employée pour estimer la température de fusion,  $T_{m,I}$ , à 1 atmosphère de l'isonovalal. La valeur obtenue est  $-78,43 \pm 3,37^\circ\text{C}$  (le détail des calculs est présenté dans l'**annexe H**). 1 mL d'isonovalal purifié, stocké 12 h à  $-74^\circ\text{C}$ , ne présente aucune forme de cristallisation. Ce phénomène conforte l'idée que la température de fusion de l'isonovalal soit strictement inférieure à  $-74^\circ\text{C}$ .

#### III.3.2.4. Estimation de la pression de vapeur saturante

La pression de vapeur saturante de l'isonovalal,  $P^\circ_I$  (en atmosphère), est estimée à partir du modèle semi-empirique de MACKAY et al. (1982) :

$$\ln P_I^\circ = -(4,4 + \ln T_{b,I}) \cdot \left[ 1,803 \cdot \left( \frac{T_{b,I}}{T} - 1 \right) - 0,803 \cdot \ln \left( \frac{T_{b,I}}{T} \right) \right] \quad (\text{III.6})$$

Avec  $T$  la température du système (°K) et  $T_{b,I}$  la température d'ébullition de l'isonovalal



(estimée à 475,15°K dans le paragraphe précédent). Les pressions de vapeur saturantes obtenues à 25°C et 30°C sont de 0,49±0,12 mmHg et 0,70±0,17 mmHg, respectivement.

### III.3.2.5. Estimation de la tension de surface

La tension de surface de l'isonovalal,  $t_s$  (dyn.cm<sup>-1</sup>), peut être déterminée *via* le parachor de ce même composé,  $p$  (cm<sup>3</sup>.g<sup>1/4</sup>.S<sup>-1/2</sup>.mol<sup>-1</sup>), selon la relation de SUGDEN (1924) :

$$t_s = \left( \frac{p \cdot (\rho_l - \rho_{v,l})}{M_l} \right)^4 \quad (\text{III.7})$$

$M_l$  est la masse molaire de l'isonovalal (152 g.mol<sup>-1</sup>),  $\rho_l$  et  $\rho_{v,l}$  sont respectivement la masse volumique liquide et vapeur de l'isonovalal (g.mL<sup>-1</sup>).

Le parachor de l'isonovalal peut être obtenu par la relation de MEISSNER (1949) :

$$T_{b,l} = \frac{637 \cdot (R_D)^{1,47} + B}{p} \quad (\text{III.8})$$

Avec  $T_{b,l}$  la température d'ébullition de l'isonovalal (estimée à 475,15°K dans le paragraphe III.3.2.3),  $R_D$  l'indice de réfraction molaire (estimé à 49,22 dans le paragraphe III.3.2.2) et  $B$  une constante empirique dépendant de la fonction chimique de la molécule étudiée ( $B=15000$  pour les aldéhydes).  $p$  est ainsi estimé à 443,43±8,87 cm<sup>3</sup>.g<sup>1/4</sup>.S<sup>-1/2</sup>.mol<sup>-1</sup>.

L'estimation de  $p$  permet de calculer  $t_s$  grâce à la relation III.7 (la masse volumique de l'isonovalal en phase gazeuse est considérée comme négligeable devant sa masse volumique liquide). La tension de surface de l'isonovalal est ainsi estimée à 43,44 dyn.cm<sup>-1</sup>.

### III.3.2.6. Détermination de la solubilité et du coefficient d'activité à dilution infinie dans l'eau

La détermination de la solubilité dans l'eau d'un composé ( $S_w$  en mol.L<sup>-1</sup>) et de son coefficient d'activité à dilution infinie dans l'eau ( $\gamma_w^\infty$ , sans unité) constitue en réalité une démarche identique. En effet, en condition biphasique liquide / liquide et à l'équilibre thermodynamique, l'égalité des potentiels chimiques d'un composé au sein des deux phases liquides  $L_1$  et  $L_2$  mène à la relation suivante :

$$\gamma_{L_1} \cdot x_{L_1} = \gamma_{L_2} \cdot x_{L_2} \quad (\text{III.9})$$

Avec  $\gamma$  le coefficient d'activité du composé et  $x$  sa fraction molaire dans le solvant indiqué.

Dans le cas d'un système comprenant un composé organique, faiblement soluble dans l'eau, fortement dilué dans une phase aqueuse en excès, l'équation III.9 se simplifie pour :

### III. Caractérisation de l'isonovalal

Méthode	Log $K_{ow}$
MEYLAN et HOWARD (1995) <sup>a)</sup>	<b>3,58</b>
KLOPMAN et al. (1994) <sup>a)</sup>	3,61
HANSCH et LEO (1979) <sup>a)</sup>	4,92
LOGKOW <sup>b)</sup>	3,45
PIRIKA <sup>c)</sup>	2,79
ALOGPS <sup>d)</sup>	3,13
Moyenne :	<b>3,58±0,76</b>

- a- Les calculs sont détaillés dans le document annexe I.  
b- Voir le site [http://www.syrres.com/esc/est\\_kowdemo.htm](http://www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm).  
c- Voir le site <http://www.pirika.com/chem/tcpee/tcpe.htm>.  
d- Voir le site <http://www.vcclab.org/lab/alogsps/start.html>.

**Tableau III.g.** Estimation du logarithme du coefficient de partition dans un système eau / octanol (log  $K_{ow}$ ) de l'isonovalal à 25°C.

Méthode	$S_{w,I}$ (mmol.L <sup>-1</sup> )
<i>A partir du <math>\gamma_w^\infty</math> <sup>a)</sup></i>	
PIEROTTI et al. (1959) <sup>b)</sup>	0,03
UNIFAC <sup>c)</sup>	3,45
AUAFAC <sup>b)</sup>	83,77
<i>A partir du log <math>K_{ow}</math> <sup>d)</sup></i>	
YALKOWSKY et VALVANY (1979) <sup>e)</sup>	0,85
GROS et LARROCHE (2005) <sup>f)</sup>	5,41
MEYLAN et al. (1996) <sup>g)</sup>	0,44
<i>A partir de la structure de la molécule <sup>h)</sup></i>	
IRMANN (1965)	0,05
KLOPMAN et al. (1992)	9,22

a-  $S_{w,I}$  (mol.L<sup>-1</sup>) est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$S_{w,I} = \frac{55,6}{\gamma_w^\infty}$$

b- Les calculs sont détaillés dans le document annexe K.

c- Calculé grâce au logiciel UNIFAC (téléchargé sur <http://www.che.edu/thermo/basicprograms.htm>).

d-  $K_{ow}$  est le coefficient de partition de l'isonovalal dans un système eau / octanol issue du tableau III.g.

e-  $S_{w,I}$  (mol.L<sup>-1</sup>) est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\log S_{w,I} = 0,5 - \log K_{ow}$$

f-  $S_{w,I}$  (mmol.L<sup>-1</sup>) est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\log S_{w,I} = -\log K_{ow} - \log \gamma_o^\infty + 3,916$$

$\gamma_o^\infty$  est le coefficient d'activité à dilution infinie dans l'octanol, déterminé par UNIFAC.

g-  $S_{w,I}$  (mol.L<sup>-1</sup>) est déterminé à partir de l'équation suivante :

$$\log S_{w,I} = 0,796 - 0,854 \cdot \log K_{ow} - 0,00728 \cdot (M_I)$$

$M_I$  est la masse molaire de l'isonovalal (152 g.mol<sup>-1</sup>).

h- Les détails des calculs sont présentés dans l'annexe J.

**Tableau III.i.** Estimation de la solubilité de l'isonovalal dans l'eau ( $S_{w,I}$ ) à 25°C.

$$\gamma_w^\infty = \frac{1}{x_w} = \frac{55,6}{S_w} \quad (\text{III.10})$$

Il existe plusieurs méthodes permettant d'estimer le  $\gamma_w^\infty$  (PIEROTTI et al. (1959) ; AQUAFAC ; UNIFAC) mais leur manque de fiabilité est communément reconnu (LYMAN et al., 1990). D'autres méthodes ont été employées dans cette étude.

Des relations empiriques ont par exemple été observées entre la solubilité d'un composé dans l'eau et le logarithme de son coefficient de partition dans un système eau / octanol,  $\log K_{ow}$  (YALKOWSKI et VALVANY, 1992 ; MEYLAN et al., 1996). Le **tableau III.g** présente les valeurs des  $\log K_{ow}$  obtenues pour l'isonovalal avec les méthodes les plus utilisées. Les résultats du  $\log K_{ow}$  tendent vers une moyenne de  $3,58 \pm 0,76$ . La valeur obtenue avec la méthode de MEYLAN et HOWARD est retenue car elle est la plus représentative de cette moyenne (3,58). D'autres méthodes utilisent la structure moléculaire du composé d'intérêt pour estimer directement sa solubilité comme celles d'IRMANN (1965) et de KLOPMAN et al. (1992).

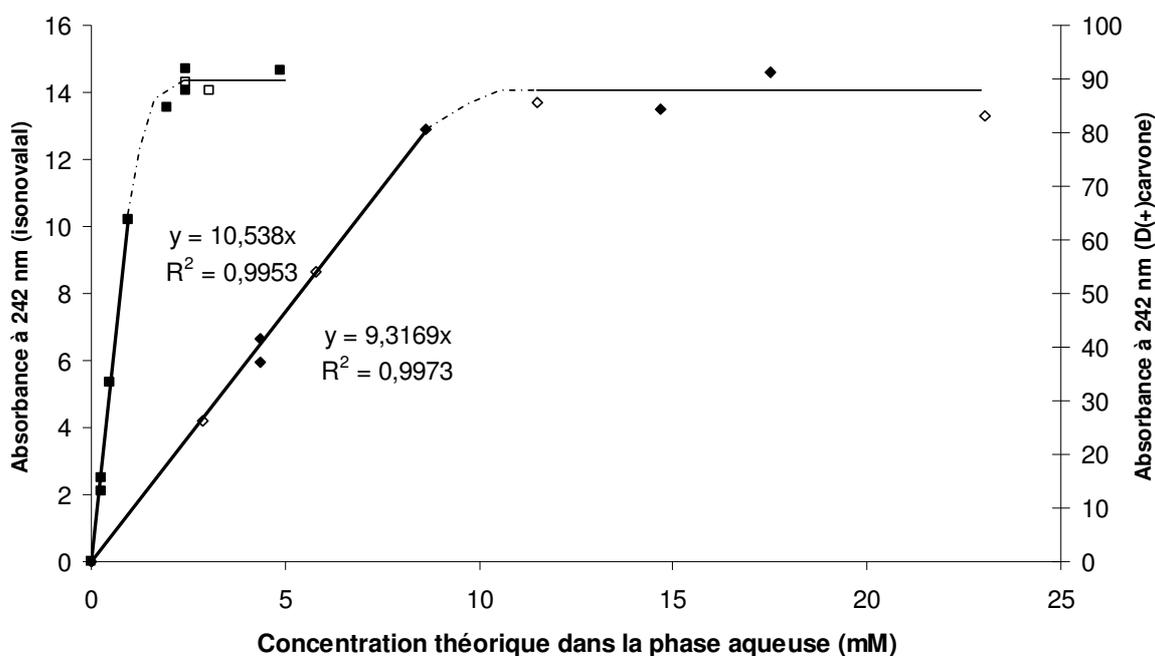
Les valeurs de  $S_w$  obtenues avec les différentes méthodes énoncées ci-dessus sont présentées dans le **tableau III.i**. Les résultats confirment de façon générale une faible solubilité de l'isonovalal dans l'eau. Néanmoins, les méthodes donnent une série de valeurs dont il est impossible de discerner une tendance.

La solubilité de la carvone et de l'isonovalal dans l'eau à 25°C est estimée expérimentalement par sa mise en contact avec de l'eau distillée sous forte agitation. Les résultats obtenus montrent des valeurs similaires pour des temps d'agitation allant de 12 à 48 h (**tableau III.j**) avec une moyenne de  $0,56 \pm 0,40$  mmol.L<sup>-1</sup> pour l'isonovalal et  $7,69 \pm 0,49$  mmol.L<sup>-1</sup> pour la S(+)-carvone (25°C). D'après la banque de données PHYSPROP, la solubilité dans l'eau de la R(+)-carvone a été préalablement estimée à 8,65 mmol.L<sup>-1</sup> (YALKOWSKI et DANNEN, 1992). La méthode expérimentale utilisée présente donc une sous estimation de l'ordre de 11 % et une forte incertitude pour la valeur de l'isonovalal ( $\pm 71$  %). Ce phénomène peut être lié aux méthodes analytiques employées ; la CPG ne semble en effet pas adaptée à la quantification de concentrations faibles ( $< 0,5$  g.L<sup>-1</sup>). Elle nécessite en plus une étape de concentration par évaporation susceptible de provoquer des pertes par entraînement.

Les expérimentations sont à nouveau réalisées avec des périodes d'agitation plus courtes (1 à 12 h) et la concentration de l'isonovalal dans l'eau est estimée par spectrophotométrie UV. Cette méthode présente un meilleur seuil de détection que la méthode

Temps d'agitation (h)	Solubilité (mmol.L <sup>-1</sup> )	
	Isonovalal	R(+)-carvone
12	0,59	7,73
48	0,53	7,65
moyenne	<b>0,56±0,40</b>	<b>7,69±0,49</b>

**Tableau III.j.** Détermination expérimentale de la solubilité de l'isonovalal et de la R(+)-carvone par mesure CPG (la méthode est détaillée dans le paragraphe II.4.5).



**Figure III.16.** Détermination expérimentale de la solubilité de l'isonovalal (carrés) et de la R(+)-carvone (losanges) par lecture de l'absorbance à 242 nm. La concentration théorique dans la phase aqueuse est calculée à partir du volume du composé initialement introduit dans des fioles Erlenmeyer de 150 mL à partir de la densité et de la pureté des échantillons (isonovalal  $d_1=0,880$ , pureté=95 % ; R(+)-carvone :  $d_c=0,858$ , pureté=98 %) et du volume de phase aqueuse (100 mL). Les fioles sont agitées 1 h (symboles pleins) ou 12 h (symboles vides) à 300 rpm dans un bain marie régulé à 25°C.

de quantification par CPG et permet une mesure directe de la concentration en isonovalal dans la phase aqueuse sans qu'une étape supplémentaire d'extraction ne soit nécessaire. Le fait que la méthode de quantification par spectrophotométrie possède une faible spécificité ne présente ici pas d'inconvénient majeur dans la mesure ou la pureté de l'échantillon d'isonovalal a été préalablement confirmée (voir la section III.3.1). La figure III.16 montre l'évolution de l'absorbance à 242 nm en fonction de la quantité en isonovalal initialement introduite dans les fioles. La similarité des résultats pour des agitations de 1 et 12 h montre qu'une heure d'agitation à 300 rpm (25°C) est suffisante pour solubiliser complètement les composés dans l'eau. La première partie de la courbe correspond à des concentrations inférieures à la solubilité des composés, elle permet d'estimer le coefficient d'extinction molaire de l'isonovalal dans l'eau pour une longueur d'onde de 242 nm à  $10538 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Cette valeur est proche de celle précédemment fixée par GRIFFITHS et al. (1987a) ( $\epsilon=9000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). La seconde partie de la courbe montre un phénomène de saturation pour une absorbance maximale moyenne de  $15,02 \pm 1,38$ , ce qui correspond à une solubilité de l'isonovalal dans l'eau à 25°C de  $1,42 \pm 0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ . De la même façon, la solubilité de la R(+)-carvone est estimée à  $9,25 \pm 0,61 \text{ mmol.L}^{-1}$ , ce qui montre que cette méthode expérimentale, contrairement à la précédente, a tendance à surestimer les solubilités. Cette surestimation est cependant plus faible (+ 6 %) et la valeur obtenue pour l'isonovalal présente une incertitude également plus faible ( $\pm 8 \%$ ). Cette dernière valeur est donc finalement retenue.

#### III.3.3. Conclusions - Discussions

Les analyses spectrométriques ont permis de confirmer l'identité et la pureté de l'isonovalal produit, certaines constantes physico-chimiques de l'isonovalal ont ainsi pu être estimées. Le **tableau III.k** compare les résultats obtenus expérimentalement et les résultats des méthodes empiriques se rapprochant le plus de ces valeurs.

L'indice de réfraction, la densité et la température d'ébullition de l'isonovalal ont été déterminés. Les valeurs obtenues sont correctement prédites par certains modèles (méthode d'EISENLHOR, de CANSTANTINO et al. et de JOBACK et REID, respectivement).

La température de fusion, la pression de vapeur saturante et la tension de surface n'ayant pu être confirmées expérimentalement, les valeurs données dans le **tableau III.k** sont à prendre avec précaution. Il est néanmoins à noter que la température de fusion est estimée avec un modèle qui a donné de bons résultats pour la détermination de la température

### III. Caractérisation de l'isonovalal

Constante	Méthode	
	Expérimentale	Théorique
R <sub>D</sub>	49,22	49,19±2,46 <sup>a)</sup>
d <sub>i</sub>	0,88±0,01	0,87±0,01 <sup>b)</sup>
T <sub>b,I</sub> (°C)	202,05±1,30	202,00±8,69 <sup>c)</sup>
T <sub>m,I</sub> (°C)	< -74	-78,43±3,37 <sup>c)</sup>
P <sub>1</sub> 25°C (mmHg)	/	0,49±0,12 <sup>d)</sup>
ts (dyn.cm <sup>-1</sup> )	/	43,44 <sup>e)</sup>
S <sub>w,I</sub> 25°C (mmol.L <sup>-1</sup> )	1,42±0,12	/
γ <sub>w</sub> <sup>∞</sup>	39154,93±46,33 <sub>f)</sub>	/
Log K <sub>ow</sub>	/	3,58±0,76 <sup>g)</sup>

a- Méthode d'EISENLHOR (1910).

b- Méthode de CANSTANTINO et al. (1995).

c- Méthode de JOBACK et REID (1987).

d- Méthode de MACKAY et al. (1982).

e- Méthode de MEISSNER (1949).

f- Le coefficient d'activité à dilution infinie de l'isonovalal dans l'eau, γ<sub>w</sub><sup>∞</sup>, est déterminé à partir de la solubilité de l'isonovalal dans l'eau, S<sub>w,I</sub> (mol.L<sup>-1</sup>), grâce à la relation suivante :

$$\gamma_w^\infty = \frac{55,6}{S_w}$$

g- voir le tableau III.g.

**Tableau III.k.** Estimation des constantes physico-chimiques de l'isonovalal.

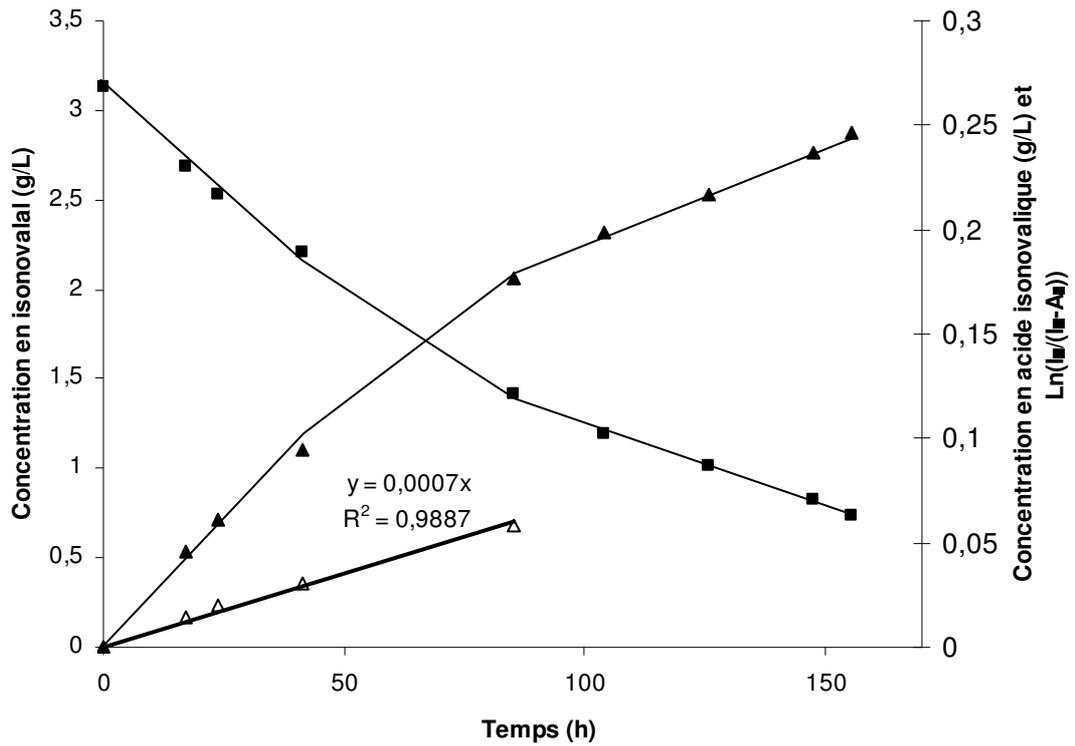
d'ébullition. La tension de surface et la pression de vapeur saturante, quant à elles, sont estimées à partir d'équations pour lesquelles les valeurs entrées ont toutes été déterminées expérimentalement ( $T_{b,i}$ ,  $R_D$  et  $\rho_l$ ). La pression de vapeur obtenue à 25°C est du même ordre de grandeur que celle précédemment estimée dans l'étude de FONTANILLE et al. (2002) (0,39 mmHg).

La solubilité dans l'eau a été déterminée à  $1,42 \pm 0,12$  mmol.L<sup>-1</sup>. Aucune des estimations obtenues avec les modèles ne correspondent de façon satisfaisante à cette valeur (**tableau III.i**). Il est à noter que cette donnée correspond à une valeur faible, la méthode analytique mise en œuvre pour sa détermination est donc importante. Il a ainsi été possible de mettre en place une technique plus performante que la chromatographie et basée sur l'absorption UV de la molécule d'intérêt.

La connaissance des constantes physico-chimiques de l'isonovalal apporte plusieurs informations sur cette molécule. La détermination de sa densité a permis de confirmer les méthodes de quantification de l'isonovalal dans la phase organique par CPG (voir le paragraphe III.2.2.2). La détermination de sa solubilité dans l'eau et de sa pression de vapeur saturante apporte également des informations sur le comportement de la molécule aux interfaces phase aqueuse / phase organique et phase liquide / phase gazeuse. Ces données sont essentielles à la compréhension des phénomènes de transfert entre la phase aqueuse contenant le biocatalyseur et la phase organique contenant le produit de la bioconversion et à la compréhension des phénomènes de transfert entre la phase organique et la phase gazeuse à l'origine des pertes par entraînement. Ce dernier point fait l'objet de la partie suivante.

#### **III.4. Etude des réactions abiotiques**

Cette partie vise à mettre en évidence les phénomènes chimiques ou physiques agissant sur les concentrations en isonovalal et en  $\alpha$ -pinène oxyde dans le solvant organique au cours du temps. L'objectif est, dans un premier temps, d'identifier précisément les produits issus de ces réactions. Dans un second temps, ces phénomènes sont quantifiés afin d'expliquer les 5 % manquant au sur les bilans carbone effectués au cours d'une bioconversion.



**Figure III.17.** Evolution de la concentration en isonovalal au cours d'une incubation en condition biphasique tampon phosphate / hexadécane (-■-) et production de l'acide isonovalique (-▲-). Tracé de la courbe  $\ln(I_0/(I_0-A_i))=f(t)$  (-Δ-). Les incubations sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL avec 25 mL d'hexadécane. La phase aqueuse est constituée de 25 mL de tampon phosphate ajusté à pH 7,5. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

Carbone N°	Déplacements chimiques par rapport au TMS (ppm)		
	Acide isonovalique <sup>a)</sup>	Acide isonovalique <sup>b)</sup>	Acide <sup>c)</sup>
1	20,6	20,5	20,6
2	154,2	154,1	154,2
3	144,1	144,6	144,3
4	34,2	34,6	34,2
5	126,6	126,9	126,8
6	107,9	107,9	107,9
7	34,6	35,2	34,6
8 et 9	21,6	21,6	21,6
10	171,6	173,7	173,0

a- Valeurs rapportées par GRIFFITHS et al. (1987a).

b- Valeurs rapportées par TUDROSZEN et al (1977).

c- Valeurs observées pour l'acide issu de la dégradation abiotique de l'isonovalal.

**Tableau III.I.** Analyses par RMN du  $^{13}\text{C}$  du produit de dégradation abiotique de l'isonovalal.

### III.4.1. Phénomènes de dégradation chimique

#### III.4.1.1. Dégradation chimique de l'isonovalal

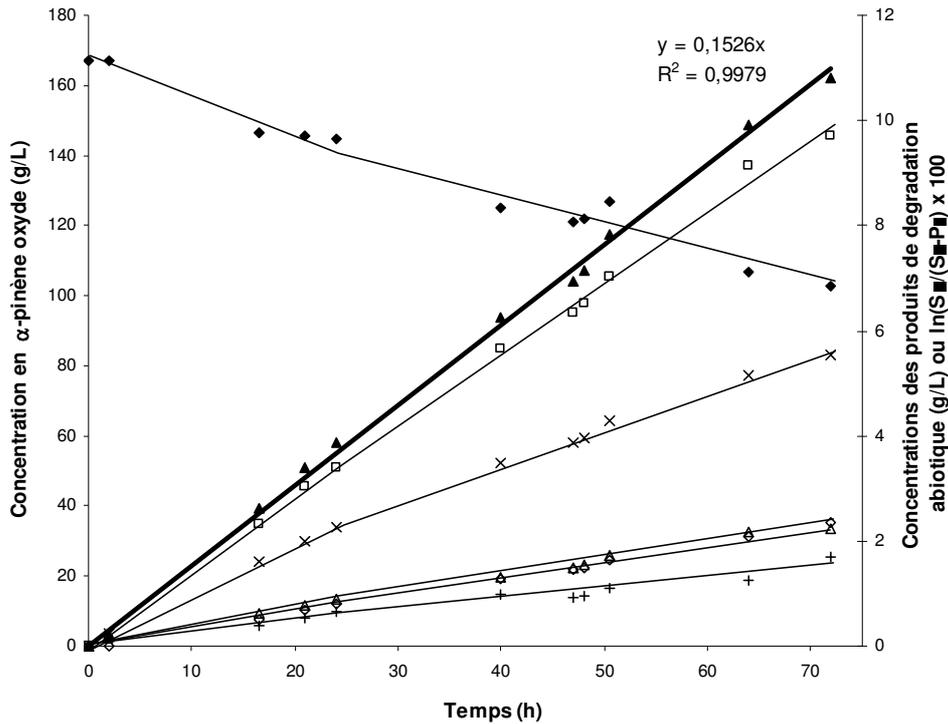
Le milieu de bioconversion retenu dans cette étude est un milieu biphasique eau / solvant organique. Les multiples avantages apportés par ce type de système sont détaillés dans le chapitre I.2.5.3.2. La stabilité de l'isonovalal purifié est suivie pendant 155 h en condition biphasique tampon phosphate / hexadécane dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL (30°C, 200 rpm). Les résultats montrent une diminution significative de la concentration en isonovalal au cours du temps (**figure III.17**). Cette diminution s'accompagne de la formation d'un produit unique possédant un temps de rétention de 9,8 min. Ce composé est identifié par spectrométrie de masse (m/z 125 (100), 107 (16,2), 135 (13,1), 111(10,8), 91 (9,2), 79 (8,9), 98 (7,8), 123 (5,8), 150 (4), 153 (3), M<sup>+</sup> 168 (0,3)) (le chromatogramme et le spectre de masse associé est présenté dans le document **annexe D**) et par spectrométrie RMN du <sup>13</sup>C (**tableau III.I**) comme étant l'isomère *cis* de l'acide 2-méthyle-5-isoproylhexa-2,5-dienoïque, également appelé acide isonovalique. La diminution de la concentration en isonovalal est donc en partie liée à une oxydation de l'aldéhyde en son acide respectif. L'analyse de ce composé par spectrométrie RMN du <sup>1</sup>H donne les pics suivants : RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 1,95 (s, 3H, H<sub>1</sub>) ; 6,13 (t, 1H, J=7,5 Hz, H<sub>3</sub>) ; 3,29 (d, 2H, J=8,0 Hz, H<sub>4</sub>) ; 4,80 (s, 1H, H<sub>6a</sub>) ; 4,69 (s, 1H, H<sub>6b</sub>) ; 2,26 (m, 1H, J=7,0 Hz, H<sub>7</sub>) ; 1,05 (d, 6H, J=6,5 Hz, H<sub>8</sub> et H<sub>9</sub>) (**annexe B**)

Le tracé de la courbe  $\ln(I_0/(I_0-A_t))=f(t)$ , avec I<sub>t</sub> et A<sub>t</sub> les concentrations respectives en isonovalal et en acide isonovalique à l'instant t (g.L<sup>-1</sup>), montre que la cinétique de dégradation abiotique de l'isonovalal en acide isonovalique est d'ordre 1 (**figure III.17**). Sa vitesse de dégradation (en g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) au cours de la bioconversion est donc la suivante :

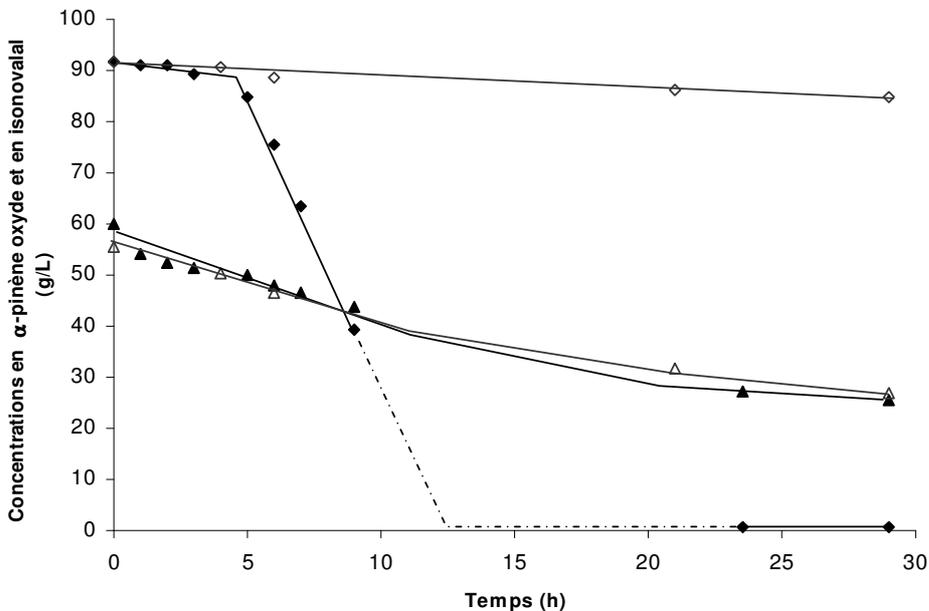
$$\frac{dI}{dt} = k \cdot I_t \quad (\text{III.11})$$

k est la constante de vitesse de la réaction d'oxydation abiotique. Celle-ci est estimée expérimentalement à  $1,01 \pm 0,45 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$  en moyennant les résultats de plusieurs tests d'incubation réalisés dans les mêmes conditions que la **figure III.17**. La perte d'isonovalal par ce phénomène, P<sub>cl</sub>, peut donc être quantifiée de la façon suivante :

$$P_{cl} = \int_t^0 k \cdot I_t \cdot dt \quad (\text{III.12})$$



**Figure III.18.** Dégradation de l' $\alpha$ -pinène oxyde (-♦-) au cours d'une incubation en condition biphasique et production de l' $\alpha$ -campholenal (-□-), du *trans*-carveol (-Δ-), du *trans*-sobrerol (-+-) ainsi que des produits non identifiés possédant des temps de rétention de 9,5 (-x-) et 11,2 (-◇-) min. la courbe d'équation  $\ln(S_0/(S_0-P_i))=f(t)$  est tracée (-▲-). Les incubations sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL (voir II.2.1). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.



**Figure III.19.** Concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde (losanges) et en isonovalal (triangles) au cours d'incubations séparées des 2 molécules (symboles vides) ou combinées (symboles pleins). Les incubations sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL à 30°C, 200 rpm (voir le paragraphe II.3.1).

### III.4.1.2. Dégradation chimique de l' $\alpha$ -pinène oxyde

La stabilité de l' $\alpha$ -pinène oxyde est suivie pendant 72 h dans les mêmes conditions que l'isonovalal (voir paragraphe précédent). Une diminution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde est également observée au cours du temps (**figure III.18**). Celle-ci s'accompagne de la production de 5 composés dont 3 sont identifiés par spectrométrie de masse comme étant l' $\alpha$ -campholenal, le *trans*-carveol et le *trans*-sobrerol. Ces derniers sont classiquement observés lors de la dégradation chimique de l' $\alpha$ -pinène oxyde en présence de catalyseurs acides (VICEVIC et al., 2004 ; WILSON et al, 1999). Deux autres composés non identifiés ont été détectés aux temps de rétention 9,5 et 11,2 min (le chromatogramme et les spectres de masse sont présentés en **annexe D**).

Le tracé de la courbe  $\ln(S_0/(S_0-P_t))=f(t)$ , avec  $S_t$  la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde et  $P_t$  la somme des produits mesurés à l'instant  $t$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ), montre que la cinétique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène oxyde est également d'ordre 1 (**figure III.18**). Sa vitesse de dégradation (en  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) au cours de la bioconversion est donc la suivante :

$$\frac{dS}{dt} = k' \cdot S_t \quad (\text{III.13})$$

La constante de vitesse  $k'$  est estimée expérimentalement à  $1,40 \pm 0,25 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ . La perte en  $\alpha$ -pinène oxyde par ce phénomène,  $P_{cs}$ , peut donc être quantifiée de la façon suivante :

$$P_{cs} = \int_t^0 k' \cdot S_t \cdot dt \quad (\text{III.14})$$

### III.4.1.3. Stabilité de l' $\alpha$ -pinène oxyde en présence d'isonovalal

L'interaction du précurseur avec le produit de bioconversion est testée en condition biphasique. Les résultats montrent que la présence d' $\alpha$ -pinène oxyde ne joue pas sur la stabilité de l'isonovalal (**figure III.19**). L'isonovalal ne possède pas non plus d'impact sur la stabilité de l' $\alpha$ -pinène oxyde, pendant les 5 premières heures de l'incubation. Cependant, une fois cette période écoulée, la vitesse de dégradation de l' $\alpha$ -pinène oxyde s'accélère brusquement, aboutissant à la consommation totale du substrat en moins de 24 h. Cette dégradation s'accompagne de la formation des mêmes produits abiotiques identifiés dans le paragraphe précédent (résultats non présentés).

Dans le cadre d'une bioconversion, il faut compter 1 h à compter de l'ajout du substrat pour que la concentration en isonovalal atteigne les  $60 \text{ g.L}^{-1}$  (**figure III.1**). L'accélération de la dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde ne peut donc avoir lieu avant la 6<sup>ème</sup> heure de

### III. Caractérisation de l'isonovalal

Constantes	Isonovalal	$\alpha$ -pinène oxyde	Hexadécane
$T_b$ (°C) à 1 atm	202,00 <sup>a)</sup>	195,34 <sup>a)</sup>	287,00
$P^\circ$ (atm) 30°C <sup>b)</sup>	$9,52 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$	$1,51 \cdot 10^{-5}$
$\gamma_H^\infty$ 30°C <sup>c)</sup>	4,34	1,02	/
M (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>d)</sup>	152,00	152,00	226,45
$\rho$ (g.L <sup>-1</sup> ) 30°C	880,00	964,00	772,00

a- Estimation expérimentale de la température d'ébullition par distillation à travers une colonne de Vigreux (voir le paragraphe III.3.2.3).

b- Pression de vapeur saturante, estimée à partir de la relation de MACKAY et al. (1982) utilisant les températures d'ébullition des composés à 1 atm (voir le paragraphe III.3.2.4) .

c- Coefficient d'activité à dilution infinie dans l'hexadécane, calculé avec le modèle Unifac.

d- Masse molaire des composés, estimées par spectrométrie de masse (Les spectres de masse de l'isonovalal et de l' $\alpha$ -pinène oxyde sont présentés dans le document annexe D).

**Tableau III.m.** Propriétés physico-chimiques du substrat, du produit de bioconversion et du solvant organique employé.

réaction, temps au bout duquel le biocatalyseur est déjà inactivé. Ce processus n'intervient donc pas au cours de la réaction de bioconversion.

### III.4.2. Caractérisation des phénomènes de perte par entraînement en fiole Erlenmeyer

Les phénomènes de dégradation chimique mis en évidence dans les paragraphes précédents n'expliquent qu'une partie minoritaire de la consommation de l'isonovalal et de l' $\alpha$ -pinène oxyde en condition abiotique (environ 10 % et 30 %, respectivement). Le reste peut être dû à des pertes du substrat et du produit de la réaction biocatalytique par entraînement dans la phase gazeuse, elles-mêmes liées à la forte volatilité de ces composés. Les propriétés physico-chimiques des molécules intéressant notre étude sont résumées dans le **tableau III.m.**

#### III.4.2.1. Etablissement du modèle

La vitesse d'entraînement d'un composé (en mol.h<sup>-1</sup>) est égale au produit de la fraction molaire de ce composé dans la phase gazeuse,  $y$ , avec le débit molaire en gaz,  $G_e$  (mol.h<sup>-1</sup>) :

$$V_L \cdot \frac{dC}{dt} = G_e \cdot y \quad (\text{III.15})$$

$V_L$  est le volume de phase liquide (en L) et  $C$  la concentration en produit dans cette même phase (en mol.L<sup>-1</sup>).

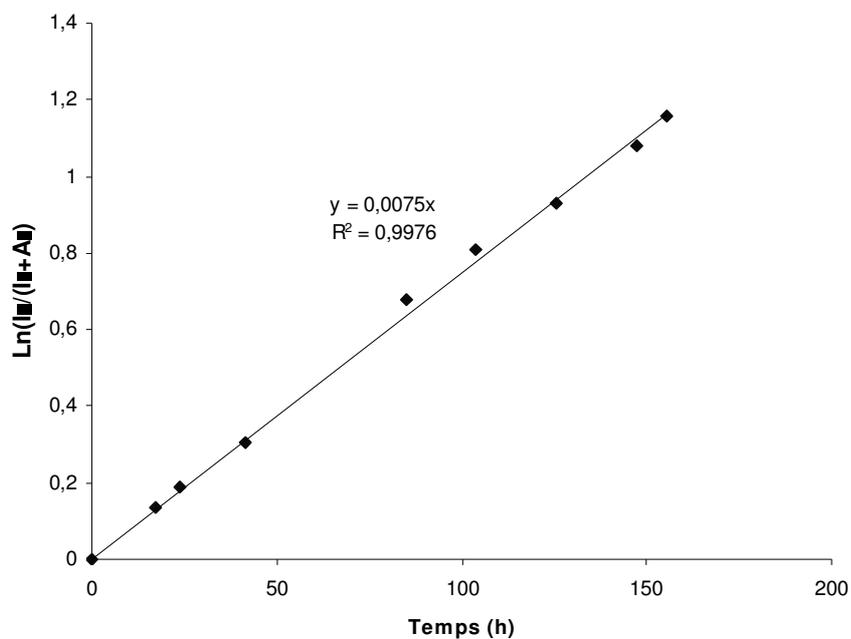
A l'équilibre thermodynamique,  $y$  dépend de la fraction molaire du composé dans une des phases liquides,  $x$ , selon la relation suivante :

$$y = \gamma^\infty \cdot x \cdot \frac{P^\circ}{P} \quad (\text{III.16})$$

où  $\gamma^\infty$  et  $x$  sont le coefficient d'activité du composé à dilution infinie et la fraction molaire, par exemple dans le solvant,  $P^\circ$  la pression de vapeur saturante du composé (atm) et  $P$  la pression du système (atm).

Dans le cadre d'un système non aéré,  $G_e$  est une valeur apparente qui dépend entre autres des phénomènes de transferts à travers le bouchon de la fiole. La série de relations suivante peut être écrite :

$$G_e \cdot y = G_e \cdot \gamma^\infty \cdot x \cdot \frac{P^\circ}{P} = G_e \cdot \gamma^\infty \cdot \frac{C}{C_s} \cdot \frac{P^\circ}{P} = V_L \cdot \frac{dC}{dt} \quad (\text{III.17})$$



**Figure III.20.** Détermination de la constante  $\alpha$  de l'isonovalal. Le phénomène de dégradation abiotique de l'isonovalal est annulé par ajout de la concentration en acide isovalique ( $A_t$ ) à la valeur de  $I_t$ . Les concentrations sont mesurées au cours d'une incubation en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de tampon phosphate et 25 mL d'une solution d'isonovalal dans de l'hexadécane ( $I_0=3,12 \text{ g.L}^{-1}$ ). Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

Avec  $C_S$  la concentration du solvant (en mol.L<sup>-1</sup>). A partir de l'intégration des deux derniers termes de III.17, il vient :

$$\ln\left(\frac{C_0}{C_t}\right) = \frac{G_e \cdot \gamma^\infty \cdot P^o}{V_L \cdot C_S \cdot P} \cdot t \quad (\text{III.18})$$

Il devient ainsi possible de déterminer  $G_e$  à partir de  $\alpha$ , la pente de la droite d'équation  $\ln(C_0/C_t) = f(t)$  :

$$G_e = \frac{\alpha \cdot V_L \cdot C_S \cdot P}{\gamma^\infty \cdot P^o} \quad (\text{III.19})$$

Les pertes par entraînement,  $P_e$ , peuvent ainsi être déterminées à partir de l'équation III.20 :

$$P_e = \int_0^t G_e \cdot y \cdot dt \quad (\text{III.20})$$

#### III.4.2.2. Perte de l'isonovalal par entraînement

Dans les conditions de bioconversion en fiole Erlenmeyer de 250 mL, la phase liquide au contact de la phase gazeuse est la phase organique, constituée de 25 mL d'hexadécane. La phase gazeuse correspond au volume total de la fiole (estimé à 300 mL) moins le volume total de liquide (50 mL). La constante  $\alpha$  est déterminée expérimentalement à  $7,65 \pm 1,90 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  (un exemple est illustré dans la **figure III.20**).  $G_e$  est calculé à partir des données du **tableau III.m** et de la relation III.19 à  $0,16 \pm 0,04 \text{ mol.h}^{-1}$  soit un débit volumique de  $0,26 \pm 0,06 \text{ vvm}$  (l'isonovalal étant considéré comme un gaz parfait, son volume molaire est de  $24,5 \text{ L.mol}^{-1}$ ).

La perte d'isonovalal par entraînement  $P_{eI}$  peut ainsi être calculée à partir de la concentration en isonovalal dans la phase organique à l'instant  $t$ ,  $I_t \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$  :

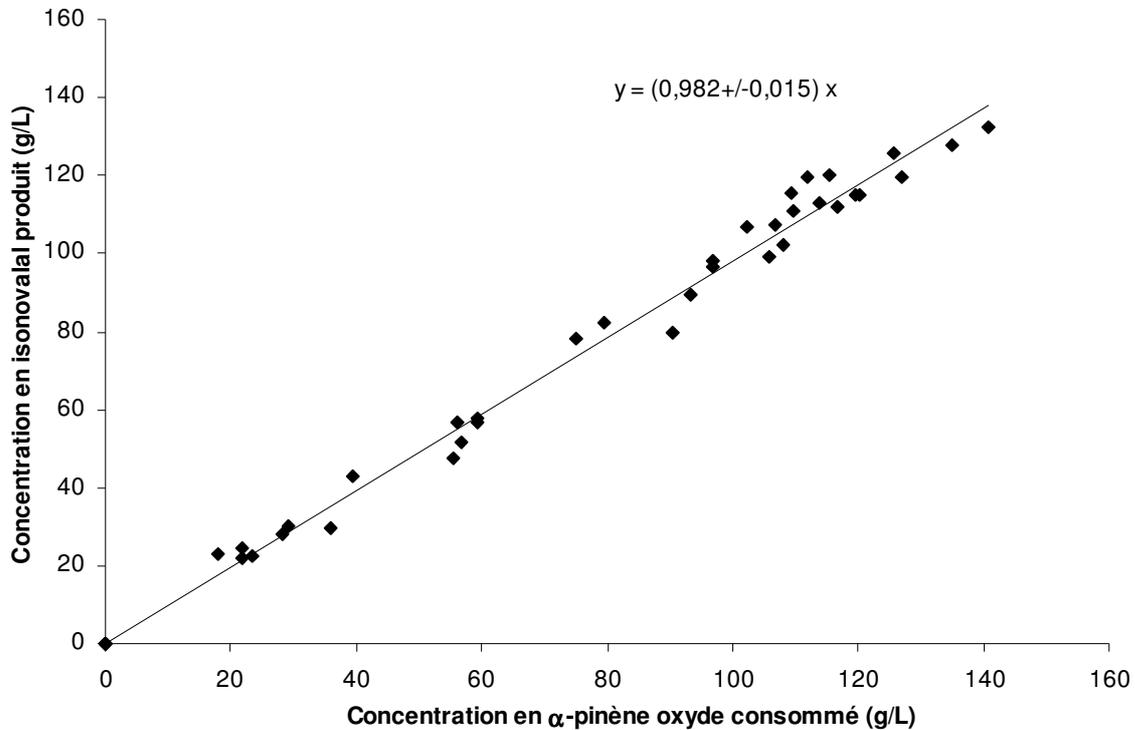
$$P_{eI} = \int_0^t 7,65 \cdot 10^{-3} \cdot I_t \cdot dt \quad (\text{III.21})$$

#### III.4.2.2. Perte de l' $\alpha$ -pinène oxyde par entraînement

De la même façon, la constante  $\alpha'$  de l' $\alpha$ -pinène oxyde est estimée expérimentalement à une valeur moyenne de  $2,27 \pm 0,38 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ .  $G_e$  est calculé à  $0,15 \pm 0,02 \text{ mol.h}^{-1}$  soit un débit volumique de  $0,25 \pm 0,04 \text{ vvm}$ . Ces dernières valeurs sont proches de celles obtenues pour l'isonovalal ( $0,16 \pm 0,04 \text{ mol.h}^{-1}$  et  $0,26 \pm 0,06 \text{ vvm}$ ), ceci conforte l'idée que les débits de pertes sont correctement estimés avec le modèle appliqué.

Constantes	Isonovalal	$\alpha$ -pinène oxyde
$k$ (h <sup>-1</sup> )	$1,01 \pm 0,45 \cdot 10^{-3}$	$1,40 \pm 0,25 \cdot 10^{-3}$
$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	$7,65 \pm 1,90 \cdot 10^{-3}$	$2,27 \pm 0,38 \cdot 10^{-3}$

**Tableau III.n.** Estimation des constantes de vitesse de dégradation abiotique ( $k$ ) et de perte par entraînement ( $\alpha$ ) du substrat et du produit de la réaction biocatalytique.



**Figure III.21.** Détermination du rendement réel de la réaction de bioconversion. Les concentrations en isovalal produit et en  $\alpha$ -pinène oxyde consommé mesurées sont corrigées de façon à annuler les phénomènes de perte par entraînement, de dégradation abiotique et de dégradation thermique. Les corrections apportées sont issues des relations III.23 et III.24 appliquées pour les valeurs du tableau III.n ainsi que du facteur correctif de dégradation thermique de l'isonovalal dans l'injecteur calculé dans le paragraphe III.2.2.2 ( $F_c=1,271$ ). Les mesures de CPG sont effectuées pendant les 5 premières heures de bioconversion réalisées par 25 mL de biomasse perméabilisée, en fiole Erlenmeyer de 250 mL. La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans 25 mL d'hexadécane ( $180 \text{ g.L}^{-1}$ ). Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

La perte d' $\alpha$ -pinène oxyde par entraînement  $P_{eS}$  peut ainsi être calculée à partir de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde dans la phase organique à l'instant  $t$ ,  $S_t$  (g.L<sup>-1</sup>):

$$P_{eS} = \int_0^t 2,27 \cdot 10^{-3} \cdot S_t \cdot dt \quad (\text{III.22})$$

### III.4.3. Conclusions

Les transformations chimiques et les pertes par entraînement de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal ayant été quantifiées, ces phénomènes peuvent être annulés par correction des concentrations du substrat et du produit de bioconversion au cours de la réaction biocatalytique selon les deux équations suivantes :

$$I_{\text{corrigé}_t} = I_{\text{mesurée}_t} + \int_0^t (\alpha + k) \cdot I_{\text{mesurée}_t} \cdot dt \quad (\text{III.23})$$

$$S_{\text{corrigé}_t} = S_{\text{mesurée}_t} + \int_0^t (\alpha' + k') \cdot S_{\text{mesurée}_t} \cdot dt \quad (\text{III.24})$$

Les résultats des estimations des constantes de vitesses de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal sont résumés dans le **tableau III.n**. Ces données permettent de calculer le rendement réel de la réaction de bioconversion à une valeur de  $98,2 \pm 1,5$  % (**figure III.21**).

De la même façon, il est possible de calculer les rendements apparents de la réaction de bioconversion par annulation des différents phénomènes abiotiques successivement observés et quantifiés au cours de cette étude (**tableau V.o**). Ces valeurs permettent ainsi de déterminer les contributions apportées par chacun de ces phénomènes sur la perte totale du rendement apparent (environ 23 %). Les résultats confirment qu'une majeure partie des pertes observées est liée aux méthodes analytiques employées (20,2 %), les phénomènes de dégradation chimique et de perte par entraînement de l'isonovalal et de l' $\alpha$ -pinène oxyde n'apportent qu'une faible contribution (2,7 %). L'application de conditions anaérobies, susceptibles d'empêcher ces derniers phénomènes, entraînerait donc une complexification importante du procédé pour un gain de production marginale. Il est donc possible de considérer que le rendement de production (proche de 95 %) est à ce stade optimisé.

Le faible pourcentage manquant à l'obtention d'un rendement de 100 % peut s'expliquer par une série de phénomènes plus difficilement quantifiables, comme la cristallisation partielle du *trans*-sobrerol (survenant après 30 h d'incubation), l'adsorption probable d'une partie des composés sur les parois de la fiole Erlenmeyer ou l'interaction du produit et du substrat de bioconversion entraînant une dégradation accélérée de l' $\alpha$ -pinène

### III. Caractérisation de l'isonovalal

Phénomène(s) abiotique(s) annulé(s)	Rendement apparent (%) <sup>a)</sup>	Contribution de perte (%) <sup>b)</sup>
Aucun	74,7±1,2	/
Dégradation thermique <sup>c)</sup>	94,9±1,5	20,2
Dégradation thermique + Dégradation chimique <sup>d)</sup>	95,5±1,5	0,6
Dégradation thermique + Perte par entraînement <sup>e)</sup>	97,6±1,5	2,1
Tous	98,2±1,5	/

a- Les rendements apparents sont calculés de la même façon que pour la figure III.21.

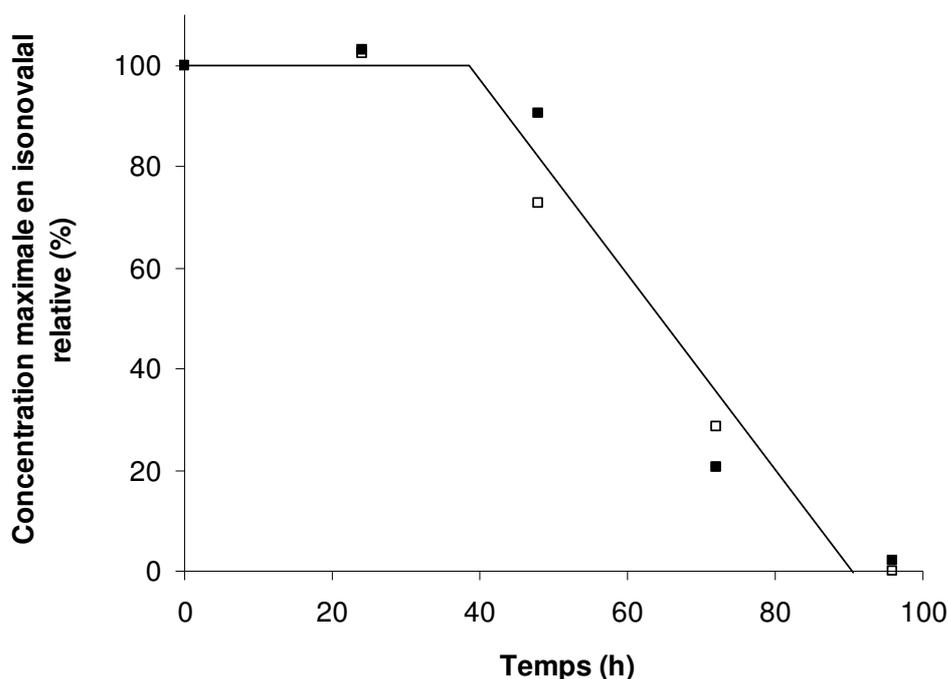
b- Cette valeur correspond à la différence entre le rendement apparent de l'étape concerné et celui de l'étape précédente.

c- Dégradation thermique de l'isonovalal dans l'injecteur de l'appareil CPG.

d- Dégradation chimique de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal dans le milieu liquide

e- Perte de l'isonovalal et de l' $\alpha$ -pinène oxyde par entraînement dans la phase gazeuse.

**Tableau V.o.** Calcul des rendements apparents de la réaction de bioconversion en fonction des phénomènes abiotiques pris en compte.



**Figure III.22.** Activité de la biomasse perméabilisée après une période d'incubation à 30°C, agité à 200 rpm en présence (-■-) et en absence (-□-) d'hexadécane. Les incubations et les tests d'activité sont réalisés dans des fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup> perméabilisée à l'éther (voir le chapitre II.1.5). L' $\alpha$ -pinène oxyde (170 g.L<sup>-1</sup>) est ajouté après les temps d'incubation représentés sur l'axe des abscisses. La concentration maximale d'isonovalal est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur de référence obtenue sans période d'incubation.

oxyde. Ce phénomène, encore mal défini, avait déjà été observé et attribué à la présence de biomasse dans le milieu réactionnel (FONTANILLE, 2002 ; LATZA, 1999), il semble que l'isonovalal participe également à ce processus.

Au final, il est peu probable qu'une réaction chimique ou métabolique n'ait pas été détectée par les analyses de CPG. Les seules réactions ayant lieu sont donc la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal (catalysée par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase présente dans la biomasse perméabilisée) et la dégradation chimique de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal. Les seuls composés produits au cours de la bioconversion, autrement dits les seuls composés susceptibles d'être responsables de l'inactivation du biocatalyseur, sont donc l'isonovalal et les produits de dégradation abiotiques de l'isonovalal et de l' $\alpha$ -pinène oxyde. Il est à présent nécessaire de tester l'effet de ces produits biotiques et abiotiques sur le biocatalyseur afin de déterminer lequel est responsable de son inactivation.

## III.5. Etude de l'effet des produits de la réaction sur l'inactivation du biocatalyseur

### III.5.1. Stabilité du biocatalyseur dans les conditions de bioconversion

Avant de tester l'effet des produits de la réaction sur les performances de la bioconversion, il est nécessaire de déterminer la stabilité au cours du temps du système enzymatique dans les conditions de réaction choisies (30°C, 200 rpm, système biphasique tampon phosphate / hexadécane, pH 7,5).

Cette stabilité est évaluée par comparaison de la concentration maximale en isonovalal obtenue dans des conditions de bioconversion standards (voir le chapitre II.3.1) avec celles obtenues après différents temps d'incubation. En effet, il a été précédemment démontré que cette concentration était directement proportionnelle à la quantité de lyase active dans la biomasse (FONTANILLE et LARROCHE, 2003).

La **figure III.22** montre que le biocatalyseur subit une perte importante d'activité à partir de 48 h d'incubation. Cette perte affiche le même profil en condition biphasique et en condition monophasique aqueuse, elle ne semble donc pas liée à la présence d'une phase organique mais plutôt aux conditions de température et/ou d'agitation (30°C, 200 rpm). La perte d'activité devient majoritaire à 72 h et quasiment totale à 96 h. Ces résultats montrent que le milieu de bioconversion choisi n'influe pas sur l'activité du biocatalyseur pendant le temps nécessaire à la réalisation de la réaction de bioconversion (5 h) et, d'une façon plus générale, pendant les 24 premières heures d'incubation.

### III. Caractérisation de l'isonovalal

Produits de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal <sup>a)</sup>	Inhibiteurs de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase <sup>b)</sup>
$\alpha$ -campholenal	$\beta$ -pinène oxyde
<i>Cis</i> - et <i>trans</i> -carveol	Limonene oxyde
<i>Trans</i> -sobrerol	pinan-3-ol
Acide isonovalique	pinan-3-one
	Carvone
	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate
	P-hydroxymercuribenzoate
	Arsenite de sodium
	Iodoacetamide
	KCN

a- Composés répertoriés au cours de cette étude.

b- Selon GRIFFITHS et al. (1987b).

**Tableau III.p.** Liste des produits de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal mis en évidence et des inhibiteurs connus de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase.

Composé	Concentration à 5 h de bioconversion (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>	Concentration initiale au cours du test d'inactivation (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>c)</sup>	Concentration relative maximale en isonovalal produit (%) <sup>d)</sup>
Référence <sup>a)</sup>	/	/	100
<i>Produits de dégradation abiotique :</i>			
$\alpha$ -campholenal	2,00	9,86	100
<i>trans</i> -carveol	0,10	1,96	100
		9,44	97
<i>cis</i> -carveol	0	20,0	95
		8,00	97
Produit de dégradation non identifié (Rt=9,5 min)	0,50	14,00	95
		4,63	100
<i>trans</i> -sobrerol	0,54	0,42	100
Produit de dégradation non identifié (Rt=11,2 min)	0,20	1,57	100
		0,55	91
acide isonovalique	0,80	0,55	91
<i>Produit biotique :</i>			
isonovalal	120,45	50,68	<b>85</b>
		69,69	<b>67</b>
		103,59	<b>64</b>

a- Bioconversion réalisée en fiole Erlenmeyer de 250 mL dans les conditions définies dans le chapitre II.3.1, uniquement en présence du substrat.

b- Concentration du composé dans la phase organique après 5 h de bioconversion dans les conditions de référence (voir a).

c- Concentration initiale des composés indiqués au cours des bioconversions réalisées dans les mêmes conditions que a).

d- Concentration maximale d'isonovalal produit, exprimée en pourcentage par rapport à la valeur de référence obtenue sans ajout de composés.

**Tableau III.q.** Influence des produits abiotiques et biotiques sur l'activité du biocatalyseur.

### III.5.2. Effet des produits de dégradation abiotique et de l'isonovalal

Aucun des produits de dégradation abiotique de l'isonovalal ou de l' $\alpha$ -pinène oxyde identifiés ne correspondent aux composés inhibiteurs de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase précédemment mis en évidence (**tableau III.p**). La stabilité du biocatalyseur est testée en présence des produits répertoriés au cours de cette étude, de façon individuelle. Les produits de dégradation de l' $\alpha$ -pinène oxyde sont issus d'un témoin abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde. Le *cis* et le *trans*-carveol provenant d'échantillons commerciaux ont également été testés. Le *cis*-carveol, bien que non détecté au cours de notre étude, fait parti des produits de dégradation de l' $\alpha$ -pinène oxyde fréquemment observés (WILSON et al., 1999). L'acide isonovalique est isolé par extraction alcaline d'un témoin de dégradation abiotique de l'isonovalal (voir II.4.1.1). Enfin, l'isonovalal est issu de la purification réalisée dans la partie III.2.

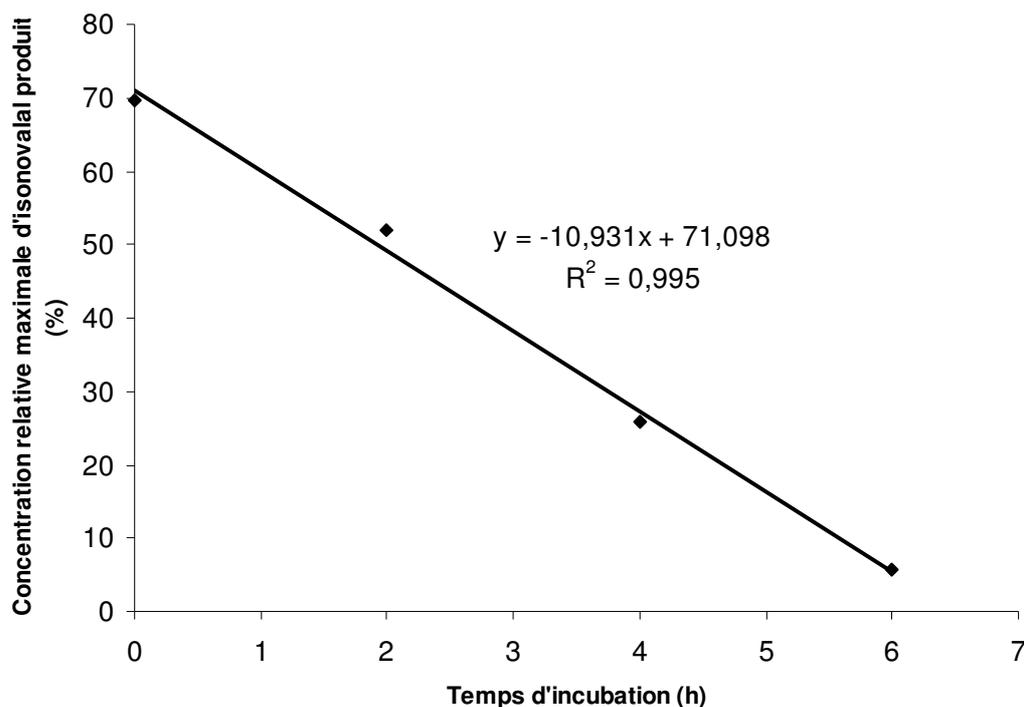
Le **tableau III.q** montre qu'aucun des produits de dégradation abiotique répertoriés n'ont d'effet sur l'activité du biocatalyseur et ce même à des concentrations bien supérieures à celles accumulées au cours des bioconversions. En fait seul le produit d'intérêt, l'isonovalal, semble avoir un effet réellement inhibiteur sur le biocatalyseur (**tableau III.q**). Néanmoins, même à des concentrations supérieures à 100 g.L<sup>-1</sup>, l'isonovalal ne provoque qu'une perte partielle instantanée d'activité.

Par contre, lorsque le biocatalyseur est laissé au contact de l'isonovalal avant le début de bioconversion, il est possible d'observer une perte d'activité proportionnellement au temps d'incubation (**figure III.23**). Après 6 h en présence d'une phase organique contenant de l'isonovalal pour une concentration de 65 g.L<sup>-1</sup>, le biocatalyseur perd 94 % de son activité. Ces résultats montrent que l'isonovalal est capable de provoquer l'intégralité de l'inactivation du biocatalyseur pourvu que le temps de contact soit suffisant. L'inactivation de l'enzyme par l'isonovalal n'est donc pas un phénomène instantané.

### III.6. Conclusion générale

Cette étude a permis d'établir un protocole de purification de l'isonovalal à une échelle semblable au procédé de production actuel. Ce protocole conduit à l'obtention d'une molécule pure à plus de 95 % ce qui a permis ainsi d'envisager l'étude de ses caractéristiques physico-chimiques.

Ce chapitre a également permis d'identifier les phénomènes responsables des pertes de rendement préalablement observés (Cf III.1). Les résultats montrent que ceux-ci sont



**Figure III.23.** Inactivation du biocatalyseur au cours d'incubations en présence d'isonovalal. Les incubations et les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse perméabilisée et 25 mL d'une solution d'isonovalal dans l'hexadécane ( $65 \text{ g.L}^{-1}$ ). L'activité de la biomasse est alors mesurée par ajout du substrat ( $170 \text{ g.L}^{-1}$ ) aux temps indiqués sur l'axe des abscisses. La concentration relative maximale d'isonovalal produit est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur de référence obtenue sans incubation et en absence d'isonovalal. L'activité à  $t=0$  correspond à la valeur observée dès la mise en contact de l'enzyme avec l'isonovalal (tableau III.q). Température :  $30^\circ\text{C}$ . Agitation : 200 rpm.

entièrement liés à la dégradation du produit et du substrat de bioconversion par des mécanismes d'origine uniquement physique (perte par entraînement et dégradation thermique si les conditions de chromatographie ne sont pas adaptées) et chimique (dégradation abiotique). La prise en compte quantitative de l'ensemble de ces phénomènes permet d'établir des bilans matière corrects qui démontrent sans ambiguïté que la seule réaction enzymatique catalysée par la biomasse perméabilisée est la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal.

Les résultats ont montré que l'inactivation du biocatalyseur était, au moins en partie, liée à l'isonovalal (cf paragraphe III.1). Parmi les produits de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de l'isonovalal détectés, aucun n'ont montré d'effet sur l'activité du biocatalyseur. Les résultats montrent par contre un effet inactivateur réel du produit de bioconversion sur le biocatalyseur. La caractérisation du mécanisme d'inactivation nécessite à présent une étude plus spécifique de l'effet de l'isonovalal sur l'activité de l'enzyme impliquée dans la réaction de bioconversion, l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. Cet aspect fait l'objet du chapitre suivant.



**IV. Purification et caractérisation  
de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de  
*Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491**

---



## IV.1. Introduction

L'optimisation de la production de l'isonovalal passe par une augmentation du rendement, de la vitesse réactionnelle et de la concentration maximale en isonovalal obtenue au cours du procédé de bioconversion (par. I.3.1). Le chapitre précédent a permis de déterminer précisément le rendement de production obtenu dans les conditions utilisées (95 %). L'objectif de ce chapitre est de déterminer si l'utilisation sous forme purifiée de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *P.rhodesiae* CIP 107491 peut permettre d'améliorer la vitesse de bioconversion grâce notamment à la suppression des limitations par les transferts de masse au niveau de la membrane cellulaire (par. I.3.2.2). La purification de l'enzyme permettra également d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le phénomène d'inactivation observé et éventuellement d'agir sur son turn-over. Des informations sur la structure de l'enzyme et sur son comportement en présence des constituants du milieu réactionnel seront notamment apportées.

## IV.2. Extraction de la lyase

Au cours de travaux préliminaires (FONTANILLE, 2002), il a été démontré que l'un des traitements de perméabilisation de la biomasse les plus efficaces pour la production d'isonovalal était successivement un cycle de congélation / décongélation puis un traitement au diethyl éther (par. II.1.5). Ce traitement permet de diminuer les limitations par le transfert au niveau de la membrane cellulaire sans avoir à extraire et à séparer l'enzyme de la biomasse. Les solvants organiques qui sont couramment employés pour ce type d'application en laboratoire comportent néanmoins des inconvénients à l'échelle industrielle. C'est pourquoi des procédés de perméabilisation substitutifs de type mécanique vont être comparés avec le procédé classiquement utilisé.

Dans un second temps, d'autres méthodes de perméabilisation membranaire sont testées sur la biomasse préalablement congelée. L'objectif d'une telle opération est cette fois de produire un extrait cellulaire brut le plus riche possible en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase, débarrassé des constituants de la biomasse et ne pas contenir de solvants afin de faciliter la purification ultérieure de l'enzyme.

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

Biomasse perméabilisée <sup>a)</sup>	C <sub>I0</sub> maximale (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>	Protéines (mg) <sup>c)</sup>
1 cycle de congélation / décongélation et éther (6 % v/v)	<b>46,51±4,7</b>	8,2±0,2
1 cycle de congélation / décongélation et Presse de French	<b>45,83±2,4</b>	8,3±0,5
1 cycle de congélation / décongélation et Homogénéisation	15,3±0,5	<b>5,1±0,1</b>

a- Les perméabilisats sont issus d'une biomasse cultivée en réacteur de 7 L avec l' $\alpha$ -pinène (6 g) et le glucose (18,2 g) comme sources de carbone selon le protocole détaillé dans le paragraphe II.1.2.4. L'*inoculum* utilisé est une préculture en fiole Erlenmeyer de 500 mL sur lactate de sodium (0,25 g). La biomasse est ensuite récupérée et concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup> dans un tampon phosphate avant d'être stockée à -20°C (par. II.1.4). La biomasse est décongelée 30 min à 30°C, 200 rpm puis perméabilisée selon les protocoles détaillées dans le paragraphe II.1.5.

b- Concentration maximale d'isonovalal produit (en g.L<sup>-1</sup> de phase organique) mesurée par CPG (par. II.3.3.1) à partir de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par 2 mL de biomasse perméabilisée en fiole Erlenmeyer de 50 mL. La phase aqueuse est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde (95 g.L<sup>-1</sup> de phase organique) dans 5 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

c- La quantité en protéines totales dans le perméabilisat est déterminée par la méthode de Bradford et par la méthode de Lowry modifiée selon Peterson (par. II.1.3.3).

**Tableau IV.a.** Efficacité des procédés de perméabilisation de la biomasse.

#### IV.2.1. Perméabilisation des membranes cellulaires par traitements mécaniques.

Dans un premier temps, la biomasse est classiquement produite par culture en réacteur selon le procédé décrit dans le chapitre II (par. II.1.2.4). Différents traitements de perméabilisation mécanique (presse de French et homogénéisateur haute pression) sont appliqués à la biomasse préalablement congelée et décongelée (par. II.1.5). Les efficacités des différents traitements sont alors comparées en prenant comme critère la concentration maximale d'isonovalal produit dans la phase organique,  $C_{IO}$  maximale ( $\text{g.L}^{-1}$ ), dans des conditions de bioconversion identiques. Le système réactionnel est composé de 2 mL de phase aqueuse et d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde ( $95 \text{ g.L}^{-1}$  de phase organique) dans 5 mL d'hexadécane. La bioconversion se déroule dans une fiole Erlenmeyer de 50 mL dans un bain marie thermostaté à  $30^\circ\text{C}$  et agité à 200 rpm.

La presse de French est un appareil reconnu pour sa capacité à éclater la majeure partie des microorganismes par l'application d'une forte pression (2,7 kbars). Elle est, de ce fait, communément utilisée comme méthode d'extraction de référence des contenus intracellulaires (CHELICO et KHACHATOURIANS, 2003). Le perméabilisat obtenu avec cet outil permet de produire une concentration maximale en isonovalal très proche de celle obtenue après utilisation de l'éther (**tableau IV.a**). Il semble donc que ces deux procédés permettent de rendre disponible dans la suspension l'intégralité de la lyase contenue dans la biomasse.

Des tests sont également réalisés avec un homogénéisateur industriel à double étage (APV 2000, Invensys APV, Evreux, France) réglés respectivement à 0,2 et 2,0 kbars. Les résultats obtenus affichent une concentration maximale 3 fois plus faible que pour les autres procédés (**tableau IV.a**). Ce phénomène peut en partie s'expliquer par une perte de masse protéique ou par une perméabilisation incomplète de la biomasse (5,1 g de protéines extraites contre 8,2 g pour les autres procédés). La perte d'activité restante peut être liée à une dénaturation de l'enzyme suite à l'élévation constatée de la température de l'appareil.

Dans l'optique d'une mise en place du procédé à l'échelle industrielle, l'utilisation d'un homogénéisateur haute pression ne semble pas être le procédé le plus efficace pour perméabiliser la biomasse. Des études complémentaires sont nécessaires si l'on souhaite atteindre cet objectif.

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

Extraits cellulaires bruts <sup>a)</sup>	C <sub>10</sub> maximale (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>	Protéines (mg) <sup>c)</sup>	C <sub>10</sub> maximale relative (%) <sup>d)</sup>
1 cycle de congélation / décongélation et éther (6 % v/v)	41,05±4,5	2,66±0,2	88,2
2 cycles de congélation / décongélation	32,09±1,5	3,49±0,1	69,0
3 cycles de congélation / décongélation	<b>44,44±3,1</b>	3,93±0,4	<b>95,4</b>
1 cycle de congélation / décongélation et sonication	<b>47,91±11,5</b>	6,62±1,0	<b>103,0</b>

a- Les extraits sont issus d'une biomasse produite dans les mêmes conditions que le tableau IV.a. Après perméabilisation, les perméabilisats sont débarrassés de leurs débris cellulaires par centrifugation et filtration (par. II.1.5).

b- Concentration maximale d'isonovalal produit mesurée dans les mêmes conditions que le tableau IV.a.

c- La quantité en protéines dans les extraits est dosée de la même façon que pour le tableau IV.a.

d- Concentration maximale d'isonovalal produit moyenne comparée à celle du perméabilisa obtenu par un cycle de congélation / décongélation et traitement à l'éther (voir le tableau IV.a).

**Tableau IV.b.** Efficacité des procédés d'extraction de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase.

### IV.2.2. Libération de la lyase dans le milieu extracellulaire

Le fait que l'intégralité de la lyase soit rendue disponible pour la réaction enzymatique ne garantit pas pour autant une libération complète de l'enzyme hors des microorganismes. Certaines protéines peuvent, par exemple, rester dans la membrane plasmique. Les perméabilisats sont centrifugés et les surnageants obtenus sont filtrés plusieurs fois afin de se débarrasser des cellules perméabilisées et des débris membranaires (par. II.1.5).

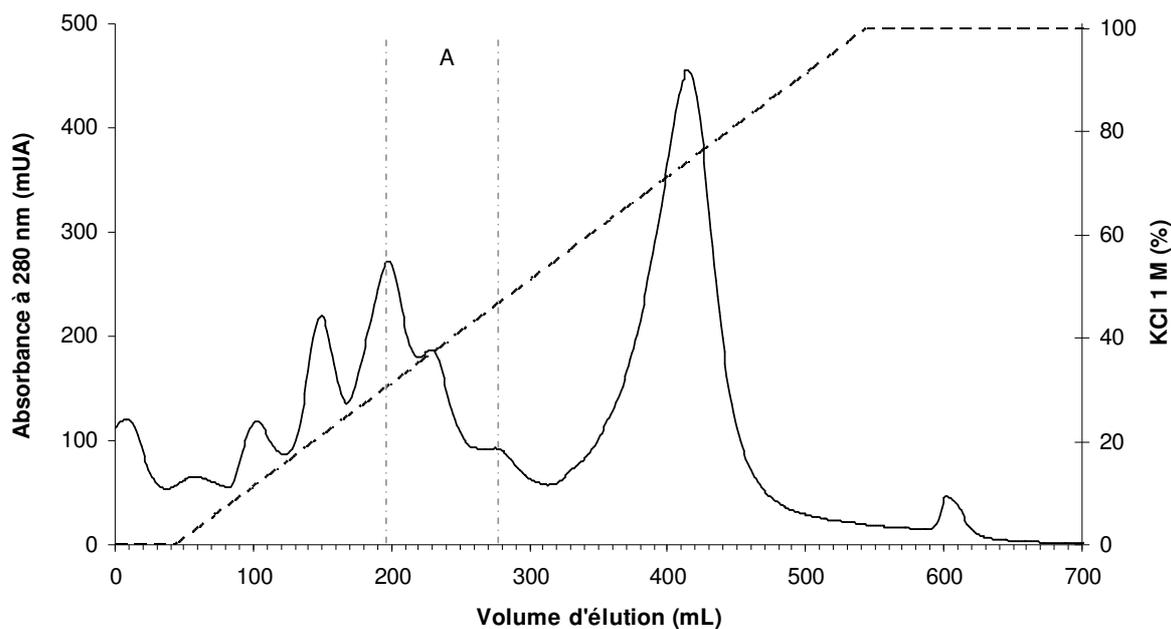
L'activité des extraits cellulaires est mesurée de la même manière que précédemment. L'extrait issu de la perméabilisation de la biomasse par l'éther possède 88 % de l'activité du perméabilisat entier (**tableau IV.b**). Ce phénomène peut être lié à une libération incomplète de la lyase hors du microorganisme ou à une perte partielle d'activité en l'absence des constituants de la membrane cellulaire. D'autres méthodes de perméabilisation sont testées. L'application de 3 cycles de congélation / décongélations et l'utilisation d'une aiguille à soniquer permet d'obtenir des extraits possédant respectivement 95 % et 103 % de l'activité maximale précédemment obtenue (**tableau IV.b**). Ce dernier procédé permet donc d'extraire l'intégralité de la lyase présente dans la biomasse sans que celle-ci ne subisse de perte d'activité.

### IV.2.3. Conclusions

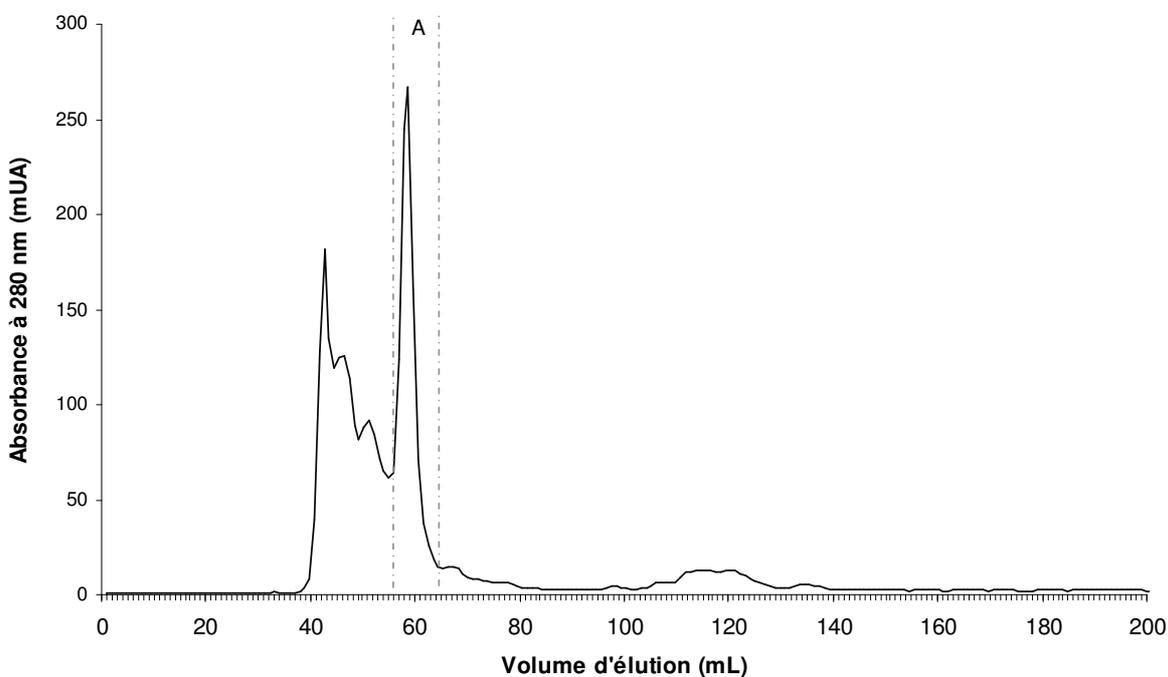
Les résultats apportés dans cette partie montrent que l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est une enzyme soluble dont le fonctionnement est totalement indépendant des constituants des membranes cellulaires. Ces observations laissent présager une amélioration des vitesses de bioconversion suite à la purification de l'enzyme. Cette opération doit permettre d'annuler toute limitation de la bioconversion par les transferts membranaires sans que cela ne joue sur l'activité de l'enzyme.

Bien que très efficaces, les procédés de perméabilisation à l'éther et par la presse de French comportent néanmoins des inconvénients pratiques d'un point de vue appliqué ; le diethyl éther est un solvant organique polluant et la presse de French ne s'adapte à la perméabilisation de volumes importants de biomasse que pour la production de métabolites à haute valeur ajoutée.

A l'échelle du laboratoire, les résultats présentés permettent de visualiser les possibilités des divers traitements de perméabilisation et de choisir celui qui sera le plus approprié pour la purification de l'enzyme (**tableau IV.b**). L'utilisation d'éther est un procédé efficace mais l'utilisation de solvants organiques n'est pas compatible avec les gels utilisés



**Figure IV.1.** Profil d'élution de la colonne DEAE Cephacel. Absorbance à 280 nm (-), dilution de l'éluant (KCl 1 mol.L<sup>-1</sup>) (- -). Débit : 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. A : fractions pour lesquelles une activité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est détectée par zymographie (par. II.2.6).



**Figure IV.2.** Profil d'élution de la colonne Superdex 75. Éluant : KCl (0,5 mol.L<sup>-1</sup>). Débit : 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. A : fractions pour lesquelles une activité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est détectée par zymographie (par. II.2.6).

pour la purification de l'enzyme (DEAE Cephacel et Superdex 75). Le procédé de perméabilisation par 3 cycles de congélation / décongélation est finalement adopté car très efficace et plus spécifique à l'extraction de la lyase (par rapport à l'extraction des autres protéines) que la sonication.

### IV.3. Purification et caractérisation structurale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

#### IV.3.1. Purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

La purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est réalisée par chromatographie liquide utilisant successivement une colonne comprenant un gel échangeur d'anion (DEAE Cephacel) et une colonne comprenant un gel d'exclusion moléculaire (Superdex 75), conformément au protocole utilisé par GRIFFITHS et al. (1987b). L'extrait cellulaire choisi pour démarrer la purification est issu de la perméabilisation de la biomasse par 3 cycles de congélation / décongélation. Les raisons invoquant le choix de cette méthode de perméabilisation sont indiquées dans le paragraphe précédent. L'élution des protéines est suivie automatiquement par spectrophotométrie UV et la présence de lyase dans les différentes fractions recueillies est décelée par zymographie. Les techniques de zymographie permettent de révéler une activité enzymatique particulière « *in situ* ». Dans notre cas, les extraits protéiques sont séparés par électrophorèse en condition non dénaturante, la bande protéique correspondant à la lyase est ensuite révélée sélectivement par immersion des gels dans une émulsion contenant de l' $\alpha$ -pinène oxyde dans du tampon phosphate. Une bande blanche, liée à la formation d'isonovalal insoluble, apparaît au niveau de l'enzyme après 30 min sous agitation (75 rpm).

Le profil d'élution de la première colonne montre une série de pics d'absorption à 280 nm (**figure IV.1**). La présence de lyase est testée par zymographie dans l'ensemble des fractions recueillies. Seuls les fractions correspondant à des volumes d'élution situés entre 200 et 280 mL (0,35 à 0,5 mol.L<sup>-1</sup> de KCl) affichent une activité. Ces dernières sont regroupées et concentrées par centrifugation sur membrane d'ultrafiltration (par. II.2.3) puis le retentat est déposé sur la seconde colonne. Le profil d'élution obtenu montre un pic d'absorption majoritaire affichant une activité pour un volume d'élution compris entre 55 et 65 mL (**figure IV.2**). La pureté des fractions actives est vérifiée par électrophorèse sur gel

IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

Etapes	Volume (mL)	Protéines totales (mg) <sup>a)</sup>	C <sub>10</sub> maximale (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>	m <sub>1</sub> maximale totale (mg) <sup>c)</sup>	m <sub>1</sub> maximale totale spécifique (mg.mg <sup>-1</sup> ) <sup>d)</sup>	Taux de recouvrement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	35,0	75,4	48,3	4230,5	56,1	100,0	1,0
Colonne 1 (DEAE Cephacel)	33,8	22,6	26,8	2268,6	100,2	53,6	1,8
Concentration (Ultra 15-YM)	3,0	10,8	233,3	1750,0	161,4	41,4	2,9
Colonne 2 (Superdex 75) <sup>e)</sup>	4,8	0,9	59,2	710,3	781,3	<b>16,8</b>	<b>13,9</b>

a- La quantité de protéines contenue dans les extraits est dosée par la méthode de Bradford (par. II.1.3.3.2).

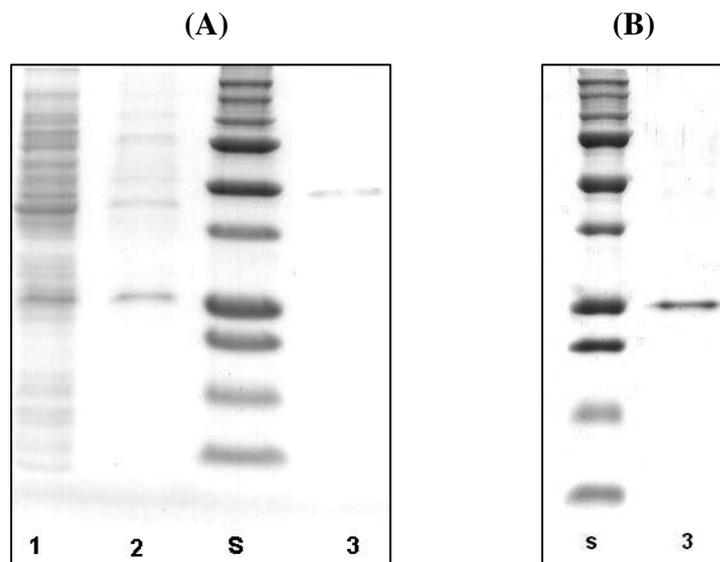
b- Concentration maximale en isonovalal produit pour 2 mL d'extrait au cours de la bioconversion en fiole Erlenmeyer de 50 mL. La phase aqueuse est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde (95 g.L<sup>-1</sup> de phase organique) dans 5 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

c- Extrapolation de la quantité maximale d'isonovalal produit par l'ensemble de l'extrait.

d- Ces valeurs sont exprimées en mg d'isonovalal produit par mg de protéines présentes dans l'extrait.

e- L'activité de la lyase purifiée est mesurée dans les mêmes conditions que (a) excepté la présence de SAB (sérumalbumine bovine) dans la phase aqueuse (3 g.L<sup>-1</sup>).

**Tableau IV.c.** Tableau de purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491.



**Figure IV.3.** Séparation par électrophorèse des extraits issus des étapes de purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en condition non dénaturante (A) et en condition dénaturante (B) (par. II.2.4 et II.2.5, respectivement) : 1- Extrait brut, 2- Extrait Cephacel, 3-  $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée, S- Echelle standard de protéines (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20,15 et 10 kDa).

de polyacrylamide en condition non dénaturante, révélée au bleu de Coomassie. Les fractions affichant une bande unique sont sélectionnées pour la suite de l'étude.

La quantité d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase dans les différents extraits est estimée par des bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde en fiole Erlenmeyer de 50 mL, la concentration maximale d'isonovalal produit est considérée comme proportionnelle à la quantité de lyase présente (par. III.5.1). Le déroulement d'une purification représentative est illustré dans le **tableau IV.c**. Le protocole utilisé permet d'obtenir un facteur de purification de 13,9 fois pour un taux de recouvrement proche de 17 %.

L'étape de concentration des protéines par centrifugation sur membrane d'ultrafiltration permet de se débarrasser des protéines de faible poids moléculaire (< 10 KDa) et de l'éluant. Bien que contribuant sensiblement à la purification (**tableau IV.c**), elle est avant tout utilisée pour réduire le volume de l'extrait déposé sur la colonne Superdex 75 (au maximum 2 mL). Cette étape entraîne une perte significative de lyase (environ 10 %). Ce phénomène, anormal étant donné le poids moléculaire attendu de la lyase (de 40000 à 50000 Da selon GRIFFITHS et al., 1987b) et l'absence d'activité dans le filtrat récupéré (résultats non présentés), peut s'expliquer par une adsorption de l'enzyme sur la membrane d'ultrafiltration lié à l'hydrophobicité de l'enzyme (MILLIPORE, 2005).

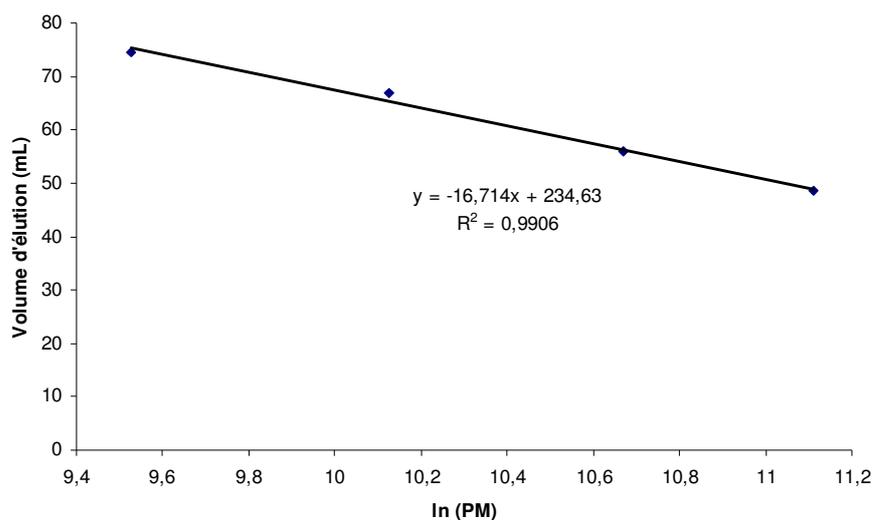
Les différents extraits sont déposés sur gel de polyacrylamide et séparés par électrophorèse en condition non dénaturante (**figure IV.3**). Le puit correspondant à la lyase purifiée affiche une seule bande dont la masse moléculaire est proche de 45000 Da par comparaison des distances de migration relatives (Rf) avec un standard de protéines. On remarque que la bande correspondant à la lyase est clairement visible dans l'extrait cellulaire brut, ce qui indique qu'il possède une forte teneur en cette enzyme.

### IV.3.2. Estimation de la masse moléculaire

La masse moléculaire de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est estimée par calibration de la colonne gel-filtration (Superdex 75) à l'aide de protéines standards (**figure IV.4**). Le volume moyen d'élution de la lyase est déterminé à 56 mL, ce qui correspond à une masse moléculaire proche de 44000 Da.

La lyase est également analysée par électrophorèse en condition dénaturante afin de recueillir des informations sur sa structure quaternaire. Le gel obtenu affiche une bande unique (**figure IV.3**), ce qui confirme une bonne pureté de l'échantillon final. Ce résultat montre également que l'enzyme est formée de 2 sous unités de même masse moléculaire,

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase



**Figure IV.4.** Calibration de la colonne gel-filtration (Superdex 75). Protéines standard utilisées : Albumine (67000 Da), Ovalbumine (43000 Da), Chymotrypsinogène A (25000 Da) et Ribonucléase A (13700 Da).

Souche	Type d'organisme	Protéine concernée	E-value <sup>a)</sup>
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Champignon	Hypothetical protein SNOG_02104	464
<i>Campylobacter coli</i>	Bactérie	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase Cj1253	570
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Plante	Putative polyprotein	590
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Plante	Retrotransposon protein	590
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Plante	OSJNBa0036B17.9	590
<i>Paramecium tetraurelia strain d4-2</i>	Paramécie	Hypothetical protein GSPATT00011190001	595
<i>Bacillus phage BCJA1c</i>	Phage	DEAD box family helicase	635
<i>Debaryomyces hansenii CBS767</i>	Bactérie	Hypothetical protein DEHA0C14916g	652
<i>Kordia algicida OT-1</i>	Bactérie	Phosphoesterase family protein	709
<i>Vibrio harveyi ATCC BAA-1116</i>	Bactérie	Hypothetical protein VIBHAR_01871	763

a- Le résultat est considéré comme significatif si la valeur est inférieure à  $10^{-5}$ .

**Tableau IV.d.** Résultat du BLAST sur *Genbank* pour la séquence N-terminale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491.

selon une configuration de type homodimère  $\alpha$ - $\alpha$ . La masse moléculaire de la lyase étant de 44000 Da, celle des sous-unités est estimée à 22000 Da. Cette observation est en adéquation avec la masse moléculaire de la bande obtenue par électrophorèse en condition dénaturante, située entre 20000 et 25000 Da (**figure IV.3**).

### IV.3.3. Séquençage partiel de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

La détermination de la séquence totale en acide aminés de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est susceptible d'apporter des éléments sur les relations structure / fonction ou structure / mécanisme d'inactivation de la lyase. Cette séquence peut également être utilisée pour la synthèse d'une sonde nucléotidique spécifique permettant de localiser précisément le gène codant pour l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase dans le génome de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Une telle approche apporterait des informations sur les régions régulatrices de l'expression de l'enzyme (promoteurs). Plus encore, elle permettrait de faciliter le clonage du gène d'intérêt dans un hôte hétérologue (par exemple *Escherichia coli*), conduisant à une surexpression de cette enzyme.

Le séquençage complet d'une protéine étant un travail fastidieux et coûteux, les paragraphes suivant visent à séquencer partiellement la lyase purifiée précédemment et tentent de retrouver la séquence complète de la protéine *via* l'outil bioinformatique.

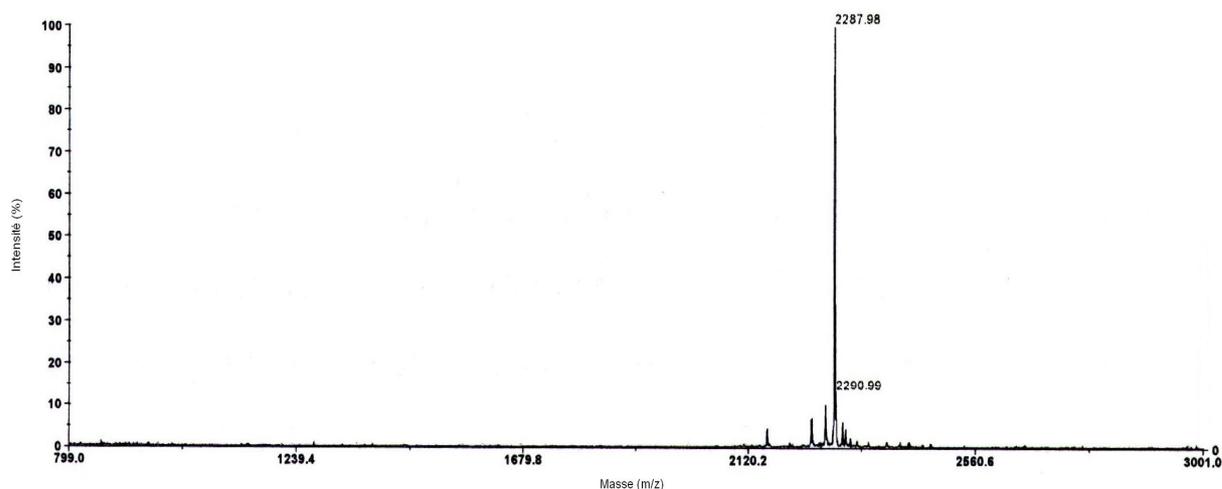
#### IV.3.3.1. Séquençage des acides aminés N-terminaux de la lyase

Un acide aminé ayant une masse moléculaire moyen de 110 Da, il est possible, à partir de la masse moléculaire de l'enzyme (44000 Da), d'estimer le nombre en acides aminés présents dans la lyase à environ 400 (soient environ 200 par sous-unité).

Les 10 acides aminés N-terminaux de l'enzyme ont été séquencés par une société indépendante (Enosphere Biotechnologies, France) grâce à la technique de dégradation d'Edman. L'analyse est précédée d'une électrophorèse préparative en condition dénaturante au cours de laquelle une seule bande de 22000 Da a été mise en évidence. Le séquençage de cette bande n'a donné qu'une seule séquence possible, ce qui confirme définitivement la pureté de l'échantillon. La séquence en acides aminés du côté N-terminal d'une sous unité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est la suivante : **SQTEN KKGFK**.

La banque de données *Genbank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)) et la banque de données spécifique du genre *Pseudomonas*, *Pseudomonas genome* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), sont basées sur l'analyse d'homologies entre séquences. Ces banques fournissent un

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase



**Figure IV.5.** Spectre Maldi-Tof d'une fraction obtenue suite à la séparation par CLHP des peptides issus de la digestion trypsique de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. La colonne utilisée est de type Interchim UP5WTF-25QK, l'élution se fait avec un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup> avec une solution d'acide trifluoroacétique (0,1 % v/v) dans l'eau (A) et une solution d'acide trifluoroacétique (0,007 % v/v) et d'acétonitrile (70 % v/v) dans l'eau (B). Le programme d'élution est le suivant : 10 min avec A, 90 min avec un mélange de A et B (40/60 v/v), 105 min avec B et 115 min de A.

Souche	Type d'organisme	Protéine concernée	E-value <sup>a)</sup>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Bactérie	Iguanylate phosphodiesterase	2854
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie	Predicted diguanlyate cyclase	2854
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie	Predicted diguanlyate cyclase	2854
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactérie	Sucrose-6-phosphate hydrolase	2854
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Bactérie	Twin-arginine translocation pathway signal	2854

a- Le résultat est considéré comme significatif si la valeur est inférieure à 10<sup>-5</sup>.

**Tableau IV.e.** Résultat du BLAST sur *Genbank* pour la séquence interne de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491.

indicateur, le e-value, qui permet de déterminer si un résultat est significatif ou non. La e-value correspond à la probabilité de « piocher » aléatoirement dans la banque une séquence similaire à celle recherchée ; plus cette valeur est élevée, moins la présence de similitude entre les protéines des deux organismes est probable. En pratique, cette valeur doit être inférieure à  $10^{-5}$  pour que le résultat proposé soit significatif. Les résultats obtenus à l'aide du BLAST p de *Genbank* affichent des e-value trop élevées pour pouvoir établir une correspondance entre la séquence testée et une séquence des banques de données (**Tableau IV.d**). De plus, aucun des organismes trouvés n'est du genre *Pseudomonas*. En parallèle, l'interrogation de la banque de données spécifiques *Pseudomonas genome* n'a également pas permis de déterminer d'homologies avec les séquences répertoriées (résultats non présentés).

#### IV.3.3.2. Analyse de la lyase par spectrométrie de masse Maldi-Tof.

L'enzyme purifiée est coupée par digestion enzymatique (action de la trypsine) puis analysée par spectrométrie de masse de type Maldi-Tof (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-Of-Flight). Le spectre obtenu (présenté dans le document **annexe L**) est analysé par les logiciels Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) et DeepView (<http://www.unb.br/cbsp/paginiciais/profound.htm>). Ces algorithmes comparent des masses peptidiques obtenues expérimentalement avec celles calculées théoriquement à partir des séquences protéiques issues des principales banques de données protéiques (Swissprot et NCBI). La recherche à partir des données Maldi-Tof n'a là encore permis de retrouver d'homologies avec les spectres contenus dans les banques de données.

#### IV.3.3.3. Séquençage partiel d'un peptide de la lyase

Les différents fragments issus de la digestion tryptique de la lyase sont séparés par CLHP préparative en phase inverse. Le fragment correspondant à une masse de 2290 m/z est efficacement isolé (**Figure IV.5**) et un séquençage de ses 5 acides aminés N-terminaux est réalisé de la même façon que précédemment. La séquence obtenue est la suivante : **WTQEE**.

Cette seconde séquence est analysée par *Genbank*. Comme précédemment, les résultats obtenus présentent des e-value trop importantes pour qu'il existe une homologie entre *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107941 et les organismes trouvés (**tableau IV.e**).

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

---

<b>Souche bactérienne</b>	<b><i>Nocardia</i> P18.3</b>	<b><i>Pseudomonas putida</i> PX1 NCIMB10684</b>	<b><i>Pseudomonas rhodesiae</i> CIP 107491</b>
Masse molaire (Da)	50000	42000	44000
Sous-unités (Da)	17000 - 22000	21000 - 21000	22000-22000
Référence bibliographique	GRIFFITHS et al. (1987b)	TRUDGILL (1994)	Cette étude

**Tableau IV.f.** Caractéristiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de différentes souches bactériennes.

### IV.3.4. Conclusions - Discussions

Cette partie a permis de purifier l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, des informations sur la structure de l'enzyme ont ainsi pu être recueillies. La masse moléculaire et la configuration de la protéine sont proches mais différentes des lyases de *Nocardia* P18.3 et de *Pseudomonas putida* PX1 NCIMB10684 précédemment mises en évidence (**tableau IV.f**). Le séquençage partiel de l'enzyme n'a pas permis de recouper les informations contenues actuellement dans les banques de données. Bien que les séquences N-terminales des protéines puissent parfois subir des modifications au cours de l'évolution, les séquences internes sont généralement bien conservées entre les organismes. Ce travail montre donc sans équivoque que l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 n'a fait l'objet d'aucune étude de caractérisation ni de séquençage à ce jour. L'étude de cette protéine, encore méconnue, comporte donc un intérêt fondamental.

Dans cette optique, la détermination de deux séquences (l'une présente du côté N-terminale et l'autre dans la région interne de la protéine) permet l'élaboration d'amorces nucléotidiques qui laisse envisager une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'une partie du gène codant pour l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. Cette opération ouvrirait la voie à une série de travaux dont le clonage du gène d'intérêt dans un organisme hôte hétérologue et/ou à la localisation précise de ce dernier dans le génome de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491.

En terme d'optimisation du procédé de production de l'isonovalal, l'ajout d'une étape de purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase nécessite une quantité de matériel et de temps supplémentaire (avec les moyens actuels, 4 jours sont nécessaires pour la purification de 2 mg d'enzyme) et entraîne une perte importante du biocatalyseur (le taux de recouvrement obtenu n'est que de 17 %). L'utilisation de l'enzyme pure plutôt que de la biomasse perméabilisée doit donc se justifier par un gain important de productivité (au moins de 73 %). L'étude de la stabilité et des performances du biocatalyseur purifié est présentée dans les parties suivantes.

## IV.4. Stabilité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en condition biphasique

### IV.4.1. Stabilité de l'enzyme purifiée

L' $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée est incubée dans les conditions de bioconversion, en absence du substrat et en présence ou non d'une phase organique. Les incubations se font à

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

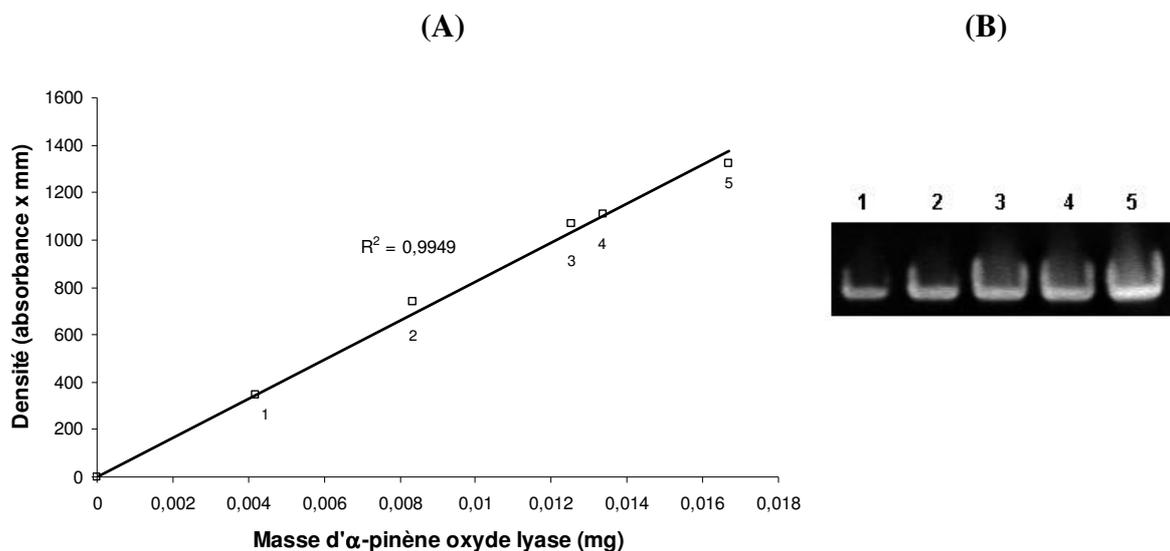
Mode d'emploi de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase	Condition	Temps d'incubation <sup>a)</sup>		
		0 h	12 h	24 h
$\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée	Monophasique aqueux	100	100	100
	Biphasique	100	0	0
Biomasse perméabilisée <sup>b)</sup>	Monophasique aqueux	100	100	100
	Biphasique	100	100	100
Extrait cellulaire brut <sup>c)</sup>	Monophasique aqueux	100	100	94
	Biphasique	100	100	100

a- Les échantillons sont incubés pendant la période de temps indiquée en fiole Erlenmeyer de 50 mL (par. II.3.1), en absence du précurseur et en présence ou non d'une phase organique (hexadécane). La température est réglée à 30°C, l'agitation est de 200 rpm. Une fois la période d'incubation écoulée, l'activité est mesurée par ajout du substrat (95 g.L<sup>-1</sup> de phase organique) et exprimée en concentration relative maximale d'isonovalal produit (en % par rapport à l'activité obtenue sans incubation).

b- Biomasse perméabilisée par traitement à l'éther (par. II.1.5).

c- Extrait cellulaire brut obtenu par perméabilisation de la biomasse à l'éther (par. II.1.5).

**Tableau IV.g.** Activité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase (concentration relative maximale en isonovalal produit) selon son niveau de purification et après incubation dans les conditions de bioconversion (en présence ou non d'une phase organique).



**Figure IV.6.** Exemple de courbe de calibration obtenue par zymographie (A) et photo du gel associé (B). Puits 1 à 5 : zymogramme obtenue avec différentes quantités d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée. Les densités sont mesurées par le logiciel Quantity One selon le protocole détaillé dans le chapitre II (par. II.2.7).

volume réduit, en fiole Erlenmeyer de 50 mL, étant donné la faible quantité disponible d'enzyme purifiée. L'activité de l'enzyme est ensuite déterminée par ajout du substrat et quantification de la concentration maximale d'isonovalal produit par analyses CPG.

Les résultats montrent que la température, l'agitation ainsi que le milieu aqueux choisi (tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5) n'ont aucun effet sur l'activité de la lyase pendant au moins 24 h d'incubation (**tableau IV.g**), alors que la présence d'une phase organique dans le milieu réactionnel entraîne une perte totale de l'activité après 12 h d'incubation. Ces observations sont contraires aux résultats précédemment obtenus au cours de tests de stabilité de la biomasse perméabilisée en condition biphasique (par. III.5.1). En effet, les observations concluaient à une absence d'inactivation du biocatalyseur au contact de l'hexadécane pendant au moins 24 h. Le comportement de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase au contact d'une interface eau / solvant organique semble donc différer selon que l'enzyme est sous forme purifiée ou en présence des constituants de la biomasse (**tableau IV.g**).

La suite de l'étude consiste à comparer les performances de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase selon son niveau de purification. Ce travail nécessite, dans un premier temps, la mise au point d'une méthode de quantification de la lyase contenue dans différents perméabilisats et extraits cellulaires bruts.

#### IV.4.2. Quantification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par zymographie

La technique de zymographie, précédemment utilisée pour détecter les fractions contenant la lyase au cours de la purification de l'enzyme (par. IV.3), est ici utilisée pour déterminer la quantité d'enzyme présente dans les différents perméabilisats et extraits cellulaires. L'intensité des bandes blanches, correspondant à la lyase, est mesurée par densitométrie (par. II.2.7). Une gamme de calibration, effectuée avec l'enzyme purifiée, montre que cette intensité est proportionnelle à la quantité d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase présente dans l'échantillon dosé (**figure IV.6**). Cette technique permet de mesurer l'activité des extraits tout en garantissant l'absence de phénomènes d'inactivation interfaciale étant donné que le système ne contient pas d'interface liquide / liquide.

La concentration en lyase est dosée dans 3 échantillons provenant de la même biomasse concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup>, obtenue par une culture en réacteur utilisant l' $\alpha$ -pinène et le glucose comme sources de carbone (par. II.1.2.4). Le premier échantillon est un perméabilisat obtenu par traitement de la biomasse à l'éther, après que celle-ci ait subi un cycle de congélation / décongélation. Le deuxième échantillon est un extrait filtré de ce

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

Echantillon <sup>a)</sup>	$m_I$ maximale (mg) <sup>b)</sup>	Masse de lyase dosée dans l'extrait (mg) <sup>c)</sup>	$m_I$ maximale spécifique (mg.mg <sup>-1</sup> )
Biomasse perméabilisée <sup>d)</sup>	27,3	$3,5.10^{-2}$	780,0
Extrait cellulaire brut (éther) <sup>e)</sup>	26,1	$3,5.10^{-2}$	745,7
Extrait cellulaire brut (congélation) <sup>f)</sup>	29,0	$3,6.10^{-2}$	805,5
$\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée	26,3	$10,8.10^{-2}$	<b>243,5</b>

a- Tous les échantillons sont issues de la même biomasse cultivée en réacteur avec l' $\alpha$ -pinène (8,5 mL) et le glucose (18,2 g) comme sources de carbone selon le protocole détaillé dans le paragraphe II.1.2.4. L'*inoculum* utilisé est une préculture en fiole Erlenmeyer sur lactate de sodium (0,25 g). La biomasse est ensuite concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup> (par. II.1.4).

b- Quantité maximale d'isonovalal produit au cours d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde (95 g.L<sup>-1</sup> de phase organique) par 0,25 mL d'extrait dans qsp. 2 mL de tampon phosphate, réalisé en fiole Erlenmeyer de 50 mL (par. II.3.1).

c- Cette masse est dosée par zymographie selon la méthode décrite dans le paragraphe II.2.7.

d- Biomasse perméabilisée à l'éther (6 % v/v) (par. II.1.5).

e- Extrait cellulaire filtré obtenu par perméabilisation de la biomasse par un cycle de congélation / décongélation et traitement à l'éther (6 % v/v) (par. II.1.5).

f- Extrait cellulaire filtré obtenu par perméabilisation de la biomasse par 3 cycles de congélation / décongélation (par. II.1.5).

**Tableau IV.h.** Activité spécifique de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée et en présence des constituants de la biomasse.

perméabilisat. Le troisième échantillon est un extrait filtré obtenu par perméabilisation de la biomasse par 3 cycles de congélation / décongélation (par. II.1.5).

Les concentrations en lyase sont estimées à 0,138 g.L<sup>-1</sup> dans le perméabilisat non filtré, 0,139 g.L<sup>-1</sup> dans l'extrait filtré issu de la perméabilisation de la biomasse à l'éther et 0,144 g.L<sup>-1</sup> dans l'extrait filtré issu de la perméabilisation de la biomasse par des cycles de congélation / décongélation. Les résultats obtenus montrent que les différents échantillons possèdent une quantité en lyase relativement proche, conformément aux résultats obtenus par mesures de l'activité lors de bioconversions en condition biphasique (par. IV.2).

Il est possible de calculer la teneur en lyase dans la biomasse produite grâce aux valeurs obtenues par la méthode de dosage zymographique. Celle-ci est estimée 0,14 g.L<sup>-1</sup> de lyase (moyenne des 3 valeurs précédemment mesurées) pour une biomasse concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup>, soit 0,020 g de lyase par g de biomasse.

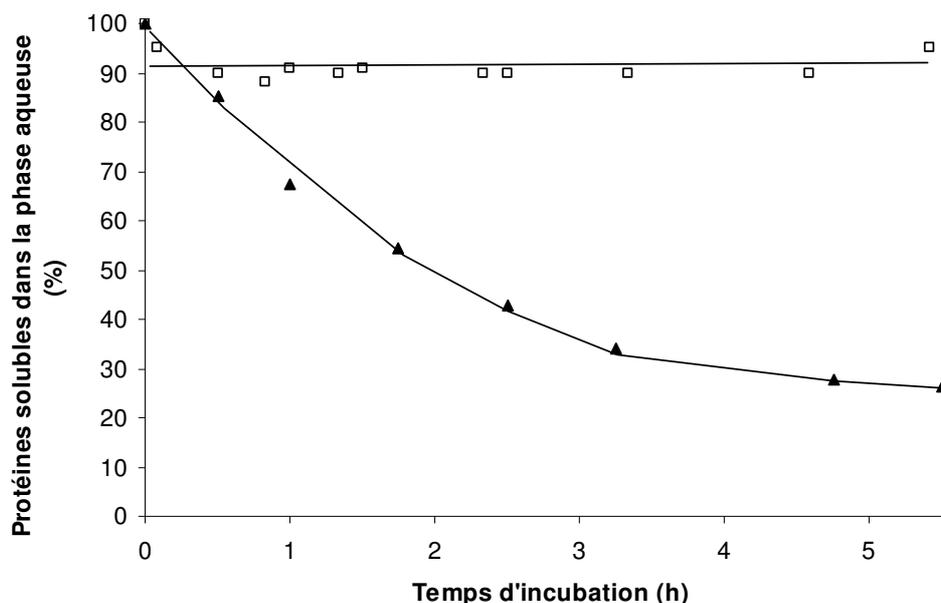
#### IV.4.3. Activité de la lyase et niveau de purification

L'estimation précédente de la quantité de lyase présente dans le perméabilisat et les extraits permet de mesurer leur quantité spécifique maximale d'isonovalal produit (en mg d'isonovalal produit par mg de lyase présente dans le milieu réactionnel) et de comparer les performances obtenues avec celles de l'enzyme purifiée.

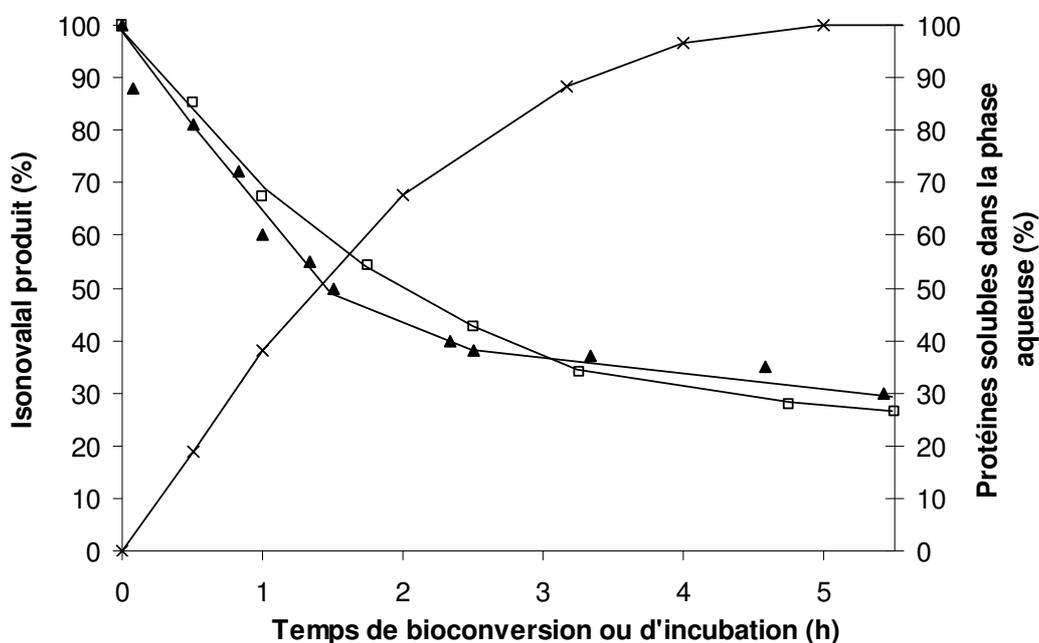
Les résultats montrent des performances 3 fois supérieures en présence des constituants de la biomasse (**tableau IV.h**). Ce phénomène peut être lié à une erreur d'estimation des concentrations en lyase dans les extraits ou à un phénomène d'inactivation supplémentaire, s'exerçant spécifiquement au niveau de l'enzyme purifiée.

#### IV.4.4. Inactivation interfaciale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

Un dosage de la concentration en protéine dans la phase aqueuse, réalisé au cours de l'incubation de la lyase purifiée dans les conditions de bioconversion, montre une diminution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase soluble en présence d'hexadécane. Cette diminution atteint son maximale après 5 h d'incubation (**figure IV.7**). Ce phénomène est accompagné de l'accumulation d'un précipité blanc à l'interface eau / solvant organique qui devient bleu en présence de réactif de Bradford, confirmant sa nature protéique.



**Figure IV.7.** Evolution de la concentration en lyase soluble au cours de l'incubation, en présence (-▲-) ou en absence (-□-) d'hexadécane. Les incubations sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL contenant une solution de lyase purifiée dans qsp. 2 mL de tampon phosphate. La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde (95 g.L<sup>-1</sup>) dans 5 mL d'hexadécane. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.



**Figure IV.8.** Evolution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase soluble (-□-) et de la concentration en isonovalal produit (-x-) au cours d'une bioconversion en condition biphasique. Evolution de la concentration en lyase soluble en cours d'une incubation en condition biphasique et en absence de substrat (-▲-). L'incubation et la bioconversion sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL de la même façon que pour la figure IV.7.

Des phénomènes identiques sont observés au cours de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par de la lyase purifiée ; le dosage protéique montre une diminution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase soluble similaire à celle observée en absence de substrat et en corrélation avec la diminution de l'activité de l'enzyme au cours de la bioconversion (**figure IV.8**).

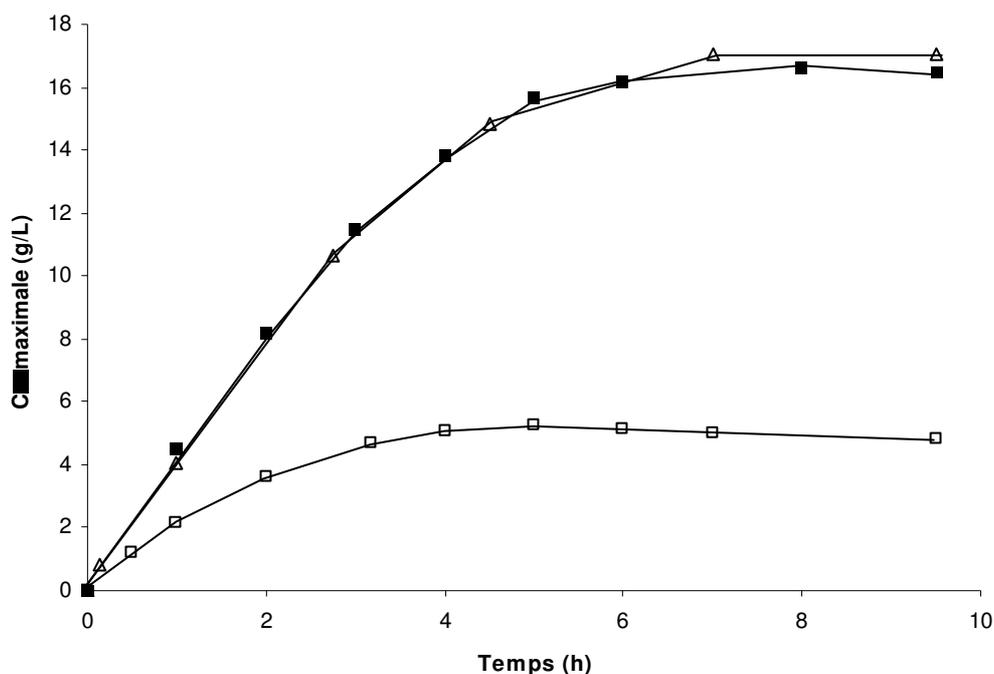
Ces résultats montrent clairement que l'inactivation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase purifiée est liée à son contact direct avec l'interface eau / solvant organique. BALDASCINI et JANSSEN (2005) ont récemment mis en évidence un mécanisme d'inactivation interfaciale en plusieurs étapes, similaires à celles observées au cours de notre étude : adsorption de l'enzyme à l'interface, réarrangement structurelle de la protéine, précipitation et inactivation de l'enzyme (ces étapes sont décrites dans le paragraphe I.4.4.2.4).

#### IV.4.5. Effet protecteur des constituants de la biomasse

Aucune inactivation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase maintenue pendant 24 h en présence d'hexadécane n'est observée lorsque l'enzyme est contenue au sein d'un perméabilisant ou d'un extrait cellulaire (**tableau IV.g**). La biomasse semble donc contenir des constituants protecteurs contre l'inactivation interfaciale de la lyase. Ces derniers sont nécessairement des composés solubles, différents des constituants de la membrane cellulaire, puisque les filtrats conservent la capacité à protéger l'enzyme.

Une bioconversion réalisée avec de l'enzyme purifiée, additionnée d'une forte concentration en sérumalbumine bovine dans la phase aqueuse (SAB / lyase 50:1), permet d'obtenir des cinétiques de bioconversion identiques à celles d'un extrait cellulaire pour une même quantité de lyase dans le milieu réactionnel (**figure IV.9**). Ce résultat montre que la biomasse possède effectivement des constituants protecteurs, manifestement de nature protéique, contre l'inactivation interfaciale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase au contact de l'interface eau / hexadécane.

Un phénomène similaire a été observé au cours de l'étude de l'inactivation de l'époxyde hydrolase d'*Agrobacterium radiobacter* AD1 au contact d'une interface eau / octane. De la même façon, il a été montré que l'ajout de SAB dans un milieu réactionnel biphasique agissait comme des « protéines sacrificielles », empêchant ainsi l'adsorption de l'enzyme d'intérêt à l'interface par un phénomène compétitif (BALDASCINI et JANSSEN, 2005).



**Figure IV.9.** Isonovalal produit au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde par 0,11 mg d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase contenue au sein d'un extrait cellulaire (- $\Delta$ -) ou sous forme purifiée, en absence (- $\square$ -) et en présence de SAB (- $\blacksquare$ -) ( $3 \text{ g.L}^{-1}$  de phase aqueuse). L'extrait cellulaire est issu de la perméabilisation de biomasse concentrée par 3 cycles de congélation / décongélation (II.1.5). Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL (II.3.1), la concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde est de  $95 \text{ g.L}^{-1}$ .

#### IV.4.6. Conclusions

Ce travail a permis de mettre en évidence un phénomène d'inactivation de la lyase au contact d'une interface eau / hexadécane. Cette inactivation est présente uniquement lorsque l'enzyme est utilisée sous forme purifiée. En effet, l'ajout de SAB dans les perméabilisats ou dans les extraits cellulaires bruts ne change pas les performances du procédé (résultats non présentés). Le phénomène d'inactivation irréversible de la lyase observé au cours de la bioconversion par de la biomasse perméabilisée n'est donc pas liée à la présence d'hexadécane dans le milieu réactionnel.

En terme de productivité, l'utilisation de l'enzyme purifiée ne permet pas d'améliorer les concentrations maximales d'isonovalal obtenues. A l'inverse, le fait d'éliminer les constituants de la biomasse du milieu réactionnel rend l'enzyme vulnérable à des phénomènes d'inactivation à l'interface eau / hexadécane et contribue à diminuer son turn-over.

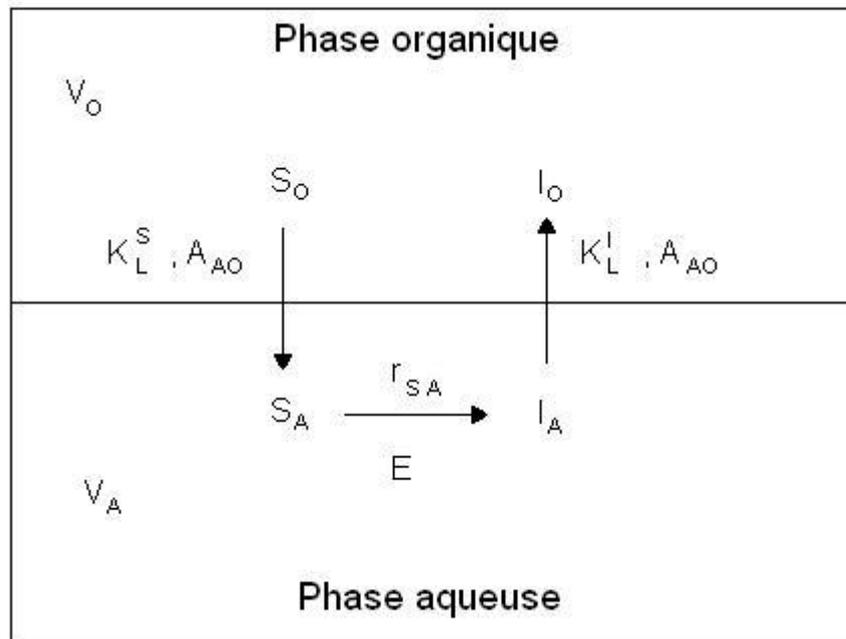
#### IV.5. Caractérisation cinétique de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

La vitesse de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est dirigée par 3 paramètres : les transferts de masses du produit et du substrat à travers la membrane plasmique (inexistants lorsque l'enzyme est utilisée sous forme purifiée), les transferts de masse de ces composés au niveau de l'interface eau / solvant organique (dépendent des caractéristiques du milieu réactionnel) et les caractéristiques cinétiques intrinsèques de la lyase (déterminées par l'estimation des constantes cinétiques  $K_S$  et  $r_{Smax}$ ). Les paragraphes suivant traitent successivement de ces deux derniers aspects.

##### IV.5.1. Vitesses initiales et limitations par les transferts à l'interface

###### IV.5.1.1. Considérations préliminaires

Jusqu'à présent, « l'activité » de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase était dosée *via* la mesure de la concentration maximale en isonovalal produit dans la phase organique,  $C_{IO}$  maximale (en  $g.L^{-1}$ ). Cette valeur ne correspond pas à la définition stricte d'une activité enzymatique qui possède la dimension d'une vitesse. Afin de doser l'activité de la lyase et d'évaluer ses performances cinétiques, la suite de l'étude utilise la vitesse de consommation de l' $\alpha$ -pinène oxyde dans la phase aqueuse,  $r_{SA}$  ( $g.L^{-1}.h^{-1}$ ), estimée à partir de la vitesse d'accumulation de l'isonovalal dans la phase organique,  $r_{IO}$  ( $g.L^{-1}.h^{-1}$ ).



**Figure IV.10.** Schéma de la composition et des transferts entre phases au cours d'une bioconversion en condition biphasique liquide / liquide de l' $\alpha$ -pinène oxyde (S) en isonovalal (I) par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase (E).

Etant donné que les mesures s'effectuent dans la phase organique et que le biocatalyseur est présent dans la phase aqueuse, il est nécessaire de prendre en compte les transferts de masse à l'interface eau / solvant organique (**figure IV.10**). Ces phénomènes sont mis en évidence par l'établissement des bilans de matière de l' $\alpha$ -pinène oxyde sur la phase aqueuse :

$$\frac{d(C_{SA})}{dt} = K_L^S \cdot A_{AO} \cdot (C_{SA}^* - C_{SA}) - V_A \cdot r_{SA} \quad (IV.1)$$

Avec  $K_L^S$  le coefficient de transfert de l' $\alpha$ -pinène oxyde,  $C_{SA}^*$ , sa concentration à saturation par la phase organique dans la phase aqueuse et  $C_{SA}$ , la concentration réelle de ce composé dans la phase aqueuse ( $\text{g.L}^{-1}$ ).  $A_{AO}$  représente la surface d'échange entre les deux phases liquides et  $V_A$  le volume de phase aqueuse (L). Si l'on considère que l'on peut faire l'hypothèse du régime quasi-permanent sur la phase aqueuse, le terme d'accumulation devient nul. L'équation IV.1 se simplifie pour :

$$V_A \cdot r_{SA} = K_L^S \cdot A_{AO} \cdot (C_{SA}^* - C_{SA}) \quad (IV.2)$$

Dans la mesure où l' $\alpha$ -pinène oxyde est très peu soluble dans l'eau, on peut considérer que  $C_{SA}$  est négligeable. Les vitesses initiales de bioconversion mesurées correspondent donc à des vitesses apparentes égales à la vitesse de transfert à l'interface selon l'équation suivante :

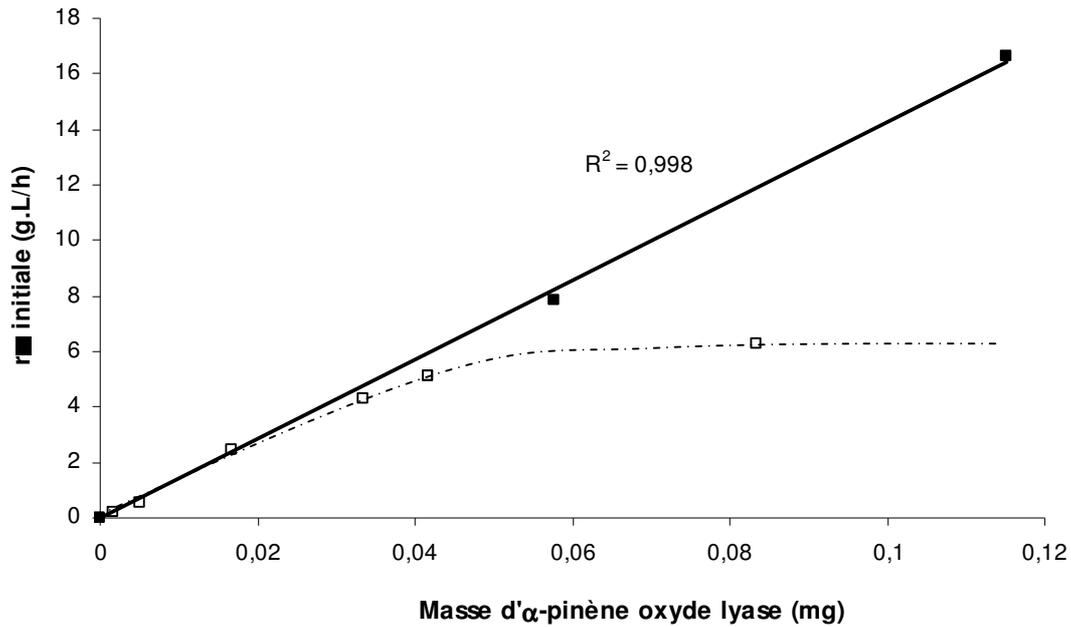
$$V_A \cdot r_{SA} = K_L^S \cdot A_{AO} \cdot C_{SA}^* \quad (IV.3)$$

Afin que les vitesses initiales apparentes mesurées soient le plus proche possible des valeurs réelles, il faut que la vitesse de transfert du substrat à l'interface puisse au moins égaler la vitesse maximale de consommation du substrat dans la phase aqueuse, ce qui est généralement possible en jouant sur la surface d'échange,  $A_{AO}$ .

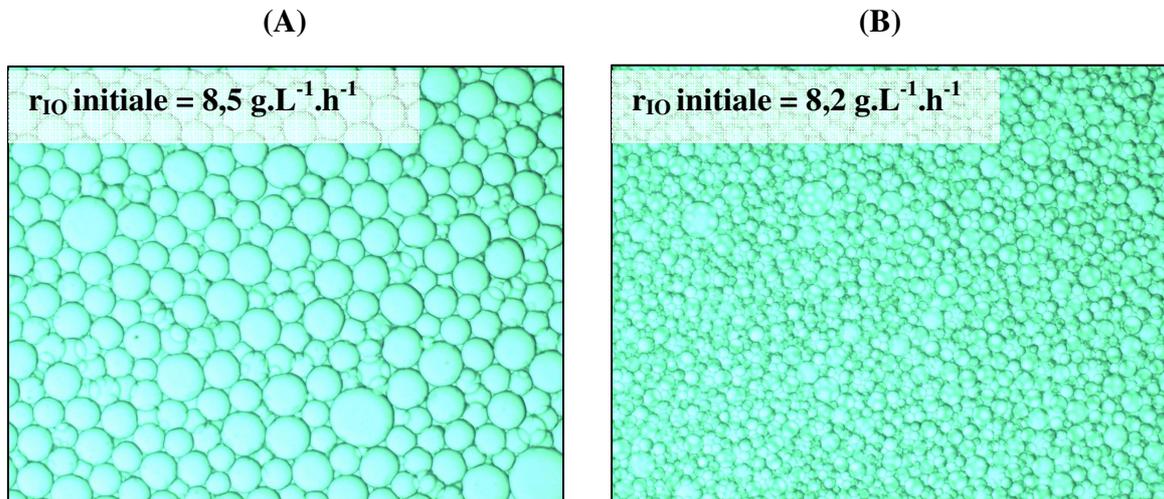
Si le transfert est non limitant pour le passage du substrat dans la phase aqueuse, il peut être considéré comme non limitant pour le passage du produit dans la phase organique. De plus, toujours dans l'hypothèse d'un régime quasi-permanent, l'accumulation de l'isonovalal dans la phase aqueuse peut être considérée comme nulle, la relation entre  $r_{IO}$  et  $r_{SA}$  devient :

$$r_{IO} = \frac{V_A}{V_O} \cdot r_{SA} \cdot Y_{I/S} \quad (IV.4)$$

$V_O$  représente le volume de phase organique (L) et  $Y_{I/S}$  est le rendement massique apparent de production de l'isonovalal en fonction de la consommation de l' $\alpha$ -pinène oxyde ; ce dernier a été déterminé à 0,95 dans le chapitre III (par. III.2.2).



**Figure IV.11.** Evolution de la vitesse initiale de production de l'isonovalal en fonction de la quantité de lyase présente dans le milieu réactionnel. Les bioconversions se déroulent en fiole Erlenmeyer de 50 mL en absence (- □ -) ou en présence (- ■ -) de Triton X100 (10 % v/v). La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans 5 mL d'hexadécane (95 g.L<sup>-1</sup>). La phase aqueuse est constituée d'une quantité donnée de lyase dans 2 mL de tampon phosphate contenant de la SAB (3 g.L<sup>-1</sup>). Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.



**Figure IV.12.** Photographie de l'émulsion eau / hexadécane (x1000) et vitesse initiale de production de l'isonovalal mesurées après 30 min de bioconversion en présence de Triton X100 5,7 % v/v (A) et 11,4 % v/v (B). Les bioconversions se déroulent en fiole Erlenmeyer de 50 mL en présence de 0,06 mg de lyase purifiée, dans les conditions de la figure IV.11.

#### IV.5.1.2. Correction des limitations par les transferts à l'interface

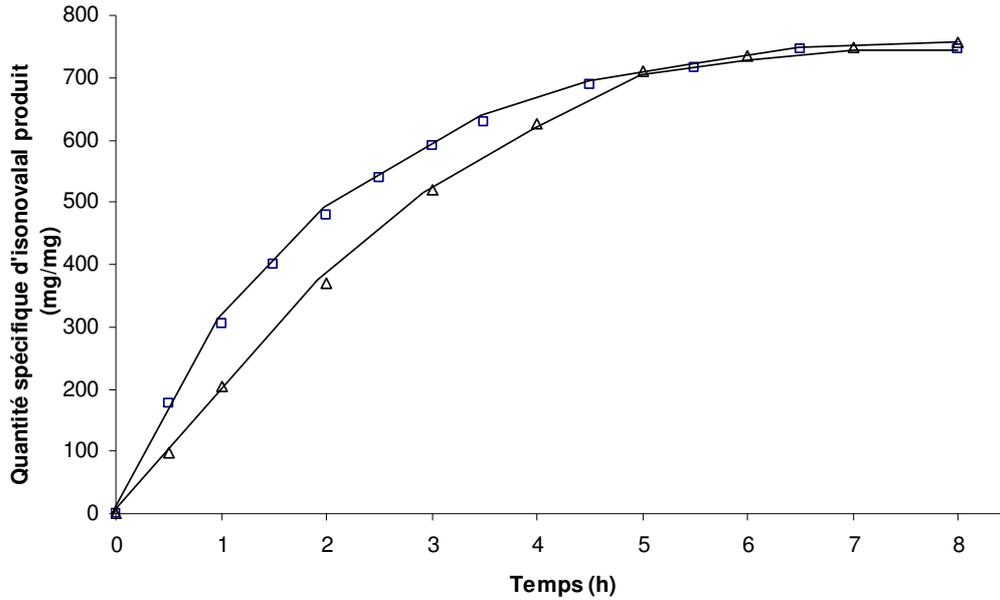
La vitesse initiale d'accumulation de l'isonovalal dans la phase organique ( $r_{IO}$  mesurée après 30 minutes de bioconversion) est déterminée pour différentes quantités de lyase au cours de bioconversions en fioles Erlenmeyer de 50 mL et pour une même concentration initiale en substrat ( $95 \text{ g.L}^{-1}$  de phase organique). La phase aqueuse contient de la SAB ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ ), de façon à empêcher l'inactivation de la lyase au contact de l'interface eau / hexadécane (par. IV.4.5). Les résultats obtenus montrent qu'un phénomène de limitation par le transfert de masse à l'interface est présent dans le système pour des quantités en enzyme supérieures à  $0,02 \text{ mg}$  (**figure IV.11**).

L'utilisation d'un surfactant commercial, le Triton X100, est choisie pour établir une émulsion complète dans le milieu réactionnel afin d'augmenter la surface d'échange entre phases. La vitesse initiale de production de l'isonovalal, obtenue précédemment avec  $0,06 \text{ mg}$  de lyase ( $6,0 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), s'élève à  $8,5 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  en présence de Triton X100 ( $5,7 \% \text{ v/v}$ ). La même expérience, réalisée en présence d'une plus forte proportion de Triton ( $11,4 \% \text{ v/v}$ ), ne permet pas une élévation supplémentaire de la vitesse initiale de bioconversion bien qu'une augmentation de la surface d'échange soit observée (**figure IV.12**). L'ajout de  $6,5 \% \text{ (v/v)}$  de Triton X100 dans le milieu réactionnel stabilise donc une microémulsion assurant une surface d'échange suffisante pour empêcher une limitation par les transferts de masses dans ces conditions ( $0,06 \text{ mg}$  de lyase dans la phase aqueuse et  $95 \text{ g.L}^{-1}$  d' $\alpha$ -pinène oxyde dans la phase organique).

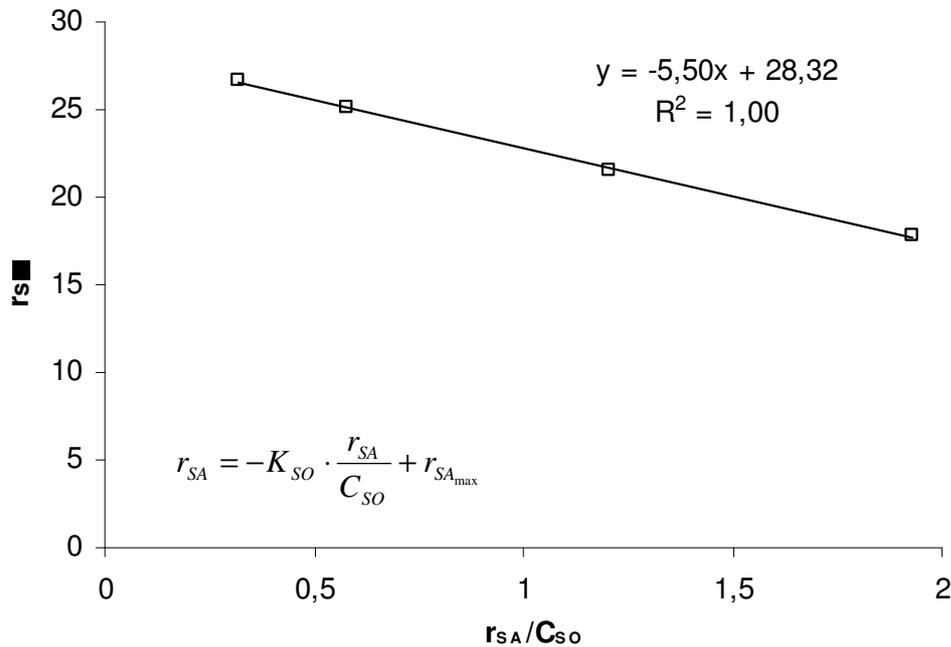
Des bioconversions sont réalisées avec différentes quantités de lyase en présence de Triton X100 (**figure IV.11**). Les résultats obtenus montrent que l'ajout du surfactant dans le milieu réactionnel ( $10 \% \text{ v/v}$ ) permet l'annulation des phénomènes de limitation par le transfert interfacial pour des quantités en lyase présentes dans le milieu réactionnel inférieures ou égales à  $0,11 \text{ mg}$  et pour une concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde dans la phase organique de  $95 \text{ g.L}^{-1}$ . La mesure de  $r_{SA}$  initiales proches des valeurs réelles est donc envisageable dans ces conditions et pour toutes concentrations en  $\alpha$ -pinène oxyde ou quantités en lyase dans le milieu réactionnel inférieures à ces valeurs.

Des bioconversions réalisées avec de l'enzyme purifiée et avec de la biomasse perméabilisée, en absence de triton X100, montrent que la biomasse permet des meilleures vitesses spécifiques initiales de bioconversion (**figure IV.13**). Ce phénomène est vraisemblablement lié à la présence de surfactants naturellement présents dans la biomasse, libérés au cours de l'étape de perméabilisation membranaire.

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase



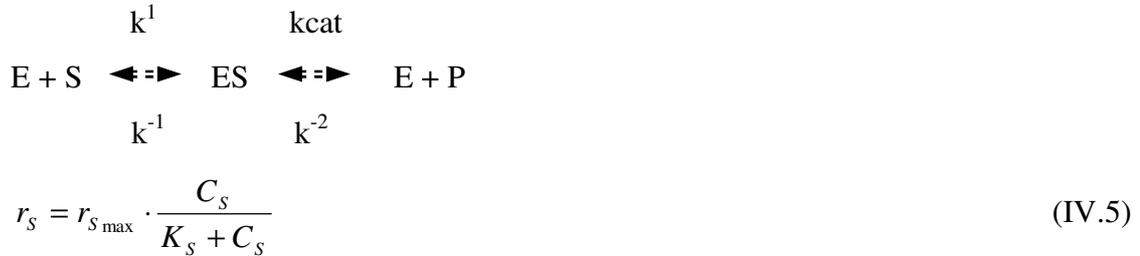
**Figure IV.13.** Masse spécifique d'isonovalal produit (en mg d'isonovalal produit par mg de lyase) au cours de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par de la biomasse perméabilisée (-□-) et de la lyase purifiée (-Δ-) en absence de Triton X100. Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL (voir II.3.1). La phase aqueuse de la bioconversion réalisée avec l'enzyme purifiée contient de la SAB (3 g.L<sup>-1</sup>).



**Figure IV.14.** Détermination des constantes cinétiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491 par la méthode de Eadie-Hofstee (l'équation théorique est présentée sur le graphique). Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL contenant 0,064 mg de lyase purifiée en présence de triton X100 (10 % v/v) et de SAB (3 g.L<sup>-1</sup> de phase aqueuse). Les concentrations en substrat varient de 9,2 à 85 g.L<sup>-1</sup> de phase organique. V<sub>A</sub>=2 mL, V<sub>O</sub>= 5 mL. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

### IV.5.2 Modèle de Michaelis-Menten - Détermination des constantes cinétiques

Pour la plupart des enzymes, la vitesse de catalyse,  $r_s$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), varie avec la concentration en substrat  $C_s$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ). L'équation proposée par Michaelis et Menten, établie à partir du mécanisme réactionnel suivant s'écrit selon l'équation IV.5 :



Il s'agit d'un modèle comprenant 2 paramètres,  $K_s$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) et  $r_{s \text{ max}}$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), qui doivent être déterminés.

Dans le cadre d'un système biphasique et en considérant une absence de limitation à l'interface liquide / liquide, la vitesse initiale de consommation du substrat dans la phase aqueuse peut s'exprimer en fonction de la concentration en substrat dans la phase organique,  $C_{sO}$  ( $\text{g.L}^{-1}$ ) :

$$r_{sA} = r_{sA \text{ max}} \cdot \frac{C_{sO}}{K_{sO} + C_{sO}} \quad \text{(IV.6)}$$

$K_{sO}$  est la constante de Michaelis-Menten (exprimée en  $\text{g.L}^{-1}$  de phase organique) et  $r_{sA \text{ max}}$  l'activité maximale (en  $\text{g.L}^{-1}$  de phase aqueuse. $\text{h}^{-1}$ ). Les  $r_{sA}$  sont calculées à partir des mesures des vitesses initiales de production de l'isonovalal dans la phase organique,  $r_{iO}$ , en appliquant la relation IV.4 du paragraphe IV.5.1.1.

Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL, en présence de Triton X100 (10 % v/v) et de SAB (3  $\text{g.L}^{-1}$  de phase aqueuse), de façon à empêcher les phénomènes interfaciaux limitants (transferts de masse et inactivation interfaciale, respectivement). La vitesse initiale de production de l'isonovalal considérée est celle obtenue après 30 min de bioconversion, période pendant laquelle l'inactivation enzymatique est considérée comme négligeable. Les constantes cinétiques sont déterminées à partir de la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten selon Eadie-Hofstee.

Les résultats obtenus montrent clairement que la lyase est une enzyme de type michaelien (**figure IV.14**). L'activité maximale,  $r_{sA \text{ max}}$ , est estimée à 28,32  $\text{g.L}^{-1}$  de phase aqueuse. $\text{h}^{-1}$  pour 0,064 mg de lyase, ce qui correspond à une activité spécifique maximale,

Constantes	Valeurs
$\gamma_H^\infty$ (25°C) <sup>a)</sup>	1,02
$S_W$ <sup>b)</sup>	2,55
$\gamma_W^\infty$ (25°C) <sup>c)</sup>	21700
$K_P^S$ (25°C) <sup>d)</sup>	<b>7,61.10<sup>-4</sup></b>

a- Coefficient d'activité à dilution infinie dans l'hexadécane, estimé à partir du logiciel UNIFACAL (<http://www.chem.eng.usyd.edu.au/pgrad/bruce/unifacal/unifacal.html>).

b- Solubilité dans l'eau à 25°C (mmol.L<sup>-1</sup>), selon FICHAN et al., 1999.

c- Coefficient d'activité à dilution infinie dans l'eau, estimé à partir de l'équation suivante :

$$\gamma_W^\infty = \frac{\rho_W}{M_W S_W}$$

Où  $M_W$  et  $\rho_W$  sont respectivement la masse molaire et la masse volumique de l'eau à 25°C (18 g.mol<sup>-1</sup> et 997 g.L<sup>-1</sup>, respectivement).

d- Coefficient de partage, défini comme le rapport de la concentration en soluté dans la phase aqueuse sur celle de la phase organique :

$$K_P^S = \frac{C_{SA}}{C_{SO}} = \frac{\gamma_H^\infty \rho_W M_H}{\gamma_W^\infty \rho_H M_W}$$

Avec  $M_H$  la masse molaire de l'hexadécane et  $\rho_H$  sa masse volumique à 25 °C (226 g.mol<sup>-1</sup> et 773 g.L<sup>-1</sup>, respectivement).

**Tableau IV.i.** Estimation des coefficients de partage de l' $\alpha$ -pinène oxyde dans un système biphasique eau / hexadécane.

$r_{S_{\max}}$ , de  $97 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de lyase. La constante de Michaelis,  $K_{SO}$ , est estimée à  $5,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de phase organique.

Afin de comparer cette dernière valeur avec les études précédentes, réalisées en condition monophasique aqueuse, il est nécessaire d'exprimer cette constante en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de phase aqueuse. La ratio entre la concentration en substrat dans la phase aqueuse ( $C_{SA}$ ) et dans la phase organique ( $C_{SO}$ ) est donné par le coefficient de partage de l' $\alpha$ -pinène oxyde de part et d'autre de l'interface eau / hexadécane ( $K_P^S$ ) :

$$K_P^S = \frac{C_{SA}}{C_{SO}} \quad (\text{IV.7})$$

$K_P^S$  est déterminé grâce à l'estimation du coefficient d'activité à dilution infinie ( $\gamma^\infty$ ) de l' $\alpha$ -pinène oxyde dans la phase aqueuse et dans la phase organique (**tableau IV.i**). La constante de Michaelis dans la phase aqueuse,  $K_{SA}$ , est ainsi calculée à  $27,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de phase aqueuse grâce à la relation suivante :

$$K_{SA} = K_{SO} \cdot K_P^S \quad (\text{IV.8})$$

#### IV.5.2. Conclusions - Discussions

Cette partie montre comment l'utilisation d'un surfactant dans le milieu réactionnel (Triton X100) empêche les limitations des vitesses de bioconversion par les transferts de masse à l'interface eau / hexadécane, sans avoir à augmenter les volumes réactionnels ni les conditions d'agitation (ce qui pourrait respectivement diluer le milieu réactionnel ou nuire à la stabilité de l'enzyme). Les constantes cinétiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, l'activité spécifique maximale ( $r_{S_{\max}}$ ) et la constante de Michaelis ( $K_{SA}$ ), ont ainsi pu être estimées (**tableau IV.j**).

Les performances cinétiques de la lyase selon son mode d'emploi (enzyme purifiée ou contenue au sein de la biomasse perméabilisée) sont comparées (**tableau IV.j**). L'enzyme affiche une  $r_{S_{\max}}$  du même ordre de grandeur dans les deux situations observées. L'utilisation de l'enzyme purifiée ou de la biomasse perméabilisée conduit donc à des performances cinétiques proches en absence de limitation par l'apport en substrat.

L'affinité de l'enzyme est, par contre, 14 fois plus élevée lorsqu'elle est utilisée en absence des constituants de la biomasse. Ceci peut s'expliquer par la présence dans la biomasse perméabilisée de constituants membranaires résiduels susceptibles de gêner l'interaction enzyme / substrat. La détermination de la constante  $K_{SA}$  obtenue à partir d'un extrait cellulaire filtré peut permettre de valider ou non cette hypothèse.

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

	<i>P. rhodesiae</i> CIP 107491		<i>Nocardia</i> P18.3 <sup>b)</sup>	<i>P. putida</i> PX1 NCIMB 10684 <sup>c)</sup>
	Biomasse perméabilisée <sup>a)</sup>	Enzyme pure		
$K_S$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	385	27	9	210
$r_{S\text{max}}$ ( $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ )	119	97	ND	ND

a- Selon FONTANILLE et LARROCHE (2003).

b- Selon GRIFFITHS et al. (1987b).

c- Selon TRUDGILL (1994).

**Tableau IV.j.** Comparaison des constantes cinétiques de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase provenant de différentes souches bactériennes et selon le procédé utilisé (enzyme purifiée ou au sein de la biomasse perméabilisée). ND : non déterminé.

D'un point de vue fondamental, cette étude a permis d'affiner l'estimation de la constante de Michaelis de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Le fait que la valeur obtenue soit comprise entre les valeurs précédemment déterminées pour des lyases d'autres souches bactériennes, réalisées en condition monophasique aqueuse, semble indiquer une estimation correcte (**tableau IV.j**). Enfin et d'une façon plus générale, ces observations confirment le fait que l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *P.rhodesiae* ne correspond à aucune autre enzyme étudiée à ce jour.

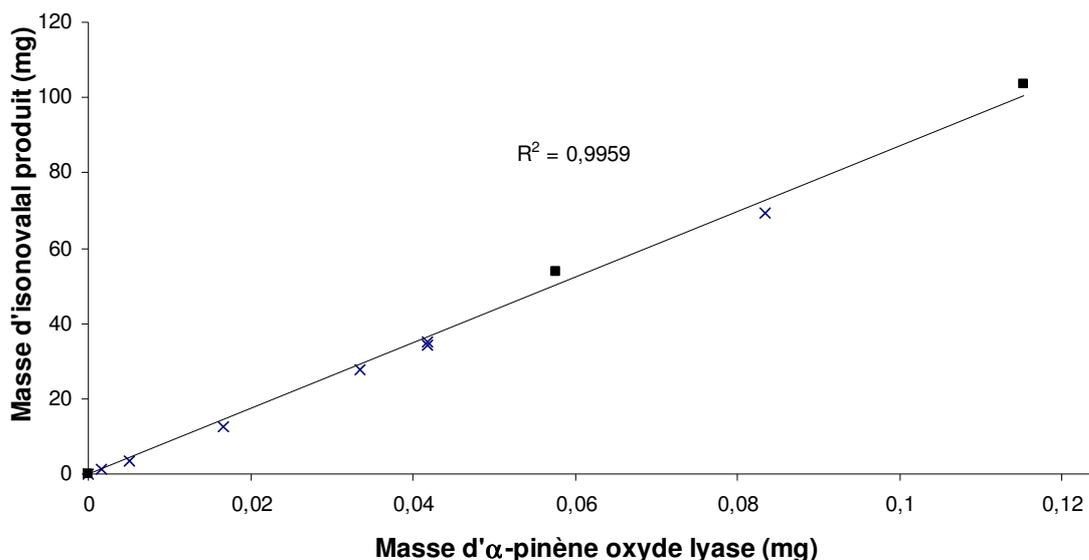
## IV.6. Caractérisation de l'inactivation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

Les parties précédentes montrent que l'enzyme présente des performances tout à fait similaires qu'elle soit sous forme purifiée ou présente au sein de la biomasse perméabilisée, aussi bien en terme de quantité spécifique maximale d'isonovalal produit (turn-over) que de vitesse spécifique maximale ( $r_{Smax}$ ). L'objectif de cette partie est de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inactivation de l'enzyme afin de proposer des méthodes permettant de les contrer et d'augmenter ainsi le turn-over de la lyase. Le biocatalyseur est ici utilisé sous sa forme purifiée de façon à mieux contrôler les conditions expérimentales. De la SAB (3 g.L<sup>-1</sup> de phase aqueuse) et du Triton X100 (10 % v/v) sont ajoutés dans le milieu réactionnel de façon à empêcher l'inactivation interfaciale de l'enzyme au contact de l'interface eau / hexadécane (par. IV.4.5) ainsi que les phénomènes de limitation par le transfert de masse au niveau de cette même interface (par. IV.1.5.2). L'activité est ici exprimée *via* la vitesse d'accumulation de l'isonovalal dans la phase organique,  $r_{IO}$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), directement proportionnelle à la vitesse de consommation du substrat dans la phase aqueuse,  $r_{SA}$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (voir la relation IV.4 du paragraphe IV.5.1).

Les résultats obtenus dans le chapitre III ont montré que l'isonovalal possédait des propriétés inactivatrices sur le biocatalyseur (par. III.5.2). Une attention particulière sera donc apportée sur le comportement de la lyase en présence d'isonovalal.

### IV.6.1. Estimation du turn-over de l'enzyme

Une étude précédente a montré que la lyase présente au sein de la biomasse perméabilisée affichait un turn-over constant, c.à.d. était capable de produire une certaine quantité d'isonovalal avant de s'inactiver de manière irréversible (FONTANILLE et LARROCHE, 2003). Ce phénomène est également mis en évidence avec l'enzyme purifiée



**Figure IV.15.** Evolution de la quantité maximale d'isonovalal produit en fonction de la quantité de lyase présente dans le milieu réactionnel. Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL en absence (-x-) ou en présence (-■-) de Triton X100 (10 % v/v). La phase aqueuse est constituée de 2 mL d'une solution de lyase dans un tampon phosphate contenant de la SAB (3 g.L<sup>-1</sup>). La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde (95 g.L<sup>-1</sup>) dans 5 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

Concentration initiale en isonovalal (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	C <sub>IO</sub> maximale (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	r <sub>IO</sub> initiale (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
0,0	10,7	7,7
5,6	7,0	8,2
8,6	6,8	7,4
29,9	5,9	7,7

a- Une quantité d'isonovalal purifié (p=95 %) est ajoutée au milieu réactionnel en même temps que le substrat de bioconversion. Les méthodes employées pour obtenir l'isonovalal pur sont discutées dans le chapitre III (par. III.2.1).

b- Concentration maximale en isonovalal produit dans la phase organique.

c- Vitesse initiale d'accumulation de l'isonovalal dans la phase organique.

**Tableau IV.k.** Effet de l'isonovalal sur le turn-over et sur l'activité initiale de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL avec 0,06 mg de lyase purifiée (par. II.3.1). Les bioconversions sont réalisées en présence de triton X100 (10 % v/v) et de SAB (3 g.L<sup>-1</sup>) dans la phase aqueuse.

(**figure IV.15**). On remarque également que l'ajout de Triton X100 n'a pas d'effet sur la quantité maximale d'isonovalal produit. Ce surfactant permet donc d'empêcher les phénomènes de limitation par les transferts de masse à l'interface tout en préservant le turn-over de l'enzyme.

Le turn-over de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est estimé par le calcul du ratio moyen entre la quantité d'isonovalal produit pour une quantité connue de lyase purifiée, mesurée par dosage protéique selon la méthode de Bradford (par. II.1.3.3.1). La valeur obtenue est de  $770 \pm 60$  g d'isonovalal produit par gramme de lyase présente dans le milieu réactionnel, ce qui correspond à  $222800 \pm 18200$  mol.mol<sup>-1</sup> ( $M_I = 152$  g.mol<sup>-1</sup>,  $M_{lyase} = 44000$  g.mol<sup>-1</sup>).

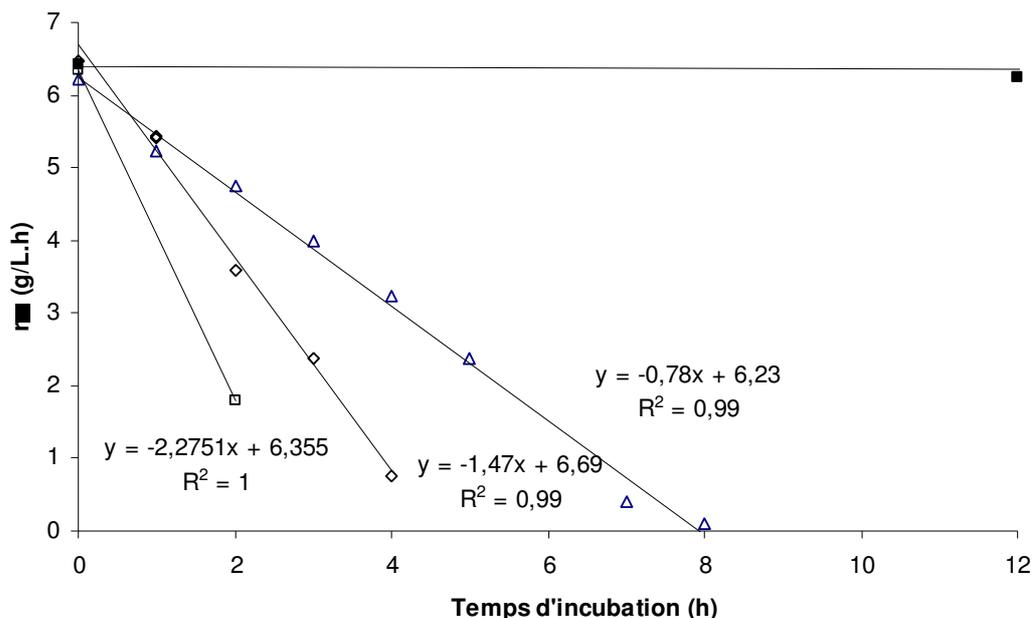
Si l'on admet que l'isonovalal est entièrement responsable de l'inactivation du biocatalyseur, ces derniers résultats suggèrent une inactivation totale de 1 g de lyase en présence de  $770 \pm 60$  g d'isonovalal.

## IV.6.2. Inactivation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par l'isonovalal

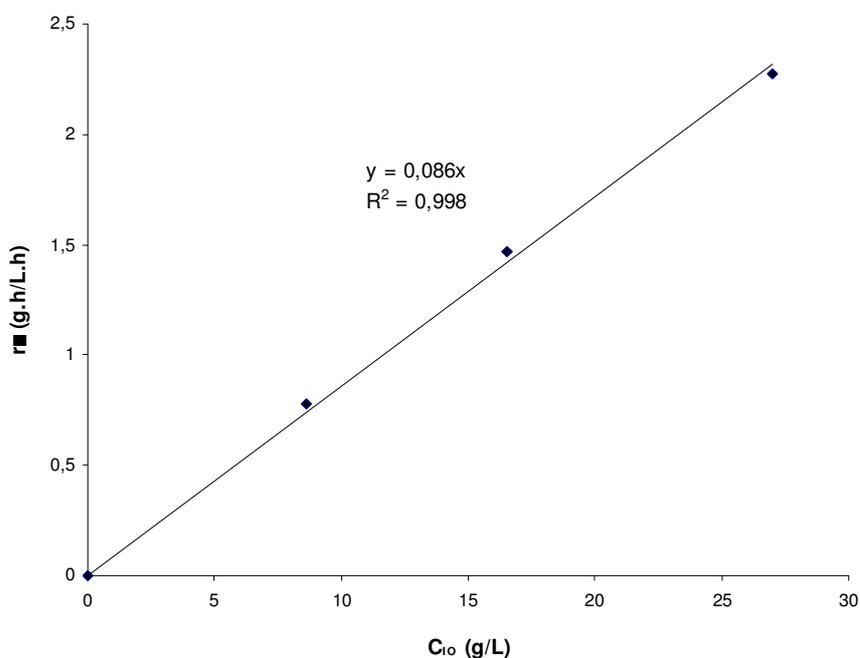
### IV.6.2.1. Effet de l'isonovalal sur l'activité initiale et sur le turn-over de la lyase purifiée

Les expérimentations préalablement effectuées avec la biomasse perméabilisée ont montré une diminution de la concentration maximale en isonovalal produit en fonction de la quantité croissante d'isonovalal purifié initialement ajoutée dans le milieu réactionnel et du temps de contact avec ce dernier (par. III.5.2). De la même façon, des bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde par de l'enzyme purifiée montrent qu'une augmentation de la concentration initiale en isonovalal diminue significativement le turn-over de l'enzyme (représenté par la concentration maximale en isonovalal produit dans la phase organique) mais n'affecte pas son activité initiale (représentée par la vitesse initiale d'accumulation de l'isonovalal dans la phase organique), même lorsque la concentration initiale en isonovalal ajouté est 3 fois supérieure aux concentrations maximales obtenues d'une bioconversion identique, sans ajout initial d'isonovalal (**tableau IV.k**). Il faut noter que, dans le cas présent, l'absence de variation des vitesses initiales ne peut s'expliquer par une limitation par les transferts de masses étant donné la présence de Triton dans le milieu réactionnel.

Ces résultats confirment définitivement une inactivation au moins partielle et non instantanée de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par l'isonovalal. Le fait que l'inactivation nécessite au moins 30 min de temps de contact pour s'établir prouve que l'inactivation de la lyase par



**Figure IV.16.** Effet de l'isonovalal sur l'activité de 0,05 mg d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en fonction du temps de contact et en fonction de la concentration initiale en isonovalal dans phase organique : 0 (-■-), 8,6 (-Δ-), 16,5 (-o-) et 26,9 g.L<sup>-1</sup> (-□-). Les incubations et les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 50 mL en présence de triton X100 (10 % v/v) et de SAB (3 g.L<sup>-1</sup> de phase aqueuse). La vitesse initiale de production de l'isonovalal est mesurée par ajout de l' $\alpha$ -pinène oxyde (95 g.L<sup>-1</sup>) après les temps d'incubation représentés sur l'axe des abscisses. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.



**Figure IV.17.** Corrélation entre la vitesse d'inactivation de 0,05 mg d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase et la concentration en isonovalal dans la phase organique au cours de l'incubation précédant la bioconversion (voir la légende de la figure IV.16).

l'isonovalal peut être négligée pendant les 30 premières minutes de la bioconversion et valide les mesures des activités initiales et des constantes cinétiques déterminées dans la partie précédente. Le mécanisme d'inactivation n'ayant pas d'effet sur la mesure de l'activité initiale, il est par contre impossible de déterminer une constante d'inhibition selon les modèles d'inhibition classiquement rencontrés (inhibition compétitive, non compétitive et incompétitive).

#### IV.6.2.2. Effet temps et concentration-dépendant de l'isonovalal sur l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

##### IV.6.2.2.1. Perte d'activité au cours des incubations

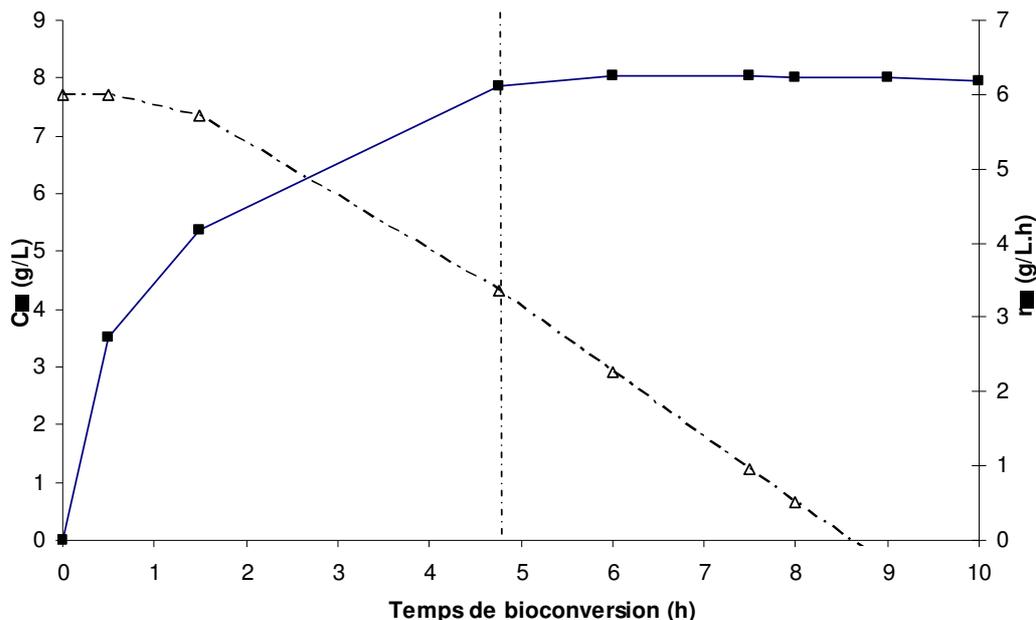
L' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est incubée pendant différents temps de contact en présence de phases organiques contenant diverses concentrations d'isonovalal. L'activité initiale de l'enzyme est ensuite mesurée par ajout du substrat dans le milieu réactionnel.

Les résultats obtenus confirment une inactivation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par l'isonovalal selon un mécanisme temps-dépendant (**figure IV.16**). Une inactivation totale de 0,05 mg d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est ainsi mise en évidence après une incubation de 8 h en présence d'une phase organique contenant 8,6 g d'isonovalal.L<sup>-1</sup>. Les résultats montrent également que la corrélation entre la perte d'activité et le temps d'incubation est linéaire, il est ainsi possible de définir une vitesse moyenne d'inactivation de la lyase pour une concentration donnée en isonovalal dans la phase organique ; cette dernière est par exemple de 0,78 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> par h d'incubation avec une phase organique contenant 8,6 g d'isonovalal.L<sup>-1</sup>.

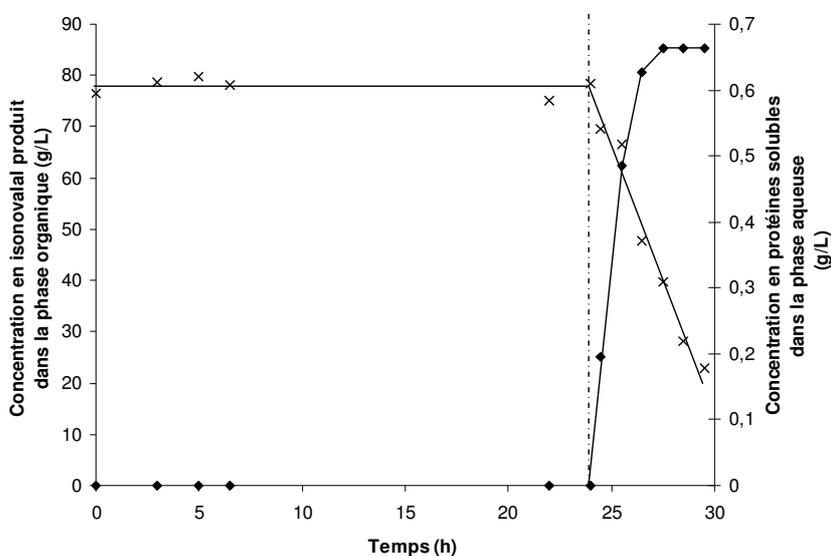
Des incubations réalisées avec différentes concentrations en isonovalal dans la phase organique montrent que le phénomène d'inactivation temps-dépendant est également concentration-dépendant (**figure IV.16**). Les observations montrent que la corrélation entre la vitesse d'inactivation de la lyase et la concentration en isonovalal dans la phase organique est également linéaire (**figure IV.17**). Il est ainsi possible de définir la vitesse d'inactivation de la lyase au cours du temps,  $r_D$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-2</sup>), par la relation suivante :

$$r_D = -\frac{dr_{I0}}{dt} = A \cdot C_{I0} \quad (\text{IV.9})$$

Avec  $C_{I0}$  la concentration en isonovalal présente dans la phase organique (en g.L<sup>-1</sup>) et  $A$  une constante d'inactivation, estimée expérimentalement à  $8,6 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-2}$  pour 0,05 mg d'enzyme présente dans le milieu réactionnel (**figure IV.17**).



**Figure IV.18.** Production de l'isonovalal (-■-) et perte d'activité théorique (--Δ--) au cours d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par 0,05 mg de lyase purifiée. La bioconversion est réalisée en fiole Erlenmeyer de 50 mL. La phase aqueuse est constituée de 2 mL d'un tampon phosphate contenant de la SAB ( $3\text{g.L}^{-1}$ ). La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde ( $95\text{ g.L}^{-1}$ ) dans 5 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température :  $30^\circ\text{C}$ . La perte d'activité théorique est calculée selon la relation IV.12 ( $A=8,6.10^{-2}\text{ h}^{-2}$ ).



**Figure IV.19.** Evolution de la concentration en protéines solubles dans la phase aqueuse (-x-) et de la concentration en isonovalal dans la phase organique (-◆-) en condition biphasique eau / hexadécane avant et pendant la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par un extrait cellulaire filtré. La concentration en protéines solubles dans la phase aqueuse est dosée par la méthode de Bradford (II.1.3.3.1). La bioconversion et l'incubation sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL. La phase aqueuse est constituée de 25 mL d'extrait cellulaire filtré. La phase organique est constituée de 25 mL d'hexadécane. L' $\alpha$ -pinène oxyde est ajouté après 24 h d'incubation (trait pointillé) pour une concentration initiale dans la phase organique de  $165\text{ g.L}^{-1}$ . Agitation : 200 rpm. Température :  $30^\circ\text{C}$ .

IV.6.2.2.2. Perte d'activité au cours des bioconversions

Au cours d'une bioconversion, la concentration en isonovalal est variable au cours du temps, la vitesse d'inactivation est ainsi redéfini :

$$r_{D_i} = -\frac{dr_{IO}}{dt} = A \cdot C_{IO_i} \quad (\text{IV.10})$$

L'activité résiduelle de la lyase à un temps t peut ainsi être calculée de la façon suivante :

$$r_{IO}^t = r_{IO}^0 - \int_0^t A \cdot C_{IO_i} \cdot dt \quad (\text{IV.11})$$

Ce qui donne pendant un intervalle de temps  $\Delta t$  (h) en présence d'isonovalal :

$$r_{IO}^{t_n} = r_{IO}^{t_{n-1}} - \left( A \cdot \overline{C_{IO}^{\Delta t}} \cdot \Delta t \right) \quad (\text{IV.12})$$

$$\Delta t = t_n - t_{n-1} \quad (\text{IV.13})$$

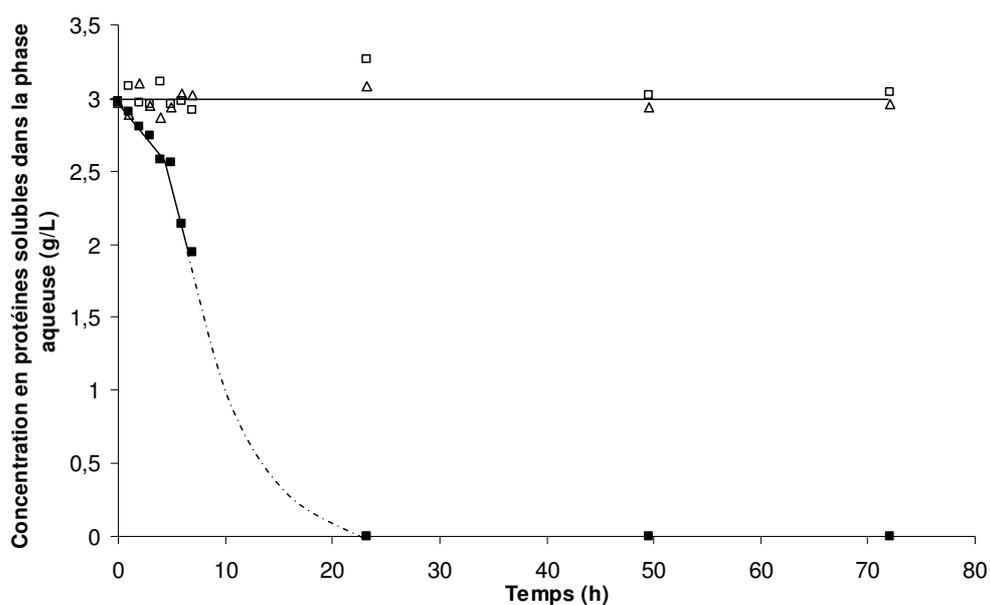
Avec  $\overline{C_{IO}^{\Delta t}}$  la concentration moyenne en isonovalal dans la phase organique (en g.L<sup>-1</sup>) pendant cet intervalle de temps :

$$\overline{C_{IO}^{\Delta t}} = \frac{C_{IO}^{t_n} + C_{IO}^{t_{n-1}}}{2} \quad (\text{IV.14})$$

Ces équations sont appliquées à la cinétique de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par de l'enzyme purifiée (**figure IV.18**). Les résultats montrent que les cinétiques d'inactivation de la lyase observées expérimentalement sont plus importantes que celles calculées par la relation IV.12. En effet, on observe une perte de 100 % de l'activité du biocatalyseur après 5 h de bioconversion alors que la perte relative d'activité calculée pour ce même temps n'est que de 45 %. L'inactivation temps-dépendante de l'enzyme par l'isonovalal mise en évidence ne suffit donc pas à expliquer la perte totale d'activité observée au cours de la bioconversion.

IV.6.2.3. Effet interfacial-dépendant de l'isonovalal

La concentration en protéines solubles est dosée au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde par de la biomasse perméabilisée, par un extrait cellulaire filtré et par de lyase purifiée en présence de SAB (3 g.L<sup>-1</sup>). Les résultats obtenus affichent des profils identiques dont un exemple est représenté dans la **figure IV.19**. La concentration en protéine soluble est d'abord stable en présence d'hexadécane seul puis diminue fortement dès le début de la bioconversion, en même temps que des précipités de natures protéiques se forment à l'interface. Ces phénomènes indiquent une adsorption et une précipitation des protéines à



**Figure IV.20.** Evolution de la concentration en SAB soluble en fonction du temps, au contact d'une interface eau / hexadécane seul ( $\Delta$ -), eau / hexadécane contenant de l' $\alpha$ -pinène oxyde ( $95 \text{ g.L}^{-1}$ ) ( $\square$ -) et eau / hexadécane contenant de l'isonovalal ( $55,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) ( $\blacksquare$ -). L'incubation est réalisée dans des fioles Erlenmeyer de 50 mL. La phase aqueuse est constituée de 2 mL d'une solution de SAB dans du tampon phosphate ( $3 \text{ g.L}^{-1}$ ). Agitation : 200 rpm. Température :  $30^\circ\text{C}$ .

Souche bactérienne	Mode d'emploi	Turn-over	Référence bibliographique
<i>Nocardia P18.3</i>	enzyme pure	11 000	GRIFFITHS et al. (1987b)
<i>P.rhodesiae</i> CIP 107491	biomasse perméabilisée	<b>237 160</b>	FONTANILLE et LARROCHE (2003)
	enzyme pure	<b>222 816</b>	Cette étude

**Tableau IV.1.** Turn-over de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de différentes souches de *Pseudomonas* selon le mode d'emploi (en moles de produit formé pour une mole d'enzyme).

l'interface liée à l'ajout d' $\alpha$ -pinène oxyde ou à l'apparition d'isonovalal dans le milieu réactionnel.

Les facultés de l'isonovalal et de l' $\alpha$ -pinène oxyde à entraîner une adsorption des protéines à l'interface phase aqueuse / phase organique sont testées avec une solution protéique de SAB. Les résultats montrent qu'une phase organique constituée d'hexadécane seul ou d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans l'hexadécane n'exerce aucun effet sur la solubilité des protéines, alors que la présence d'isonovalal entraîne une diminution importante de la concentration en protéine soluble (**figure IV.20**). La diminution de la concentration en protéine soluble s'accompagne de la formation de précipités important à l'interface de nature protéique. Ceci montre que l'adsorption des protéines à l'interface observée au cours de la bioconversion est liée à la production d'isonovalal dans le milieu réactionnel.

Enfin, lorsque l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est mise au contact d'une phase aqueuse saturée en isonovalal, aucun effet significatif n'est observé sur la concentration maximale en isonovalal produit bien que la concentration en isonovalal dans la phase aqueuse soit supérieure à la concentration en enzyme (résultats non présentés). Il semble donc que l'isonovalal présent dans la phase aqueuse ne possède pas d'effet sur le turn-over de la lyase ; l'isonovalal agit donc vraisemblablement sur l'activité de l'enzyme par des mécanismes de type purement interfaciaux.

Ces résultats semblent montrer que l'isonovalal présent dans la phase organique soit responsable d'une inactivation interfaciale supplémentaire à celle précédemment mise en évidence. Contrairement à l'inactivation de l'enzyme à l'interface eau / hexadécane qui peut être fortement ralentie par l'ajout de SAB, cette dernière ne semble pas avoir d'effet sur les cinétiques d'adsorption / précipitation des protéines à l'interface eau / phase organique contenant de l'isonovalal.

### IV.6.3. Conclusions - Discussions

Les résultats montrent que l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 présente un turn-over bien supérieur à celui de la lyase de *Nocardia* (**tableau IV.1**). Les résultats confirment également que l'utilisation de l'enzyme sous forme purifiée n'apporte aucune amélioration significative du turn-over.

Le fait que l'enzyme affiche un turn-over constant, bien qu'une grande partie des limitations par les transferts de masse aient été successivement corrigées, renforce l'idée que l'inactivation de l'enzyme soit liée aux acteurs de la réaction de bioconversion. Parmi les



produits libres de la réaction, seul l'isonovalal semble avoir une influence sur l'activité de la lyase (voir les conclusions du chapitre III). La caractérisation et la quantification de cet effet montre qu'il n'est que partiellement responsable de l'inactivation de la lyase au cours de la bioconversion. Ceci met en évidence un autre phénomène d'inactivation, plus rapide et plus localisé. Le mécanisme de la « catalyse-sucide » proposé par GRIFFITHS et al. (1987a), selon lequel l'inactivation de la lyase serait provoquée par l'isonovalal ou par l'un des intermédiaires de la bioconversion présents dans l'environnement immédiat du site catalytique, semble répondre à ces caractéristiques. Ce dernier est propre à la structure de l'enzyme et il semble difficile de pouvoir l'annuler en jouant sur les conditions de bioconversion.

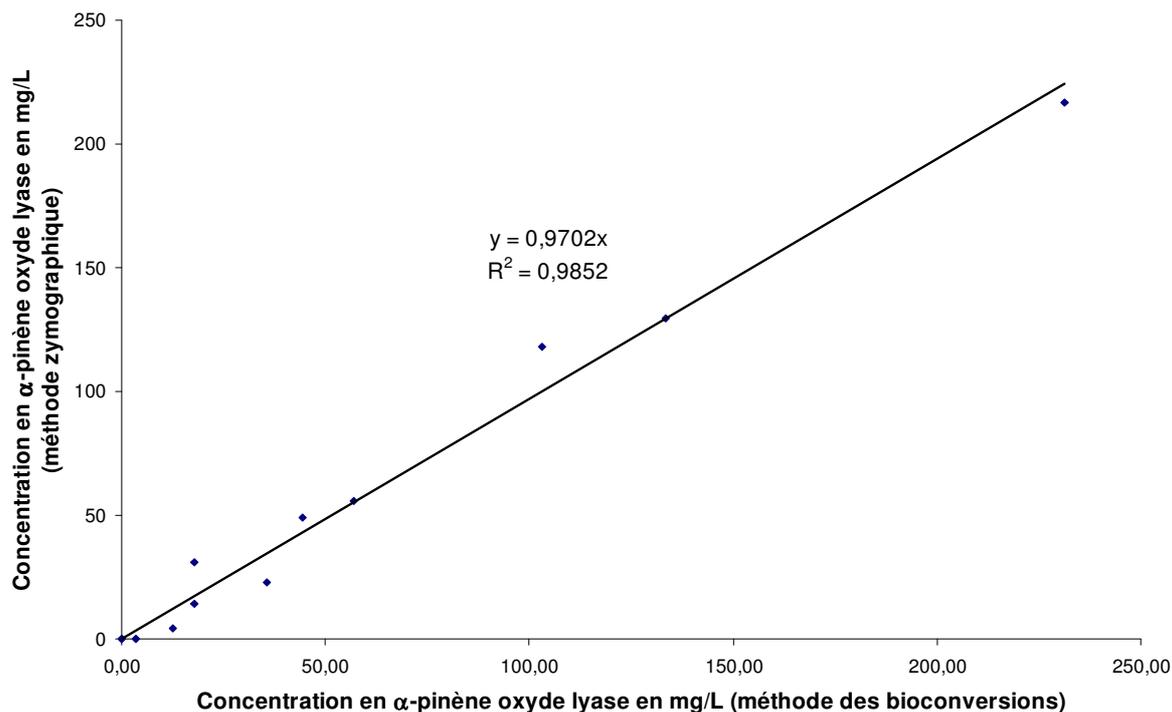
Par contre, la nature vraisemblablement interfaciale du phénomène d'inactivation temps-dépendant de l'enzyme par l'isonovalal libre dans le milieu réactionnel indique qu'il pourrait être corrigé par la mise au point d'un procédé empêchant les interactions enzyme / isonovalal. Des techniques d'immobilisation du biocatalyseur dans la phase aqueuse ou l'utilisation d'un réacteur possédant une membrane à l'interface eau / phase organique peuvent aider à obtenir ces résultats. Ces types de procédés risquent néanmoins d'entraîner une diminution considérable des vitesses de la bioconversion par l'introduction dans le système de nouvelles limitations par le transfert de masse. De plus, du fait de la grande réactivité de la lyase adsorbée, l'ajout de support d'immobilisation ou d'une membrane à l'interface dans le milieu réactionnel laisse supposer que d'autres phénomènes d'inactivation à l'interface eau / phase solide pourraient apparaître.

La dernière alternative actuellement disponible, permettant d'envisager une augmentation significative de la productivité du procédé, consiste à augmenter la teneur en lyase dans la biomasse produite en jouant sur les conditions de la culture cellulaire. Cet aspect fait l'objet de la partie suivante.

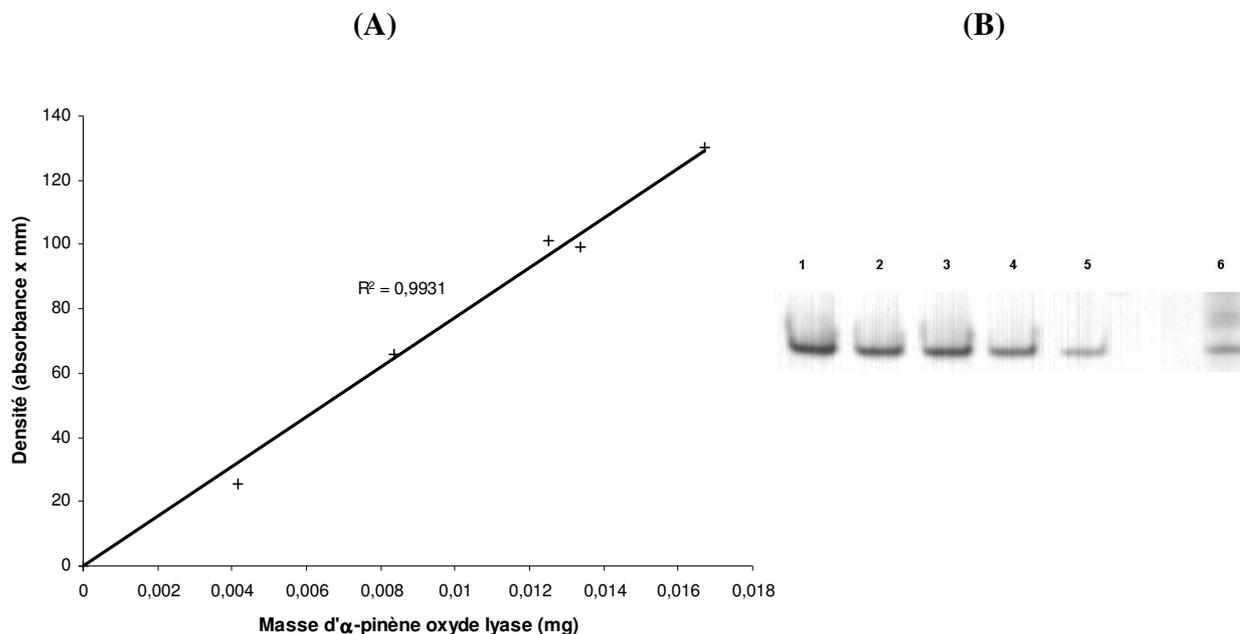
#### **IV.6. Induction de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase par la source de carbone**

La synthèse et l'activité de certaines enzymes peuvent être induites ou réprimées par des mécanismes se déroulant au niveau de l'ADN comme au niveau de la structure des protéines (voir les chapitres I.3.3.1 et I.3.3.3, respectivement). Parmi les paramètres susceptibles d'avoir un impact sur l'activité de la lyase, le choix de la source de carbone et d'énergie utilisée pendant l'étape de croissance cellulaire semble avoir un rôle important ; il a

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase



**Figure IV.21.** Corrélation entre les concentrations en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase mesurée dans la biomasse par deux méthodes différentes de quantification activité-dépendantes.



**Figure IV.22.** Exemple de courbe de calibration obtenue par la méthode du bleu de Coomassie (A) et gel associé (B). Puits 1 à 5 : intensités des bandes obtenues avec différentes concentrations connues en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase (167 à 41 mg.L<sup>-1</sup>). Puit 6 : exemple d'extrait cellulaire induit. Les quantifications sont faites par densitométrie (par II.2.7).

été montré que l'utilisation de citrate comme unique source de carbone pendant l'étape de culture produisait une biomasse dépourvue d'activité (GRIFFITHS et al., 1987a) alors que l' $\alpha$ -pinène permettait d'obtenir une biomasse particulièrement active (FONTANILLE, 2002 ; GRIFFITHS et al., 1987a).

L'objectif de cette partie est de déterminer la ou les sources(s) de carbone devant être utilisée(s) pendant l'étape de culture afin d'obtenir une biomasse la plus active possible. Le deuxième objectif est d'arriver à discerner les mécanismes impliqués dans la régulation de cette activité. Pour répondre à ces questions, il est avant tout nécessaire de mettre au point une méthode permettant de doser la quantité de lyase présente au sein des biomasses produites.

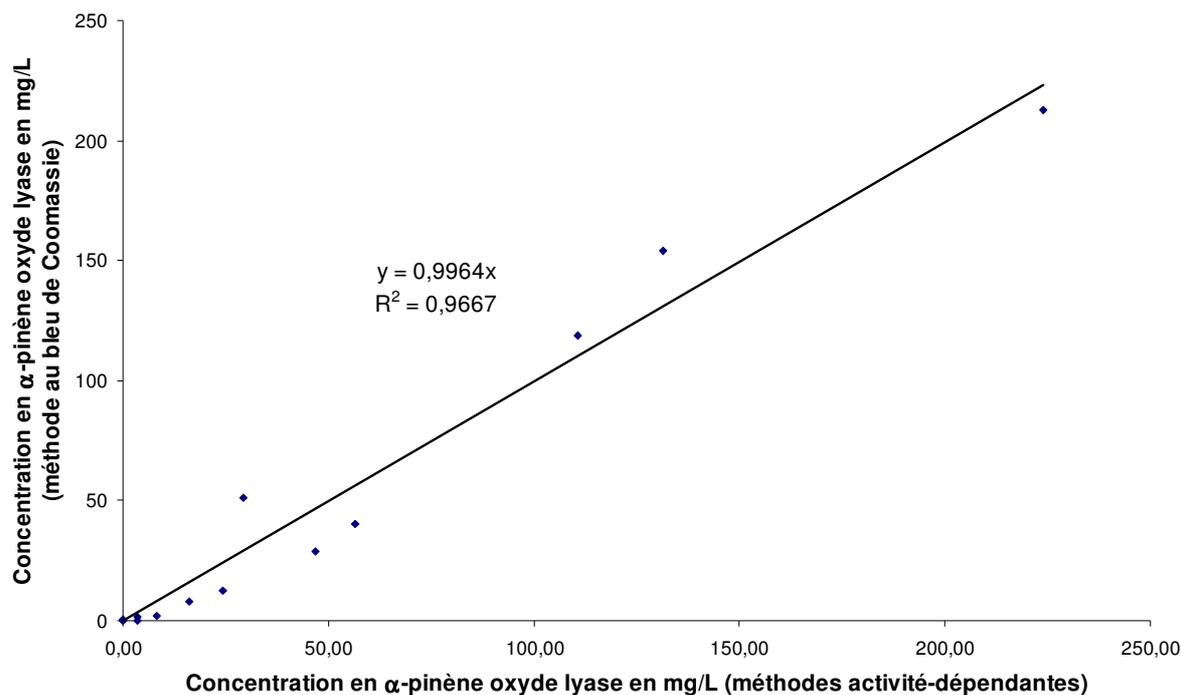
#### IV.6.1. Quantification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase dans la biomasse

Les biomasses sont produites en fiole Erlenmeyer ou en bioréacteur par des cultures sur milieu MBP contenant différentes sources de carbone et d'énergie (dont l' $\alpha$ -pinène, le lactate de sodium, le glucose et des mélanges  $\alpha$ -pinène / glucose et  $\alpha$ -pinène / lactate de sodium). Elles sont ensuite récupérées puis concentrées avant d'être congelées et traitées à l'éther selon le protocole détaillé dans le chapitre II.1.5. Comme nous l'avons vu précédemment, ce traitement perméabilise la membrane cellulaire de *Pseudomonas rhodesiae* et permet de rendre disponible l'intégralité de la lyase contenue dans la biomasse (voir le paragraphe III.4.1.1). L' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est ensuite quantifiée par la méthode de dosage zymographique (par. IV.4.2).

Le turn-over de la lyase étant constant (par. IV.6.1), il est également possible de doser la quantité de lyase présente dans les extraits cellulaires par des mesures de l'isonovalal produit au cours de bioconversions en condition biphasique (par. II.3.1). La quantité maximale d'isonovalal produit par 2 mL de biomasse perméabilisée est en moyenne de 232,5 mg (voir le **tableau IV.a**), la teneur en lyase de la biomasse ainsi estimée est de 0,022 g.g<sup>-1</sup>. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue par la méthode de dosage zymographique (0,020 g.g<sup>-1</sup> ; par. IV.4.2). Ceci indique que les deux méthodes peuvent être efficacement employées pour estimer la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase dans les extraits cellulaires.

Les résultats de la **figure IV.21** confirment que les deux méthodes peuvent être utilisées pour quantifier précisément l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase contenue dans la biomasse. Il faut néanmoins remarquer que ces deux techniques sont activité-dépendantes et ne permettent pas de discerner si l'induction de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase se fait au niveau de la production de

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase



**Figure IV.23.** Corrélation entre la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase mesurée dans différentes biomasses perméabilisées par deux différentes méthodes de quantification. Les méthodes de quantification activité-dépendantes correspondent aux valeurs moyennées données par la méthode zymographique et par bioconversion.

Source(s) de carbone <sup>a)</sup>		$L$ (mg.g <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>
Préculture	Culture	
$\alpha$ -pinène	$\alpha$ -pinène + glucose	8,7
lactate	$\alpha$ -pinène + glucose	5,3
glucose	$\alpha$ -pinène + glucose	ND
$\alpha$ -pinène + glucose	$\alpha$ -pinène + glucose	1,0

a – Source(s) de carbone utilisée en préculture et en culture réalisée en fiole Erlenmeyer de 500 mL comme décrit dans les chapitres II.1.2.2 et II.1.2.3.

b – Quantité spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase produite pour 1 g de biomasse obtenue. Cette valeur est obtenue grâce à la relation IV.15.

ND- Non déterminé. Lactate : lactate de sodium.

**Tableau IV.m.** Effets des conditions de préculture sur la production spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en fiole Erlenmeyer.

l'enzyme ou au niveau de son activité. Pour cette raison, les gels d'électrophorèse utilisés par la méthode zymographique sont également révélés au bleu de Coomassie, un colorant général des protéines. La bande correspondant à l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est identifiée et quantifiée par densitométrie de la même façon que pour la méthode zymographique (**figure IV.22**). Les résultats obtenus avec les deux méthodes activités-dépendantes et la méthode au bleu de Coomassie, quantité-dépendant, montrent là encore une bonne corrélation (**figure IV.23**). Ces observations permettent d'affirmer que les mécanismes de régulation déterminant l'activité de la biomasse se situent au niveau de la synthèse de l'enzyme et non pas au niveau de son activité. Il faudra donc privilégier les hypothèses de régulation par modulations de l'expression des gènes plutôt que par modifications post-traductionnelles.

La quantité spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase présente dans les différentes biomasses produites,  $L$  ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) est finalement bien représentée par la relation suivante :

$$L = \frac{m_{Lyase,b} + m_{Lyase,z} + m_{Lyase,c}}{3 \times B} \quad (\text{IV.15})$$

$m_{Lyase,b}$ ,  $m_{Lyase,z}$  et  $m_{Lyase,c}$  sont les quantités de lyase estimées par les méthodes des bioconversions, zymographique et au bleu de Coomassie respectivement (en mg).  $B$  représente la quantité de biomasse présente (en g). Cette quantité est estimée par la corrélation absorbance à 600 nm / poids sec préalablement déterminée (par. II.1.3.1).

#### IV.6.2. Influence de la source de carbone en préculture

Les précultures sont réalisées avec 3 sources de carbones et d'énergie différentes ; l' $\alpha$ -pinène, le lactate de sodium et le glucose. Ces précultures sont utilisées pour inoculer en fioles Erlenmeyer, un milieu de culture identique (MBP) contenant un mélange  $\alpha$ -pinène / glucose comme sources de carbone. Une fois la croissance terminée, la masse spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase contenue dans ces biomasses est quantifiée selon la relation IV.15 décrite dans le paragraphe précédent.

Les résultats obtenus indiquent que la source de carbone choisie pendant l'étape de préculture exerce une influence significative sur la production de la lyase pendant l'étape de culture (**tableau IV.m**). Ainsi, la biomasse produite à partir d'une préculture contenant de l' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone est la plus efficace pour la production de l'enzyme ( $8,7 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Le lactate de sodium donne des résultats intermédiaires ( $5,3 \text{ mg.g}^{-1}$ ), alors que l'utilisation de glucose semble fortement inhiber la production de l'enzyme (concentration en dessous du seuil de détection des méthodes de quantification employées). L'utilisation

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

Source(s) de carbone <sup>a)</sup>		<i>L</i> (mg.g <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>
Préculture	Culture	
lactate	$\alpha$ -pinène	<b>17,4</b>
lactate	glucose	0,5
lactate	lactate	0,9
lactate	$\alpha$ -pinène + glucose	5,3
lactate	$\alpha$ -pinène + lactate	6,1
$\alpha$ -pinène	$\alpha$ -pinène	<b>31,6</b>
$\alpha$ -pinène	glucose	ND
$\alpha$ -pinène	lactate	2,0
$\alpha$ -pinène	$\alpha$ -pinène + glucose	8,7
glucose	$\alpha$ -pinène	<b>3,2</b>
glucose	lactate	0,4
glucose	glucose	0,1
glucose	$\alpha$ -pinène + glucose	ND

a – Sources de carbone utilisées en préculture et en culture réalisées en fiole Erlenmeyer de 500 mL selon le protocole décrit dans le paragraphe II.1.2.3.

b - Quantité d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase produite pour 1 g de biomasse obtenue. Cette valeur est obtenue grâce à la relation IV.15.

ND- Non déterminé. Lactate : lactate de sodium.

**Tableau IV.n.** Effets des conditions de préculture et de culture sur la production spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en fiole Erlenmeyer.

combinée d' $\alpha$ -pinène avec le glucose n'augmente que très sensiblement la quantité de lyase produite (1 mg.g<sup>-1</sup>). Ces résultats montrent que la présence seule d' $\alpha$ -pinène en préculture possède un effet positif sur la production de lyase pendant l'étape de croissance mais que cet effet ne peut s'exprimer qu'en absence d'une autre source de carbone. Ce phénomène est vraisemblablement lié à des effets antagonistes des différentes sources de carbones sollicitant chacune leur propre voie métabolique.

#### IV.6.3. Influence de la source de carbone utilisée en culture

Des combinaisons de préculture et de culture contenant du lactate de sodium, de l' $\alpha$ -pinène ou du glucose sont ensuite réalisées afin de déterminer l'influence de la source de carbone au cours de l'étape de culture. Les cultures sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 500 mL. Une fois la croissance terminée, la masse spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase contenue dans ces biomasses est quantifiée de la même manière que précédemment.

Les résultats montrent que l' $\alpha$ -pinène semble également être un inducteur des mécanismes de synthèse de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase lorsqu'il est utilisé comme unique source de carbone et d'énergie au cours des cultures (**tableau IV.n**). La seule présence d' $\alpha$ -pinène ne suffit donc pas à induire la production de lyase pendant la culture, il s'agit également d'assurer l'absence d'autres sources de carbones possédant une action répressive. Ce mécanisme de régulation par les sources de carbones présentes, couplant des phénomènes d'induction et de répression, est similaire à celui de la « répression catabolique » (voir le chapitre I.3.3.1).

Les résultats des différentes combinaisons préculture / culture confirment également les observations du paragraphe précédent et montrent bien l'importance de l'étape de préculture pendant la phase de production du biocatalyseur. En effet, pour une même source de carbone utilisée en culture ( $\alpha$ -pinène), la concentration en enzyme dans la biomasse peut varier d'un facteur 10 suivant que l'on utilise du glucose ou de l' $\alpha$ -pinène comme substrat carboné au cours de la préculture (**tableau IV.n**). Les résultats obtenus avec du lactate de sodium dans la préculture restent ambigus comparativement à ceux obtenus avec de l' $\alpha$ -pinène. Il est en effet difficile de trancher entre un éventuel effet répressif de cette première source de carbone (bien moins important qu'avec le glucose) ou une amélioration des performances de la souche due à des repiquages successifs sur  $\alpha$ -pinène.

L'influence de la source de carbone précédemment mise en évidence en préculture et les phénomènes de « répression catabolique » présents au cours de la culture semblent

#### IV. Caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase

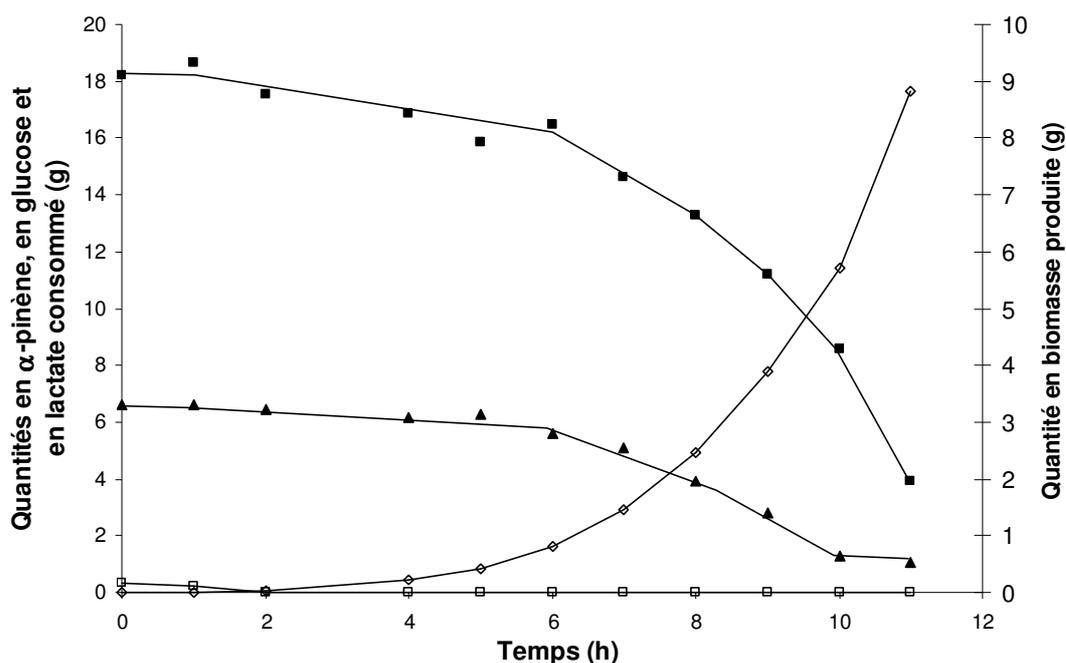
Source(s) de carbone <sup>1)</sup>		$L$ (mg.g <sup>-1</sup> ) <sup>2)</sup>
Préculture	Culture	
lactate	$\alpha$ -pinène	44,5
lactate	$\alpha$ -pinène + glucose	20,7
lactate	glucose	1,8
$\alpha$ -pinène	$\alpha$ -pinène	42,4

a – Source(s) de carbone utilisée(s) en préculture (fiolle Erlenmeyer) et en culture réalisée en bioréacteur selon le protocole décrit dans le paragraphe II.1.2.4.

b – Quantité spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase produite pour 1 g de biomasse obtenue. Cette valeur est obtenue grâce à la relation IV.15.

Lactate : lactate de sodium.

**Tableau IV.o.** Effets des conditions de préculture et de culture sur la production spécifique d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase en bioréacteur.



**Figure IV.24.** Consommation des sources de carbone (glucose (-■-),  $\alpha$ -pinène (-▲-) et lactate de sodium (-□-)) et production de biomasse (-◇-) pendant une culture en réacteur de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Phase aqueuse : 4,2 L de milieu MBP contenant le glucose (18,2 g). Phase organique : solution d' $\alpha$ -pinène (6,5 g) dans 200 mL d'hexadécane. Aération : 30 L.h<sup>-1</sup>. Agitation : 500 rpm pendant les 9 premières heures, 600 rpm de 9 à 10 h puis 700 rpm de 10 à 11 h. Température : 30°C. Le pH est régulé à 6 par ajout de soude 1 mol.L<sup>-1</sup>. Inoculum : 250 mL de préculture en fiolle Erlenmeyer sur lactate de sodium (par. II.1.2.2). Bilan carbone : 87 %.

s'exercer de façon additionnelle. Ainsi, la meilleure combinaison consiste à utiliser l' $\alpha$ -pinène en préculture et en culture permettant une production spécifique de lyase de 31,6 mg.g<sup>-1</sup>. Inversement, le lactate de sodium et surtout le glucose possèdent un rôle néfaste sur la production de l'enzyme, aussi bien en préculture qu'en culture et ce y compris en présence d' $\alpha$ -pinène. Des expériences similaires sont alors réalisées en bioréacteur. Les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

#### IV.6.4. Influence des procédés de production du biocatalyseur

Les combinaisons culture / préculture les plus pertinentes sont appliquées à la production du biocatalyseur à l'échelle du bioréacteur selon le protocole détaillé dans le chapitre Matériels et Méthodes (par. II.1.2.4).

Conformément aux résultats précédents, l'utilisation de l' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone et d'énergie permet d'obtenir le plus de lyase avec 44,5 mg.g<sup>-1</sup> (**tableau IV.o**). De même, l'effet inhibiteur du glucose sur la production de lyase est clairement mis en évidence, ce qui semble une fois de plus lié aux effets antagonistes du glucose et de l' $\alpha$ -pinène précédemment observés.

On remarque néanmoins des différences par rapport aux résultats obtenus en fiole. La nature de la source de carbone utilisée en préculture n'influe plus sur la teneur finale en lyase (**tableau IV.o**). Une augmentation globale des productions spécifiques de l'enzyme est également observée ; celle-ci est multipliée par 2,6 en présence d' $\alpha$ -pinène seul et multipliée par 4 en présence de glucose combiné avec l' $\alpha$ -pinène. Une activité de base est également observée pour une combinaison lactate / glucose (**tableau IV.o**).

L'utilisation d'un bioréacteur pour ces cultures permet de garantir une émulsion complète des phases, aboutissant ainsi à l'établissement de surfaces d'échanges importantes (voir la section bibliographie paragraphe I.3.2.1). Ces conditions facilitent les interactions entre les cellules en croissances, présentent dans la phase aqueuse, et l'inducteur ( $\alpha$ -pinène), présent dans la phase organique, alors que les interactions cellules / glucose sont préférées au cours des cultures réalisées en fioles Erlenmeyer.

Ces observations mettent en évidence un phénomène compétitif qui diffère du modèle classique de répression catabolique. En effet, l'analyse du déroulement de la culture réalisée en réacteur sur  $\alpha$ -pinène / glucose montre que l'emploi des deux sources de carbone se fait de façon simultanée et non pas selon un processus de diauxie (**figure IV.24**).

Il semble donc que la présence d'une autre source de carbone plus facilement assimilable que l' $\alpha$ -pinène dans le milieu de culture ralentisse la synthèse des enzymes de la voie de dégradation de l' $\alpha$ -pinène et qu'à l'inverse, plus les bactéries se développent longtemps sur  $\alpha$ -pinène seul, plus la teneur en lyase dans la biomasse est élevée.

Les différences de productivité observées entre les deux procédés de culture peuvent également s'expliquer par l'établissement, fortement probable, d'une limitation par l'apport en oxygène en fiole Erlenmeyer. Le phénomène est atténué en réacteur par l'application d'un débit d'aération ( $30 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ) et l'augmentation de l'agitation à deux reprises (**figure IV.24**).

#### IV.6.5. Conclusions - discussions

Les résultats montrent clairement que l' $\alpha$ -pinène est une source de carbone possédant un effet inducteur puissant sur l'expression des gènes responsables de la production de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. La présence d'autres sources de carbones (glucose, lactate) empêche son action selon un mécanisme proche de celui de la répression catabolique chez *Pseudomonas*. Les observations concluent néanmoins à des phénomènes compétitifs et non préférentiels, ce qui diffère des modèles classiques décrits dans la littérature. Dans ce cas précis, l'utilisation d'un réacteur agité peut permettre d'augmenter la disponibilité en composés inducteurs lorsqu'il existe une différence de solubilité dans l'eau entre les sources de carbone employées.

Cette étude suggère que l'apport en oxygène dans le milieu de culture joue également un rôle dans les mécanismes d'induction de la lyase. L'utilisation d'un réacteur aéré peut ainsi être à l'origine de l'augmentation globale de la production spécifique de lyase observée.

### IV.7. Conclusions du chapitre

Le travail présenté dans ce chapitre a permis d'isoler l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase des constituants de la biomasse et de mettre en évidence le rôle de ces derniers dans le procédé de production de l'isonovalal précédemment mis au point. Les résultats montrent que leur présence influe sur le turn-over et l'activité apparente de l'enzyme. En effet, la présence dans la biomasse d'agents de surface contribuent à protéger l'enzyme contre une inactivation à l'interface eau / hexadécane et stabilise une émulsion, facilitant les transferts de masse au niveau de cette même interface. Les composés à l'origine de ces deux phénomènes n'ont pas été clairement identifiés mais leurs effets ont pu être complètement substitués, voir optimisés, respectivement par l'utilisation de SAB et de Triton X100.

Au final, les performances obtenues avec l'enzyme purifiée ou en présence des constituants de la biomasse sont similaires. Seule l'affinité de l'enzyme pour son substrat affiche une valeur plus importante en absence des constituants de la biomasse, ce qui implique de meilleures performances cinétiques de l'enzyme purifiée dans des conditions de limitation par l'apport en substrat. Cependant, dans la mesure où le substrat n'a pas montré d'effet inhibiteur (des bioconversions ont notamment déjà été réalisées efficacement avec des concentrations initiales en  $\alpha$ -pinène oxyde supérieures à 500 g.L<sup>-1</sup>; FONTANILLE et LARROCHE, 2003), il est peu probable que ce genre d'évènement soit envisagé dans un procédé optimisé de production de l'isonovalal.

La purification de la lyase implique donc une perte importante du biocatalyseur et une perte totale des agents de surfaces contenus dans la biomasse sans augmenter les performances de l'enzyme. L'ajout d'une étape de purification de l'enzyme dans le procédé de production de l'isonovalal présente donc un intérêt limité.

Dans une approche plus fondamentale, la purification de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 a permis de recueillir un certain nombre d'informations sur sa structure, ses propriétés cinétiques, certains de ses mécanismes d'inactivation et sur l'expression de son (ses) gène(s).

L' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 est constituée de 2 sous-unités identiques de 22000 Da pour lesquels 10 acides aminés N-terminaux et 5 acides aminés internes ont été séquencés (SQTEN KKGFK et WTQEE, respectivement). Ces sous-unités ont été coupées par digestion trypsique et les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les éléments recueillis ne correspondent à aucune donnée contenue dans les bases informatiques ou dans la littérature préexistante, ce qui indique que la lyase de *P.rhodesiae* n'a fait l'objet d'aucune étude de caractérisation à ce jour.

Des informations sur les propriétés cinétiques de l'enzyme ont également pu être recueillies ; l'enzyme possède une activité spécifique maximale ( $r_{Smax}$ ) de 97  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , une constante de Michaelis ( $K_{SA}$ ) de 27  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ainsi qu'un turn-over de l'ordre de 230000  $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Au moins 3 mécanismes d'inactivation de l'enzyme ont été mis en évidence. Le premier est lié à la présence d'une interface eau / hexadécane entraînant une diminution du turn-over de l'enzyme purifiée. Cet effet a pu être empêché par l'ajout de SAB dans le milieu réactionnel. Le second, de type temps-dépendant, est lié à la présence d'isonovalal dans la phase organique et semble être également de nature interfaciale. Des simulations mathématiques ont montré que ce phénomène n'était pas le mécanisme d'inactivation

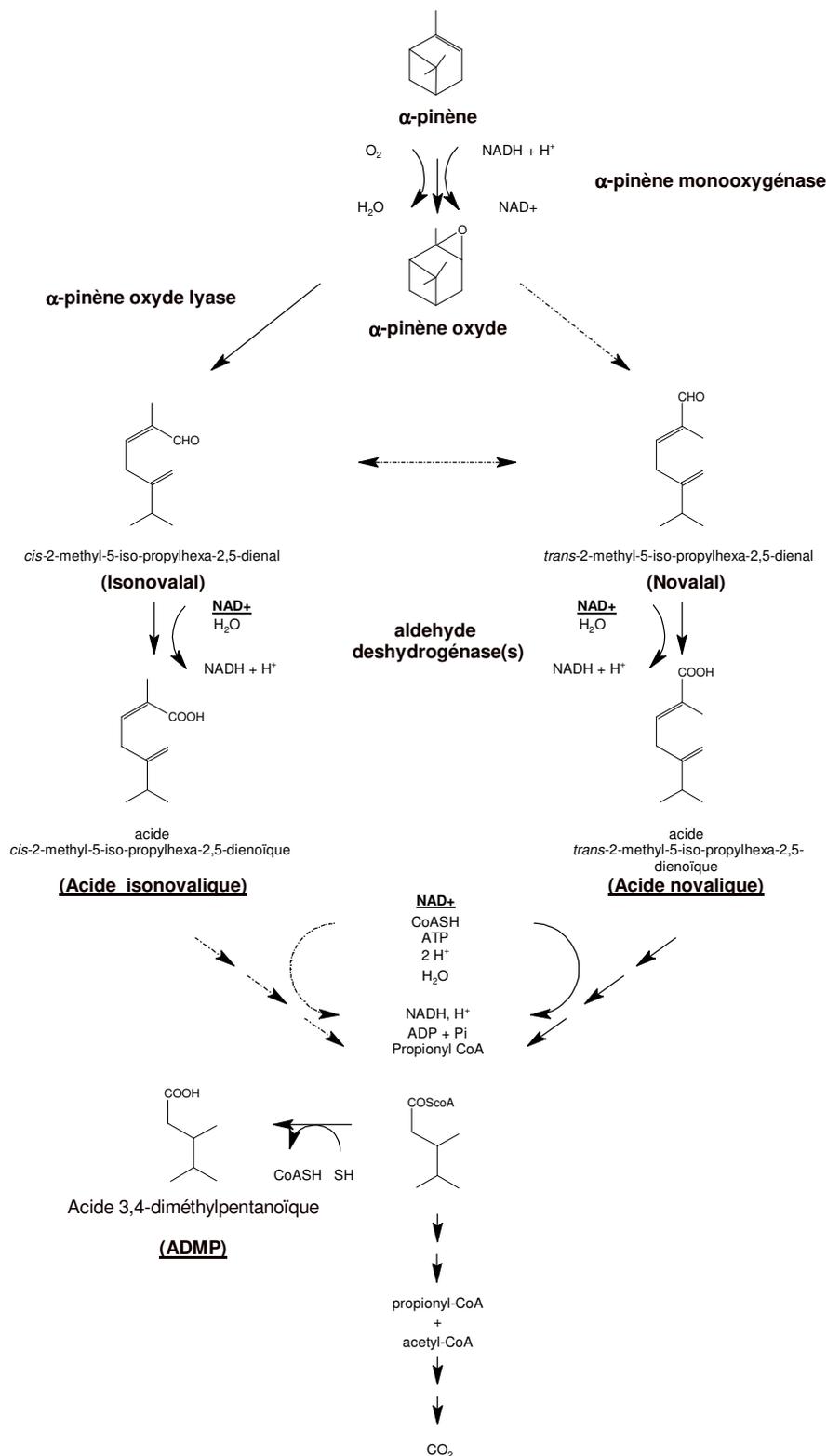
principal de la réaction. L'enzyme, qui est inactivée après un nombre donné de molécules de précurseurs consommés ( $\approx 230000$ ) quelles que soient les vitesses de réactions, semble vraisemblablement subir une inactivation de type « catalyse-sucide ».

L'étude apporte enfin des éléments sur la régulation de l'expression du ou des gène(s) responsable(s) de la synthèse de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. L' $\alpha$ -pinène possède un fort pouvoir inducteur lorsqu'il est utilisé comme unique source de carbone au cours de la croissance cellulaire, contrairement à l'utilisation des autres sources de carbone testées (glucose et lactate) qui présentent un effet répressif. L'utilisation, au cours d'une culture en réacteur, de l' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone plutôt que d'un mélange  $\alpha$ -pinène / glucose permet ainsi de produire une biomasse possédant une teneur en lyase deux fois plus importante. L'apport en oxygène dans le milieu de culture semble également influencer le mécanisme d'induction de la lyase. Ce point sera repris dans le chapitre suivant, consacré à la production des métabolites acides de la voie des composés « nova », comprenant une approche plus globale de cette voie métabolique.

V. Production des métabolites acides  
de la voie métabolique des composés

« novas »

---



**Figure V.1.** Schéma de dégradation de l' $\alpha$ -pinène via les composés « novas ». Les flèches en pointillés représentent des étapes métaboliques encore mal définies. Les réactions sont détaillées dans le paragraphe I.5.4.2.

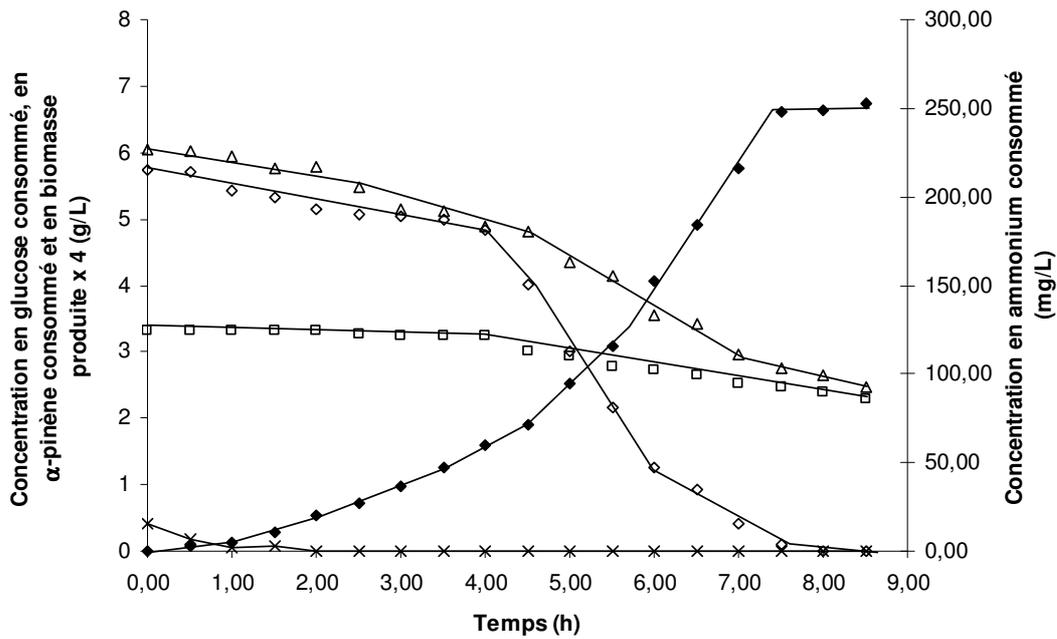
## V.1. Introduction

Les acides organiques constituent généralement une matière première de choix dans la production d'esters aux propriétés aromatiques souvent appréciées (voir le paragraphe I.5.4.4). En cela, les métabolites acides issues de la voie métabolique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène selon les composés « novas », tels l'acide *trans*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-diénoïque (ou acide novalique) et l'acide 3,4-diméthylpentanoïque (ADMP), présentent un intérêt potentiel pour l'industrie des parfums. L'étude de cette voie métabolique a ainsi fait l'objet de nombreux travaux qui ont récemment abouti à une description relativement précise de ses étapes terminales (par. I.5.4.2). Par contre, exceptée l'étape de décyclisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal évoquée dans le chapitre précédent, les étapes initiales de la voie métabolique restent encore mal définies (**figure V.1**). Les incertitudes concernent notamment les voies d'obtention du novalal (qui peut provenir d'une décyclisation directe de l' $\alpha$ -pinène oxyde ou d'une isomérisation de l'isonovalal) et de L'ADMP, qui semble provenir indifféremment de la dégradation de l'acide novalique ou de l'acide isonovalique.

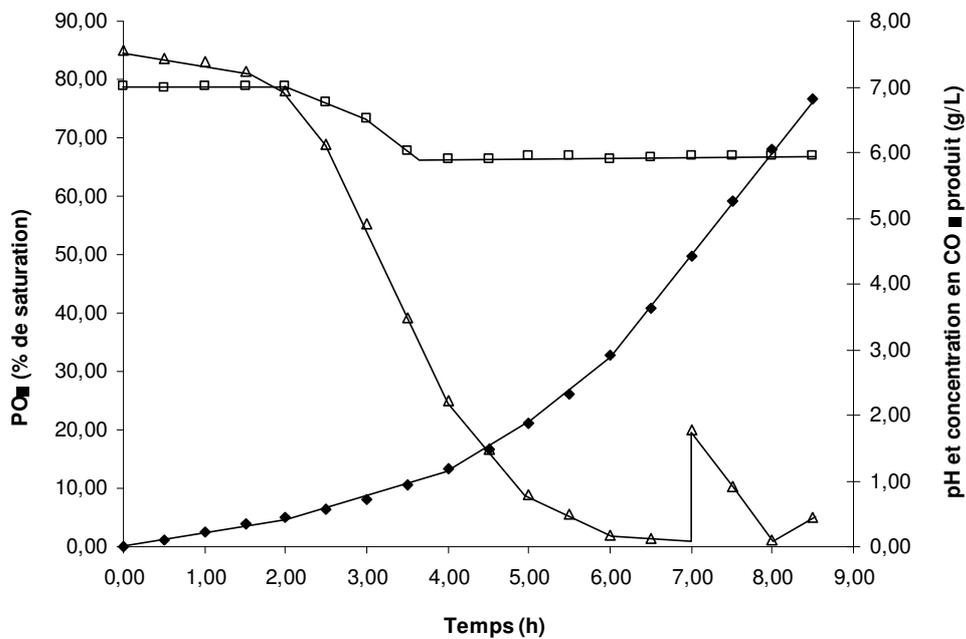
L'objectif de ce chapitre est d'apporter des informations sur le déroulement des étapes initiales de cette voie métabolique et de mettre en évidence les conditions nécessaires à la production et à l'accumulation des métabolites acides d'intérêt. Une partie des résultats présentés a fait l'objet d'une publication (LINARES et al., 2008b).

De la même façon que pour la production de l'isonovalal abordée dans les chapitres précédents, le microorganisme employé pour la bioconversion reste la souche bactérienne *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 car celle-ci possède la capacité de dégrader l' $\alpha$ -pinène selon la voie métabolique des composés « novas ».

Mis à part la souche bactérienne, la problématique propre à la production des métabolites acides apparaît comme très différente. En effet, contrairement à la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal, réalisée par une enzyme cofacteur-indépendante (l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase), certaines des étapes métaboliques mises en évidence nécessitent des cofacteurs. Des études ont notamment montré que des cofacteurs de type NAD<sup>+</sup> étaient nécessaires à l'oxydation des aldéhydes en leurs acides respectifs (GRIFFITHS et al., 1987a) et à la réalisation d'une série d'étapes de type  $\beta$ -oxydatives (ZORN et al., 2004). L'ajout direct de ce cofacteur dans le milieu réactionnel étant proscrit en raison de son coût élevé, deux alternatives restent possibles. Dans un premier cas de figure, l'apport en cofacteurs peut être assuré par l'introduction dans le milieu réactionnel d'un système de régénération par



**Figure V.2.** Consommation des sources de carbone (glucose (-Δ-), α-pinène (-□-) et lactate de sodium (-x-)), consommation de la source d'azote (-◇-) et production de biomasse (-◆-) au cours d'une culture en réacteur de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 (II.1.2.4). La phase aqueuse est constituée de 4,2 L de milieu MBP (II.1.2.1) contenant du glucose. La phase organique est une solution d'α-pinène dans 200 mL d'hexadécane. Aération : 30 L.h<sup>-1</sup>. Agitation : 500 rpm pendant les 7 premières heures puis 800 rpm. Le pH est régulé à 6 par ajout de soude 1 mol.L<sup>-1</sup>. Température : 30°C. Inoculum : 250 mL d'une préculture en fiole Erlenmeyer sur lactate de sodium (II.1.2.2).



**Figure V.3.** Production de CO<sub>2</sub> (-◇-), pression partielle en oxygène dissous (-Δ-) et pH (-□-) au cours de la culture présentée dans la figure V.2.

couplage chimique ou enzymatique *in situ* (par. I.3.3.3.2). Néanmoins, ce type de procédé risque d'entraîner une complexification importante du milieu réactionnel. La deuxième possibilité, celle retenue pour cette étude, utilise la chaîne respiratoire des cellules pour assurer la réoxydation des cofacteurs réduits au cours de la bioconversion. La mise en oeuvre d'un tel procédé nécessite la préservation de l'intégrité cellulaire du biocatalyseur.

## V.2. Etude de faisabilité

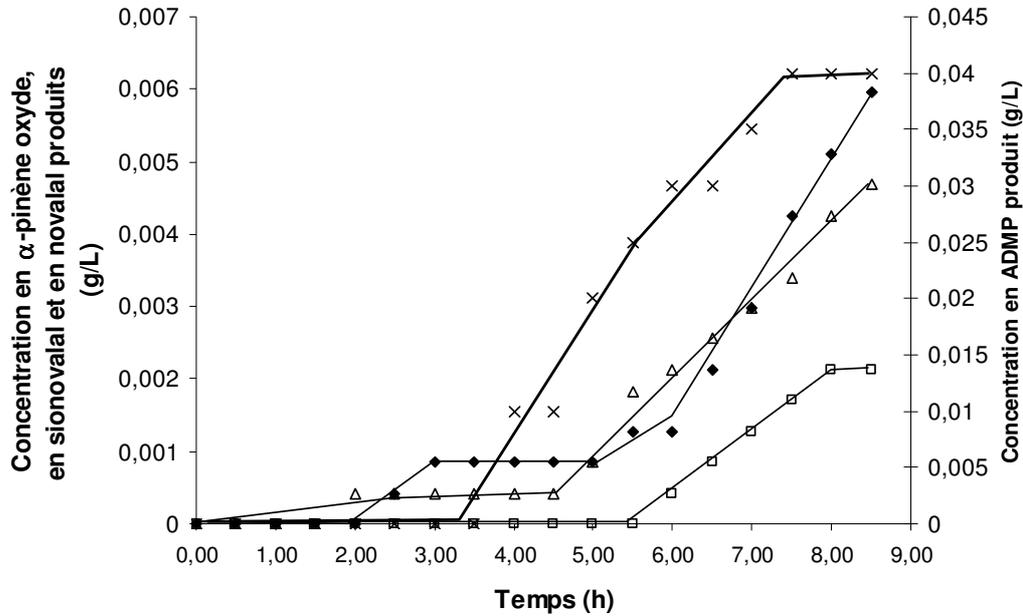
L'objectif de cette partie est de faire ressortir les stratégies nécessaires à la mise au point d'un procédé de production de l'acide novalique par des cellules vivantes de *P.rhodesiae*. En plus du choix de la souche bactérienne, le deuxième paramètre déterminé *a priori* est l'utilisation d'un système biphasique eau / solvant organique comme milieu de bioconversion. La première étape de l'étude consiste à voir si le microorganisme est capable d'accumuler les métabolites acides au cours de sa croissance cellulaire.

### V.2.1. Bioconversions mettant en œuvre un biocatalyseur en phase de croissance

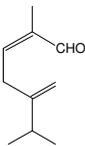
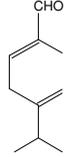
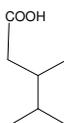
Les cultures de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 sont effectuées en bioréacteur agité et aéré, contenant un milieu liquide biphasique eau / hexadécane 20/1 (v/v) (voir Matériels et Méthodes, paragraphe II.1.2). Les sources de carbones utilisées sont l' $\alpha$ -pinène et le glucose. Dans ce paragraphe, les concentrations sont exprimées par rapport au volume de phase aqueuse.

Un exemple type de déroulement d'une culture est donné dans les **figures V.2** et **V.3**. Les résultats montrent que la culture débute directement par une phase de croissance exponentielle pour un taux de croissance  $\mu_{\max} = 0,48 \text{ h}^{-1}$ . La mesure de la pression partielle en oxygène permet de déceler une limitation par l'oxygène à 6,5 h et de l'atténuer par augmentation de la vitesse d'agitation. Cette mesure permet de maintenir la phase exponentielle jusqu'à 7,5 h, après quoi la croissance s'arrête en raison de l'épuisement de la source d'azote.

Les principaux métabolites observés sont, outre le dioxyde de carbone qui est majoritaire, l' $\alpha$ -pinène oxyde, l'isonovalal, le novalal et l'acide 3,4-diméthylpentanoïque (ADMP) quantifiés par analyse de la phase organique et de la phase aqueuse par CPG (**figure V.4**) et identifiés par spectrométrie de masse (**tableau V.a**). Les spectres de l'isonovalal et du



**Figure V.4.** Production d' $\alpha$ -pinène oxyde (-◆-), d'isovalal (-□-), de novalal (-△-) et d'acide 3,4-diméthylpentanoïque (-x-) au cours d'une culture en réacteur de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491 présentée dans les figures V.2 et V.3.

Nom	Molécule	Spectre de masse
$\alpha$ -pinène oxyde		67 (100), 109 (58,5), 83 (41,4), 137 (35,4), 82 (32,6), 81 (29,4), 95 (26,2), 55 (24,8), 69 (22,1), 119 (8,7), $M^{+}$ ; 152 (0,5)
Isonovalal		109 (100), 81 (33,2), 95 (25,4), 91 (21,7), 67 (19,8), 53 (14,9), 137 (23,5), 55 (14,6), 119 (11,4), 123 (10,5), $M^{+}$ ; 152 (1,1)
Novalal		109 (100), 81 (37,2), 67 (24,9), 95 (22,9), 137 (21,8), 55 (16,7), 53 (14,8), 91 (12,6), 123 (13,2), 119 (7,6), 123 (13,2), $M^{+}$ ; 152 (0,7)
Acide 3,4-diméthyl pentanoïque (ADMP)		73 (100), 71 (75,3), 43 (48,0), 41 (38,0), 70 (37,6), 88 (34,8), 55 (21,8), 69 (20,9), 60 (19,4), 39 (16,2), 97 (3,8) <sup>a)</sup> 73 (100), 43 (73), 71 (72), 41 (65), 70 (37), 88 (30), 69 (29), 55 (27), 60 (20), 97 (4), 39 (2,8) <sup>b)</sup>

a- Résultats de cette étude.

b- Selon LATZA (2002).

**Tableau V.a.** Identification par spectrométrie de masse des métabolites intermédiaires de la dégradation de l' $\alpha$ -pinène. Les échantillons proviennent d'une culture réalisée dans les mêmes conditions que la figure V.2.

V. Production des métabolites acides de la voie « nova »

Elément	C	H	O	N	S	P	cendres
Constitution (% massique)	45,97	6,87	20,35	13,09	0,51	2,86	10,35

**Tableau V.b.** Résultats de l'analyse de la composition de la biomasse effectuée par le C.N.R.S après 9 h de croissance. La formule élémentaire de la fraction biotique de la biomasse (exprimée en mole de carbone) est ainsi  $CH_{1,793}O_{0,332}N_{0,244}S_{0,004}P_{0,024}$ , ce qui correspond à une masse C-molaire de 22,9 g et à un rapport massique C/N de 3,51.

Carbone consommé (gC.L <sup>-1</sup> )			Carbone produit (gC.L <sup>-1</sup> )			Rendements et bilan carbone (gC.gC <sup>-1</sup> )			
Glucose	$\alpha$ -pinène	Lactate de sodium	Biomasse <sup>a)</sup>	CO <sub>2</sub>	Produits CPG <sup>b)</sup>	Y <sub>X/S</sub> <sup>c)</sup>	Y <sub>CO<sub>2</sub>/S</sub> <sup>d)</sup>	Y <sub>P/S</sub> <sup>e)</sup>	Bilan <sup>f)</sup>
0,71	1,24	0,16	0,66	1,20	0,03	0,31	0,57	0,01	<b>0,89</b>

a- Calculé à partir du tableau V.b.

b- Le terme « produits CPG » regroupe tous les composés présentés dans le tableau V.a, quantifiés par analyse par chromatographie en phase gazeuse de la phase organique et de la phase aqueuse.

$$c- Y_{X/S} = \frac{\text{biomasse produite}}{(\text{glucose} + \alpha\text{-pinène} + \text{lactate de sodium})\text{consommés}}$$

$$d- Y_{CO_2/S} = \frac{CO_2 \text{ produit}}{(\text{glucose} + \alpha\text{-pinène} + \text{lactate de sodium})\text{consommés}}$$

$$e- Y_{P/S} = \frac{\text{produits CPG accumulés}}{(\text{glucose} + \alpha\text{-pinène} + \text{lactate de sodium})\text{consommés}}$$

$$f- \text{Bilan C} = \frac{\text{Somme du carbone produit}}{\text{Somme du carbone consommé}}$$

**Tableau V.c.** Bilan carbone au bout de 7 h de culture réalisée dans les mêmes conditions que la figure V.2.

Ammonium consommé (gN.L <sup>-1</sup> )	Biomasse produite (gN.L <sup>-1</sup> )	Bilan azote (gN.gN <sup>-1</sup> )
0,20	0,19	<b>0,95</b>

**Tableau V.d.** Bilan azote au bout de 7 h de culture réalisée dans les mêmes conditions que la figure V.2.

novalal correspondent à ceux précédemment mis en évidence (paragraphe III.3.1.2). L'ADMP est le métabolite intermédiaire le plus accumulé au cours de la culture (0,04 g.L<sup>-1</sup> de phase aqueuse). Il est détecté principalement dans la phase aqueuse, contrairement aux autres métabolites qui s'accumulent dans la phase organique. Son spectre de masse correspond avec celui précédemment mis en évidence par LATZA (2002) (**tableau V.a**).

Les bilans matière, aussi bien en carbone qu'en azote, sont établis en calculant les rendements par régression linéaire en utilisant la composition de la biomasse obtenue sur un milieu MBP, telle qu'elle figure dans le **tableau V.b**. Les résultats montrent que les taux de récupération du carbone et de l'azote sont respectivement de 89 et 95 %, (**tableau V.c et V.d**), il est donc possible de considérer que le procédé de culture et les techniques analytiques employées sont relativement bien maîtrisées. L'analyse des bilans carbone montre qu'une grande partie du carbone consommé est utilisé pour la synthèse de la biomasse (31 %) ou entièrement oxydé en CO<sub>2</sub> (57 %), ce qui indique que le microorganisme possède un métabolisme fortement oxydatif. L'accumulation des métabolites issus de la voie de dégradation de l' $\alpha$ -pinène selon les composés « novas » est un phénomène marginal puisqu'il ne représente que 1 % du carbone consommé. L'accumulation de l'ADMP est faible (0,02 g.g<sup>-1</sup> de biomasse) et celle de l'acide novalique n'est pas observée.

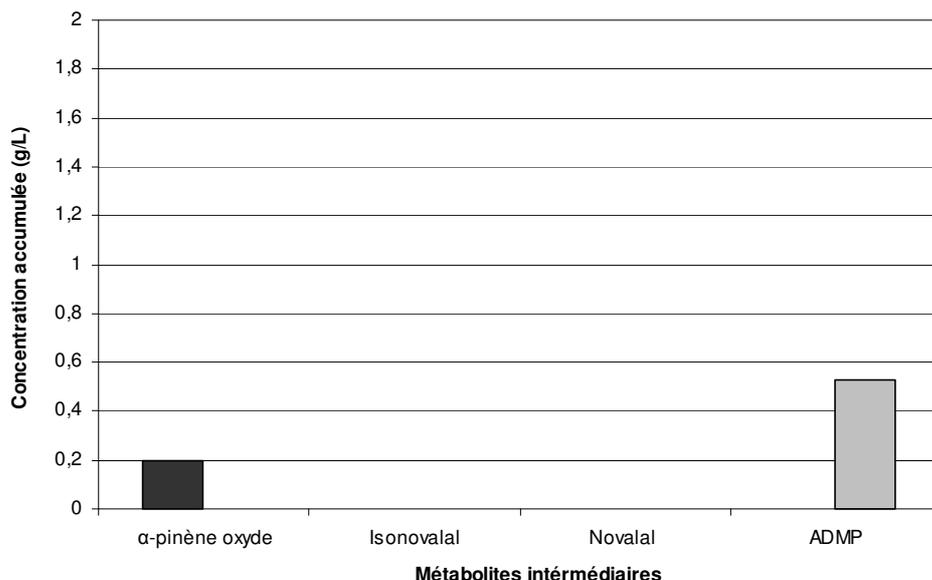
## **V.2.2. Bioconversions mettant en œuvre un biocatalyseur concentré en phase stationnaire**

### V.2.2.1. Introduction

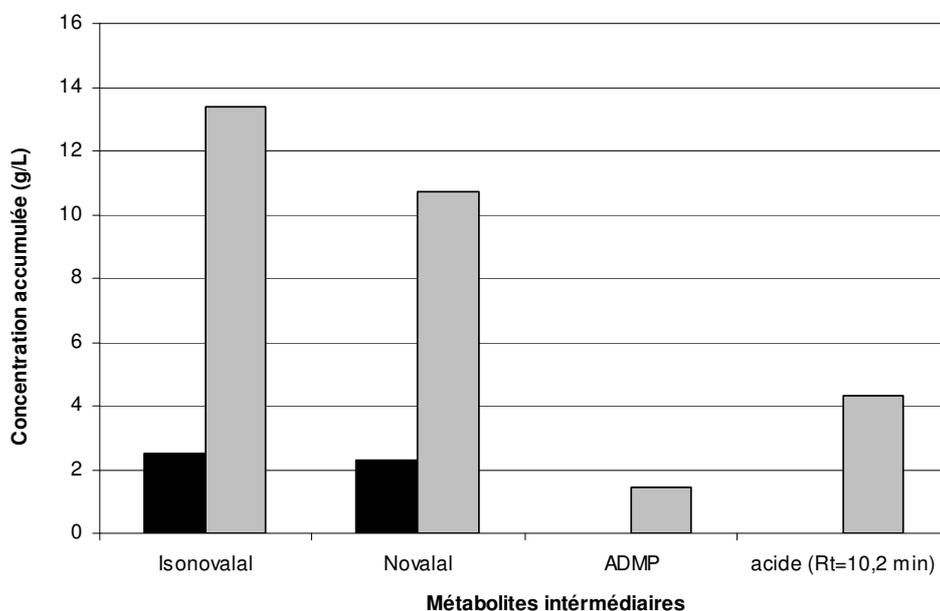
Les résultats précédents conduisent à tester les performances obtenues avec des cellules non proliférantes utilisées à fortes concentrations. Ceci revient à utiliser de la biomasse obtenue par une culture préalable sur  $\alpha$ -pinène et glucose, concentrée par centrifugation et remise en suspension dans un milieu ne contenant pas d'azote. L'étude de ces conditions devrait permettre une amélioration des vitesses réactionnelles et des rendements de bioconversion des différents métabolites.

### V.2.2.2. Bioconversion de l' $\alpha$ -pinène par des cellules non proliférantes

Les bioconversions sont réalisées en fioles Erlenmeyer de 250 mL et en condition biphasique 1/1 (v/v). La phase aqueuse est constituée de 25 mL de biomasse concentrée issue



**Figure V.5.** Accumulation des métabolites intermédiaires dans la phase organique après 24 h de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène par 25 mL de biomasse fraîche concentrée dans du milieu MBP (rectangles noirs) ou dans du tampon phosphate (rectangles clairs). Les bioconversions se déroulent en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup> et une phase organique constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène (60 g.L<sup>-1</sup>) dans 25 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.



**Figure V.6.** Accumulation des métabolites intermédiaires dans la phase organique après 24 h de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène-oxyde par 25 mL de biomasse fraîche concentrée dans du milieu MBP (rectangles noirs) ou dans du tampon phosphate (rectangles clairs). Les bioconversions se déroulent en fiole Erlenmeyer dans les mêmes conditions que la figure V.5.

de la culture détaillée dans le paragraphe précédent. La biomasse est concentrée dans un tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5). Un milieu de culture contenant une source d'azote (le MBP, décrit dans le paragraphe II.1.2.1) est également utilisé à titre comparatif. Contrairement aux chapitres III et IV, la biomasse est ici utilisée dans son intégralité sous forme non perméabilisée, dite « fraîche » (voir le paragraphe II.1.5). La phase organique est constituée d'une solution du substrat dans 25 mL d'hexadécane et les concentrations sont ici exprimées en g.L<sup>-1</sup> de phase organique.

Les résultats obtenus au bout de 24 h de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène (rassemblés dans la **figure V.5**) montrent que les conditions appliquées permettent une accumulation significative de l'ADMP (0,07 g.g<sup>-1</sup> de biomasse contre 0,02 g.g<sup>-1</sup> au cours de la culture). Le phénomène d'accumulation de l'ADMP est obtenu uniquement lorsque le milieu utilisé est un tampon phosphate dépourvu d'azote. Cette nécessité de supprimer l'azote est en accord avec les données de la partie V.2.1, ce qui montre qu'une accumulation de ces métabolites est incompatible avec une croissance cellulaire.

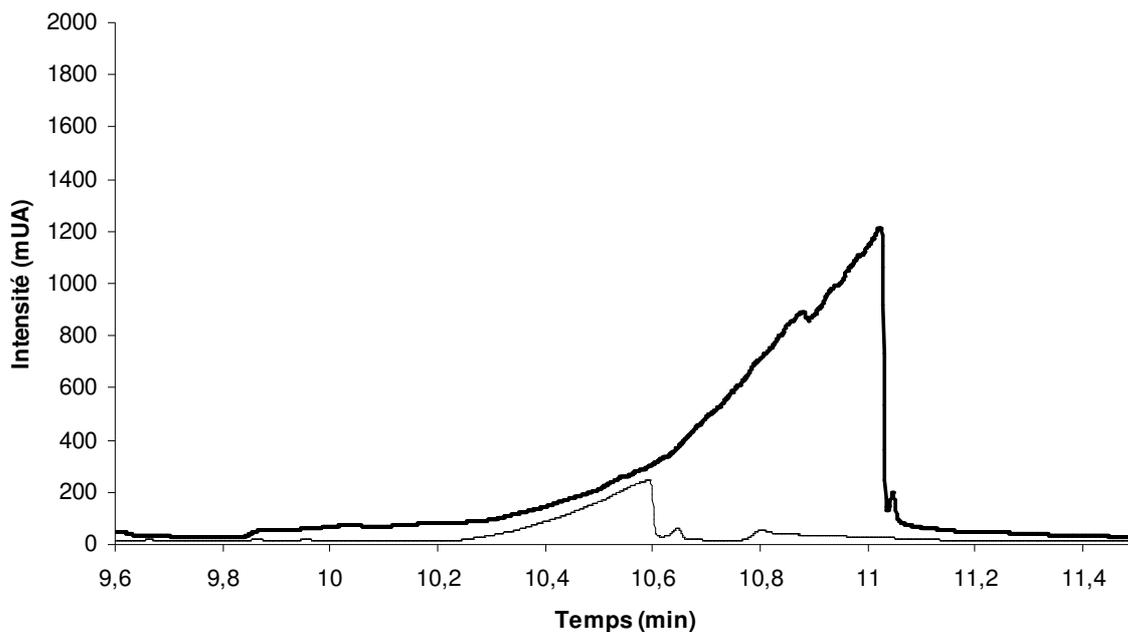
#### V.2.2.3. Bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par des cellules non proliférantes

En plus de jouer sur l'état physiologique du microorganisme (cellules en croissance ou en phase stationnaire) et sur sa concentration, il est possible de limiter les étapes métaboliques situées en amont des réactions enzymatiques d'intérêt (production des métabolites acides) en changeant le substrat. Les expérimentations précédentes sont alors à nouveau effectuées à partir de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde.

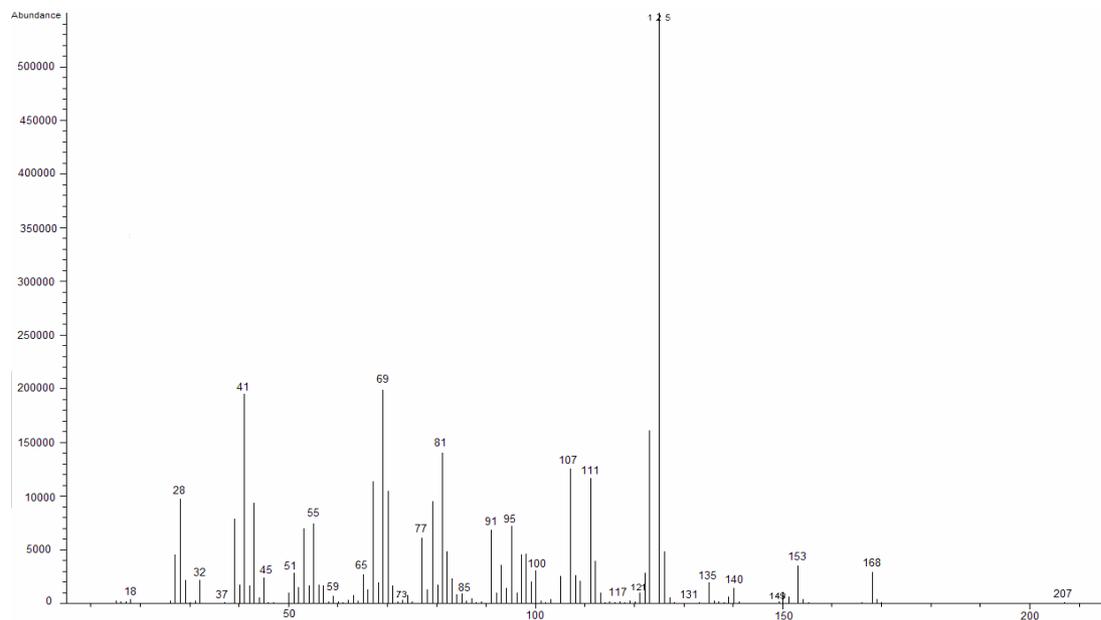
Les résultats observés au bout de 24 h sont présentés dans la **figure V.6**. Ici aussi, la nature de la phase aqueuse exerce une influence significative ; les phénomènes d'accumulation (notamment pour les métabolites acides) sont plus importants lorsque le microorganisme est utilisé en phase stationnaire. On remarque également une plus grande richesse dans la nature des métabolites biologiques détectés. En effet, outre les aldéhydes (isonovalal et novalal), on retrouve l'ADMP et un autre métabolite acide possédant un temps de rétention de 10,2 min. Ce dernier est identifié dans le paragraphe suivant.

#### V.2.2.4. Identification et stabilité des métabolites produits

L'analyse par CPG-SM de la phase organique issue de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde réalisée dans le paragraphe précédent permet d'identifier l'isonovalal, le novalal et



**Figure V.7.** Chromatogrammes obtenus par analyse de CPG de la phase organique au cours de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde (voir la figure V.6) après 8 h de bioconversion (trait fin) et après 24 h de bioconversion (trait épais). Les conditions d'analyse sont détaillées dans le paragraphe II.3.3.1.



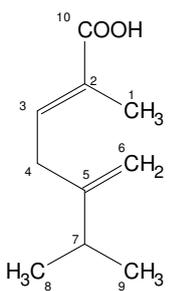
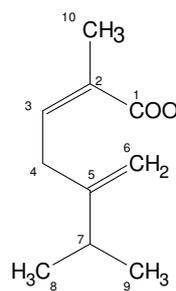
**Figure V.8.** Spectre de masse de l'acide 2-méthyle-5-isoproylhexa-2,5-dienoïque. Les conditions d'analyse sont détaillées dans le paragraphe II.3.3.3.

l'ADMP (voir le **tableau V.a**). Le chromatogramme met également en évidence l'apparition d'un pic de une forme allongée caractéristique et dont le temps de rétention démarre à 10,2 min (**figure V.7**). Le spectre de masse correspondant permet d'identifier l'acide 2-méthyle-5-isoproylhexa-2,5-dienoïque (**figure V.8**) mais ne permet pas de conclure quant à la conformation *cis* ou *trans* de la molécule. De plus, la forme de ce pic a tendance à se brouiller au cours de la bioconversion et son identité devient de moins en moins évidente (**figure V.7**).

Les acides produits sont alors analysés par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Ils sont d'abord séparés des produits neutres par extraction alcaline dans un solvant organique plus volatile (hexane) (par. II.3.2.2). L'extraction complète des acides est validée par analyse CPG de la phase organique de départ (résultats non présentés). L'hexane est éliminé de l'échantillon par évaporation et le concentré d'acide est analysé par RMN du  $^{13}\text{C}$ . Les pics majoritaires obtenus permettent d'identifier l'acide *trans*-2-méthyle-5-isoproylhexa-2,5-dienoïque ou acide novalique, conformément aux observations de GRIFFITHS et al. (1987) ainsi que de TUDROSZEN et al. (1977) (**tableau V.e**). D'autres pics sont visibles sur le spectre mais la ligne de base est trop chaotique pour arriver à identifier leur origine (voir le document **annexe C**). Les principaux signaux obtenus au cours de l'analyse par spectrométrie RMN du  $^1\text{H}$  correspondent également à ceux de l'acide novalique (le spectre est présenté dans le document **annexe E**). Les pics restants correspondent à ceux précédemment mis en évidence aux cours de l'analyse par RMN  $^1\text{H}$  de l'acide isonovalique (isomère *cis*) présentée dans le chapitre III (par. III.4.1.1) (**tableau V.f**). L'aire relative du pic situé à 2,9 ppm (caractéristique de l'acide novalique) et celle du pic à 3,3 ppm (caractéristique de l'acide isonovalique) permet d'estimer un ratio acide novalique / acide isonovalique proche de 5 / 1.

La stabilité des métabolites produits est testée dans les conditions de bioconversion et en présence d'une biomasse inactive (la biomasse est inactivée par autoclavage à 120°C, 10 min). Les résultats montrent une bonne stabilité du novalal dans le milieu de bioconversion utilisé (**figure V.9**); aucune isomérisation spontanée des aldéhydes n'est observée. On remarque par contre une diminution de la concentration en isonovalal, corrélée avec une augmentation de l'aire du pic correspondant à l'acide novalique. Ceci est lié à la dégradation chimique, décrite dans le chapitre III (par. III.4.1.1), de l'isonovalal en acide isonovalique. Le pic de ce dernier se confond avec celui de l'acide novalique, en raison de la proximité de leur temps de rétention (9,8 et 10,2 min, respectivement). Ces résultats montrent que l'acide novalique est en fait le seul produit de la réaction d'origine biotique.

V. Production des métabolites acides de la voie « nova »

 <b>Acide <i>trans</i>-2-méthyle-5-isoproylhexa-2,5-dienoïque</b> <b>ou</b> <b>acide novalique</b>	Carbone N°	Acide novalique (isomère <i>trans</i> )		Acide	Acide isonovalique (isomère <i>cis</i> )		 <b>Acide <i>cis</i>-2-méthyle-5-isoproylhexa-2,5-dienoïque</b> <b>ou</b> <b>acide isonovalique</b>
		$\delta$ (ppm) <sup>a)</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>b)</sup>		$\delta$ (ppm) <sup>c)</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>a)</sup>	
	1	12,0	12,1	11,9	20,6	20,5	
	2	152,3	154,1	152,3	154,2	154,1	
	3	142,9	144,6	143,0	144,1	144,6	
	4	29,7	34,6	33,6	34,2	34,6	
	5	127,6	126,9	127,9	126,6	126,9	
	6	108,7	107,9	108,7	107,9	107,9	
	7	33,6	35,2	34,2	34,6	35,2	
	8 et 9	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	
	10	171,8	173,7	173,6	171,6	173,7	

a- Valeurs rapportées par GRIFFITHS et al. (1987a).

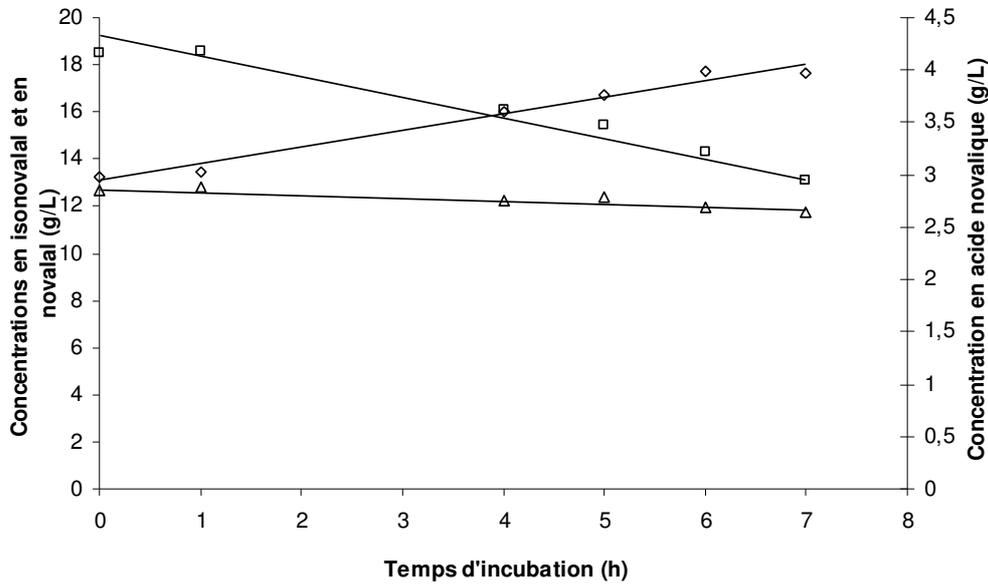
b- Valeurs rapportées par TUDROSZEN et al (1977).

c- Valeurs observées pour l'acide majoritairement produit après 24 h de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde (voir la figure V.6).

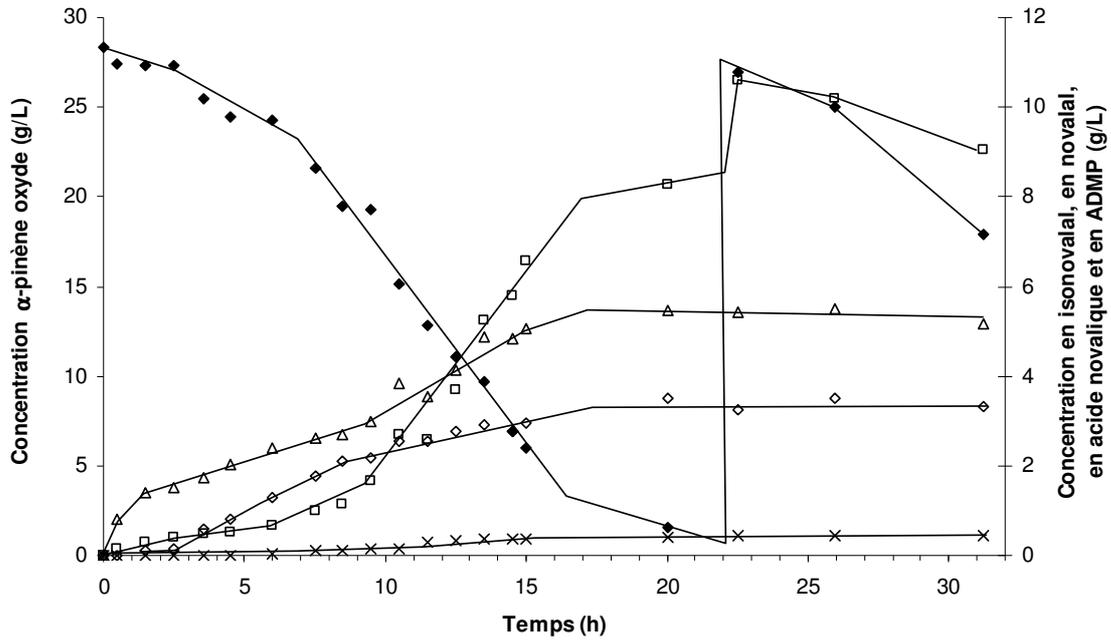
**Tableau V.e** Analyses par RMN du  $^{13}\text{C}$  du produit acide de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par des cellules fraîches de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au TMS.

Acide novalique (majoritaire)					Acide isonovalique (minoritaire)			
$\delta$ (ppm)	Signal	proton(s) concerné(s)	J (Hz)	Proton(s) du carbone N°	$\delta$ (ppm)	Signal	proton(s) concerné(s)	J (Hz)
/	/	/	/	1	1,95	s	3H	/
6,97	t	1H	7,5	3	6,13	t	1H	7,5
2,92	d	2H	7,5	4	3,29	d	2H	8,0
4,83	s	1H	/	6	4,80	s	1H	/
4,69	s	1H	/	6	4,69	s	1H	/
2,26	m	1H	7,0	7	2,26	m	1H	7,0
1,05	d	6H	6,5	8 + 9	1,05	d	6H	6,5
1,86	s	3H	/	10	/	/	/	/

**Tableau V.f** Analyses par RMN du  $^1\text{H}$  des produits acides de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par des cellules fraîches de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au TMS (s : singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet, J : constante de couplage).



**Figure V.9.** Stabilité de l'isovalal (-□-) du novalal (-Δ-) et de l'acide novalique (-◇-) en condition biphasique eau / hexadécane et en présence de biomasse inactive. L'incubation est réalisée en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse inactive concentrée à  $7 \text{ g.L}^{-1}$  dans un tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,5) et 25 mL d'une phase organique provenant d'une bioconversion ultérieure. Agitation : 200 rpm. Température :  $30^\circ\text{C}$ .



**Figure V.10.** Consommation de l'alpha-pinène oxyde (-◆-) et accumulation de l'isonovalal (-□-), du novalal (-△-), de l'ADMP (-×-) et de l'acide novalique (-◇-) au cours d'une bioconversion de l'alpha-pinène oxyde par 25 mL de biomasse fraîche concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup> dans un tampon phosphate. La bioconversion est réalisée en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant une solution d'alpha-pinène oxyde dans 25 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

#### V.2.2.5. Déroulement d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde

La production des métabolites « novas » accumulés dans la phase organique au cours d'une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par de la biomasse concentrée dans un tampon phosphate est suivie pendant 32 h (**figure V.10**). Les résultats obtenus montrent que les cinétiques d'accumulation changent au cours du temps. Pendant les 3 premières heures, le métabolite principalement accumulé est le novalal, après quoi l'accumulation de l'acide novalique démarre au dépend du novalal. Après 9 h, la vitesse d'accumulation de l'acide novalique diminue au profit des vitesses d'accumulation du novalal et surtout de l'isonovalal. Excepté pour l'isonovalal, l'accumulation des métabolites stoppe après une durée de bioconversion estimée à 17 h. L'arrêt de l'accumulation des composés « novas » semble lié à une limitation par l'apport en substrat. Néanmoins, un ajout d' $\alpha$ -pinène oxyde à la 22<sup>ème</sup> heure n'entraîne pas d'accumulation supplémentaire de l'acide novalique, de l'ADMP ou du novalal. A ce stade, le biocatalyseur semble donc avoir perdu la faculté d'accumuler ces métabolites.

Les concentrations maximales observées dans la phase aqueuse affichent des valeurs faibles (0,07, 0,14, 0,05, 0,14 et 0,55 g.L<sup>-1</sup> de phase aqueuse pour l' $\alpha$ -pinène oxyde, l'isonovalal, le novalal, l'acide novalique et l'ADMP, respectivement). Ces résultats indiquent que, excepté pour l'ADMP, ces métabolites s'accumulent majoritairement dans la phase organique.

#### V.2.3. Conclusions de l'étude de faisabilité

Ces résultats montrent que des cellules de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 maintenues en phase stationnaire possèdent la faculté de produire et d'accumuler de l'ADMP et de l'acide novalique à partir de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde. En effet, l'oxydation de l' $\alpha$ -pinène en  $\alpha$ -pinène oxyde, NADH dépendante, semble être une étape très lente, ralentissant considérablement les vitesses de bioconversion.

La production satisfaisante d'acide novalique obtenue au cours des travaux préliminaires conduit la suite de l'étude à se focaliser sur l'optimisation de la production de ce métabolite. Celui-ci est, de plus, facilement récupérable car il s'accumule quasiment uniquement dans la phase organique, à partir de laquelle il peut être entièrement extrait par une solution alcaline faiblement concentrée (NaOH 0,2 mol.L<sup>-1</sup>). Un procédé en deux temps, qui consiste en une étape de production du biocatalyseur par culture cellulaire puis en une

Source(s) de carbone utilisée(s) en culture <sup>a)</sup>	Production de l'acide novalique au cours de la bioconversion <sup>b)</sup>		
	$r_{AN}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$C_{AN}$ max (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{AN/S}$ (%)
$\alpha$ -pinène oxyde et glucose	0,0	0,0	0,0
$\alpha$ -pinène oxyde	0,1	1,1	3,6
Lactate et $\alpha$ -pinène	0,2	1,6	6,0
Glucose et $\alpha$ -pinène	0,3	3,0	24,5
Lactate	0,4	2,1	31,0
<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	<b>1,6</b>	<b>15,1</b>	<b>53,0</b>

a- Les cultures sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 2 L contenant 1 L de milieu MBP (II.1.2.1). Les concentrations initiales en source de carbone sont les suivantes (en g.L<sup>-1</sup> de phase aqueuse) :  $\alpha$ -pinène : 3,8 g.L<sup>-1</sup>, lactate : 2 g.L<sup>-1</sup>, glucose : 10 g.L<sup>-1</sup>. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C. L'*inoculum* provient d'une préculture en fiole Erlenmeyer de 500 mL contenant 250 mL de MBP et du lactate de sodium (5 g.L<sup>-1</sup>).

b- Vitesse de production ( $r_{AN}$ ), concentration maximale ( $C_{AN}$  max) et rendement de production ( $Y_{AN/S}$ ) de l'acide novalique. Ces valeurs sont mesurées au cours de bioconversions réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup> (cultivée dans les conditions décrites en (a)) et 25 mL d'une phase organique constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans de l'hexadécane (30 g.L<sup>-1</sup>). Des ajouts séquentiels d' $\alpha$ -pinène oxyde sont réalisés de façon à empêcher les limitations par l'apport en substrat. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

**Tableau V.g.** Influence de la source de carbone utilisée en culture sur les paramètres de production de l'acide novalique par bioconversion.

étape de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde utilisant le biocatalyseur concentré en phase stationnaire, est ainsi proposé.

La concentration maximale d'acide novalique obtenue à ce stade est proche de  $3,5 \text{ g.L}^{-1}$  de phase organique pour une vitesse d'accumulation de  $0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  et un rendement massique proche de 24 % (en  $\text{g.L}^{-1}$  d'acide novalique produit par  $\text{g.L}^{-1}$  d' $\alpha$ -pinène oxyde). La suite de l'étude consiste à augmenter ces dernières valeurs en optimisant successivement les étapes de culture cellulaire et de bioconversion.

## V.3. Croissance cellulaire et induction du biocatalyseur

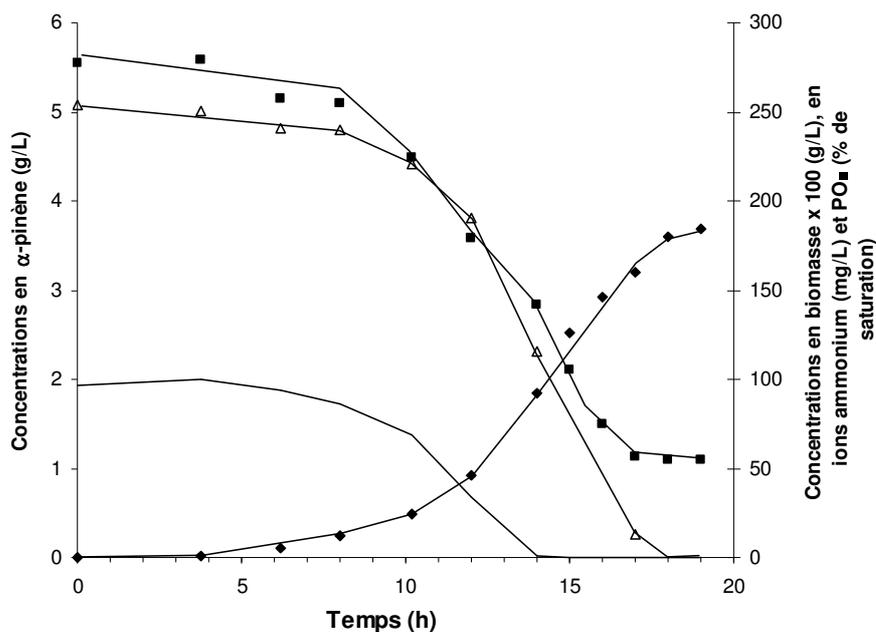
### V.3.1. Introduction

L'objectif du travail présenté dans cette partie est de déterminer les conditions de culture nécessaire à la production d'un biocatalyseur permettant une bioconversion efficace de l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique. Cette efficacité est mesurée, au cours de la bioconversion, par trois paramètres qui sont la vitesse de production ( $r_{AN}$  en  $\text{g.L.h}^{-1}$ ), la concentration maximale ( $C_{AN \text{ max}}$  en  $\text{g.L}^{-1}$ ) et le rendement de production massique ( $Y_{AN/S}$  en %) de l'acide novalique. La concentration en acide novalique produit est considérée comme étant directement proportionnelle à l'aire du pic obtenu par analyse de CPG et possédant un temps de rétention de 10,2 min. Dans cette partie, les concentrations seront exprimées en  $\text{g.L}^{-1}$  de phase organique au cours des bioconversions et en  $\text{g.L}^{-1}$  de phase aqueuse au cours des cultures cellulaires.

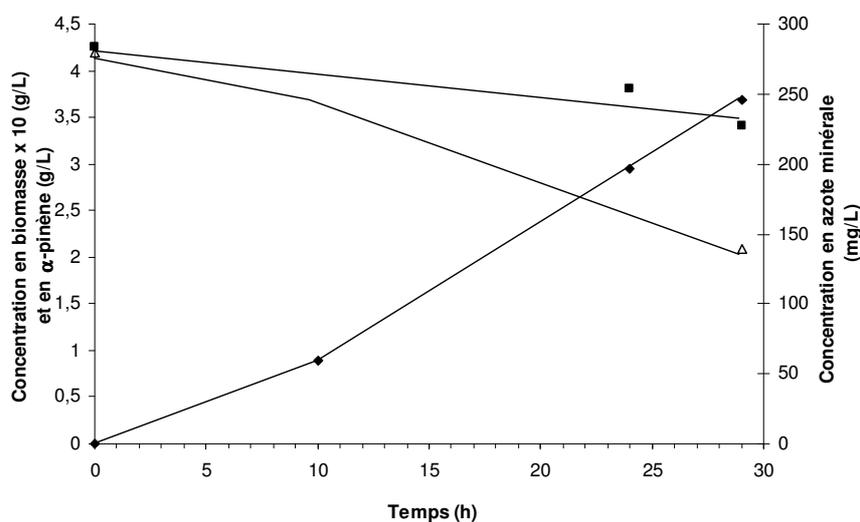
Les résultats du chapitre précédent ont montrés que la production d' $\alpha$ -pinène oxyde lyase au cours de la culture cellulaire dépendait fortement de la source de carbone utilisée (par. IV.6). Il semble donc pertinent, dans un premier temps, d'estimer l'effet de la ou des source(s) de carbone utilisée(s) pendant la croissance cellulaire sur l'activité des enzymes responsables de la production de l'acide novalique. Les conditions de culture testées premièrement en fiole Erlenmeyer sont ensuite adaptées à l'échelle d'un bioréacteur.

### V.3.2. Choix de la source de carbone

Plusieurs cultures sont réalisées en fiole Erlenmeyer avec différentes sources de carbone dont l' $\alpha$ -pinène, l' $\alpha$ -pinène oxyde, le lactate et le glucose. Les biomasses obtenues en fin de culture sont récupérées et concentrées par centrifugation (par. II.1.4), leur aptitude à



**Figure V.11.** Evolution des concentrations en biomasse (-♦-), en azote minéral (-Δ-), en  $\alpha$ -pinène (-■-) et de la pression partielle en oxygène PO<sub>2</sub> (—) mesurées du cours du temps pour une croissance en bioréacteur de 4,5 L (par. II.1.2.4). La source de carbone est l' $\alpha$ -pinène. Température : 30°C. Agitation : 500 rpm. Aération : 30 L.h<sup>-1</sup>. Le pH est régulé à 6 par une solution de soude 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. Le bilan carbone est de 86 % et le bilan azote de 91 % (ces bilans sont effectués selon la méthode décrites dans le paragraphe V.2.2).



**Figure V.12.** Evolution des concentrations en biomasse (-♦-), en azote minéral (-Δ-) et en  $\alpha$ -pinène (-■-) mesurées au cours d'une croissance en fiole Erlenmeyer de 2 L contenant 1L de milieu MBP (par. II.1.2.3). La source de carbone est l' $\alpha$ -pinène. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm. Pas d'aération ni de contrôle du pH.

bioconvertir l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique est ensuite mesurée par des bioconversions en fiole Erlenmeyer de 250 mL, en condition biphasique eau / hexadécane (par. II.3.1).

Les résultats obtenus montrent que la biomasse issue d'une culture sur  $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone permet de produire une quantité d'acide bien supérieure aux autres biomasses (**tableau V.g**). Dans ces conditions, une concentration maximale en acide novalique de 15,1 g.L<sup>-1</sup> est atteinte alors que les concentrations maximales obtenues avec les autres sources de carbone ne dépassent pas les 4 g.L<sup>-1</sup>. Le rendement massique obtenu est de 53 % et la vitesse de production est de 1,6 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

L' $\alpha$ -pinène induit donc le matériel enzymatique nécessaire à la synthèse de l'acide novalique et la présence d'autres sources de carbone (lactate, glucose) atténue cet effet inducteur. Ce mécanisme d'induction est proche de celui de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase observé dans le chapitre précédent (par. IV.6). Ces résultats suggèrent donc un mécanisme d'induction commun pour l'ensemble des enzymes responsables de la synthèse de l'acide novalique. Au cours de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde, l'étape enzymatique limitante deviendrait alors la dégradation de cet acide, ce qui aboutirait à son accumulation.

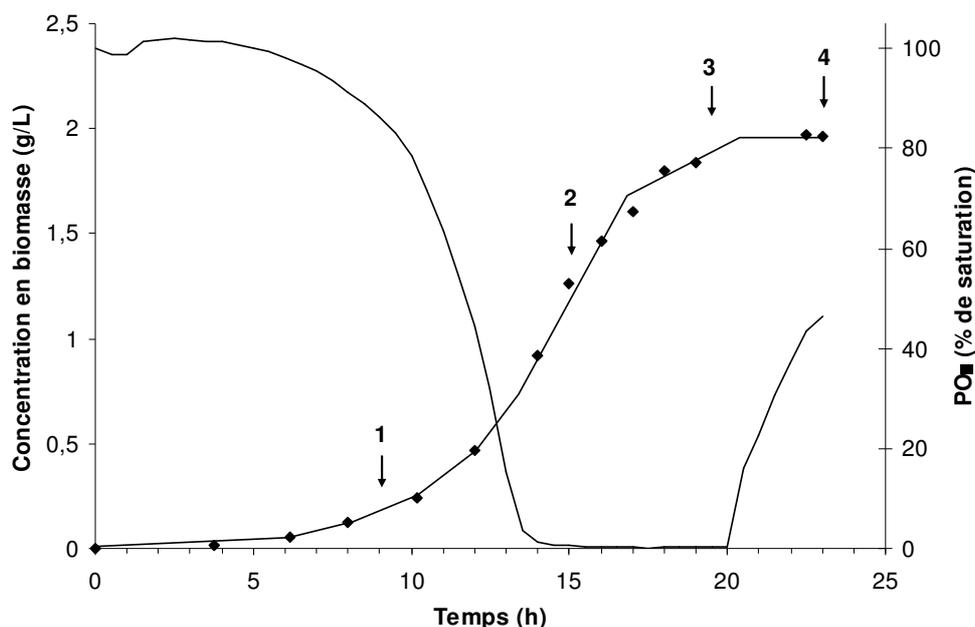
### V.3.3. Mise à l'échelle du procédé de culture

#### V.3.3.1. Etude préliminaire

Les cultures en fioles Erlenmeyer sont des procédés simples à mettre en œuvre mais permettent difficilement de mesurer et de contrôler certains paramètres de culture comme le pH ou l'aération. Ceci est d'autant plus vrai que la culture se déroule en condition biphasique. Une culture en bioréacteur de 4,5 L de volume utile, utilisant l' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone, est alors réalisée afin d'augmenter la quantité de biomasse produite.

L'aptitude de cette biomasse à bioconvertir l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique est testée selon les conditions indiquées dans le paragraphe précédent. Les performances obtenues sont les suivantes :  $r_{AN}=1,5$  g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>,  $C_{AN \text{ max}}=12,7$  g.L<sup>-1</sup>,  $Y_{AN/S}=31,0$  %. On remarque que la concentration maximale et le rendement massique de production de l'acide novalique est plus important lorsque la biomasse est issue d'une culture en fiole Erlenmeyer (**tableau V.g**). L'utilisation d'un bioréacteur permet donc d'augmenter la quantité de biomasse produite mais diminue son activité.

Les déroulements des cultures réalisées en bioréacteur et en fiole Erlenmeyer sont présentés dans les **figure V.11** et **V.12**, respectivement. Parmi les différences notables entre



**Figure V.13.** Evolution de la concentration en biomasse (-♦-) et de la pression partielle en oxygène (—) mesurées du cours du temps pour une série de cultures en bioréacteur dans les conditions décrites dans la figure V.11. Les cultures sont interrompues à différents temps (flèches numérotées) : (1) arrêt en début de phase exponentielle de croissance (2) arrêt en milieu de phase de croissance (3) arrêt en début de phase stationnaire (4) arrêt en fin de phase stationnaire.

Temps d'arrêt de la culture (h) <sup>a)</sup>	Durée de la limitation par l'oxygène (h) <sup>b)</sup>	Production de l'acide novalique au cours de la bioconversion <sup>c)</sup>		
		$r_{AN}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$C_{AN}$ max (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{AN/S}$ (%)
9	0	1,1	9,4	15
15	1	0,7	7,8	27
19	5	1,6	12,7	31
23	5	1,6	14,1	34

a- Les cultures sont réalisées et interrompues dans les conditions illustrées dans la figure V.13.

b- Cette durée correspond à la différence entre le temps total de culture et le temps au bout duquel commence la limitation par l'O<sub>2</sub> (14 h).

c- Ces valeurs sont mesurées au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde (30 g.L<sup>-1</sup> d'hexadécane) réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL (par. II.3.1).

**Tableau V.h.** Influence de la durée de la culture en bioréacteur sur l'aptitude de la biomasse à accumuler de l'acide novalique au cours de la bioconversion.

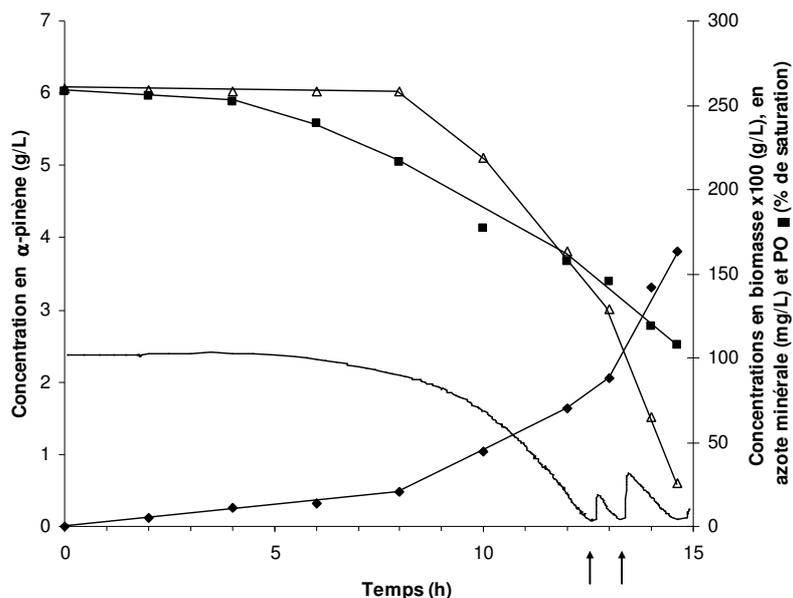
les deux procédés de culture susceptibles d'expliquer ces disparités, on remarque que la culture en réacteur est interrompue après 19 h en début de phase stationnaire (la source d'azote est entièrement consommée) (**figure V.11**), alors que la culture en fiole est interrompue pendant la phase de croissance (les sources de carbone et d'azote sont présentes en quantités encore significatives) (**figure V.12**). La phase et la durée de culture sont donc susceptibles de jouer un rôle sur l'efficacité de la biomasse ; ces deux paramètres doivent être étudiés.

On remarque également que la culture en réacteur subit une limitation par l'oxygène. Cette limitation est clairement mise en évidence en cours de culture en bioréacteur par la mesure de la pression partielle en oxygène dissous ( $PO_2$ ) devenant nulle à partir de 13 h (**figure V.11**). Il semble également que la culture en fiole Erlenmeyer subit une limitation par l'oxygène plus forte encore, bien que non mesurable, étant donné l'absence d'un système d'aération dans ce procédé. Cette limitation se traduit par une croissance linéaire observée entre 10 et 29 h (**figure V.12**). La limitation par l'oxygène en cours de culture sera le troisième paramètre étudié.

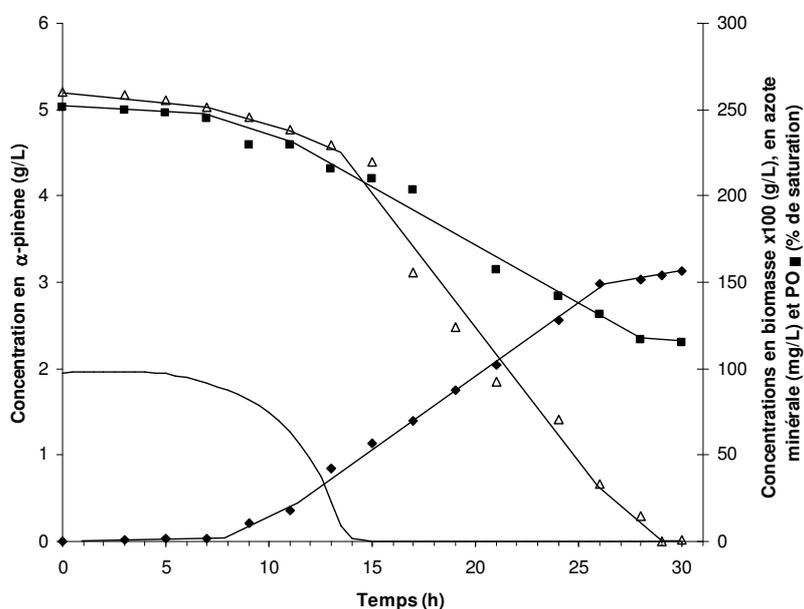
### V.3.3.2. Influence du temps culture

Plusieurs cultures sont réalisées en réacteur dans les mêmes conditions que précédemment. Ces cultures sont interrompues au bout de différents temps correspondant à différentes phases de culture, comme illustré dans la **figure V.13**. L'arrêt à 9 h de culture a lieu en début de phase exponentielle de croissance, celui à 15 h en milieu de phase de croissance, celui à 19 h en début de phase stationnaire et celui à 23 h en fin de phase stationnaire. Les biomasses à chaque fois récupérées sont concentrées à la même valeur ( $7 \text{ g.L}^{-1}$ ), leur performance est ensuite mesurée de la même façon que précédemment.

Le **tableau V.h** représente les activités obtenues avec ces différentes biomasses. Contrairement aux résultats attendus, la biomasse issue de la culture interrompue en phase de croissance (15 h) n'affiche pas l'activité la plus forte. Les biomasses interrompues en phase stationnaire restent les plus efficaces et l'interruption de la culture en fin de phase stationnaire permet d'obtenir une biomasse possédant une  $r_{AN}$  et une  $C_{AN \text{ max}}$  comparables à celles obtenues en fiole Erlenmeyer (**tableau V.g**). Néanmoins, le rendement de production de l'acide novalique reste encore nettement inférieur (30 % contre 50 % en fiole) et semble être d'autant plus important que la durée de limitation par l'oxygène subie par la biomasse est élevée (**tableau V.h**). La limitation par l'oxygène en cours de culture semble avoir une



**Figure V.14.** Evolution des concentrations en biomasse (-◆-), en azote minéral (-Δ-), en  $\alpha$ -pinène (-■-) et de la pression partielle en oxygène  $PO_2$  (-) mesurées du cours d'une croissance en bioréacteur de 4,5 L (par. II.1.2.4). Température : 30°C. Agitation : 500 rpm. Aération : 30 L.h<sup>-1</sup>. La limitation par l'oxygène a été atténuée par augmentation de l'agitation à 12,5 h (500 à 600 rpm) et à 13 h (600 à 800 rpm) (flèches). Le pH est régulé à 6 par une solution de soude 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. Le bilan carbone est de 87 % et le bilan azote de 93 %.



**Figure V.15.** Evolution des concentrations en biomasse (-◆-), en azote minéral (-Δ-), en  $\alpha$ -pinène (-■-) et de la pression partielle en oxygène  $PO_2$  (-) mesurées du cours du temps pour une croissance en bioréacteur avec une agitation de 500 rpm et un débit d'aération maintenu à 9 L.h<sup>-1</sup>. Les autres conditions expérimentales sont décrites dans la figure V.14. Le bilan carbone est de 98 % et le bilan azote de 83 %.

influence positive sur l'efficacité de la biomasse obtenue.

### V.3.3.3. Effet de la limitation par l'oxygène

L'hypothèse du paragraphe précédent est appuyée par la réalisation de cultures en réacteur selon deux approches opposées. Dans un premier temps, une culture est réalisée en évitant une limitation par l'oxygène, notamment en augmentant l'agitation à deux reprises (12,5 h et 13 h) ce qui permet une élévation de la  $PO_2$  (**figure V.14**). Dans un second temps, une culture est réalisée avec un débit d'aération plus faible ( $9 \text{ L.h}^{-1}$ ), ce qui entraîne une diminution du taux de croissance et permet de faire subir à la biomasse une limitation par l'oxygène de 26 h (**figure V.15**).

L'activité des biomasses obtenues montre clairement une influence positive de la limitation par l'oxygène au cours de la croissance cellulaire sur l'aptitude de la biomasse à accumuler l'acide novalique (**tableau V.i**). La biomasse obtenue en conditions de limitation par l' $O_2$  affiche finalement une activité semblable à celle initialement produite en fiole Erlenmeyer.

Il faut également remarquer qu'une absence de limitation par l' $O_2$  en cours de culture entraîne une augmentation importante de la vitesse de consommation de l' $\alpha$ -pinène oxyde pendant la bioconversion (**tableau V.i**), ce qui indique une augmentation de l'activité de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. Cette hypothèse est confirmée par un dosage de la quantité de lyase présente dans les biomasses,  $L$  ( $\text{mg.g}^{-1}$ ), selon les méthodes décrites dans le chapitre précédent. Les résultats confirment qu'une absence de limitation par l'oxygène en cours de culture induit la production de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase (**tableau V.i**). Ce phénomène entraîne une élévation du rendement de production des aldéhydes ( $Y_{IN/S}$ ) aux dépens de celui de l'acide novalique ( $Y_{AN/S}$ ).

### V.3.4. Conclusions - Discussions

Cette première étape de l'étude a permis de montrer que l'utilisation en culture d' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone et l'application d'une limitation par l'oxygène produit un biocatalyseur possédant de fortes aptitudes à bioconvertir l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique.

Ce phénomène peut être la résultante d'une induction différée des enzymes de la voie métabolique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène selon les conditions de culture (**figure V.16**). En absence d' $\alpha$ -pinène (conditions de culture 1), aucune de ces enzymes ne semblent être

Conditions de culture <sup>a)</sup>	Durée de la limitation par l'oxygène (h)	Activité de la biomasse au cours de la bioconversion <sup>b)</sup>					L (mg.g <sup>-1</sup> ) <sup>e)</sup>
		r <sub>AN</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	C <sub>AN</sub> max (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>AN/S</sub> (%)	r <sub>S</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>c)</sup>	Y <sub>IN/S</sub> (%) <sup>d)</sup>	
Réacteur (sans limitation par l'oxygène)	0	0,85	6,6	8,0	6,4	81,5	<b>44</b>
Réacteur (limitation par l'oxygène)	9	1,6	14,0	34,0	4,7	35,3	/
Réacteur (forte limitation par l'oxygène)	26	1,6	14,2	47,0	4,0	29,0	<b>25</b>
Fliale Erlenmeyer	>19	1,6	15,1	53	3,4	30,7	<b>30</b>

a- Les déroulements des cultures sont présentés dans les figures V.14., V.15, V.11 et V.12, successivement.

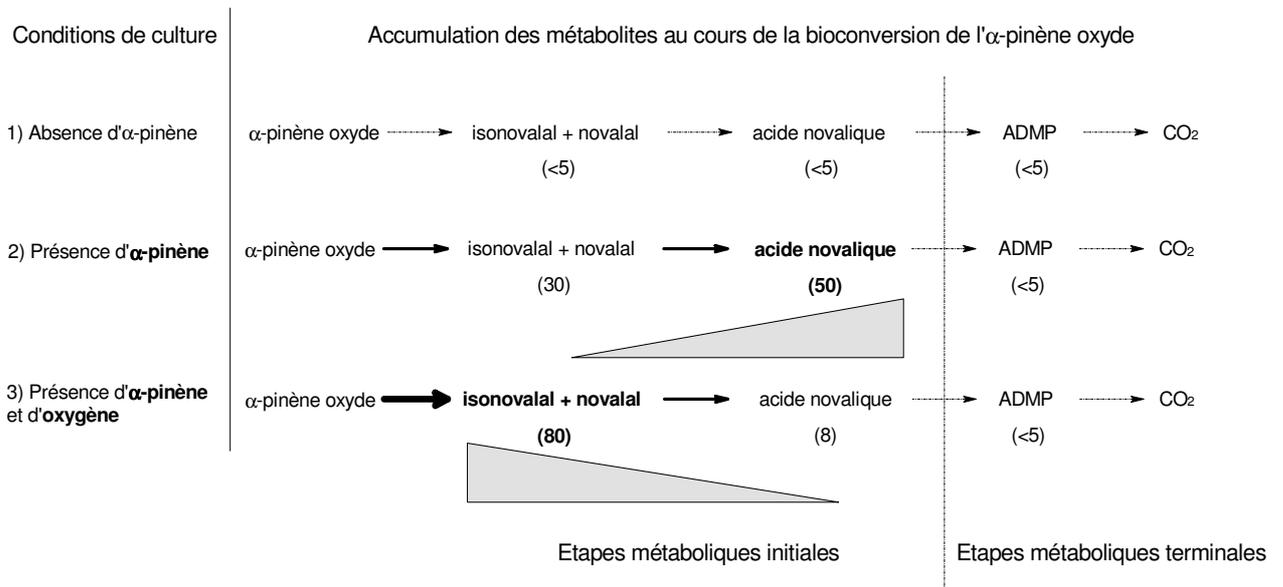
b- Ces valeurs sont mesurées au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde (30 g.L<sup>-1</sup> d'hexadécane) réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL (par. II.3.1).

c- Vitesse de consommation de l' $\alpha$ -pinène oxyde.

d- Rendement de production massique de la somme des aldéhydes (isonovalal et novalal).

e- Teneur en  $\alpha$ -pinène oxyde lyase dans la biomasse produite (en mg d'enzyme par g de biomasse). Cette valeur est mesurée selon les méthodes décrites dans le chapitre IV (par. IV.6.1).

**Tableau V.i.** Influence de la limitation par l'oxygène en cours de culture sur l'induction de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase et sur l'aptitude de la biomasse à accumuler de l'acide novalique au cours de la bioconversion.

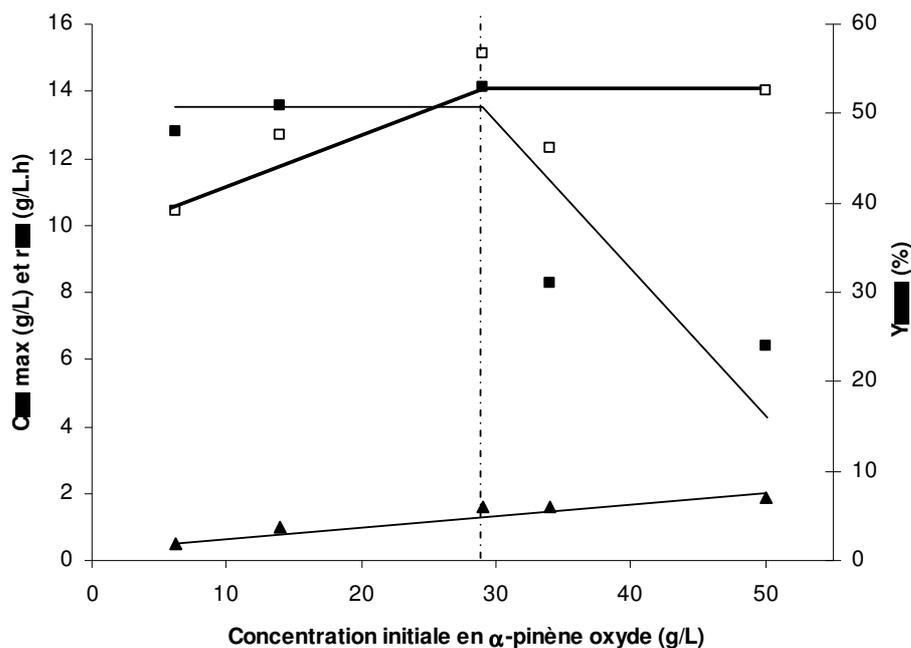


**Figure V.16.** Proposition d'un schéma d'induction des enzymes de la voie métabolique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 selon les conditions de culture appliquées. Les flèches représentent les étapes métaboliques (l'épaisseur traduit le niveau d'induction) et les triangles schématisent les gradients d'accumulation des métabolites produits. Les chiffres indiqués entre parenthèses représentent les rendements de production moyens observés expérimentalement (en %).

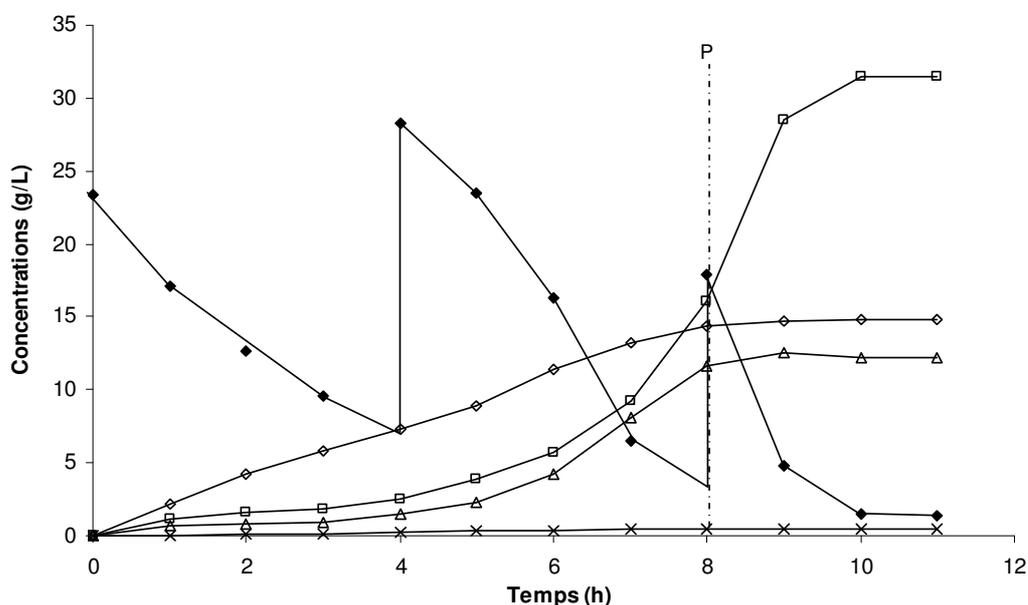
induites, ce qui empêche l'accumulation des métabolites intermédiaires au cours de la bioconversion. En présence d' $\alpha$ -pinène (conditions de culture 2), l'accumulation de l'acide novalique indique que l'étape limitante devient la réaction de dégradation de cet acide. Ceci peut être lié à une induction spécifique des enzymes responsables des étapes initiales de la voie métabolique. Ce phénomène est généralement rencontré lorsqu'un ensemble de gènes codant pour les enzymes responsables d'une partie du métabolisme est organisé sous forme d'opéron. Ces derniers possèdent un mécanisme de régulation propre qui peut être découplé des gènes commandant les autres parties du métabolisme. Un exemple particulièrement représentatif est celui de la régulation des gènes impliqués dans la voie métabolique de dégradation des terpènes acycliques (citronellol et geraniol) par le mutant PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*. DÍAZ-PÉREZ et al. (2004) ont montré que les gènes responsables des étapes terminales de la voie métabolique étaient regroupés dans un même opéron, induit en présence de citronellol et réprimé en présence de glucose.

Enfin, le fait que l'apport en oxygène dans le milieu de culture entraîne une induction supplémentaire de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase expliquerait un déplacement de l'équilibre de la bioconversion vers l'accumulation des aldéhydes (conditions de culture 3). Des exemples d'induction dépendant de l'apport en oxygène sont présents dans la littérature. ROJO et DINAMARCA (2004) font notamment état d'une oxydase (la cytochrome ubiquinol *o* oxydase) appartenant à la chaîne respiratoire de certaines souches de *Pseudomonas* et dont le gène est induit en présence d'oxygène, capable de moduler l'expression de gènes *via* des signaux de transduction encore mal définis.

L'adaptation des conditions de culture à l'utilisation d'un bioréacteur a permis de contrôler et de déterminer les conditions optimales de culture qui permettent d'obtenir de manière reproductible une biomasse efficace pour la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique.



**Figure V.17.** Influence de la concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde sur la concentration maximale (-□-), la vitesse (-▲-) et le rendement de production de l'acide novalique (-■-). Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL (II.3.1).



**Figure V.18.** Evolution des concentrations en  $\alpha$ -pinène oxyde (-◆-), en isonovalal (-□-), en novalal (-△-), en acide novalique (-◇-) et en ADMP (-x-) mesurées au cours d'une bioconversion en fiole Erlenmeyer. La phase aqueuse est constituée de 25 ml de biomasse fraîche concentrée ( $7 \text{ g.L}^{-1}$ ) issue d'une culture en bioréacteur (les conditions de cultures sont décrites dans la figure V.15). La phase organique est constituée de 25 mL d'hexadécane contenant de l' $\alpha$ -pinène oxyde. Des ajouts d' $\alpha$ -pinène oxyde sont réalisés séquentiellement afin d'empêcher une limitation par l'épuisement du substrat. Température:  $30^\circ\text{C}$ . Agitation : 200 rpm. (P) Temps au bout duquel les cellules deviennent perméabilisées.

## V.4. Optimisation des conditions de bioconversion

### V.4.1. Introduction

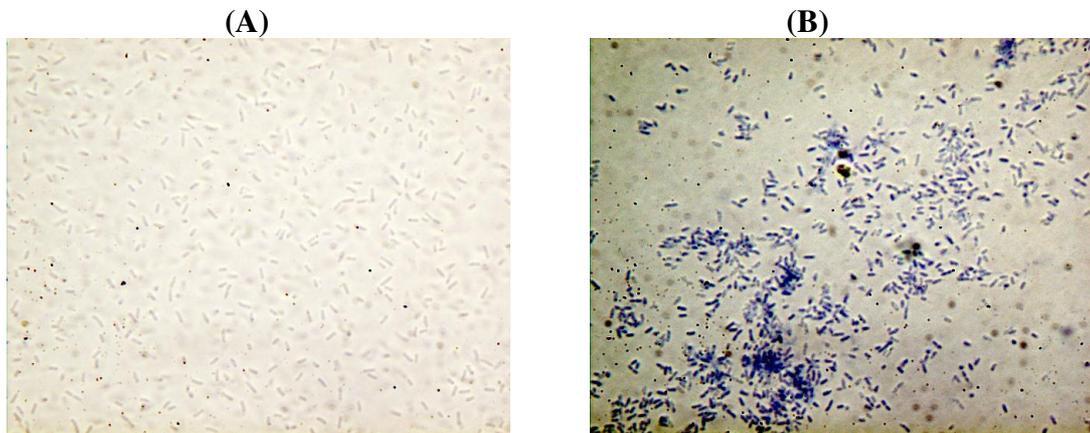
Dans cette partie, l'objectif est d'optimiser la production de l'acide novalique en agissant sur les conditions de bioconversion. Dans un premier temps, les concentrations initiales en substrat ( $\alpha$ -pinène oxyde) seront augmentées de façon à augmenter les vitesses de production de l'acide novalique. De la même façon que pour l'étape de production du biocatalyseur, le procédé de bioconversion sera mis à l'échelle du bioréacteur. La biomasse utilisée ici est produite dans les conditions retenues dans le chapitre précédent (induction par l' $\alpha$ -pinène et limitation par l' $O_2$ ).

### V.4.2. Concentration initiale en $\alpha$ -pinène oxyde

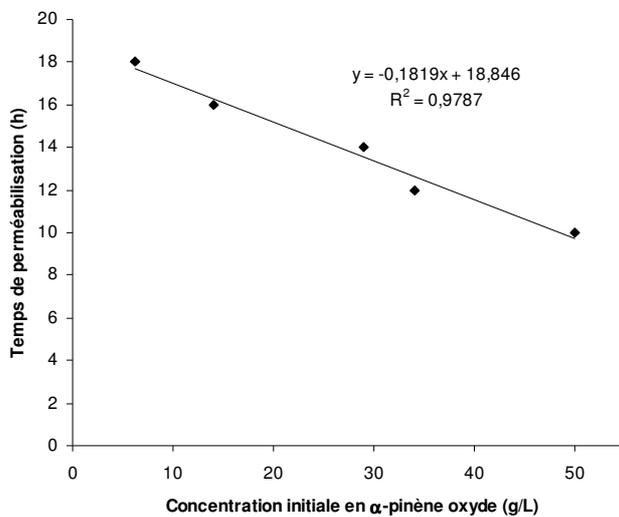
Des bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL avec des concentrations initiales croissantes en  $\alpha$ -pinène oxyde. Les limitations par l'épuisement en substrat sont empêchées par des ajouts d' $\alpha$ -pinène oxyde (fed-batch) jusqu'à l'inactivation du biocatalyseur.

Les résultats obtenus montrent une élévation de la  $V_i$  en fonction de l'augmentation de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde (**figure V.17**). L'augmentation de la concentration initiale en substrat entraîne, par contre, une diminution de la  $C_{max}$  et du rendement de production de l'acide novalique ; ceux-ci tendent respectivement vers un maximum de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  et de 53 % pour une concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde de  $29 \text{ g.L}^{-1}$ . Ces valeurs se stabilisent ( $C_{max}$ ) ou diminuent fortement ( $R$ ) pour des concentrations en substrat plus importantes. L' $\alpha$ -pinène oxyde semble donc inactiver le biocatalyseur pour des concentrations supérieures à  $30 \text{ g.L}^{-1}$ .

Les suivis des cinétiques de bioconversion mettent en évidence un phénomène systématique (un exemple est illustré dans la **figure V.18**) ; l'arrêt de la production des acides s'accompagne d'un arrêt de production du novalal, puis d'une production unique d'isonovalal en forte quantité et à fort rendement (95 %). Cette cinétique ressemble alors beaucoup à celle de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par de la biomasse perméabilisée illustrée dans les chapitres III et IV. L'arrêt de la production de l'acide novalique semble donc être lié à une perméabilisation des cellules.



**Figure V.19.** Aspect des cellules de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491 non perméabilisées (A) et perméabilisées (B) après coloration au bleu de Méthylène (grossissement x1000). La coloration bleue indique une perte de viabilité cellulaire.



**Figure V.20.** Influence de la concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde sur le temps de perméabilisation de cellules de *P.rhodesiae* dans les conditions de bioconversion en fiole Erlenmeyer indiquées dans la figure V.18.

### V.4.3. Activité et viabilité de la biomasse

Un protocole de test de la viabilité des cellules, utilisant une coloration par du bleu de méthylène (par. II.3.3.5), est mis au point de façon à déterminer si la biomasse est réellement perméabilisée au cours de la bioconversion et à quel moment. Les observations microscopiques montrent que les cellules, d'abord incolores, deviennent brusquement bleues à partir de 15 h de bioconversion (**figure V.19**). Le moment de perméabilisation de la biomasse déterminé correspond donc exactement au moment de l'arrêt de production de l'acide novalique (**figure V.18**).

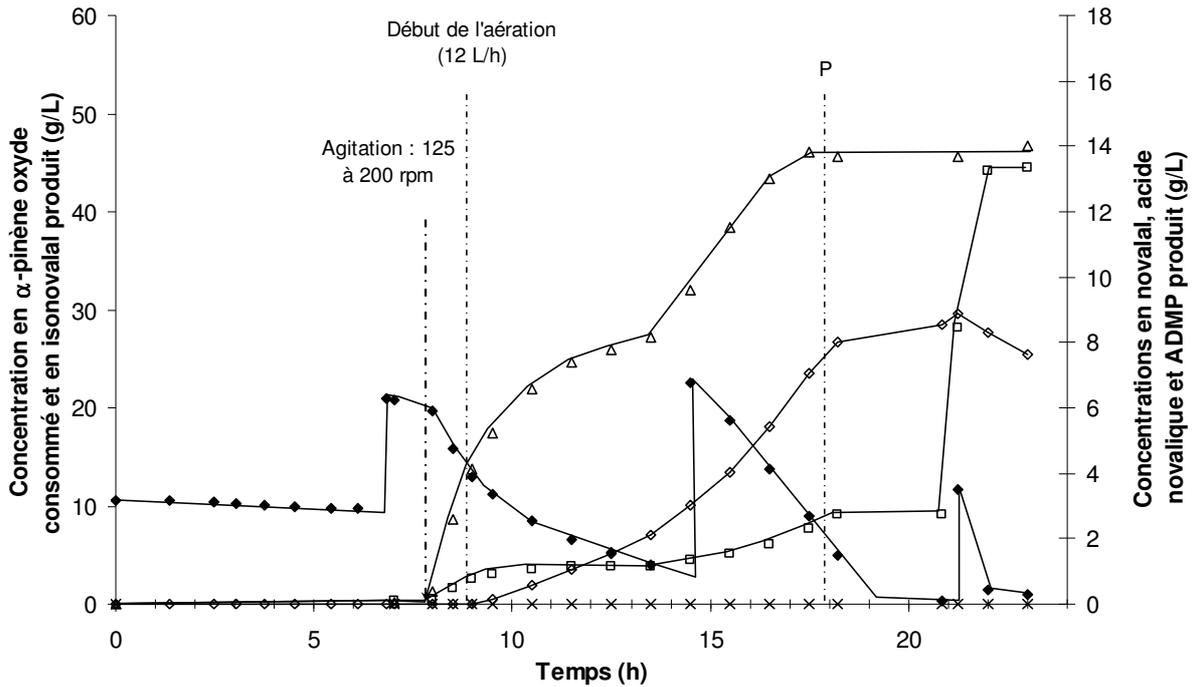
Les mêmes tests, réalisées au cours de bioconversions utilisant différentes concentrations initiales en  $\alpha$ -pinène oxyde (voir le paragraphe précédent), montrent une forte corrélation entre concentration initiale en substrat et le temps nécessaire à la perméabilisation des cellules (**figure V.20**). L'effet inactivateur de l' $\alpha$ -pinène oxyde observé précédemment est donc lié à sa toxicité sur les cellules de *P.rhodesiae*.

### V.4.4. Mise à l'échelle du procédé de bioconversion

#### V.4.4.1. Etude préliminaire

La **figure V.21** montre le déroulement d'une première tentative de bioconversion en réacteur de l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique. L'agitation est initialement maintenue à un niveau faible (125 rpm) de façon à limiter les contraintes de cisaillement appliquées à la biomasse. Ce régime entraîne une consommation très faible de l' $\alpha$ -pinène oxyde. L'augmentation de l'agitation à 8 h (125 à 200 rpm) entraîne une accélération immédiate de la consommation du substrat. Ceci est lié à une augmentation de la surface d'échange entre phases suite à la formation d'une émulsion eau / hexadécane dans le milieu réactionnel.

Dans un premier temps et en absence d'aération, l' $\alpha$ -pinène oxyde est consommé pour produire de l'isonovalal et du novalal. L'accumulation de l'acide novalique ne démarre qu'après le déclenchement de l'aération ( $12 \text{ L.h}^{-1}$ ) à la 9<sup>ème</sup> h de bioconversion (**figure V.21**). Ces résultats montrent que les performances du biocatalyseur ne dépendent pas uniquement de l'apport en  $\alpha$ -pinène oxyde mais également de l'apport en oxygène dans le milieu réactionnel. En effet, GRIFFITHS et al. (1987) ont montré que l'oxydation du novalal en acide novalique était réalisée par une déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante. Ce cofacteur peut être régénéré par la chaîne respiratoire de *P.rhodesiae* à condition que cette dernière soit alimentée en oxygène.



**Figure V.21.** Evolution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde ( $\blacklozenge$ ), en isovalal ( $\square$ ), en novalal ( $\Delta$ ), en ADMP ( $\times$ ) et en acide novalique ( $\diamond$ ) au cours d'une bioconversion réalisée en bioreacteur de 1,5 L de volume utile. La phase aqueuse est constituée de 200 mL de biomasse fraîche concentrée à  $7 \text{ g.L}^{-1}$ . La phase organique est constituée de 300 mL d'hexadecane contenant le substrat. Agitation : 125 rpm pendant les 8 premières heures puis 200 rpm. Température :  $30^\circ\text{C}$ . Aération :  $12 \text{ L.h}^{-1}$  (à partir de 9 h de bioconversion). (P) Temps au bout duquel les cellules deviennent perméabilisées.

Agitation (rpm)	Accumulation de l'acide novalique			Temps de perméabilisation (h) <sup>c)</sup>
	$r_{AN}$ (g.L-1.h-1)	$C_{AN \text{ max}}$ (g.L-1)	$Y_{ANS}$ (%)	
200 (fiolle) <sup>a)</sup>	1,6	14,4	48,3	12
200 (réacteur) <sup>b)</sup>	0,8	8,0	34,0	18

a- Performances obtenues au cours de bioconversion en fiole Erlenmeyer de 250 mL (II.3.1).

b- Performances obtenues au cours de la bioconversion en réacteur illustrée dans la figure V.21.

c- Déterminé par coloration des cellules au bleu de méthylène (par. II.3.3.5).

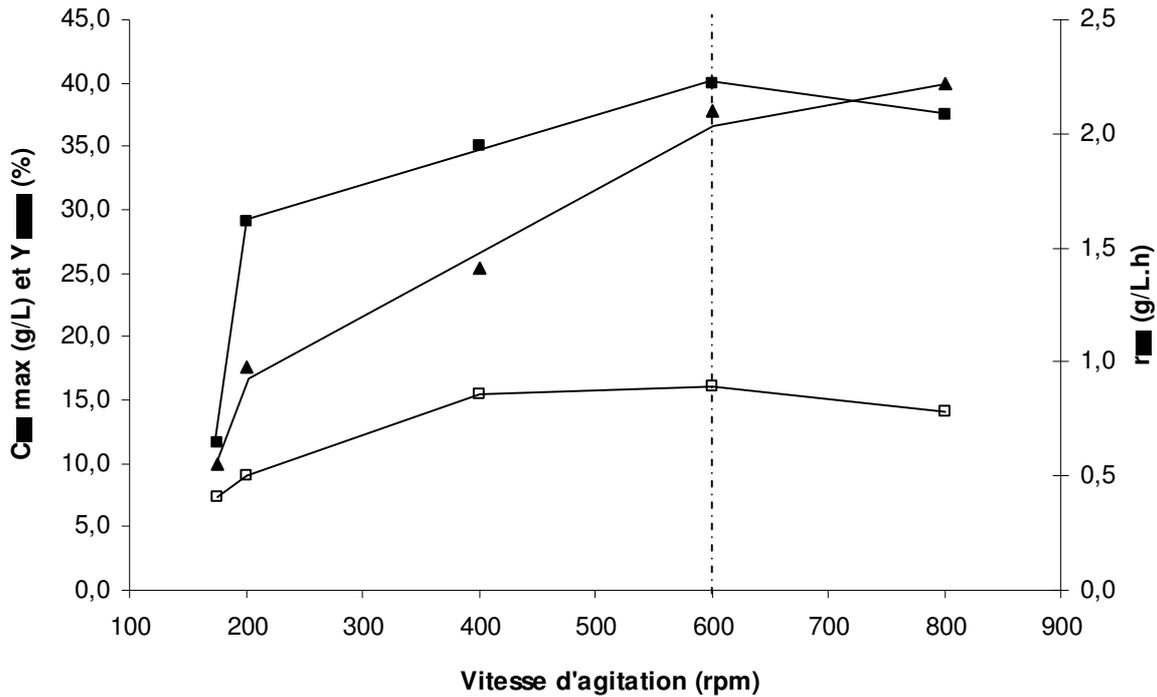
**Tableau V.j.** Comparaison des performances de production d'acide novalique lors de la mise à l'échelle du procédé.

La production d'acide novalique s'interrompt suite à la perméabilisation de la biomasse, décelée après 20 h de bioconversion contre 12 h en fiole Erlenmeyer dans les mêmes conditions d'agitation (200 rpm). Il semble donc que l'introduction dans le milieu réactionnel d'un système d'agitation de type rotor / stator ne diminue pas le temps de vie de la biomasse. Toutefois, on constate que les performances obtenues en réacteur sont plus faibles qu'en fiole Erlenmeyer (**tableau V.j**). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que, bien qu'agité à 200 rpm et aéré à 12 L.h<sup>-1</sup>, le milieu de bioconversion ne soit pas considéré comme parfaitement agité. Cet état entraîne alors des limitations par le transfert à la fois du substrat, de la phase organique vers la phase aqueuse, et de l'oxygène, de la phase gazeuse vers la phase aqueuse.

#### V.4.4.2. Effet de l'agitation

Les résultats précédents ont naturellement conduits à modifier les paramètres de bioconversion. Une série d'expériences est réalisée en augmentant l'agitation du bioréacteur (175 à 800 rpm) pour une même aération (18 L.h<sup>-1</sup>). Les résultats montrent qu'une meilleure agitation permet d'obtenir une concentration maximale en acide novalique proche de celle obtenue en fiole Erlenmeyer, dès 400 rpm (**figure V.22**). La vitesse d'accumulation de l'acide novalique augmente d'un facteur 2 entre 200 et 600 rpm. Ceci est lié à l'amélioration de la disponibilité du substrat pour le biocatalyseur suite à une augmentation des surfaces d'échange entre phases. Enfin, une amélioration du rendement de production massique de l'acide novalique est observée.

Afin de mieux appréhender les flux métaboliques, les bilans carbone sont établis à partir de la quantification par analyse de CPG des métabolites produits et consommés dans la phase organique. La production de CO<sub>2</sub> est déterminée par la mesure de la fraction molaire de l'air sortant du réacteur grâce à un analyseur de gaz (II.1.3.6). Les résultats confirment l'hypothèse émise au paragraphe précédent (**tableau V.j**). Une meilleure diffusion de l'oxygène dans la phase aqueuse conduit à une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire ; le NAD<sup>+</sup>, nécessaire au fonctionnement de la déshydrogénase responsable de la production d'acide novalique, est ainsi régénéré plus rapidement. L'équilibre des réactions est alors déplacé entraînant une augmentation du rendement de production de l'acide et du CO<sub>2</sub> et une diminution de l'accumulation des aldéhydes (isonovalal et novalal) en amont de la voie métabolique.



**Figure V.22.** Influence de la vitesse d'agitation sur la concentration maximale (-□-), la vitesse (-▲-) et le rendement de production de l'acide novalique (-■-). Les bioconversions sont réalisées en réacteur de 1,5 L de volume utile. La phase aqueuse est constituée de 400 mL de biomasse fraîche, concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup>. La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde (20 g.L<sup>-1</sup>) dans 400 mL d'hexadécane. Agitation : voir axe des abscisses. Aération : 18 L.h<sup>-1</sup>. Température : 30°C.

Agitation (rpm)	Y <sub>ANS</sub> (%) C-g/C-g <sup>a)</sup>	Y <sub>IN/S</sub> (%) C-g/C-g <sup>a)</sup>	Y <sub>CO<sub>2</sub>S</sub> (%) C-g/C-g <sup>a)</sup>	Temps de perméabilisation (h) <sup>b)</sup>
175	10,6	69,5	2,3	11
200	26,3	53,2	3,3	11
400	32,0	33,0	16,9	8
<b>600</b>	<b>35,5</b>	<b>25,9</b>	<b>19,7</b>	<b>8</b>
800	33,9	39,5	18,0	7

a- Rapport des concentrations (exprimé ici en g.C.L<sup>-1</sup>) de la ou des molécule(s) produite(s) sur la molécule consommée. AN : acide novalique, IN : isonovalal + novalal, S :  $\alpha$ -pinène oxyde.

b- Déterminé par coloration des cellules au bleu de méthylène (par. II.3.3.5).

**Tableau V.k.** Bilans carbone établis au cours des bioconversions réalisées selon les conditions décrites dans la figure V.22.

Néanmoins, une augmentation de l'agitation au-delà de 600 rpm ne permet pas d'accroître les performances obtenues (**figure V.22**). Les bilans de matières montrent que l'équilibre des réactions se déplace vers une production de l'isonovalal et les tests de viabilité mettent en évidence une perméabilisation plus rapide de la biomasse (**tableau V.k**).

#### V.4.4.3. Conclusions

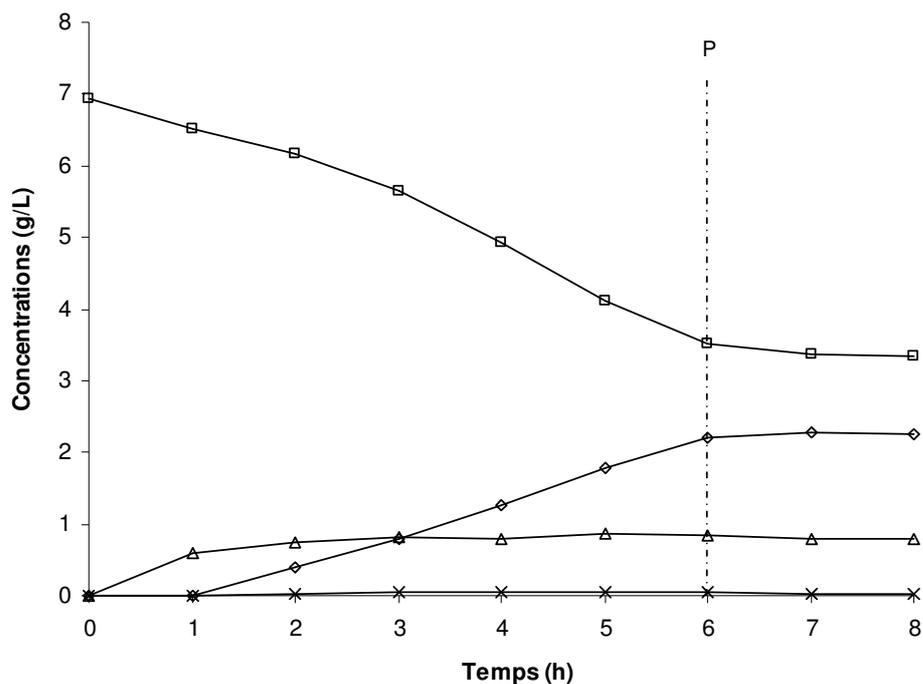
La mise à l'échelle du procédé a permis de déterminer des conditions optimales de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en réacteur (agitation : 600 rpm, aération : 18 L.h<sup>-1</sup> et concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde : 30 g.L<sup>-1</sup>).

Cette étude montre également que l'aération, répresseur pendant l'étape de culture, possède un effet clairement positif sur la production de l'acide novalique en bioconversion. Ceci confirme l'utilisation par la déshydrogénase qui permet la bioconversion du novalal en acide novalique, du NAD<sup>+</sup>, régénéré par la chaîne respiratoire.

Même s'il semble encore possible d'améliorer les vitesses et les rendements de bioconversion en jouant sur certains paramètres du procédé (des tests devront notamment être réalisés en faisant varier l'aération), on remarque que la concentration en acide novalique tend irrémédiablement vers un maximum proche de 15 g.L<sup>-1</sup>, après quoi la biomasse se perméabilise et perd sa faculté à régénérer les cofacteurs. Ce phénomène apparaît à ce moment de l'étude comme le principal facteur limitant du système. Son origine n'est cependant pas clairement identifiée ; elle peut être attribuée à la présence d' $\alpha$ -pinène oxyde, à l'effet des conditions de bioconversion (agitation et présence d'une phase organique), ou à l'accumulation des produits de la réaction. La suite de l'étude vise, dans un premier temps, à prolonger la viabilité de la biomasse en changeant le substrat de bioconversion par un précurseur moins toxique que l' $\alpha$ -pinène oxyde.

#### V.4.5. Nature du substrat de bioconversion

Les paragraphes suivants utilisent successivement l'isonovalal et le novalal comme précurseurs de la bioconversion. Ces molécules, potentiellement moins toxiques que l' $\alpha$ -pinène oxyde, sont de plus susceptibles d'augmenter les vitesses et les rendements de bioconversion en réduisant le nombre d'étapes métaboliques nécessaires à la production de l'acide novalique.



**Figure V.23.** Bioconversion de l'isonovalal (-□-) en novalal (-△-), en ADMP (-x-) et en acide novalique (-◇-) en fiole Erlenmeyer de 250 mL (II.2.3). (P) Temps au bout duquel les cellules deviennent perméabilisées.

Concentration initiale en isonovalal (g.L <sup>-1</sup> )	$r_{ISO}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>a)</sup>	Accumulation de l'acide novalique <sup>b)</sup>			Temps de perméabilisation (h)
		$r_{AN}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$C_{AN\ max}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{AN/S}$ (%)	
3,2	0,36	0,22	1,50	<b>61</b>	10
6,9	0,53	0,4	2,27	<b>63</b>	6
32,5	0,06	0,02	0,04	<b>32</b>	2
38,0	0,00	0,00	0,00	<b>0</b>	1

a- Vitesse de consommation de l'isonovalal.

b- Ces performances sont obtenues au cours de bioconversions en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse fraîche induite. La phase organique est constituée de 25 mL d'hexadécane contenant différentes quantités d'isonovalal (voir les valeurs indiquées sur le tableau). Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

**Tableau V.I.** Bioconversions de l'isonovalal réalisées en fiole Erlenmeyer (200 rpm).

L'isonovalal est produit et purifié selon les conditions décrites dans le chapitre III (par. III.2.1). Le novalal est issu d'une isomérisation chimique de l'isonovalal en présence d'un tampon glycine / NaOH.

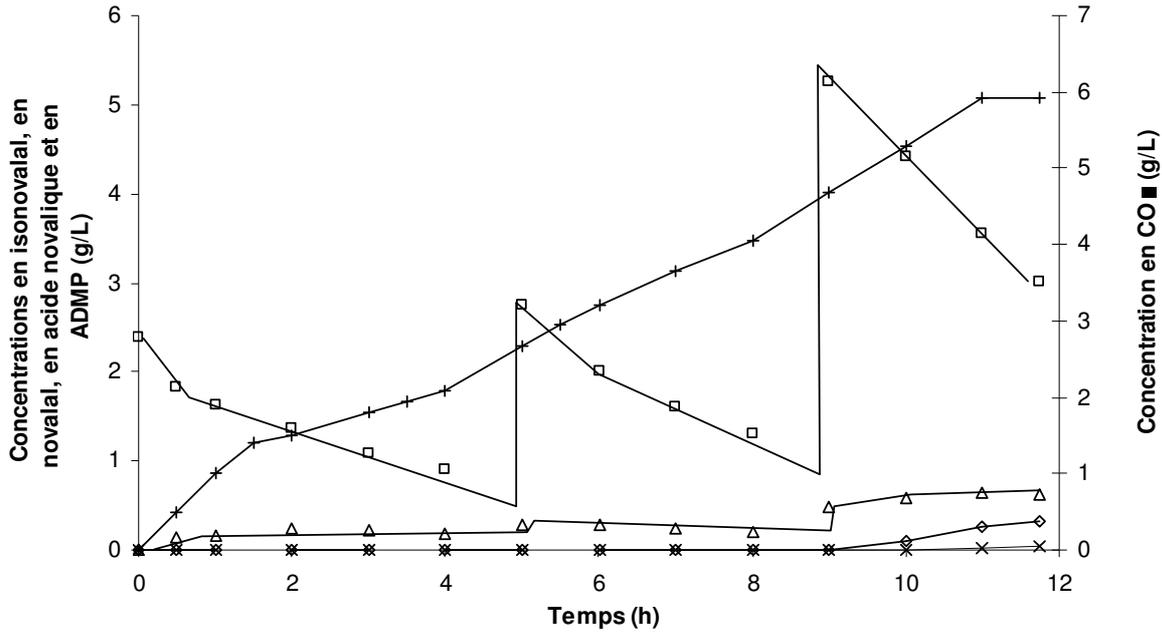
#### V.4.5.1. Utilisation de l'isonovalal

Une bioconversion de l'isonovalal est classiquement réalisée en fiole Erlenmeyer de 250 mL. Le suivi de la production des métabolites montre qu'au cours de la première heure, la consommation de l'isonovalal conduit à la production de novalal (**figure V.23**). Cette production se stabilise alors rapidement au profit de la production d'acide novalique et non d'acide isovalique comme on aurait pu s'y attendre. Ces résultats mettent en évidence une étape d'isomérisation de l'isonovalal en novalal au cours du processus métabolique. Il semble donc que la déshydrogénase utilisée ici soit sélective de la forme *trans* de l'aldéhyde.

Le fait de réduire le nombre d'étapes métaboliques permet bien d'augmenter le rendement de production en acide ( $Y_{AN/S}=63\%$ ). On remarque néanmoins une perméabilisation rapide de la biomasse (dès 6 h de bioconversion), qui semble indiquer une toxicité importante de l'isonovalal.

Une série de bioconversion est alors réalisée en faisant varier la concentration initiale en substrat (**tableau V.I**). Les résultats montrent qu'une concentration en isovalal de 38 g.L<sup>-1</sup> de phase organique est suffisante pour provoquer une perméabilisation instantanée de l'intégralité de la biomasse utilisée. Il faut rappeler que, dans les mêmes conditions, la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde nécessaire au déclenchement de ce même effet est estimée à 100 g.L<sup>-1</sup> (**figure V.20**) ; l'isonovalal possède donc des propriétés toxiques encore plus marquées que celles de l' $\alpha$ -pinène oxyde. Cette situation implique le recours à un procédé de type fed-batch, au cours duquel la concentration en isovalal dans la phase organique ne doit pas dépasser les 3 g.L<sup>-1</sup>. En effet, des signes de perméabilisation prématurée de la biomasse sont observés à partir de cette concentration (**tableau V.I**).

Une bioconversion de l'isonovalal est alors réalisée en bioréacteur avec des ajouts réguliers de substrats. Le suivi de la production des métabolites montre que la consommation de l'isonovalal ne conduit qu'à l'accumulation de novalal et à la production de CO<sub>2</sub> (figure V.24). L'accumulation de l'acide novalique n'est observée qu'à partir d'un ajout de substrat plus conséquent entraînant, de ce fait, une augmentation de la vitesse de consommation de celui-ci (de 0,5 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> à 0,8 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Cette vitesse deviendrait alors supérieure à la



**Figure V.24.** Bioconversion de l'isonovalal (-□-) en novalal (-△-), ADMP (-x-), en acide novalique (-◇-) et en CO<sub>2</sub> (-+-). Les bioconversions sont réalisées en réacteur de 1,5 L de volume utile. La phase aqueuse est constituée de 400 mL de biomasse fraîche, concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup>. La phase organique est constituée de 400 mL d'hexadécane. Agitation : 400 rpm. Aération : 0,18 L.h<sup>-1</sup>. Température : 30°C.

Concentration initiale en novalal (g.L <sup>-1</sup> )	$r_{NOV}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>a)</sup>	Accumulation de l'acide novalique		
		$r_{AN}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$C_{AN\ max}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{AN/S}$ (%)
<i>Flöte Erlenmeyer</i> <sup>b)</sup>				
3,2	0,22	0,00	0,00	0
<b>11,55</b>	<b>0,82</b>	0,24	5,04	<b>50</b>
<i>Bioréacteur</i> <sup>c)</sup>				
2,1	0,25	0,00	0,00	0
3,8	0,46	0,00	0,00	0
<b>4,77</b>	<b>0,70</b>	0,01	0,1	<b>2</b>

a- Vitesse de consommation du novalal.

b- Ces performances sont obtenues au cours de bioconversions en flöte Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse fraîche induite. La phase organique est constituée de 25 mL d'hexadécane contenant différentes quantités de novalal (voir les valeurs indiquées sur le tableau). Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

c- Les performances affichées sont obtenues au cours de bioconversions en réacteur de 1,5 L de volume utile. Contenant 400 mL de biomasse fraîche induite. La phase organique est constituée de 400 mL d'hexadécane contenant différentes quantités de novalal (voir les valeurs indiquées sur le tableau). Agitation : 400 rpm. Aération : 0,18 L.h<sup>-1</sup>. Température : 30°C.

**Tableau V.m.** Bioconversions du novalal en flöte Erlenmeyer et en bioréacteur.

vitesse de dégradation de l'acide novalique en CO<sub>2</sub>, provoquant l'accumulation de l'acide d'intérêt. Le rendement de production observé reste toutefois relativement faible (R≈15 %).

Enfin, une bioconversion en réacteur, réalisée en augmentant la concentration initiale en isonovalal (5,6 g.L<sup>-1</sup>), provoque une perméabilisation quasi-instantanée de la biomasse (résultats non présentés).

#### V.4.5.2. Utilisation du novalal

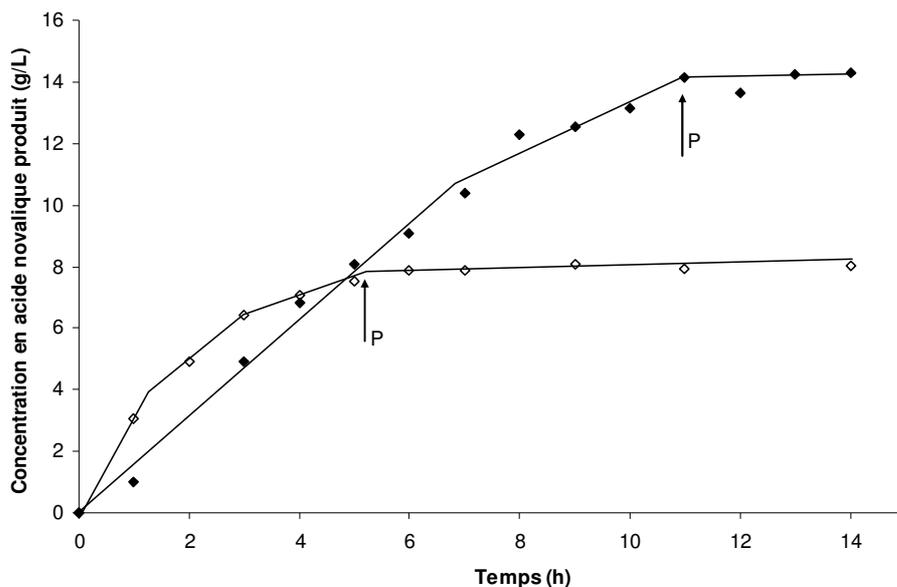
Des bioconversions du novalal sont réalisées en fioles Erlenmeyer avec deux concentrations initiales différentes (11,5 et 3,2 g.L<sup>-1</sup>). La première expérience permet une accumulation de l'acide novalique avec un rendement de production appréciable (R=50 %) (**tableau V.m**). Concernant la deuxième expérience, bien que le novalal soit consommé, aucune accumulation de l'acide novalique ni des métabolites de la voie de l' $\alpha$ -pinène n'est observée. Il semble donc qu'une vitesse minimale de consommation du substrat soit nécessaire pour permettre l'accumulation de l'acide d'intérêt.

Une série de bioconversions, réalisées en bioréacteur, confirme le fait que l'accumulation de l'acide novalique n'est possible que pour une vitesse de consommation du novalal au moins égale à 0,7 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (**tableau V.m**). De plus, de la même façon que pour la bioconversion de l'isonovalal, on remarque une diminution du rendement de production par rapport aux résultats obtenus en fiole (voir le paragraphe précédent).

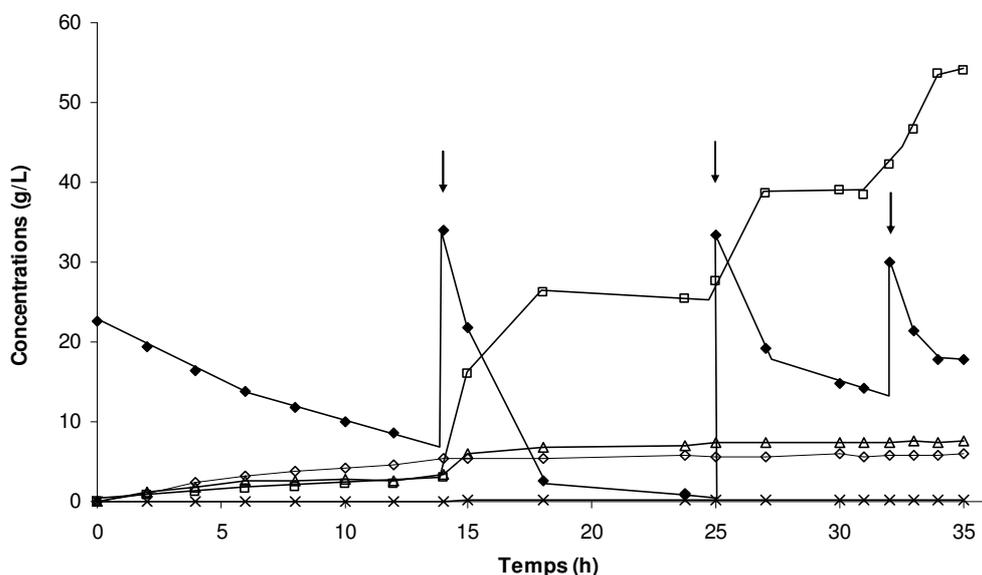
#### V.4.5.3. Conclusions - Discussions

D'un point de vue fondamental, les résultats ont mis en évidence une étape d'isomérisation de l'isonovalal vers le novalal. Etant donné que cette isomérisation n'a lieu qu'en présence de cellules intactes, il est possible de considérer qu'elle est d'origine biotique et cofacteur-dépendante. L'existence de cette étape métabolique explique le fait que seule l'accumulation de l'isomère *trans* de l'acide 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-diénoïque (acide novalique) soit observée au cours de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde, de l'isonovalal et du novalal.

L'utilisation de l'isonovalal ou du novalal comme substrat de bioconversion a permis d'augmenter sensiblement le rendement de production de l'acide novalique (plus 10 % en moyenne). Ces résultats, obtenus en fiole Erlenmeyer, n'ont cependant pas pu être retrouvés à l'échelle du bioréacteur. Ce phénomène peut être lié aux faibles concentrations initiales en substrat, généralement appliquées au cours des bioconversions en réacteur. En



**Figure V.25.** Concentration en acide novalique produit au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde en condition biphasique. La phase organique est constituée d'hexadécane frais (- $\blacklozenge$ -) ou provient d'une bioconversion ultérieure (- $\diamond$ -). Les bioconversions sont réalisées en fiole Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse fraîche concentrée à  $7 \text{ g.L}^{-1}$ . Le volume de phase organique est de 25 mL et la concentration initiale en  $\alpha$ -pinène oxyde est de  $30 \text{ g.L}^{-1}$ . (P) temps nécessaire à la perméabilisation des biomasses.



**Figure V.26.** Evolution de la concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde (- $\blacklozenge$ -), en isovalal (- $\square$ -), en novalal (- $\Delta$ -), en ADMP (- $\times$ -) et en acide novalique (- $\diamond$ -) au cours d'une bioconversion en réacteur pour laquelle des ajouts de biomasse sont effectués (flèches). La phase aqueuse est constituée de 400 mL de biomasse fraîche concentrée à  $1,4 \text{ g.L}^{-1}$ . La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde dans 400 mL d'hexadécane. 80 mL de biomasse concentrée à  $7 \text{ g.L}^{-1}$  sont ajoutés peu avant 14, 25 et 32 h. Un ajout du même volume de phase organique contenant de l' $\alpha$ -pinène oxyde est effectué en parallèle de façon à garder le ratio des volumes de phases (1/1). La dilution est prise en compte dans les concentrations affichées. Agitation 600 rpm. Aération  $18 \text{ L.h}^{-1}$ . Température :  $30^\circ\text{C}$ .

effet, il a été observé qu'une accumulation de l'acide novalique ne pouvait avoir lieu qu'à partir d'une certaine vitesse de production (de l'ordre de  $0,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), qui ne peut être dépassée que par un apport plus conséquent en substrat. Concernant le novalal, des tests complémentaires utilisant des concentrations initiales plus importantes devront donc être réalisés. Cette étude nécessitera, dans un premier temps, une optimisation de la méthode de production du novalal par isomérisation chimique de l'isonovalal. Concernant l'isonovalal, les concentrations initiales pourront difficilement être augmentées en raison de la forte toxicité de la molécule mise en évidence.

Contrairement à la plupart des processus métaboliques, généralement considérés comme des mécanismes de détoxification, l'isonovalal présente des propriétés encore plus toxiques que son substrat de bioconversion. Ceci met en évidence une toxicité importante des produits de la réaction. L'effet de ces derniers est étudié dans la partie suivante.

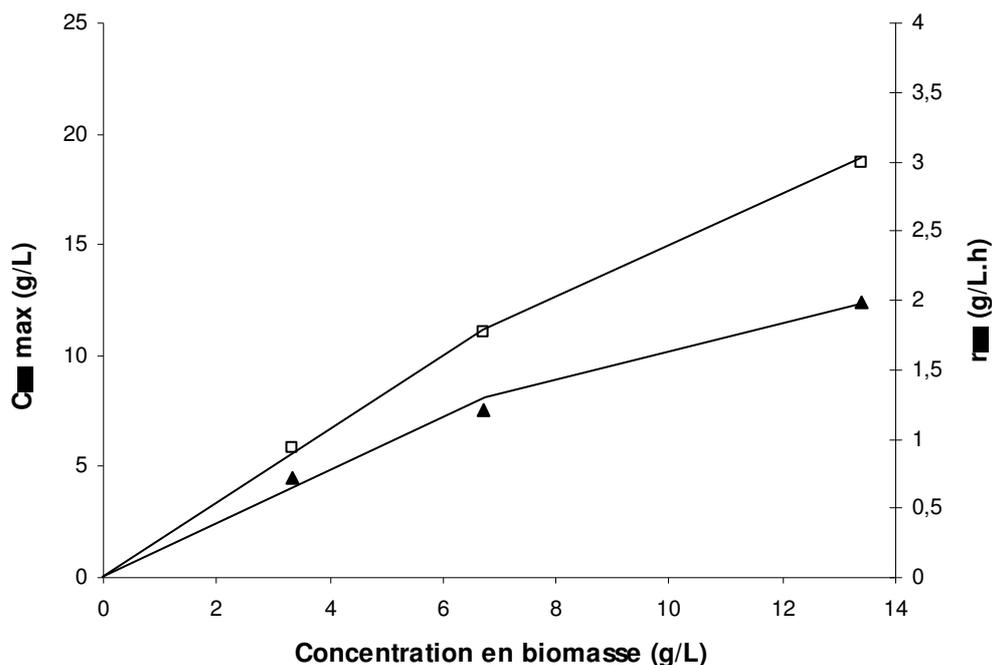
#### **V.4.6. Toxicité des métabolites et préservation de la viabilité du biocatalyseur**

##### V.4.6.1. Toxicité des métabolites

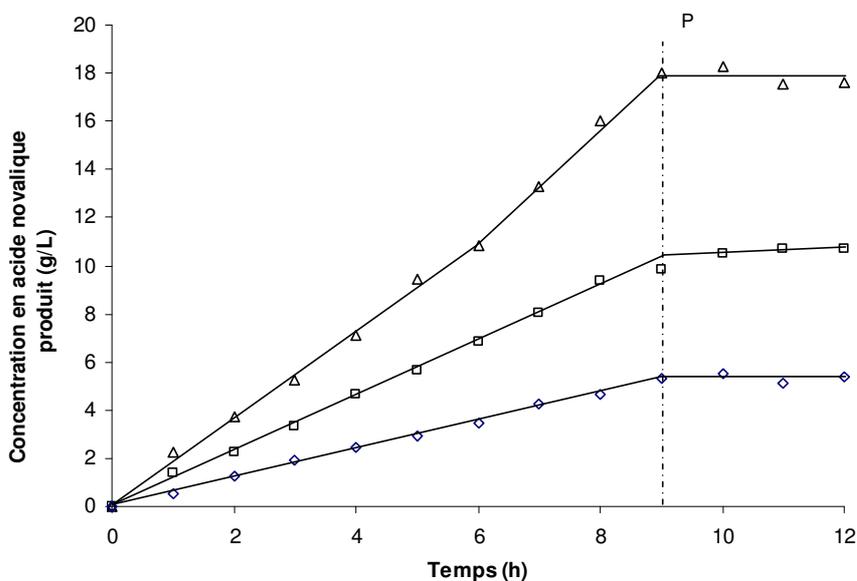
Les résultats précédents ont montré que l' $\alpha$ -pinène oxyde et l'isonovalal présentaient une forte toxicité pour les cellules de *P.rhodesiae* (paragraphes V.4.2 et V.4.5.1, respectivement). De la même façon, une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde réalisée en présence d'une phase organique provenant d'une bioconversion antérieure affiche des performances plus faibles à cause d'une perméabilisation prématurée de la biomasse (**figure V.25**). L'analyse de la composition de cette phase organique montre que l'acide novalique en est le principal constituant (isonovalal :  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , novalal :  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , ADMP :  $0 \text{ g.L}^{-1}$  et acide novalique :  $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), ce dernier semble donc également présenter une toxicité cellulaire importante.

Des études préliminaires ont montré que les cellules de *P.rhodesiae* restaient intactes après une incubation de 24 h en condition biphasique et en absence de substrat ( $30^\circ\text{C}$ , 600 rpm,  $18 \text{ L.h}^{-1}$ ) (résultats non présentés). Les conditions de bioconversion appliquées ne semblent donc pas être responsables de la perte de viabilité du biocatalyseur.

A ce stade, il apparaît donc clairement que le phénomène de perméabilisation de la biomasse est en grande partie lié aux produits de la bioconversion. Des stratégies de renouvellement du biocatalyseur ou de la phase organique devraient donc permettre de



**Figure V.27.** Performances obtenues ( $V_i$  (-▲-) et  $C_{max}$  (-□-)) au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde en fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de biomasse à différentes concentrations initiales. Les concentrations sont ramenées au volume de phase organique. (II.3.1). La phase organique est constituée d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) dans 25 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température :  $30^\circ\text{C}$ .



**Figure V.28.** Accumulation de l'acide novalique dans la phase organique au cours des bioconversions décrites dans la figure V.30. La concentration en biomasse dans la phase aqueuse est de 3,3 (-◇-), 6,7 (-□-) et 13,4 (-△-)  $\text{g.L}^{-1}$ . (P) Temps au bout duquel les biomasses sont perméabilisées.

prolonger la viabilité de la biomasse et ainsi augmenter la concentration maximale en acide novalique produit. Ces points sont traités successivement dans les paragraphes suivants.

#### V.4.6.2. Renouvellement du biocatalyseur

##### V.4.6.2.1. Fed-batch de biomasse

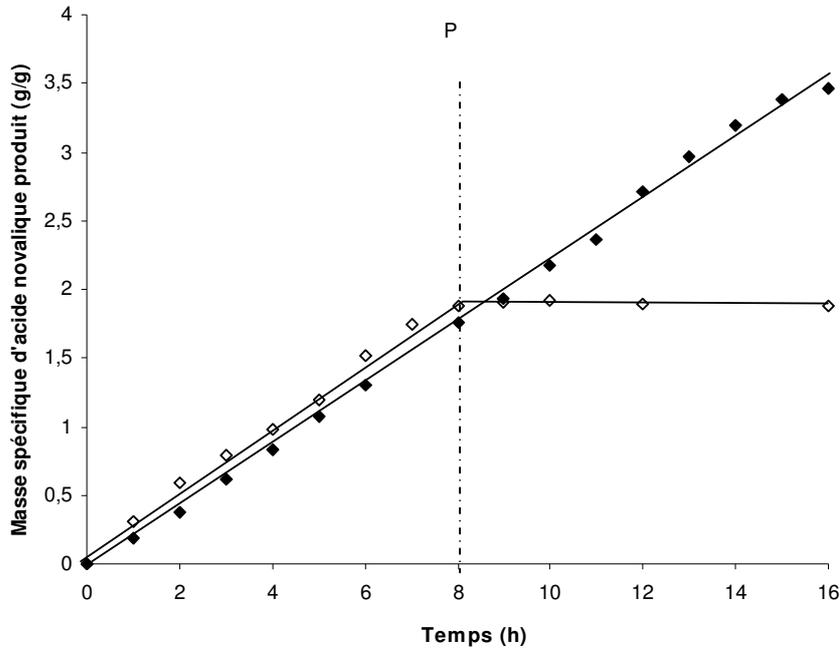
Une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde est réalisée en bioréacteur au cours de laquelle des ajouts de biomasse fraîche sont effectués. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de biocatalyseurs intacts dans le milieu réactionnel ne permet pas de prolonger la production de l'acide novalique (**figure V.26**). La nouvelle biomasse est en effet permabilisée dès son ajout dans le milieu de bioconversion. Ces observations confirment la toxicité importante des métabolites accumulés dans le milieu réactionnel au cours de la bioconversion.

En effet, la perméabilisation de la membrane cellulaire entraîne une production importante d'isonovalal (**figure V.26**). L'accumulation de cette molécule, toxique pour les cellules, accélère encore d'avantage la perméabilisation du biocatalyseur nouvellement ajouté. Ces résultats montrent qu'un ajout de biocatalyseur frais doit à tous prix être réalisé avant la perméabilisation de la biomasse et la production massive d'isonovalal qui en découle. Ceci revient à augmenter la concentration initiale en biomasse.

##### V.4.6.2.2. Effet de la concentration initiale en biocatalyseur

Des bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde sont réalisées en fiole Erlenmeyer à partir de différentes concentrations en biomasse dans la phase aqueuse (3 à 13 g.L<sup>-1</sup>). Les rendements de production observés entre les différentes expériences sont similaires (proches 40 %) et la mesure des  $V_i$  et des  $C_{max}$  montre une baisse de la productivité spécifique pour des concentrations en biomasse supérieures à 7 g.L<sup>-1</sup> (**figure V.27**). Ces résultats montrent qu'une augmentation de la concentration initiale en biomasse n'aboutit pas obligatoirement à une amélioration des performances du procédé. Des expériences complémentaires devront être réalisées de façon à identifier l'influence d'une éventuelle limitation par le transfert à l'interface.

Dans tous les cas observés, la biomasse se perméabilise entièrement après 9 h de bioconversion (**figure V.28**) ; une augmentation de la concentration en biomasse ne permet donc pas de prolonger la durée de vie des cellules.



**Figure V.29.** Accumulation de l'acide novalique au cours de bioconversions de l' $\alpha$ -pinène oxyde en fiole Erlenmeyer de 250 mL avec (-◇-) et sans renouvellement de la phase organique (-◆-). La phase aqueuse est constituée de 25 mL de biomasse concentrée et 25 mL d'une solution d' $\alpha$ -pinène oxyde ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) dans 25 mL d'hexadécane. Les quantités sont exprimées en g d'acide novalique produits par g de biomasse présente dans le milieu réactionnel. Les pertes de biomasse au cours des étapes de centrifugation et les pertes de volumes de phase organique au cours des prélèvements sont prises en compte. (P) Une perméabilisation de la biomasse est observée pour l'expérience réalisée sans renouvellement de la phase organique.

#### V.4.6.3. Renouvellement de la phase organique

Une bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde est classiquement réalisée en fiole Erlenmeyer. Après 2 h de bioconversion, l'intégralité du contenu de la fiole est centrifugé (10 min à 10000 g, 20°C). Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 25 mL de tampon phosphate. Cette biomasse est employée pour réaliser une nouvelle bioconversion en fiole à partir d'une phase organique fraîche contenant le substrat de bioconversion (20 g.L<sup>-1</sup>). L'opération est ainsi répétée toutes les 2 h de bioconversion.

Les cinétiques obtenues montrent qu'un renouvellement régulier de la phase organique permet de prolonger l'activité du biocatalyseur au-delà du temps de contact substrat / cellule habituellement responsable d'une perte complète de la viabilité cellulaire (**figure V.29**). Ceci montre clairement que la perméabilisation de la biomasse n'est pas liée à la présence de l' $\alpha$ -pinène oxyde mais à l'accumulation des produits de bioconversion dans le milieu réactionnel. Le fait que ces derniers s'accumulent préférentiellement dans la phase organique permet d'annuler leur effet toxique par renouvellement de cette phase.

#### V.4.7. Conclusions sur l'optimisation des conditions de bioconversion

Cette étude met en évidence les conditions nécessaires à la bioconversion efficace de l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique par des cellules fraîches de *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491. Les résultats montrent qu'un apport en oxygène dans le milieu réactionnel est nécessaire à la dégradation du novalal en acide novalique. En effet, l'oxygène alimente la chaîne respiratoire des cellules permettant la régénération du NADH, H<sup>+</sup> en NAD<sup>+</sup>, or ce dernier cofacteur est nécessaire au fonctionnement de l'aldéhyde déshydrogénase (GRIFFITHS et al, 1897a). L'augmentation de l'agitation permet ainsi de faciliter l'apport en substrat ( $\alpha$ -pinène oxyde) et en cosubstrat (O<sub>2</sub>) dans la phase aqueuse, en augmentant respectivement les surfaces d'échange liquide / liquide et gaz / liquide. L'utilisation d'un bioréacteur agité à 600 rpm et aéré à 18 L.h<sup>-1</sup> a ainsi permis de produire 16 g.L<sup>-1</sup> d'acide novalique pour une vitesse de 2,1 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et un rendement de production de 47,5 %. Ceci correspond à une production de 6 g d'acide novalique en 9 h de bioconversion, après quoi la biomasse se perméabilise et devient incapable de régénérer les cofacteurs nécessaires à la production de l'acide novalique.

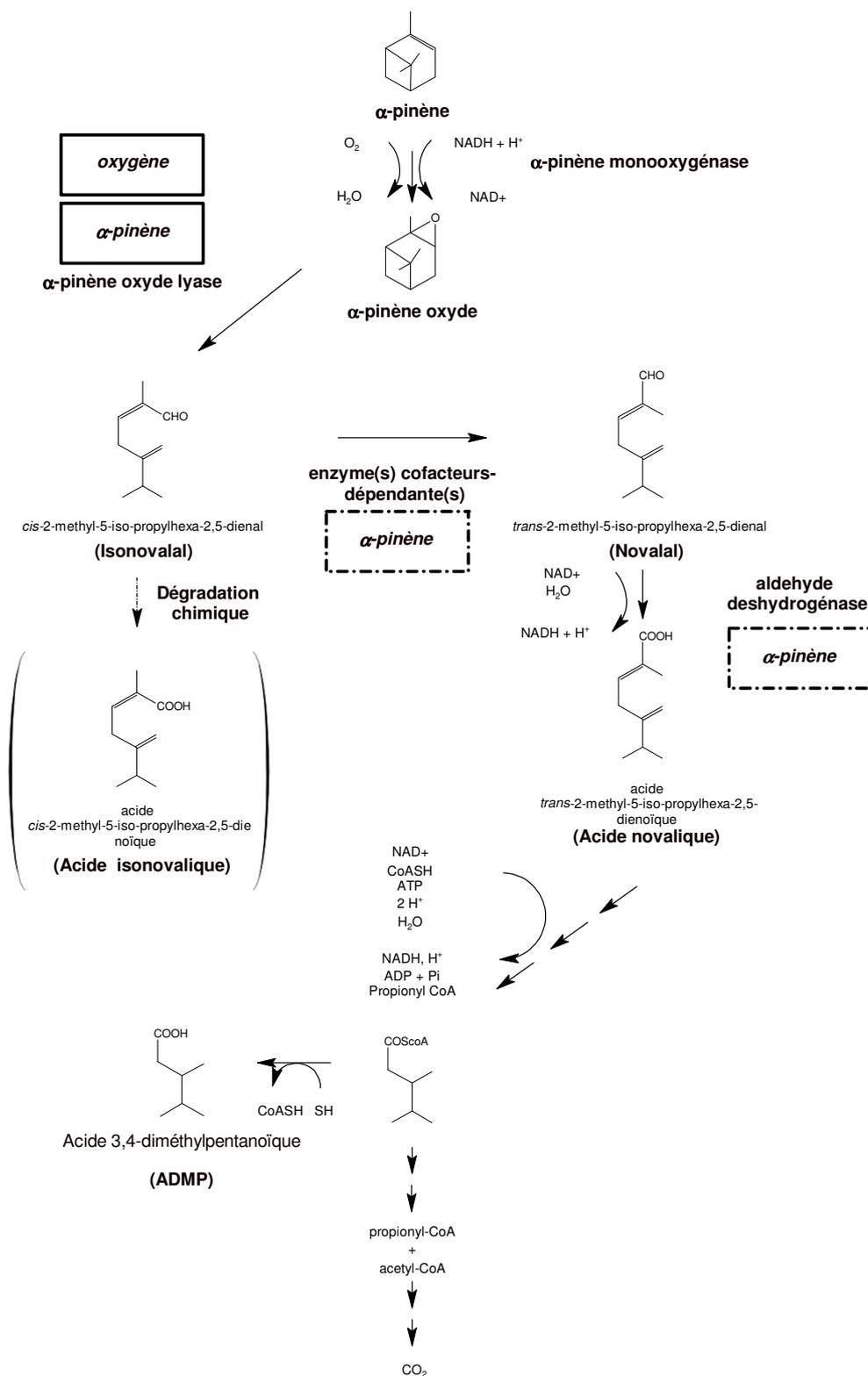


La perméabilisation de la biomasse apparaît ainsi nettement comme le facteur limitant du procédé. Son origine semble liée à la forte toxicité du substrat (l' $\alpha$ -pinène oxyde) et des produits de bioconversion (notamment de l'isonovalal et de l'acide novalique) mise en évidence au cours de cette étude. Une optimisation supérieure du procédé nécessite donc de limiter le contact entre ces composés et le biocatalyseur. Les résultats ont montrés que des apports en petites quantités d' $\alpha$ -pinène oxyde, pour une concentration maximale dans la phase organique proche de 30 g.L<sup>-1</sup>, permettait de préserver l'intégrité des cellules, tout en maximisant les vitesses et les rendements de bioconversion. D'autre part, cette étude a montré le rôle prépondérant des produits de bioconversion dans les phénomènes de perméabilisation prématurée de la biomasse.

Dans la mesure où ces produits s'accumulent majoritairement dans la phase organique, une production supérieure de l'acide novalique est envisageable par la mise en œuvre de procédés permettant un renouvellement de la phase organique en continu ou la séparation des phases liquides. L'utilisation de réacteur comprenant une membrane à l'interface eau / hexadécane semble particulièrement adapté. Un procédé de ce type a récemment été mis au point par BOONTAWAN et STUCKEY (2006), permettant de préserver la viabilité de cellules de *Pseudomonas fluorescens* en présence d'une phase organique contenant une concentration en isonovalal supérieure à 100 g.L<sup>-1</sup>.

## V.5. Conclusion générale

Ce chapitre a permis d'optimiser la production de l'acide novalique à partir de la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde par des cellules de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Le procédé utilisé comprend une étape de production du biocatalyseur par croissance cellulaire suivie d'une étape de bioconversion en condition biphasique eau / hexadécane (1/1 v/v), utilisant le biocatalyseur maintenu en phase stationnaire. Les deux étapes ont pu être adaptée à l'échelle d'un bioréacteur (4,5 et 1,5 L respectivement). Les conditions propres à chacune des étapes, influant positivement sur la production et l'accumulation de l'acide novalique, ont été déterminées. Les résultats montrent qu'une croissance de *P.rhodesiae* sur l' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone et en présence d'une limitation par l'oxygène permet de produire un biocatalyseur particulièrement apte à accumuler l'acide novalique. A l'inverse, l'apport en oxygène au cours de la bioconversion permet d'alimenter la chaîne respiratoire des cellules et de régénérer les cofacteurs nécessaires à la production de l'acide novalique. Les vitesses de bioconversion ont ainsi pu être améliorées en favorisant l'apport en

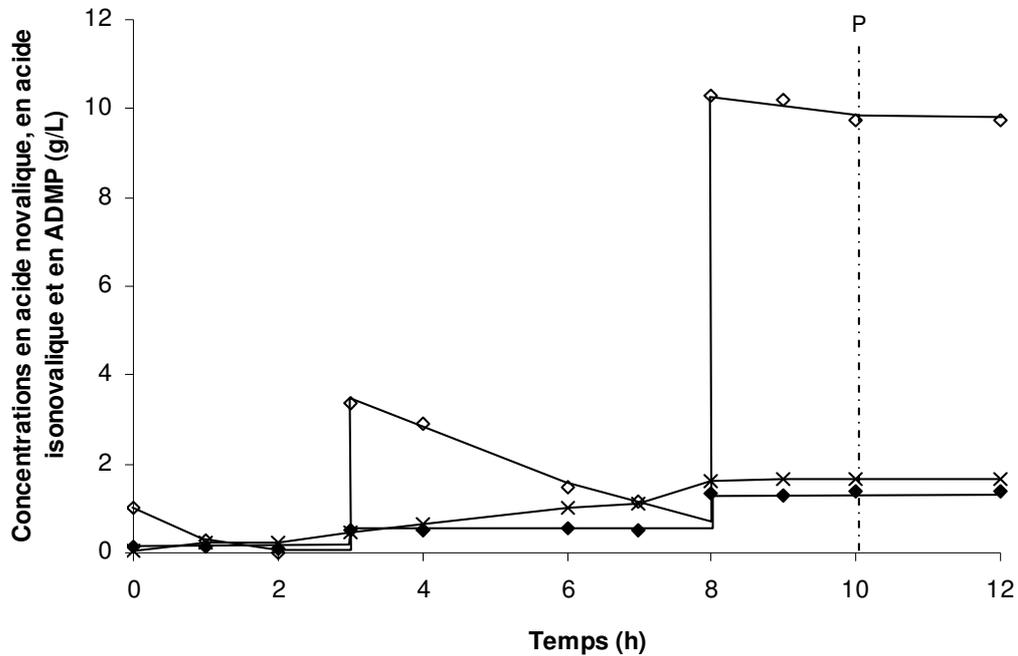


**Figure V.30.** Schéma proposé de dégradation de l'α-pinène par *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Les cadres situés à proximité du nom des enzymes symbolisent une induction positive par le composé encadré au cours de l'étape de culture cellulaire.

substrat ( $\alpha$ -pinène oxyde) et en cosubstrat ( $O_2$ ) dans la phase aqueuse grâce à l'augmentation de l'agitation et application d'une aération. Une production de  $16 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide novalique pour une vitesse de production de  $2,2 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  et un rendement de production de 47 % ont ainsi été atteints, après quoi la biomasse se perméabilise et perd sa capacité à régénérer les cofacteurs nécessaires à la production de l'acide novalique. Bien que l' $\alpha$ -pinène oxyde possède une toxicité significative, les résultats ont montré que le phénomène de perméabilisation des cellules était surtout lié à la toxicité des métabolites produits (notamment l'isonovalal et l'acide novalique lui-même). L'apport de substrat en mode fed-batch, pour des concentrations ne dépassant pas  $30 \text{ g.L}^{-1}$ , et l'élimination du milieu réactionnel des métabolites produits devrait ainsi prolonger la survie de la biomasse et permettre d'augmenter la concentration maximale d'acide novalique produit.

D'un point de vue fondamental, cette étude apporte un éclairage sur le déroulement des étapes initiales de la voie métabolique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Les résultats obtenus permettent de poser des hypothèses nouvelles et de proposer un schéma métabolique (**figure V.30**). En plus de l'étape de décyclisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase, étudiée en détail dans les chapitres précédents, cette partie de l'étude met en évidence une étape métabolique d'isomérisation de l'isonovalal vers le novalal. Le ou les enzymes responsables de cette isomérisation semblent être au moins en partie cofacteur-dépendante(s) car elles ne semblent plus pouvoir s'exprimer une fois que la biomasse est perméabilisée. L'étape suivante serait une oxydation du novalal en acide novalique par une déshydrogénase vraisemblablement  $NAD^+$ -dépendante. Ceci est confirmé par le fait que cette enzyme ne soit capable de s'exprimer qu'en présence d'oxygène dans le milieu réactionnel. L'acide novalique est ensuite dégradé selon les étapes métaboliques de type  $\beta$ -oxydative décrites par ZORN et al. (2004), aboutissant à la production de l'ADMP et du  $CO_2$ . Les résultats convergent vers le fait que seul l'isomère *trans* de l'acide 2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-diénoïque ou acide novalique appartiendrait à cette voie métabolique. L'acide isonovalique détecté dans le milieu réactionnel serait uniquement lié à la dégradation abiotique de l'isonovalal mise en évidence dans le chapitre III (par. III.4.1.1). Enfin, des mécanismes d'induction de certaines enzymes par la source de carbone et par l'apport en oxygène dans le milieu réactionnel au cours de la culture cellulaire ont également été mis en évidence (**figure V.30**).

Concernant la production de l'ADMP, un procédé de bioconversion utilisant l'acide novalique comme précurseur est envisageable. Une étude préliminaire montre que cette réaction est possible à partir de l'utilisation de biomasse fraîche (**figure V.31**). Un rendement



**Figure V.31.** Bioconversion de l'acide novalique (-◇-) en ADMP (-x-) réalisée en fiole Erlenmeyer de 250 mL par 25 mL de biomasse fraîche concentrée à 7 g.L<sup>-1</sup>. Les concentrations en acide novalique (-◇-) et en acide isonovalique (-◆-) sont suivies par extraction alcaline des acides dans de l'hexane, ce qui permet une meilleure séparation des pics. La phase organique est constituée d'un mélange acide novalique / acide isonovalique dans 25 mL d'hexadécane. Agitation : 200 rpm. Température : 30°C.

de bioconversion appréciable, proche de 40 %, a ainsi été obtenu. Le procédé devra prendre en compte la toxicité de l'acide novalique, ici clairement mise en évidence. En effet, la biomasse se perméabilise rapidement après qu'un ajout de substrat soit réalisé pour une concentration dans la phase organique proche de 10 g.L<sup>-1</sup>. Enfin, les résultats permettent également de confirmer que seul l'acide novalique est consommé au cours de la bioconversion, l'acide isonovalique ne semble donc effectivement pas intervenir au cours de cette voie métabolique.



## Conclusion générale

---



La voie de dégradation de l' $\alpha$ -pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 constitue le cadre général de cette étude. L'objet du travail présenté est plus particulièrement la production du *cis*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal) et de l'acide *trans*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoïque (acide novalique) par bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde dans un système biphasique eau / hexadécane.

Les travaux précédents de FONTANILLE et LARROCHE (2002) ont montré que l'étape de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en isonovalal pouvait être réalisée de manière particulièrement efficace puisque le procédé mis au point avait permis une production de 400 g.L<sup>-1</sup> en 2,5 h de réaction.

Le travail réalisé dans un premier temps a permis de mettre au point un protocole de purification et une caractérisation fine du produit. Les spectres UV-Vis, IR, SM, RMN <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H de l'isonovalal sont présentés et ses caractéristiques physico-chimiques principales ont été estimées (point de fusion, tension de surface, pression de vapeur saturante, densité, indice de réfraction, point d'ébullition, solubilité dans l'eau et coefficient d'activité à dilution infinie, également dans l'eau). Des phénomènes de dégradation thermique de l'isonovalal au cours de l'injection du composé pour son analyse CPG ont été mis en évidence. Des pertes du produit par dégradation chimique et par entraînement dans la phase gazeuse au cours de la bioconversion ont été calculées et les concentrations alors mesurées ont été corrigées. Un modèle de calcul des pertes par entraînement en fiole Erlenmeyer a notamment été proposé. Les corrections apportées montrent alors que le rendement de production de l'isonovalal obtenu précédemment (75 %) est en fait de 95 % et que le rendement global de bioconversion atteint une valeur proche de 100 %.

Cette étude a également permis de purifier et de caractériser l'enzyme à l'origine de cette bioconversion, l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase. Elle est constituée de 2 sous-unités identiques et sa masse molaire est de 44 kDa. Il a été démontré que l'utilisation de l' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone au cours de la phase de production du biocatalyseur induisait fortement la production de cette enzyme. La comparaison des informations recueillies sur sa structure (masse moléculaire, structure quaternaire, séquences en acides aminés N-terminale et interne) avec les données contenues dans les bases de données ont montré que cette enzyme n'a fait l'objet d'aucune étude de caractérisation ni de séquençage à ce jour. Les résultats obtenus ont également permis de confirmer que le fonctionnement de l'enzyme est totalement indépendant de la présence de cofacteurs ou de constituants de la biomasse. L'estimation de ses constantes cinétiques ( $K_S=27 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $r_{S\text{max}}= 97 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) a montré que les performances du biocatalyseur purifié ne permettait pas d'améliorer le système par rapport au

protocole utilisant la biomasse perméabilisée. Trois mécanismes d'inactivation de l'enzyme ont été mis en évidence. Une inactivation interfaciale de l'enzyme purifiée au contact de l'interface eau / hexadécane a pu être complètement évitée par l'ajout de SAB (sérumalbumine bovine) dans le milieu réactionnel. Une inactivation temps-dépendante de l'enzyme au contact de l'isonovalal produit, vraisemblablement également de nature interfaciale, a permis d'expliquer une perte partielle d'activité de l'enzyme proche de 45 % au cours de la bioconversion. Enfin, le plus important de ces trois mécanismes, conduisant à un turn-over proche de  $230000 \text{ mol.mol}^{-1}$ , pourrait être expliqué par un phénomène du type « catalyse-sucide ».

La deuxième partie de l'étude a porté sur la synthèse des métabolites acides issues de la voie métabolique de dégradation de l' $\alpha$ -pinène selon les composés « novas », et plus particulièrement de l'acide *trans*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-diénoïque (ou acide novalique). En plus de l'étape de décyclisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase, deux étapes métaboliques supplémentaires, une isomérisation et une déshydrogénation ont été mises en évidence pour permettre la synthèse de l'acide novalique. Ces réactions sont cofacteur-dépendantes et ne peuvent avoir lieu que lorsque la biomasse est non-perméabilisée. L'étape de déshydrogénation correspond à l'oxydation  $\text{NAD}^+$ -dépendante du novalal en acide novalique décrite par les travaux de GRIFFITHS et al. (1987a). Par contre, notre étude est la première à mettre clairement en évidence une étape d'isomérisation de l'isonovalal vers le novalal d'origine biologique.

Le procédé de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide novalique par des cellules intactes de *P.rhodesiae* a été mis au point et optimisé. Il comporte une étape de production du biocatalyseur en réacteur, en limitation par l'oxygène et avec de l' $\alpha$ -pinène comme unique source de carbone. L'étape de bioconversion utilise le biocatalyseur concentré sous forme non proliférante avec un apport non limitant en oxygène, nécessaire à la régénération des cofacteurs réduits. Une toxicité du substrat à faible concentration ayant été mise en évidence, des ajouts séquentiels d' $\alpha$ -pinène oxyde (fed-batch) ne dépassant pas  $30 \text{ g.L}^{-1}$  doivent être effectués pour préserver la viabilité de la biomasse pendant plusieurs heures de bioconversion. Le procédé final permet d'obtenir  $16 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide novalique produit à une vitesse de  $2,2 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  avec un rendement moyen de 47 %, à partir de  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse. La bioconversion s'interrompt suite à la perméabilisation de la biomasse, provoquée par les produits de bioconversion (notamment l'isonovalal et l'acide novalique) dont la toxicité est encore plus marquée que celle de l' $\alpha$ -pinène oxyde.

Ce travail a démontré qu'en utilisant une même souche bactérienne et un même substrat de bioconversion il était possible d'orienter l'accumulation de différents métabolites de sa voie de dégradation en agissant à différents niveaux du procédé (production du biocatalyseur, traitements de la biomasse et bioconversion proprement dite). C'est ainsi que le choix de la source de carbone lors de la production du biocatalyseur pouvait avoir une importance prépondérante. Dans cette étude, l' $\alpha$ -pinène induit les enzymes responsables de la bioconversion des métabolites d'intérêt alors que d'autres sources de carbone testées comme le glucose ou le lactate de sodium les répriment. Il a également été mis en évidence une influence forte du potentiel redox des cellules sur le déroulement de la bioconversion. La ou les réaction(s) enzymatique(s) souhaitée(s) peuvent également conduire à des traitements appliqués à la biomasse différents. En effet, l'utilisation d'une enzyme cofacteur-indépendante autorise la perméabilisation de la biomasse et conduit à une augmentation considérable de la vitesse de bioconversion. A l'inverse, ce traitement ne peut être envisagé pour produire un métabolite dont la synthèse simplifie une (ou plusieurs) étapes d'oxydation. La priorité devient alors la viabilité de la biomasse et la réoxydation des cofacteurs impliqués.



# Nomenclature

---



**Symboles latins**

---

A = concentration en acide isonovalique ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$A_{AO}$  = aire interfaciale entre les phases aqueuse et organique ( $\text{m}^2$ )

B = quantité de biomasse (g)

C = concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$C^*$  = concentration à saturation ( $\text{g.L}^{-1}$ )

d = densité

$F_c$  = facteur correctif de la dégradation thermique de l'isonovalal

$G_b$  = débit volumique ( $\text{L.h}^{-1}$ )

$G_e$  = débit molaire en gaz ( $\text{mol.h}^{-1}$ )

I = concentration en isonovalal ( $\text{g.L}^{-1}$ )

k = constante de vitesse de dégradation abiotique ( $\text{h}^{-1}$ )

$K_L$  = coefficient de transfert entre la phase organique et la phase aqueuse ( $\text{m.s}^{-1}$ )

$K_{ow}$  = coefficient de partage dans un système standard eau / octanol

$K_p$  = coefficient de partage entre la phase organique et la phase aqueuse

$K_S$  = constante de Michaelis ( $\text{g.L}^{-1}$ )

m = masse (g)

M = masse molaire ( $\text{g.mol}^{-1}$ )

$n_D$  = indice de réfraction

p = parachor ( $\text{cm}^3.\text{g}^{1/4}.\text{s}^{-1/2}.\text{mol}^{-1}$ )

P = produits de dégradation chimique de l' $\alpha$ -pinène oxyde ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$P^\circ$  = pression de vapeur saturante (atm ou mmHg)

$P_c$  = perte par dégradation chimique ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$P_e$  = perte par entraînement ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$R_D$  = indice de réfraction molaire ( $\text{cm}^3.\text{mol}^{-1}$ )

Rf = « response factor » obtenu en CCM

Rt = temps de rétention au cours de l'analyse CPG (min)

$r$  = vitesse de la réaction ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$r_{S_{\max}}$  = activité spécifique maximale ( $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ )

$S$  = concentration en  $\alpha$ -pinène oxyde ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_w$  = solubilité dans l'eau ( $\text{mol.L}^{-1}$ )

$T$  = température (C ou  $^{\circ}\text{K}$ )

$\gamma$  = tension de surface ( $\text{dyn}.\text{cm}^{-1}$ )

$V$  = volume (L)

$V_m$  = volume molaire ( $\text{cm}^3.\text{mol}^{-1}$ )

$x$  = fraction molaire dans la phase liquide

$y$  = fraction molaire dans la phase gazeuse

$Y_{X/Z}$  = rendement de production (en  $\text{g}.\text{g}^{-1}$  ou  $\text{gC}.\text{gC}^{-1}$ )

---

### **Indices et exposants**

---

A = phase aqueuse

AN = acide novalique

b = ébullition

c = critique

H = hexadécane

I = isonovalal

IN = isonovalal + novalal

L = ensemble des phases liquide

Lyase =  $\alpha$ -pinène oxyde lyase

m = fusion

NOV = novalal

O = phase organique

S =  $\alpha$ -pinène oxyde

W = eau

$\infty$  = dilution infinie

### ***Symboles grecs***

---

$\alpha$  = constante de vitesse de perte par entraînement ( $\text{h}^{-1}$ )

$\gamma$  = coefficient d'activité en phase liquide

$\delta$  = déplacement chimique obtenu en RMN (ppm)

$\varepsilon$  = coefficient d'extinction molaire dans l'eau ( $\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

$\lambda_{\text{max}}$  = longueur d'onde maximale d'absorption dans l'UV (nm)

$\rho$  = masse volumique à 25 °C ( $\text{g.mL}^{-1}$ )

### ***Abréviations***

---

CCM = Chromatographie sur couche mince

CLHP = chromatographie liquide à haute performance

CPG = chromatographie en phase gazeuse

IR =infrarouge

MM = masse molaire

$\text{NAD}^+ / \text{NADH}, \text{H}^+$  = nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée, forme réduite)

RMN = résonance magnétique nucléaire

SAB = sérumalbumine bovine

SM = spectrométrie de masse

TMS = tetramethylsilane

Tris = tris-(hydroxyméthyl) aminométhane

UV = ultraviolet

***Unités***

---

ppm = partie par million

rpm = rotation par minute

slpm= litres par minute dans des conditions standard (25°C, 1 atmosphère)

vvm = volume de gaz par volume de milieu par minute

# Références bibliographiques

---



- AALTONEN O., RANTAKYLA M. (1991). Biocatalysis in supercritical CO<sub>2</sub>. Chem. Tech., 21 : 240-248.
- AHARONI A., JONGSMA M.A., BOUWMEESTER H.J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. Trends Plant Sci., 10 : 594-602.
- ALEXANDER M. (2002). Aromatherapy and the immune system. Int. J. Aromather., 12 : 92.
- ARMAKA M., PAPANIKOLAOU E., SIVROPOULOU A., ARSENAKIS M. (1999). Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. Antivir. Res., 43 : 79.
- ARMSTRONG D.W., BROWN L.A. (1994). Aliphatic, aromatic, and lactone compounds. Dans : Bioprocess production of flavour, fragrance, and color ingredients, Gabelman A. (ed), Wiley, New York, pp 44-48 .
- AYRES H.M., FURR J.R., RUSSEL A.D. (1999). Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett. Appl. Microbiol., 28 : 13-16.
- BALDASCINI H.G. (2004). Bioreaction engineering for the kinetic resolution of racemic epoxides by epoxide hydrolase. Chap.4 : Inactivation of epoxide hydrolase by vicinal diols. Thèse de Doctorat. University of Groningen. The Netherland.
- BALDASCINI H.G., JANSSEN D.B. (2005). Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system. Enz. Microbiol. Technol., 36 : 285-293.
- BAUM E.J. (1998). Chemical property estimation : Theory and application, Lewis publishers, Boca Raton, états unis.
- BERGER R.G. (1995). Aroma compounds in food. Dans : Aroma biotechnology, Berger R.(ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p 1.
- BERGER R.G., DE BONT J.A.M., EGGINK G., DA FONSECA M., GEHRKE M., GROS J. B., VAN KEULEN F., KRINGS U., LARROCHE C., LEAK D.J., VAN DER WERF M. (1999). Biotransformations in the flavour industry. Dans : Current Topics in flavours and fragrances, Swift K. A. D. (ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 139-170.
- BERGER R.G., KRINGS U., ZORN H. (2001). Biotechnological Flavour Generation. Food flavour technology. Dans : Taylor A. (ed), Sheffield academic press, Sheffield, p 60.
- BERMUDEZ O., PADILLA P., HUITRON C., FLORES M.E. (1998). Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. FEMS Microbiol. Lett., 164 : 77-82.
- BEST D.J., FLOYD N.C., MAGALHAES A., BURFIELD A., RHODES P.M. (1987). Initial enzymatic steps in the degradation of  $\alpha$ -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. Biocatalysis, 1 : 147-159.

- BEVERIDGE T.L., GRAHAM L.I. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.*, 55 : 684-705.
- BHIRUD V.L. (1978). Saturated liquid densities of normal fluids. *AIChE J.*, 24 : 1127-1131.
- BILLHARDT U.M., STEIN P. (1989). Enzymatic methods for the preparation of acetyl-CoA and analogs. *Bioorg. Chem.*, 12 : 170-175.
- BINKS B.P. (1998). Emulsions : Recent advances in understanding. Dans : *Modern aspects of emulsion science*, Binks B.P. (ed), Royal society of chemistry, Cambridge, UK, pp 1-141.
- BLOCK K.I., GYLLENHAAL C., MEAD M.N. (2004). Safety and efficacy of herbal sedatives in cancer care. *Int. Cancer. Ther.*, 3 : 128-148.
- BOONTAWAN A., STUCKEY D.C. (2006). A membrane bioreactor for the biotransformation of  $\alpha$ -pinene oxide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69 : 643-649.
- BRADFORD M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248-254.
- BRENNECKE J.F., MAGINN E.J. (2001). Ionic liquids : Innovative fluids for chemical processing. *AIChE J.*, 47 : 2384.
- BURFIELD A.G., BEST D.J., DAVIS K.J. (1989). Production of 2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dien-1-al and of 2-methyl-5-isopropyl-hexa-2,4-dien-1-al in microorganisms. Eur. Patent N° 0304318.
- BUDDE M. (2007). Biocatalysis with cytochrome P450 monooxygenases : Towards selective oxidation of terpenes and fatty acids. Thèse de Doctorat, Université de Stuttgart, Allemagne.
- BURKART M.D., IZUMI M. (1999). Enzymatic regeneration of 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulfate using aryl sulfotransferase for the preparative enzyme synthesis of nucleotide sugars. *Glycoconj. J.*, 16 : 147-149.
- CABRAL J.M.S. (2001). Biotransformations. Dans : *Basic Biotechnology*, Ratledge C. & Kristiansen B. (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp 471-501.
- CÁNOVAS M., TORROGLOSA T., IBORRA J.L. (2005). Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. *Enzym. Microbial Tech.*, 37 : 300-308.
- CANSTANTINO L., GANI R. (1994). New gròoup contribution method for estimating properties of pure compounds. *AIChE J.*, 40 : 1697-1710.
- CHALIKIAN T.V., GINDIKIN V.S., BRESLAUER K.S. (1995). Volumetric characterization of the native, molten globule and unfolded states of cytochrome *c* at acid pH. *J. Mol. Biol.*, 250 : 291-306.

- CHAMOULEAU F., HAGEDORN C., MAY O., GRÖGER H. (2007). Biocatalytic aldehyde reduction using tailor-made whole-cell catalysts : A novel synthesis of the aroma chemical cinnamyl alcohol. *Flavour Fragr. J.*, 22 : 169-172.
- CHANG S.T., CHEN P.F., CHANG S.C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oil and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.*, 77 : 123-127.
- CHATTERJEE T. (2004). Biotransformation of Geraniol by *Rhodococcus* sp. Strain GR3. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 39 : 303-306.
- CHATTERJEE T., BHATTACHARYYA D.K. (2001). Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55 : 541-546.
- CHEETHAM P.S.J. (1993). The use of biotransformations for the production of flavours and fragrances. *Trends Biotech.*, 11 : 478-488.
- CHELICO L., KHACHATOURIANS G.G. (2003). Permeabilization of *Beauveria bassiana* blastospores for in situ enzymatic assays. *Mycologia*, 95 : 976-981.
- CHENAULT H.K., SIMON E.S. (1988). Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, 6 : 221-70.
- CHIANG L.C., NG L.T., CHENG P.W., CHIANG W., LIN C.C. (2005). Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clin. Exp. Pharmacol.*, 32 : 811.
- CHRISTENSEN L.P., EDELENBOS M., KREUTZMANN S. (2007). Fruits and vegetables of moderate climate. Dans : *Flavours and fragrances : Chemistry, bioprocessing and sustainability*, Berger R.G. (ed), Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, p 136.
- CLARK B.C., CHAMBLEE T.S. (1992). Acid-catalyzed reactions of citrus oils and other terpene-containing flavors. Dans : *Off-flavour in foods and beverages*, Charalambous G. (ed), Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, pp 229-232.
- CLARK S.S., ZHONG L., FILIAUT D., PERMAN S., REN Z., GOULD M., YANG X. (2003). Anti-leukemia effect of perillyl alcohol in Bcr/Abl-transformed cells indirectly inhibits signaling through Mek in Ras- and Raf-independent fashion. *Clin. Cancer. Res.*, 9 : 4494-4505.
- COHEN-BAZIRE G., SISTROM W.H., STANIER R.Y. (1957). Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell Comp. Physiol.*, 44 : 25-68.
- COLLINS R.P. (1976). Terpenes and odoriferous materials from microorganisms. *Lloyda*, 39 : 20-68.
- COLOCOUSI A., SAQIB K.M., LEAK D.J. (1996). Mutants of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 defective in the catabolism of  $\alpha$ -pinene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45 : 822-830.

- COROLER L., ELOMARI M., HOSTE B., GILLIS M., IZARD D., LECLERC H. (1996). *Pseudomonas rhodesiae* sp. Nov., a new species isolated from natural mineral waters. System. Appl. Microbiol., 19 : 600-607.
- CRANS D.C., WHITEHEAD G.M. (1983). A convenient synthesis of disodium acetyl phosphate for use in in situ ATP cofactor regeneration. J. Orga. Chem., 48 : 3130-3132.
- CROTEAU R. (1980). Fragrance and flavour substances. Proc. Second Int. Haarmann and Reimer Symposium on fragrance and flavour substances. Croteau R. (ed), Verlag, Pattensen, pp 13-36.
- CROUZET J. (1992). La biogénèse des arômes. Dans : Les arômes alimentaires, Richard H. & Multon J.L. (eds), Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp 22-37.
- CROWELL P.L. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J. Nutr., 129 : 775S-778S.
- DAUGULIS A.J. (1997). Partitioning bioreactors. Curr. Opin. Biotechnol., 8: 169-174.
- DE CARVALHO C.C., DA FONSECA M.M. (2006). Biotransformation of terpenes. Biotechnol. Adv., 24 : 134-142.
- DE CARVALHO C.C., PORETTI A., DA FONSECA M.M. (2005). Cell adaptation to substrate, solvent and product : A successful strategy to overcome product inhibition in a bioconversion system. Appl. Microbiol. Biotechnol., 69 : 268-275.
- DEMYTTENAERE J.C.R., WILLEMEN H.M. (1998). Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*. Phytochem., 47 : 1029-1036.
- DEWICK P.M. (2002). Medicinal natural products : A biosynthetic approach, 2<sup>nd</sup> édition, Wiley, Chichester.
- DHAVALIKAR R.S, RANGACHARI P.N., BHATTACHARYYA P.K. (1966). Microbial transformations of terpenes : Part IX- pathways of limonene degradation by a soil pseudomonad. Indian J. Biochem., 3 : 158-164.
- DÍAZ-PÉREZ A.L., ROMÁN-DOVAL C., DÍAZ-PÉREZ C., CERVANTES C., ROSA-AGUIRRE C.R., LÓPEZ-MEZA J.E., CAMPOS-GARCÍA J. (2007). Identification of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate acyclic terpenes and leucine. FEMS Microbiol. Lett., 269 : 309-316.
- DÍAZ-PÉREZ A.L., ZAVALA-HERNÁNDEZ N., CERVANTES C., CAMPOS-GARCÍA J. (2004). The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. and Environ. Microbiol., 70 : 5102-5110.
- DINAMARCA M.A., RUIZ-MANZANO A., ROJO F. (2002). Inactivation of cytochrome *o* ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. J. Bacteriol., 184 : 3785-3793.

- EBNER H., SELLMER S., FOLLMANN H. (1996). *Biotechnology*, vol. 6, Rehm H.J. & Reed G. (eds), VCH, Weinheim, p 381.
- EISENLOHR F. (1910). A new calculation of atomic refractions. *Z. Physic.Chem.*, 75 :585-607.
- ELSON C.E. (1995). Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids : Protective roles in cancer and cardiovascular disease. *J. Nutr.*, 125 : 1666S-1672S.
- ELSON C.E., YU S.G. (1994). The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. *J. Nutr.*, 124 : 607-614.
- ESSAWI T., SROUR M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 70 : 343-349.
- ETSCHMANN M.M.W., SCHRADER J. (2006). An aqueous / organic two phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71 : 440-443.
- ETSCHMANN M.M.W., SELL D., SCHRADER J. (2005). Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnol. Bioeng.*, 92 : 624.
- EVANS L.R., LINKER A. (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 116 : 915-924.
- FABER K. (2000). *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, pp 177-183.
- FAHLBUSCH K.G., HAMMERSCHMIDT F.J., PANTEN J., PICKENHAGEN W., SCHATKOWSKI D. (2005). *Flavors and fragrances*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 5-81.
- FAUCONNIER M.L., MPAMBARA A., DELCARTE J., JACQUES P., THONART P., MARLIER M. (1999). Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.*, 21 : 629-633.
- FARBOOD M.I, WILLIS B.J. (1989). Process for producing diol and furan and microorganism capable of same. US Patent N°4798799.
- FELIX H. (1982). Permeabilized cells. *Anal. Biochem.*, 120 : 211-234.
- FICHAN I., LARROCHE C., GROS J.B. (1999). Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids. *J. Chem. Eng., Data*, 44 : 56-62.
- FLETCHER P.I.D. (1998). Interaction of emulsion drops. Dans : *In Drops and bubbles in interfacial research*, Mobius D. & Miller R. (eds), Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp 563-592.

- FONTANILLE P. (2002). Biotransformation de l' $\alpha$ -pinène oxyde en *cis*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal) par *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal. N° 1404.
- FONTANILLE P., GROS J.B., LARROCHE C. (2005). Biotransformations with crude enzymes and whole cells. Dans : Enzyme technology, Pandey A., Webb C., Soccol C.R. et Larroche C. (eds), Asiatech publisher inc., New Delhi, pp 123-131.
- FONTANILLE P., LE FLÈCHE A., LARROCHE C. (2002). *Pseudomonas rhodesiae* sp. : A new and efficient biocatalyst for production of isonovalal from  $\alpha$ -pinene oxide. Biocatal. Biotrans., 20 : 413-421.
- FONTANILLE P., LARROCHE C. (2003). Optimisation of isonovalal production from  $\alpha$ -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Appl. Microbiol. Biotechnol., 60 : 534-540.
- FÖRSTER-FROMME K., HÖSCHLE B., MACK C., BOTT M., ARMBRUSTER W., JENDROSSEK D. (2006). Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine / isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 72 : 4819-4828.
- FURLAN A., PANT H.K. (2005). General properties. Dans : Enzyme technology, Pandey A., Webb C., Soccol C.R., Larroche C. (eds), Asiatech publisher inc., New Delhi, p 30.
- FURUSAWA M., HASHIMOTO T., NOMA Y., ASAKAWA Y. (2005). Highly Efficient Production of Nootkatone, the Grapefruit Aroma from Valencene, by Biotransformation. Chem. Pharm. Bull., 53 : 1513.
- GHATORAE A.S., BELL G., HALLING P.J. (1994a). Inactivation of enzymes by organic solvents : New technique with well-defined interfacial area. Biotechnol. Bioeng., 43 : 331-336.
- GHATORAE A.S., GUERRA M.J., BELL G., HALLING P.J. (1994b). Immiscible organic solvent inactivation of urease, chymotrypsin, lipase and ribonuclease. Separation of dissolved solvent and interfacial effect. Biotechnol. Bioeng., 44 : 1355-1361.
- GIBBON G.H., PIRT S.J. (1971). Degradation of  $\alpha$ -pinene by *Pseudomonas* PX1. FEBS Lett., 18 : 103-105.
- GIRI A., DHINGRA V., GIRI C.C., SINGH A., WARD O.P., NARASU M.L. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems : Current trends and future prospects. Biotechnol. Adv., 19 : 175-199.
- GIROLAMI G.S. (1994). A simple "back of the envelope" method for estimating the densities and molecular volumes of liquid and solids. J. Chem. Ed., 11 : 962-964.
- GOVAN J.R.W., FYFE J.A.M., JARMAN T.R. (1981). Isolation of alginate-producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. J. Gen. Microbiol., 125 : 217-220.

- GRAIN C.F., ARTHUR D. (1979). Little, Inc., Cambridge, Mass., personal communication.
- GRIFFIN D.R., GAINER J.L., CARTA G. (2001). Asymmetric transfer reduction with immobilized yeast in hexane : Biocatalyst deactivation and regeneration. *Biotechnol. Prog.*, 17 : 304-310.
- GRIFFIN S.G., WYLLIE S.G., MARKHAM J.L., LEACH D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour fragr. J.*, 14 : 322-332.
- GRIFFITHS E.T., BOCIEK S.M., HARRIES P.C., JEFFCOAT R., SISSONS D.J., TRUDGILL P.W. (1987a). Bacterial metabolism of  $\alpha$ -pinene : Pathway from  $\alpha$ -pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. strain P18.3. *J. Bacteriol.*, 169 : 4972-4979.
- GRIFFITHS E.T., HARRIES P.C., JEFFCOAT R., TRUDGILL P.W. (1987b). Purification and properties of  $\alpha$ -pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. Strain P18.3. *J. Bacteriol.*, 169 : 4980-4983.
- GRIVEL F. (1999). Biotransformation de la  $\beta$ -ionone par *Aspergillus niger*. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, N°1176.
- GROS J.B., LARROCHE C. (2005). Bioreactor analysis and design. Dans : *Enzyme technology*, Pandey A., Webb C., Soccol C.R. et Larroche C. (eds), Asiatech publisher Inc., New Delhi, p 479.
- GRUBER P., HENTON D.E., STARR J. (2006). Polylactic acid from renewable resource. Dans : *Biorefiners - Industrial processes and products*, Vol. 2, Kamm B., Gruber P.R. et Kamm M. (Eds), Wiley-VCH, Weinheim, p 381.
- HABERLAND J., HUMMEL W., DAUßMANN T., LIESE A. (2002). New continuous production process for enantiopure (2R,5R)-hexane-diol. *Org. Process Res. Dev.*, 6 : 458-462.
- HALLING P.J. (1987). Biocatalysis in multi-phase reaction mixtures containing organic liquids. *Biotechnol. Adv.*, 5 : 47-84.
- HANCOCK R.E.W., CHAPPLE D.S. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 : 1317-1323.
- HANSCH C., LEO A.J. (1979). Dans : *Substituant constants for correlation analysis in chemistry and biology*, J. Wiley, New York.
- HANSRUEDI F. (1982). Permeabilized cells. *Anal. Biochem.*, 120 : 211-234.
- HÄRTIG C., LOFFHAGEN N., HARMS H. (2005). Formation of *trans* fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 : 1915-1922.
- HATTI-KAUL R. (2001). Aqueous two-phase systems : A general overview. *Mol. Biotechnol.*, 19 : 269-277.

HAYNES C.A., NORDE W. (1995). Structures and stabilities of adsorbed proteins. *J. Colloid. Int. Sci.*, 169 : 313-328.

HEIPIEPER H.J., DIFENBACH R., KEWELOH H. (1992). Conversion of *cis* unsaturated fat acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas Putida* from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 1847-1852.

HEIPIEPER H.J., WEBER F.J., SIKKEMA J., KEWELOH H., DE BONT J.A.M (1994). Mechanisms behind resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.*, 12 : 409-415.

HEROUT V. (1970). Some relations between plants, insects and their isoprenoids. *Prog. Phytochem.*, 144-202.

HILL R.A. (1993). The chemistry of natural products, Thomson R.H (ed), Blackie, London, p 106.

HOLLMANN F., KLEEB A., OTTO K., SHMID A. (2006). Corrigendum to “coupled chemoenzymatic transfer hydrogenation catalysis for enantioselective reduction and oxidation reactions”. *Tetrahedron Asymmetry*, 17 : 867- 868.

HORST S., PANTEN J. (2006). Common fragrance and flavor materials : Preparation, properties and uses, 5ème édition, Wiley-VCH, Weinheim, pp 27-80.

HOWARTH J., PARAIC J., JIFENG D. (2001). Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF<sub>6</sub> and water mix. *Tetrahedron Lett.*, 42 : 7517-7519.

HUSSON M.O., HAMZE M., VERHILLE S., IZARD D. (2000). *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Dans : Précis de bactériologie clinique, Eska (eds), Paris, pp 1259-1285.

IRMANN F. (1965). A simple correlation between water solubility and structure of hydrocarbons and halohydrocarbons. *Chem. Ing. Tech.*, 37 : 789-798.

ISCO Inc. (2003). Effective organic compound purification : Guidelines and tactics for flash chromatography, p 7.

JACOB F., PERRIN D., SANCHEZ C., MONOD J. (1960). The operon : A group of genes whose expression is coordinated by an operator. *C.R. Seances Acad. Sci.*, 250 : 1727-1729.

JACKSON R.W., DEMOSS J.A. (1965). Effect of toluene on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 90 : 1420-1425.

JOBACK K.G., REID R.C. (1987). Estimation of pure-component properties from group-contributions. *Chem. Eng. Comm.*, 57 : 233-243.

JUILLARD M., LE PETIT J., RITZ P. (2004). Regeneration of NAD<sup>+</sup> cofactor by photosensitized electron transfer in an immobilized alcohol dehydrogenase system. *Biotechnol. Bioeng.*, 28 : 1774-1779.

KALEMB A.D., KUNICK A.A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 10 : 813-829.

KAMAT S., BARRER A.J., BECKMAN E.J., RUSSEL A.J. (1992). Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids : 1. Optimization of enzyme environment. *Biotechnol. Bioeng.*, 40 : 158-166.

KERSTERS K., LUDWIG W., VANCANNEYT M., DE VOS P., GILLIS M., SCHLEIFE K.H. (1996). Recent changes in the classification of the Pseudomonads : An overview. *System. Appl. Microbiol.*, 19 : 465-477.

KINNEY C.R. (1940). Calculation of boiling points of aliphatic hydrocarbons. *Ind. Eng. Chem.*, 32 : 559-562.

KLOPMAN G., WANG S., BALTHASAR D.M. (1992). Estimation of aqueous solubility of organic molecules by the group contribution approach. Application to the study of biodegradation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 32 : 474-482.

KOIZUMI S., ENDO T. (1998). Large-scale production of GDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria. *Nat. Biotechnol.*, 25 : 213-217.

KORDALI D., CAKIR A., MAVI A., KILIC H., YILDIRIM A. (2005). Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of three Turkish *Artemisia* species. *J. Agric. Food. Chem.*, 53 : 1408-1416.

KRASNOBAJEV V. (1984). Terpenoids. Dans : *Biotechnology*, volume 6a, Kieslich K. (ed), Verlag chemie, Weinheim, pp 98-125.

KRIEGER N., BHATNAGAR T., BARATTI J.C., BARON A.M., DE LIMA V., MITCHELL D. (2004). Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.*, 42 : 279-286.

KRINGS U., BERGER R.G. (1998). Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49 : 1-8.

KUMAR R., MODAK J., MADRAS G. (2005). Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. *Biochem. Eng. J.*, 23 : 199.

LAANE C., BOEREN S., VOS K., VEEGER C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 30 : 81-87.

LAMARE V., FURSTOSS R. (1990). Bioconversion of sesquiterpenes. *Tetrahedron*, 46 : 4109-4132.

LARROCHE C., GROS J.B., FONTANILLE P. (2007). Microbial processes. Dans : *Flavours and fragrances : Chemistry, biprocessing and sustainability*, Berger R.G. (ed), Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 575-597.

LARROCHE C., CREULY C., GROS J.B. (1995a). Fed-Batch Biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43 : 222-227.

LARROCHE C., GRIVEL F., CREULY C., GROS J.B. (1995b). Fed batch biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger* immobilized in Ca-alginate beads. Dans : Bioflavour 95, Etiveant P. & Schreier P. (eds), INRA, Paris, pp 309-314.

LATZA E. (1999). Thèse de Doctorat, Hannover Universität, Allemagne.

LEE L.G., WHITESIDES G.M. (1986). Preparation of optically-active 1,2 diols and  $\alpha$ -hydroxy ketones using glycerol dehydrogenase as catalyst – limit to enzyme-catalyzed synthesis due to noncompetitive and mixed inhibition by product. *J. Org. Chem.*, 51 : 25-36.

LEE Y.P., TAKAHASHI T. (1966). An improved colorimetric determination of aminoacids with the use of ninhydrine. *Anal. Biochem.*, 14 : 71-77.

LE MOS J.L.S., FONTES M.C.A., PEREIRA Jr.N. (2001). Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 93 : 681-690.

LÉON R., FERNANDES P., PINHEIRO H.M., CABRAL J.M.S. (1998). Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.*, 23 : 483-500.

LE ROUX M.R., MELKI R., GORDON B., BATELIER G., CANDIDO E.P.M. (1997). Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.*, 272 : 24646-24656.

LINARES D., FONTANILLE P., LARROCHE C. (2008a). Protective effect of biomass components against interfacial inactivation of  $\alpha$ -pinene oxide lyase from *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Food Biotechnol.* (in press).

LINARES D., MARTINEZ D., FONTANILLE P., LARROCHE C. (2008b). Production of *trans*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Bioresource Technol.*, 4590-4596.

LIMBERGER R.P., ALEIXO A.M., FETT-NETO A.G., HENRIQUES A.T. (2007). Bioconversion of (+)- and (-)- $\alpha$ -pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. *E. J. Biotechnol.*, 10 : 500-507.

LOZANO P., DE DIEGO T., CARRIE D., VAULTIER D., IBORRA M.J. (2004). Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *J. Mol. Catal. A : Chemical*, 214 : 113-119.

LU X.G., ZHAN L.B., FENG B.A., QU M.Y., XIE J.H. (2004). Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J. Gastroenterol.*, 10 : 2140-2144.

LUCINI E.I. (2004). Thèse de Doctorat, Universidad nacional de Córdoba, Argentine.

LÜTZ S. (2006). Transition metal catalyzed regeneration of nicotineamide cofactors. Dans : *The handbook of homogenous hydrogenation*, vol. III, de Vries J.G. & Elsevier C.J. (eds), GmbH, Weinheim, pp 1471-1482.

LYMAN W.J., REEHL W.F., ROSENBLATT D.H. (1990). Handbook of chemical property estimation methods, American Chemical Society, Washington, DC.

MACKAY D., BOBRA A.M., CHAN D., SHIU W.Y. (1982). Vapor pressure correlations for low volatility environmental chemicals. Environ. Sci. Technol., 16 : 645-649.

MAGASANIK B. (1970). Glucose effect : Inducer exclusion and repression. Dans : The lactose operon, Beckwith J. & Zipser D. (eds), Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, pp 198 – 206.

MAARSE H. (1991). Volatile compounds in food and beverages, Dekker, New York.

MATHEIS G. (1998). Raw materials for flavourings. Dans : Flavourings, Ziegler E. & Ziegler H. (eds), VCH-Wiley, Weinheim, pp 125-142.

MEISSNER H.P. (1949). Critical constants from parachor and molar refraction. Chem. Eng. Prog., 45 : 149-153.

MENZEL M., SCHREIER P. (2007). Enzymes and flavour biotechnology. Dans : Flavours and fragrances : Chemistry, biprocessing and sustainability, Berger R.G. (ed), Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, p 589.

MEYLAN W.M., HOWARD P.H., BOETHLING R.S. (1996). Improved method for estimation of water solubility from octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem., 15 : 100-106.

MIKAMI Y. (1988). Microbial conversion of terpenoids. Biotechnol. Gen. Eng. Rev., 6 : 271-320.

MIKAMI Y., FUKUNAGA Y., ARITA M., KASAKI T. (1981a). Microbial transformation of  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -methylionone. Appl. Environ. Microbiol., 41 : 610-617.

MIKAMI Y., FUKUNAGA Y., ARITA M., OBI Y., KISAKI T. (1981b). Preparation of aroma compounds by microbial transformation of isophore with *Aspergillus niger*. Agric. Biol. Chem., 43 : 791-793.

MILLIPORE (2005). Amicon Ultra-15 Centrifugal filter devices, user guide. Millipore corporation, Ireland.

MONSAN P., COMBES D. (1984). Effect of water activity on enzyme action and stability. Ann. N.Y. Acad. Sci., 12 : 4860.

MORALES G., LINARES J.F., BELOSE A., ALBAR J.P., MARTÍNEZ J.L., ROJO F. (2004). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. J. Bacteriol., 186 : 1337-1344.

MOTTRAM D.S. (2007). The Maillard reaction : Source of flavours in thermally processed foods. Dans : Flavours and fragrances : Chemistry, bioprocessing and sustainability, Berger R.G. (ed), Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 270-273.

MOUREY A., CANILLAC N. (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. Food Control, 13 : 289-292.

MUHEIM A., MÜLLER B., MÜNCH T., WETLI M. (1998). Process for the production of vanillin. Eur. Patent N°0885968A1.

MÜHLBAUER R.C., LOZANO A., PALACIO S., REINLI A., FELIX R. (2003). Common herbs, essential oils, and monoterpenes potentially modulate bone metabolism. Bone, 32(4) : 372-380.

MULLER B.L., DEAN C., WHITEHEAD I.M. (1995a). Dans : Bioflavour 95, Etiévant P. & Schreier P. (eds), INRA, Versailles, p 339.

MULLER B., GAUTIER A., DEAN C., KUHN J.C. (1995b). Process for the enzymatic preparation of aliphatic alcohols and aldehydes from linoleic acid, linolenic acid, or a natural precursor. US Patent N° 5464761.

NÄF F., NÄF R., UHDE G. (1990) Synthesis of natur-identical flavour chemicals. Dans : Flavour science and technology, Bessiere Y. & Thomas A.F. (eds), John Wiley & Sons, New York, Singapore, Toronto, pp 1-20.

NELKEN L.H. (1990). Densities of vapors, liquids and solids. Dans : Handbook of chemical properties estimation methods. Environmental behavior of organic compounds, Lyman W.J., Reehl W.F. et Rosenblatt D.H. (eds), American chemical society, Washington, D.C.

NIJSSEN L.M., VISSCHER C.A., MAARSE H., WILLEMSSENS L.C., BOELSENS M.H. (1996). Volatile compounds in food : Qualitative and quantitative data, 7<sup>ème</sup> édition, TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, pp 1963-1999.

NIKAIDO H., ROSENBERG E.Y., FOULDS J. (1983). Porin channels in *Escherichia coli* : Studies with  $\beta$ -lactams in intact cells. J. Bacteriol., 153 : 232-240.

NIWA T., KAWAMURA Y., KATAGIRI Y., EZAKI T. (2005). Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA. J Microbiol. Methods., 61 : 251-60.

NORDE W. (1986). Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. Adv. Colloid Interface Sci., 25 : 267-340.

OGATA Y., TSUCHIDA M. (1957). Linear boiling point relationships. Ind. Eng. Chem., 49 : 415-417.

OHLOFF G. (1994). Scent and fragrances, Springer, Berlin, Heidelberg.

OKAMURA H. (1974). Antimicrobial properties of perfumes. Kôryô, 108 : 9-13.

- OLIVEIRO J., KANNAN K. (1999). Quantitative structure-retention relationships of polychlorinated naphthalenes in gas chromatography. *J. Chromatogr., A.*, 849 : 621–627.
- OMELIANSKI V.L. (1923). Generation of atmospheric nitrogen by activity of microbes. *J. Bacteriol.*, 8 : 393.
- ONKEN J., BERGER R.G. (1999). Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in a membrane bioreactor. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 51 : 158-163.
- PALLERONI N.J. (1984). *Pseudomonadaceae*. Dans : Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1, Krieg N.R, Holt J.G (eds). The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp 141-199.
- PALLERONI N.J., KUNISAWA R., CONTOPOULOU R., DOUDOROFF M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23 : 333-339.
- PARK S., KAZLAUSKA R.J. (2003). Biocatalysis in ionic liquids-advantages beyond green technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14 : 432-437.
- PARVEEN M., HASAN M.K., TAKAHASHI J., MURATA Y., KITAGAWA E., KODAMA O., IWAHASHI H. (2004). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene : Evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. antimicrob. Chemother.*, 54 : 46-55.
- PATTON C.J., CROUCH S.R. (1977). Spectrophotometric and kinetic investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 49 : 464-469.
- PEQUIGNOT C., LARROCHE C., GROS J.B. (1998). A spectrophotometric method for determination of bacterial biomass in the presence of a polymer. *Biotechnol. Tech.*, 12 : 899-903.
- PERÉZ A., RIOS J., SANZ C., OLIAS J. (1992). Aroma components and free amino acids in strawberry var. Chandler during ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 36 : 2232-2235.
- PERRY N.S.L., BOLLEN C., PERRY E.K., BALLARD C. (2003). *Salvia* for dementia therapy : Review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. biochem. Behave.*, 75 : 651-659.
- PETERSON G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83 : 346-356.
- PIEROTTI G., DEAL C.H., DERR E.L. (1959). Activity coefficients and molecular structure. *Ind. Eng. Chem.*, 51 : 95-102.
- RABENHORST J., GATFIELD I. (2000). Method of producing  $\gamma$ -decalactone. WO Patent N°0024920.
- RABENHORST J., GATFIELD I.L., HILMER J.M. (2001). Fermentative procedure for obtaining aromatic, aliphatic and thiocarboxylic acid and microorganisms therefor. Eur. Patent N°1081229.

RABENHORST J., HOPP R. (2000). Process for the preparation of vanillin and microorganisms suitable therefore. US Patent N°6133003.

RAMOS J.L., MARQUES S., TIMMIS K.N. (1997). Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51 : 341-373.

RASOR J.P., VOSS E. (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Appl. Catal. A.*, 22 : 145-158.

RATLEDGE C. (2001). Biochemistry and physiology of growth and metabolism. Dans : *Basic Biotechnology*. Ratledge C. & Kristiansen B. (eds), Cambridge University Press, Cambridge, p 31.

RECHSTEINER C.E.Jr. (1990). Boiling point. Dans : *Handbook of chemical properties estimation methods. Environmental behavior of organic compounds*, Lyman W.J., Reehl W.F. et Rosenblatt D.H. (eds), American chemical society, Washington, D.C.

RICHARD H. (1992). Connaissance de la nature des arômes. Dans : *Les arômes alimentaires*, Richard H. & Multon J.L. (eds), Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp 22-37.

RIEBEL B.R., GIBBS P.R., WELLBORN W.B., BOMMARIUS A.S. (2002). Cofactor regeneration of NAD<sup>+</sup> from NADH : Novel water-forming NADH oxidases. *Adv. Synth. Catal.*, 344 : 1156-1168.

RIEBEL-BOMMARIUS B., BOMMARIUS A., GIBBS P., WELLBORN W. (2007). Methods and compositions for NAD(P)(H) oxidases. US Patent N° 11045874.

ROCKEMANN W. (1922). Uber tetralinharn. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 95 : 52-67.

ROJO F., DINAMARCA M.A. (2004). Catabolic repression and physiological control. Dans : *Pseudomonas*, vol. 2, Virulence and gene regulation. Ramos J.L. (ed), Kluwer academic / plenum publishers, pp 365-387.

ROSS A.C., BELL G., HALLING P.J. (2000a). Effect of pH on rate of interfacial inactivation of serine proteases in aqueous-organic systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 67 : 498-503.

ROSS A.C., BELL G., HALLING P.J., (2000b). Organic solvent functional group effect on enzyme inactivation by interfacial mechanism. *J. Mol. Catal., B : Enzymatic*, 8 : 183-192.

ROY D., HILL C. (2001). Bacterial osmoadaptation : The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26 : 49-71.

RUIZ-MANZANO A., YUSTE L., ROJO F. (2005). Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions. *J. Bacteriol.*, 187 : 3678-3686.

SANDERSON G.W., GRAHAM H.N. (1973). On the fermentation of black tea aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 21 : 577-585.

SANDWICK P.K., SCHRAY K.J. (1987). The inactivation of enzymes upon interaction with a hydrophobic latex surface. *J. Colloid Interf. Sci.*, 115 : 130-138.

SAVITHIRY N., GAGE D., FU W., ORIEL P. (1998). Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation*, 9 : 337-341.

SCHMID R.D. (2003). Pocket guide to biotechnology and genetic engineering. Wiley-VCH, Weinheim.

SCHRADER J., ETSCHMANN M.M.W., SELL D., HILMER J.M., RABENHORST J. (2004). Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds : Current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Lett.*, 26 : 463-472.

SCHRADER J. (2007). Microbial flavour production. Dans : Flavours and fragrances : Chemistry, bioprocessing and sustainability, Berger R.G. (ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 508-513.

SCHREIER P. (1988). Biotechnology and flavour production, Vol. 2, Proc. 8<sup>th</sup> Int. Biotechnol. Symp., Paris, France, pp 869-883.

SCHWARZENBACH R.P., GSCHWEND P.M., IMBODEN D.M. (1993). Environmental organic chemistry, J.Wiley & Sons, New York, p 133.

SCRAGG A.H. (1997). The production of aromas by plant cell cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, 55 : 239-267.

SHUKLA O.P., BATTACHARYYA P.K. (1968). Microbial transformations of terpenes : Part X- Pathways of degradation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinenes in a soil pseudomonad (PL- strain). *Indian J. Biochem.*, 5 : 92-101.

SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B. (1994). Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269 : 8022-8028.

SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B. (1995). Membrane toxicity of cyclic hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59 : 201-222.

SILVERTSEIN R.M., BASLER C.G., MORILL C.T. (1998). Identification spectrométrique de composés organiques, De Boeck (ed.), p 26.

SLEIN M.W. (1965). D-glucose determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. Dans : Methods in enzymatic analysis, Bergmeyer H.U. (ed), Academic Press, London, pp 117-123.

SOMAYAJULU G.R., PALIT S.R. (1957). Boiling points of homologous liquids. *J. Chem. Soc.*, 1957 : 2540-2544.

STANIER R.Y., PALLERONI N.J., DOUDOROFF M. (1966). The aerobic pseudomonads : A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43 : 159-271.

STEARNS V., COOP A., SINGH B., GALLAGHER A., YAMAUCHI H., LIEBERMAN R., PENNANEN M., TROCK B., HAYES D.F., ELLIS M.J. (2004). A pilot surrogate end point biomarker trial of perillyl alcohol in breast neoplasia. *Clin. Cancer. Res.* 10 : 7583-7591.

STECKHAN E., HERRMANN S., RUPPERT R., DIETZ E., FREDE M., SPIKA E. (1991). Analytical study of a series of substituted (2,2'-bipyridil)(pentamethylcyclopentadienyl) rhodium and -iridium complexes with regard to their effectiveness as redox catalysts for the indirect electrochemical and chemical reduction of NAD(P). *Organometallics*, 10 : 1568 – 1577.

STIEL L.I., THODOS G. (1962). The normal boiling points and critical constants of saturated aliphatic hydrocarbons. *AIChE J.*, 8 : 527-529.

STRAATHOF A.J.J. (2003). Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces. *Biotech. Bioeng.*, 83 : 371-375.

SUGDEN S. (1924). The influence of the orientation of surface molecules on the surface tension of pure liquids. *J. Chem. Soc.*, 125 : 1177-1189.

SUHARA Y., ITOH S., OGAWA M., YOKOSE K., SAWADA T., SANO T., NINIMIYA R., MARUYAMA H.B. (1981). Regio-Selective 10-Hydroxylation of Patchoulol, a Sesquiterpene, by *Pithomyces* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 : 187-191.

TERRANCE G.S., LE MAGUER M. (1980). Solubilities of terpenic essential oil components in aqueous solutions. *J. Chem. Eng. Data*, 25 : 150-152.

TESSEIRE P.J. (1991). *Chimie des substances odorantes*. Tech&doc, Lavoisier, Paris, pp 3-23.

THEIS N., LERDAU M. (2003). The ecology and evolution of plant secondary metabolites. *Int. J. Plant. Sci.*, 164s: 93-102.

THIJSSE G.J.E. (1964). Fatty-acid accumulation by acrylate inhibition of  $\beta$ -oxidation in an alkane-oxidizing *Pseudomonas*. *Biophys. Acta*, 84 : 195-197.

TRAMPER J., VERMÛE M.H., BEEFTINK H.H., VON STOCKAR U. (1992). *Biocatalysis in non-conventional media*. Elsevier Science Publ., Amsterdam, The Netherlands.

TRIPP B.C., MAGDA J.J., ANDREA J.D. (1995). Adsorption of globular proteins at the air / water interface as measured via dynamic surface tension : concentration dependence, mass-transfer considerations and adsorption kinetics. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 173 : 16-27.

TROQUET J., LARROCHE C., DUSSAP C.G. (2003). Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13 : 103-112.

TRUDGILL P.W. (1994). Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes. Dans : *Biochemistry of microbial degradation*, Ratledge C. (ed), Kluwer, Dordrecht, pp 33-61.

- TUDROSZEN N.J., KELLY D.P., MILLIS N.F. (1977).  $\alpha$ -pinene metabolism by *Pseudomonas putida*. *Biochem J.*, 168 : 312-318.
- URIBE S., RAMIREZ J., PENA A. (1985). Effects of  $\beta$ -pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.*, 161 : 1195-1200.
- ULTEE A., BENNINK M.H.J., MOEZELAAR R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 : 1561-1568.
- VAN DER WERF M.J., HARTMANS S., VAN DEN TWEEL W.J.J. (1995). Permeabilization and lysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* cells by Triton X-100 for efficient production of D-malate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43 : 590-594.
- VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DE VOS P., KERSTERS K., GOVAN J.R.W. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60 : 407-438.
- VANDAMME E.J., SOETAERT W. (2002). Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77 : 1323-1332.
- VAN RANTWIJK R.M., SHELDON L., SHELDON R.A. (2003). Biocatalytic transformation in ionic liquids. *Trends Biotechnol.*, 21 : 131-138.
- VERMÜE M., TRAMPER J. (1995). Interrelations of chemistry and biotechnology. V : Biocatalysis in non-conventional media : Medium engineering aspects. *Pure Appl. Chem.*, 67 : 345-373.
- VIERLING E. (1998). Les arômes. Dans : *Aliments et boissons*, Figarella J. & Zonszain F. (eds), Biosciences et techniques, Bordeaux, pp 71-77.
- VILLIERE A., GENOT C., (2004). Interactions protéines - métaux et stabilité à l'oxydation des émulsions alimentaires. Dans : 16<sup>ème</sup> rencontres AGORAL, TEC & DOC (eds), Nantes, pp 32-39.
- WALSH S.E., MAILLARD J.Y., RUSSEL A.D., CATRENICH C.E., CHARBONNEAU D.L., BARTOLO R.G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 94 : 204-247.
- WEE J.L., HARRIS S.A., SMITH J.P., DIONIGI C.P., MILLIE D.F. (1994). Production of the taste / odor-causing compound, *trans*-2, *cis*-6-nonadienal, within the Synurophyceae. *J. App. Phycology.*, 22 : 365-369.
- WEI CHEN S., MIN L., JING LI W., XI KONG W., FANG LI J., JING ZHANG Y. (2004). The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 79 : 377-382.
- WHITEHEAD I.M., OHLEYER E. (1997). Process for the production of carboxylic acids from alcohols using *saccharomyces*. US Patent N° 5599700.

- WICHMANN R., WANDREY C. (1981). Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol. Bioeng.*, 67 : 791-804.
- WICK E., KOSHIKA M., MIZUTANI J. (1965). Effect of storage at ambient temperature on the volatile components of irradiated beef. *J. Food Sc.*, 30 : 433- 440.
- WODZINSKI R.S., BERTELONI D. (1972). Physical state in which naphthalene and bibenzyl are utilized by bacteria. *Appl. Microbiol.*, 23 : 1077-1081.
- WONG C.H., DRUECKHAMMER D.G. (1985). Enzymatic vs fermentation - thermostable glucose - deshydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis. *J. American Chem. Soc.*, 107 : 4028-4031.
- WOODYER R.D., JOHANNES T.W., ZHAO H. (2005). Regeneration of cofactors for enzyme biocatalysis. Dans : *Enzyme technology*, Pandey A., Webb C., Soccol C.R. et Larroche C. (eds), Asiatech publisher Inc., New Delhi, pp 85-103.
- YALKOWSKY S.H., VALVANI S.C. (1979). Solubilities and partitioning : 2. Relationships between aqueous solubilities, partition coefficients and molecular surface areas of rigid aromatic hydrocarbons. *J. Chem. Eng. Data*, 24 : 127-129.
- YAMAGUCHI K., SHINOHARA C., KOJIMA S., SODEOKA M., TSUJI T. (1999). (2E,6R)-8-Hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenoic Acid, a Novel Anti-osteoporotic Monoterpene, Isolated from *Cistanche salsa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 : 731-735.
- YANG Z., PAN W. (2005). Ionic liquids : Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 37 : 19-28.
- YOO S.K., DAY D.F (2002). Bacterial metabolism of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. Strain PIN. *Proc. Biochem.*, 37 : 739-745.
- YUSTE L., ROJO F. (2001). Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J. Bacteriol.*, 183 : 6197-6206.
- ZHAO H., VAN DER DONK W.A. (2003). Regeneration of cofactors for use in biocatalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14 : 1-7.
- ZORN H., NEUSER F., BERGER R.G. (2004). Degradation of  $\alpha$ -pinene oxide and [ $^2\text{H}_7$ ]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761. *J. Biotechnol.*, 107 : 255-263.

**Sites Internet :**

**Banques de données de constantes physico-chimiques:**

Physprop :

<http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>

Chemfinder :

<http://www.chemfinder.com>

Links for chemists :

<http://www.liv.ac.uk/chemistry/links/links.html>

Aquasol :

<http://www.pharmacy.arizona.edu/outreach/aquasol/>

Unifac :

téléchargé sur : <http://www.che.edu/thermo/basicprograms.htm>.

**Banques de données génomiques :**

Genbank :

[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)

Pseudomonas genome :

[www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)

Algorithmes d'analyse des spectres Maldi-Tof :

-Mascot :

[www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)

-Profound :

<http://www.unb.br/cbsp/paginiciais/profound.htm>

**Banques de données spectrométriques :**

Sigma – Aldrich :

<http://www.sigmaaldrich.com>

Acros-Organics :

<http://www.acros.com>

NIST (National Institute of Standard and Technology) :

<http://www.webbbock.nist.gov/chemistry/name-ser.html>

Spectral database for organic compounds, SDDBS :

<http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct-top.cgi>

Sadtler spectral database :

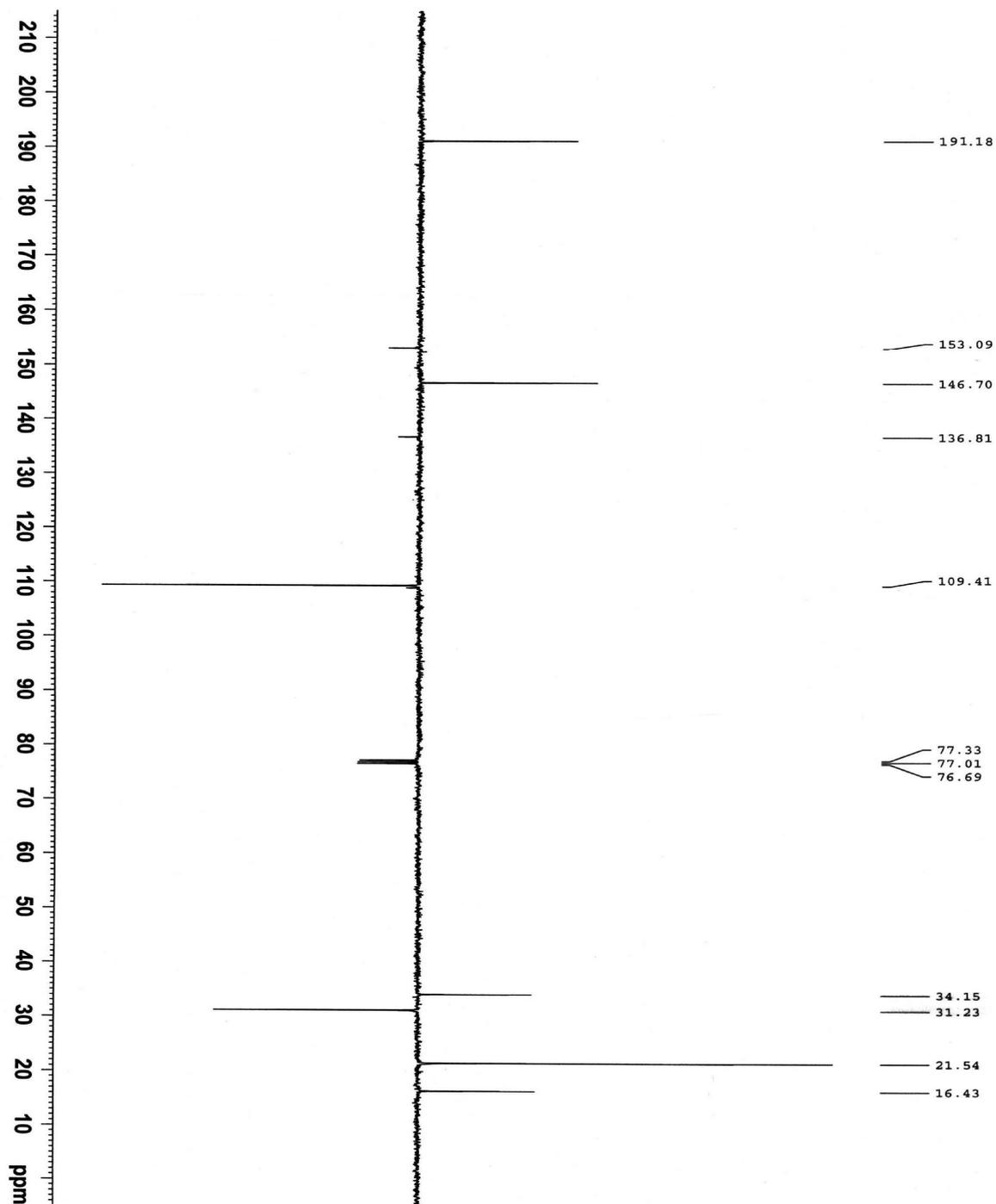
<http://www.bio-rad.com/b2b/biorad/offices/sadtler/sadtler-irbb.jsp>

# Annexes

---



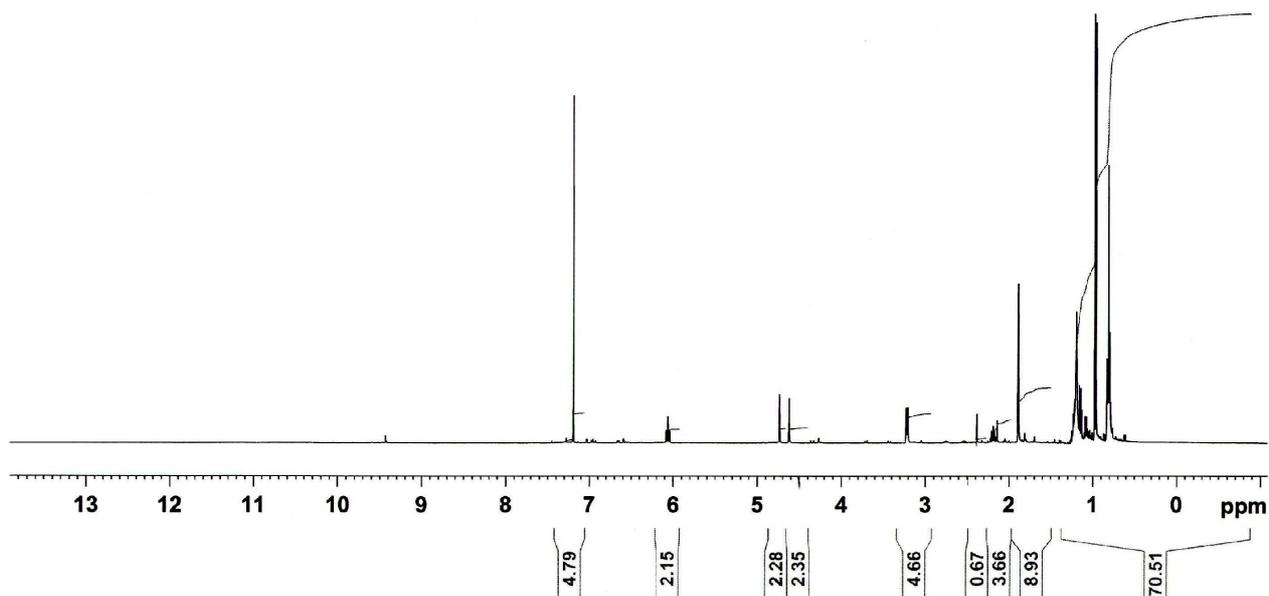
## Annexe A

Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'isonovalal

Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  de l'isonovalal purifié dans les conditions décrites dans le chapitre II.3.3. Les conditions d'analyse sont décrites dans le chapitre II.2.3.4. Les pics à 77 ppm correspondent au  $\text{CDCl}_3$ .

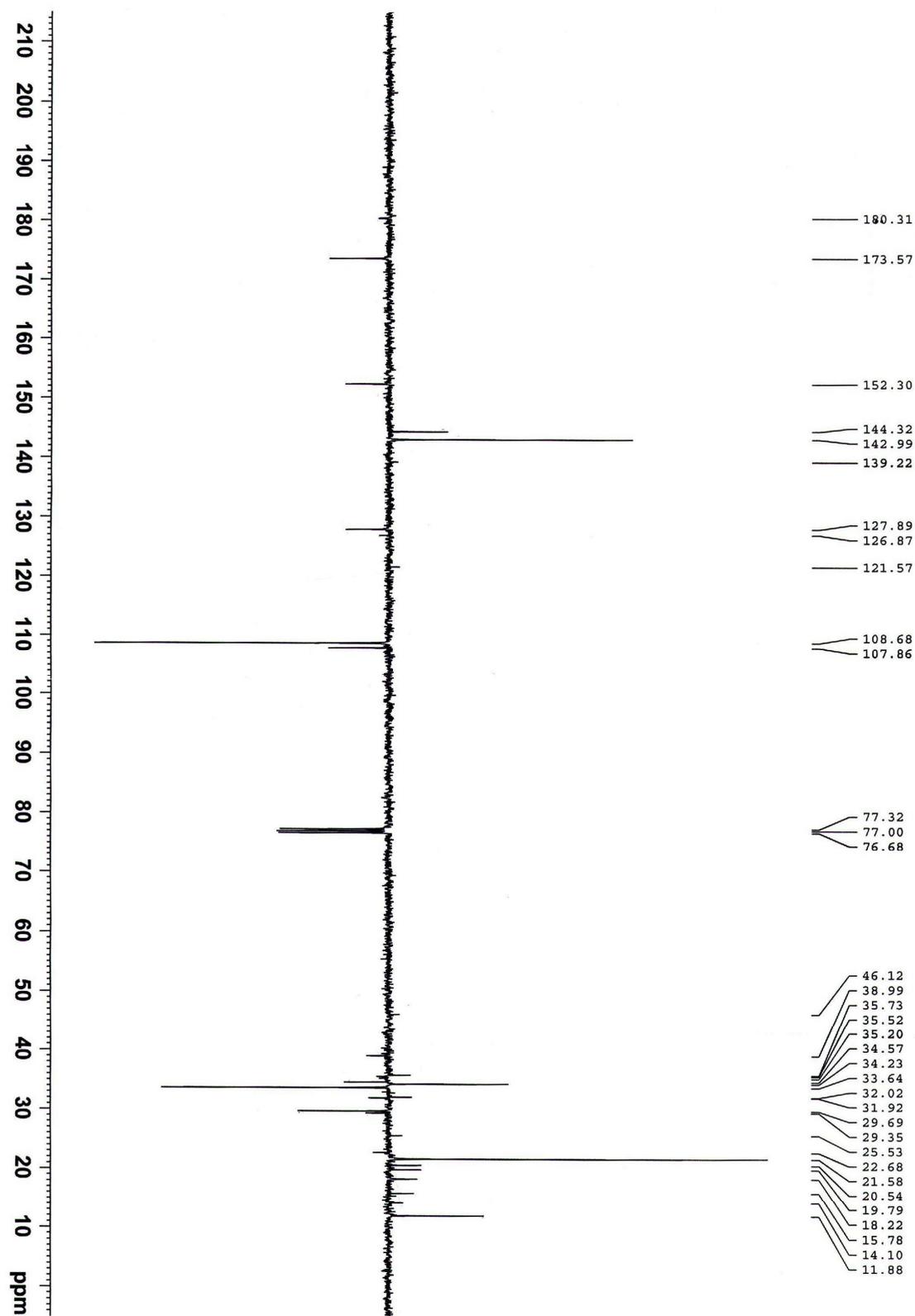
**Annexe B**

Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'acide isonovalique



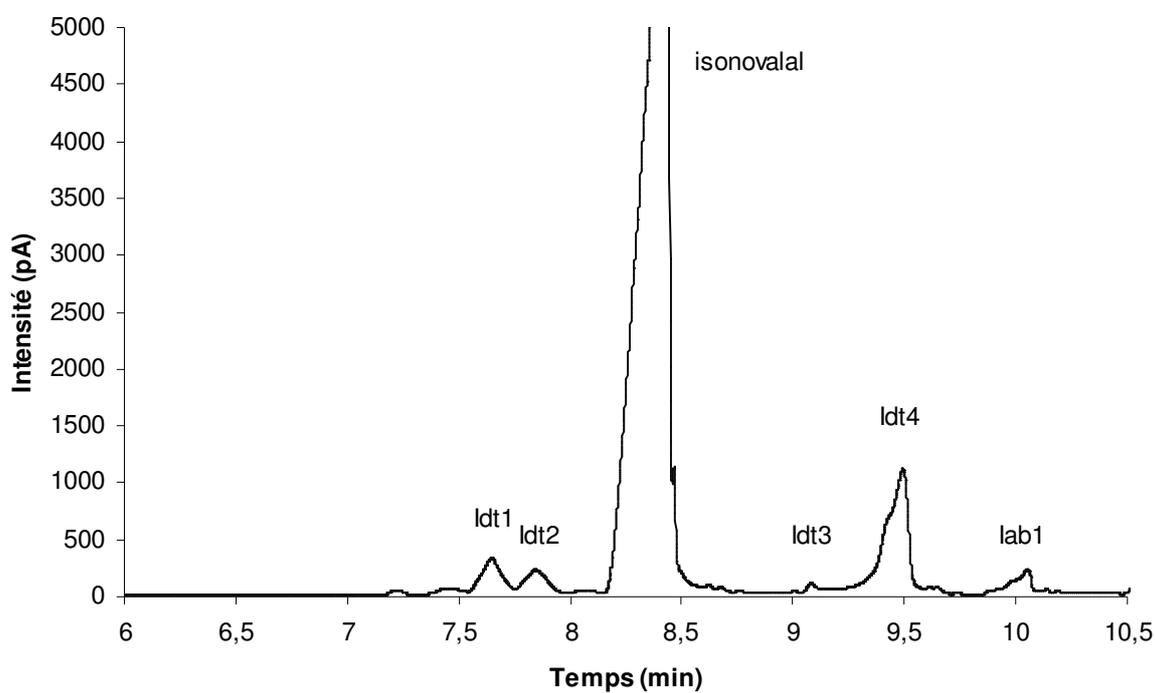
Annexe C

Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'acide novalique

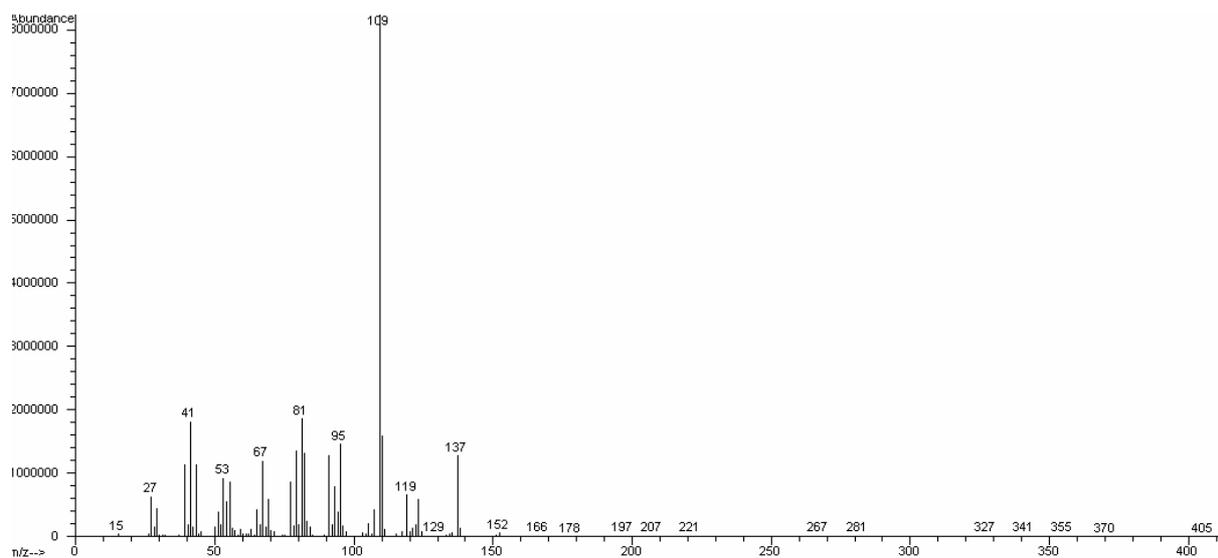


**Annexe D****Banque des spectres de masse**

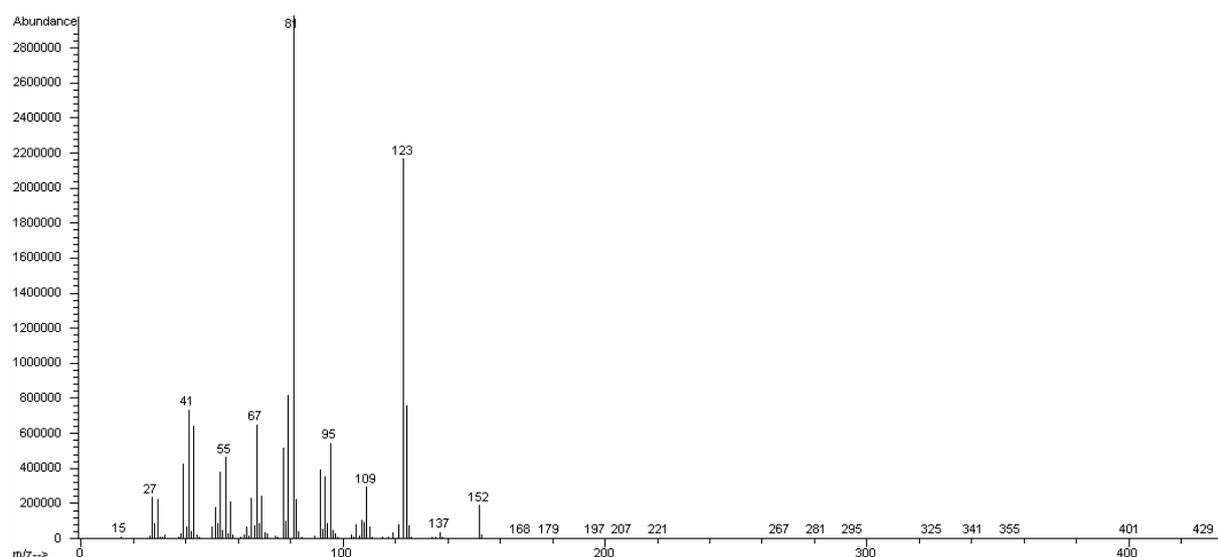
Les documents suivant présentent les résultats obtenus par analyse des composés produits au cours de cette étude par un appareil de CPG couplé à un spectromètre de masse. Les analyses sont réalisées dans les conditions décrites dans le paragraphe II.3.3.3.

**A. Isonovalal et produits de dégradation thermique et abiotique**

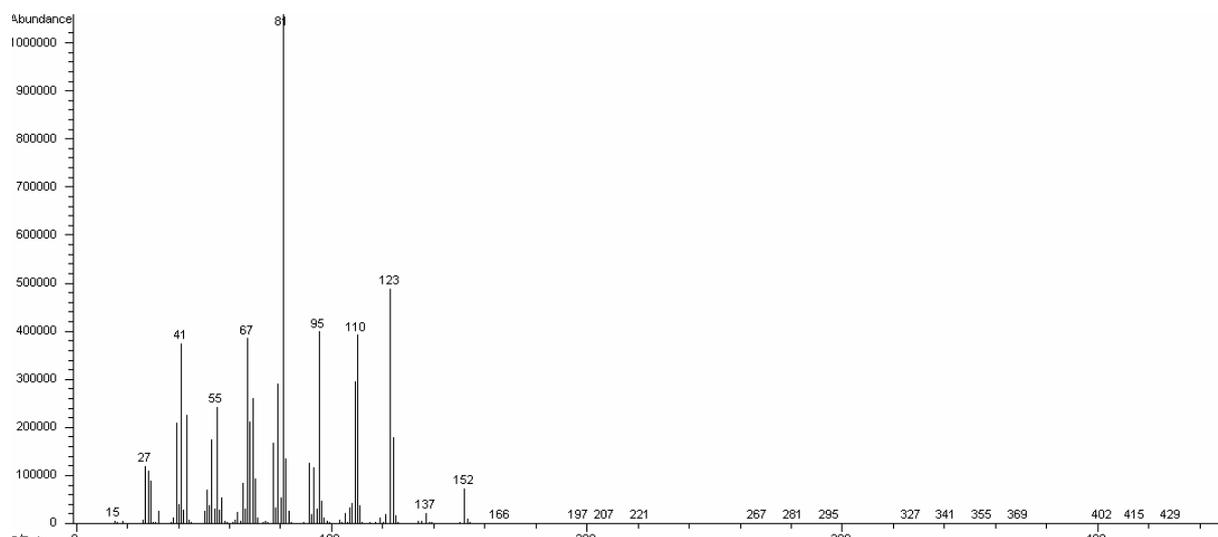
Chromatogramme en phase gaz de l'isonovalal et de ses produits de dégradation thermique (Idt) et abiotique (Iab).



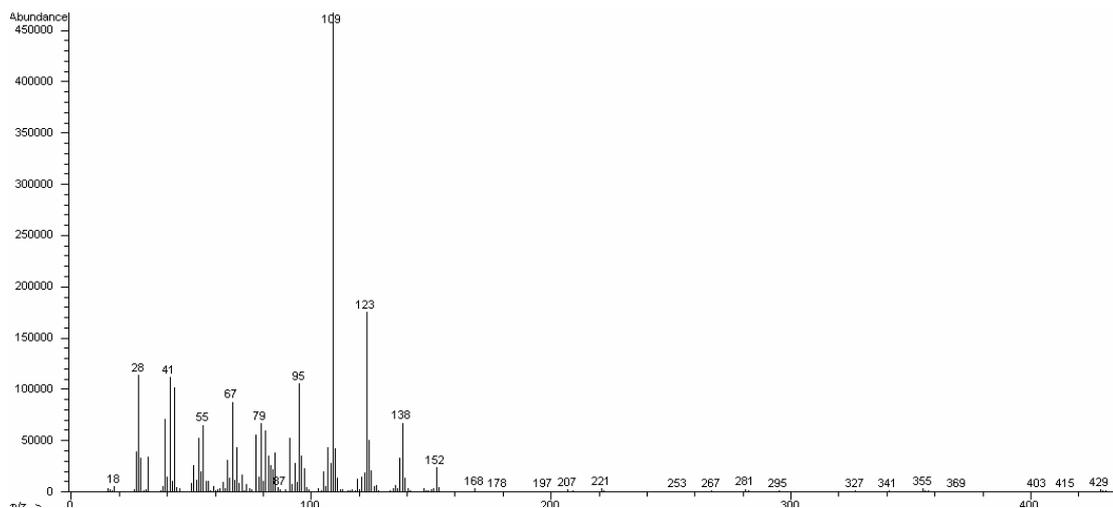
Spectre de masse de l'isovalal.



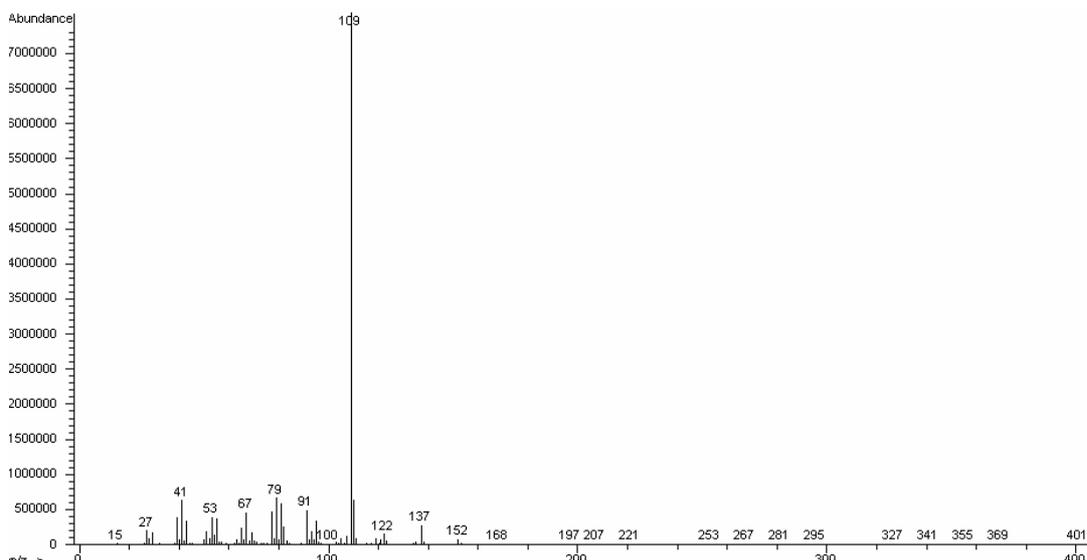
Spectre de masse du produit de dégradation thermique de l'isovalal 1 (Idt1).



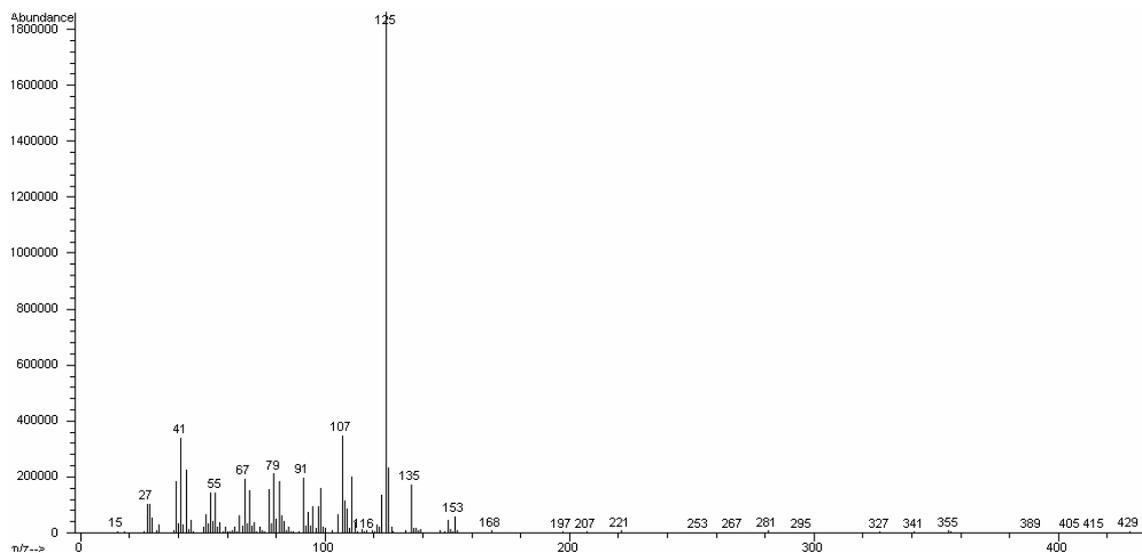
Spectre de masse du produit de dégradation thermique de l'isovalal 2 (Idt2).



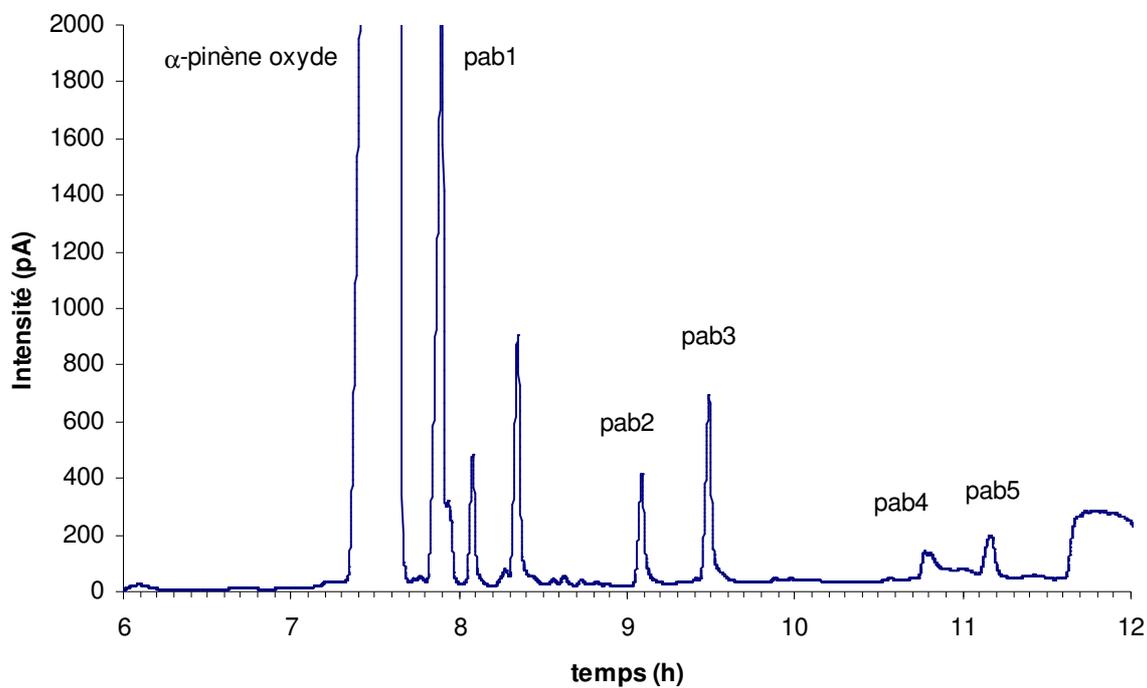
Spectre de masse du produit de dégradation thermique de l'isonovalal 3 (Idt3).



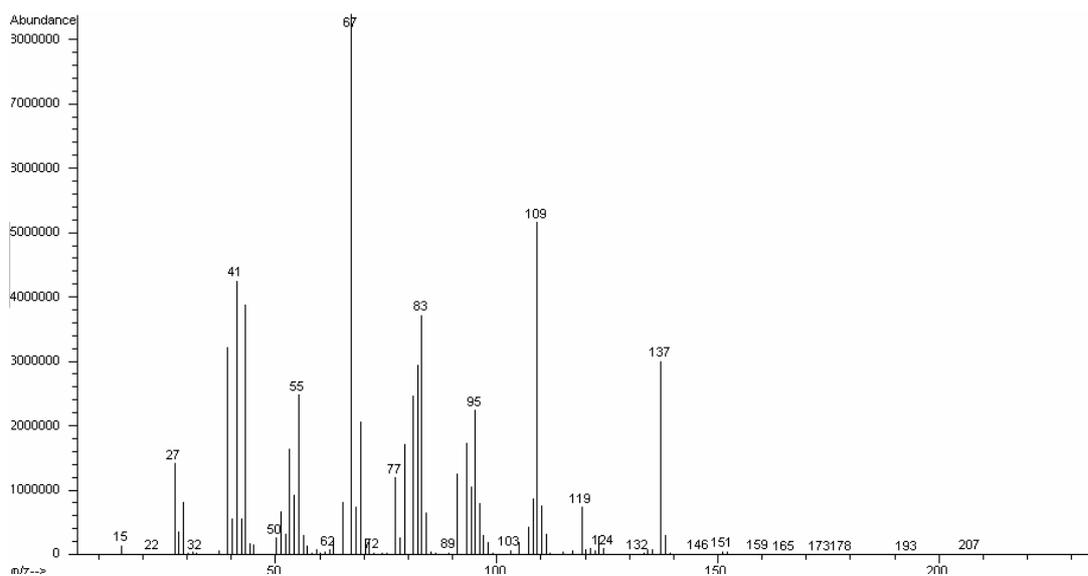
Spectre de masse du produit de dégradation thermique de l'isonovalal 4 (Idt4).



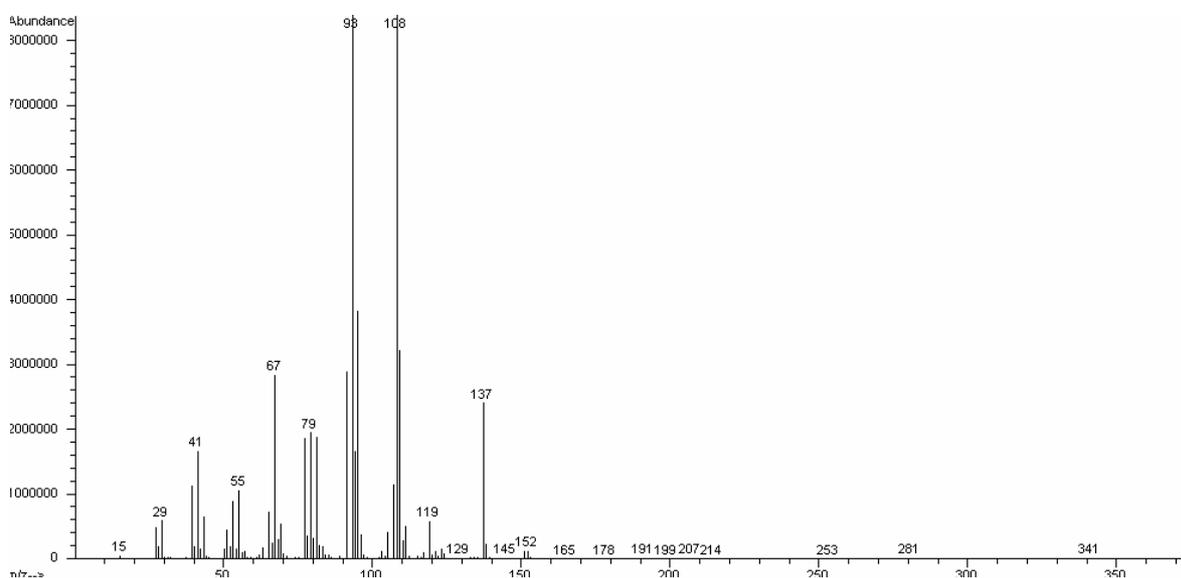
Spectre de masse du produit de dégradation abiotique de l'isonovalal 1 (Iab1): acide isovalique.

**B.  $\alpha$ -pinène oxyde et produits de dégradation abiotique**

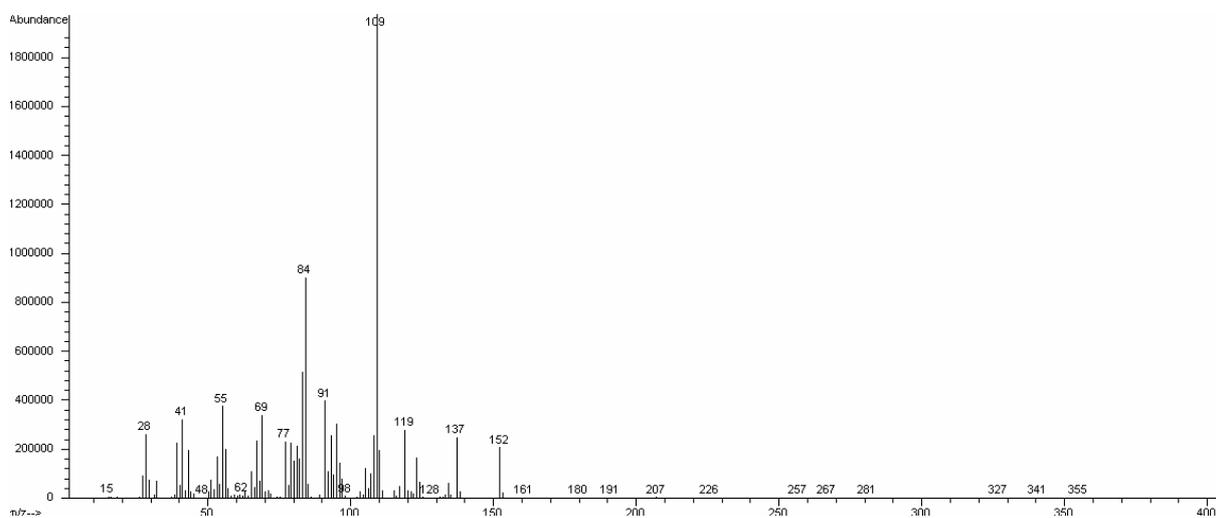
Chromatogramme en phase gaz de l' $\alpha$ -pinène oxyde et de ses produits de dégradation abiotique (pab).



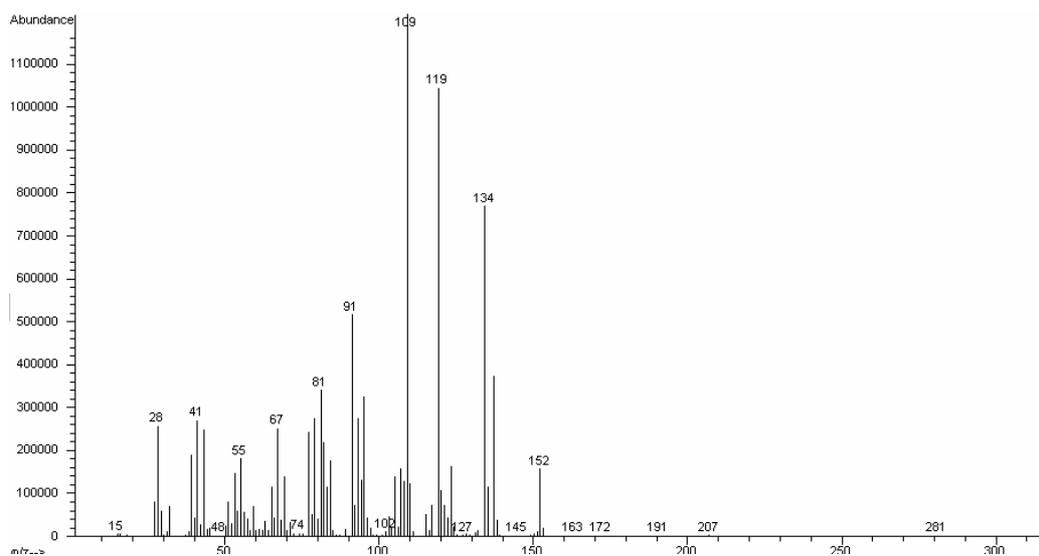
Spectre de masse de l' $\alpha$ -pinène oxyde.



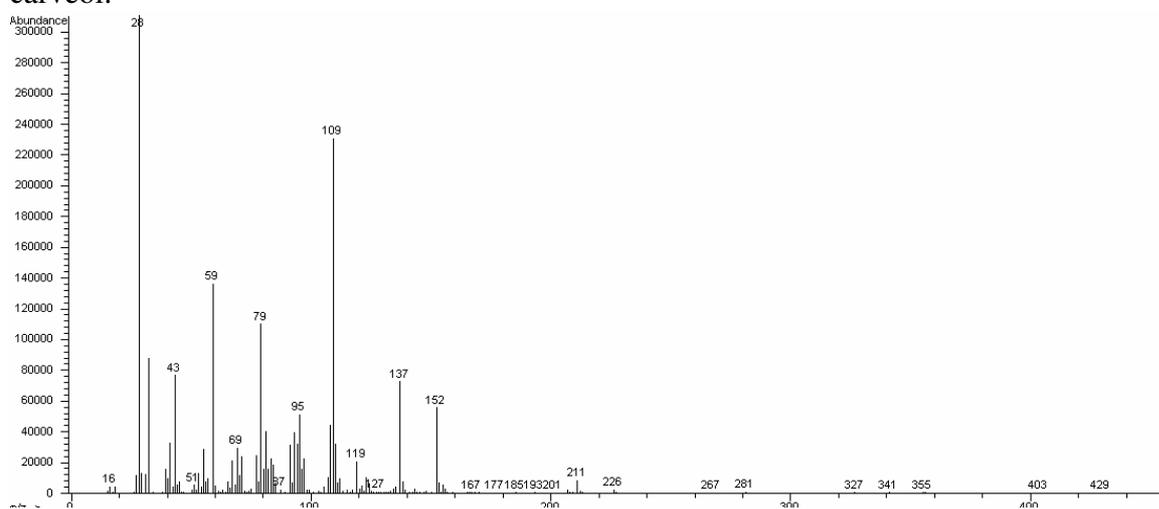
Spectre de masse du produit de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde 1 (pab1) :  $\alpha$ -campholenal.



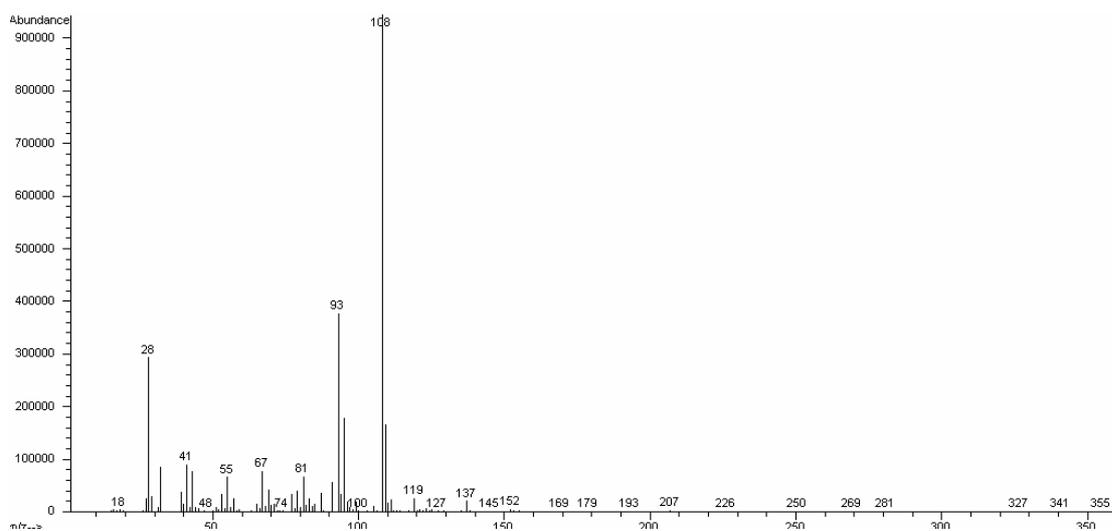
Spectre de masse du produit de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde 2 (pab2).



Spectre de masse du produit de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde 3 (pab3) : *cis*-carveol.



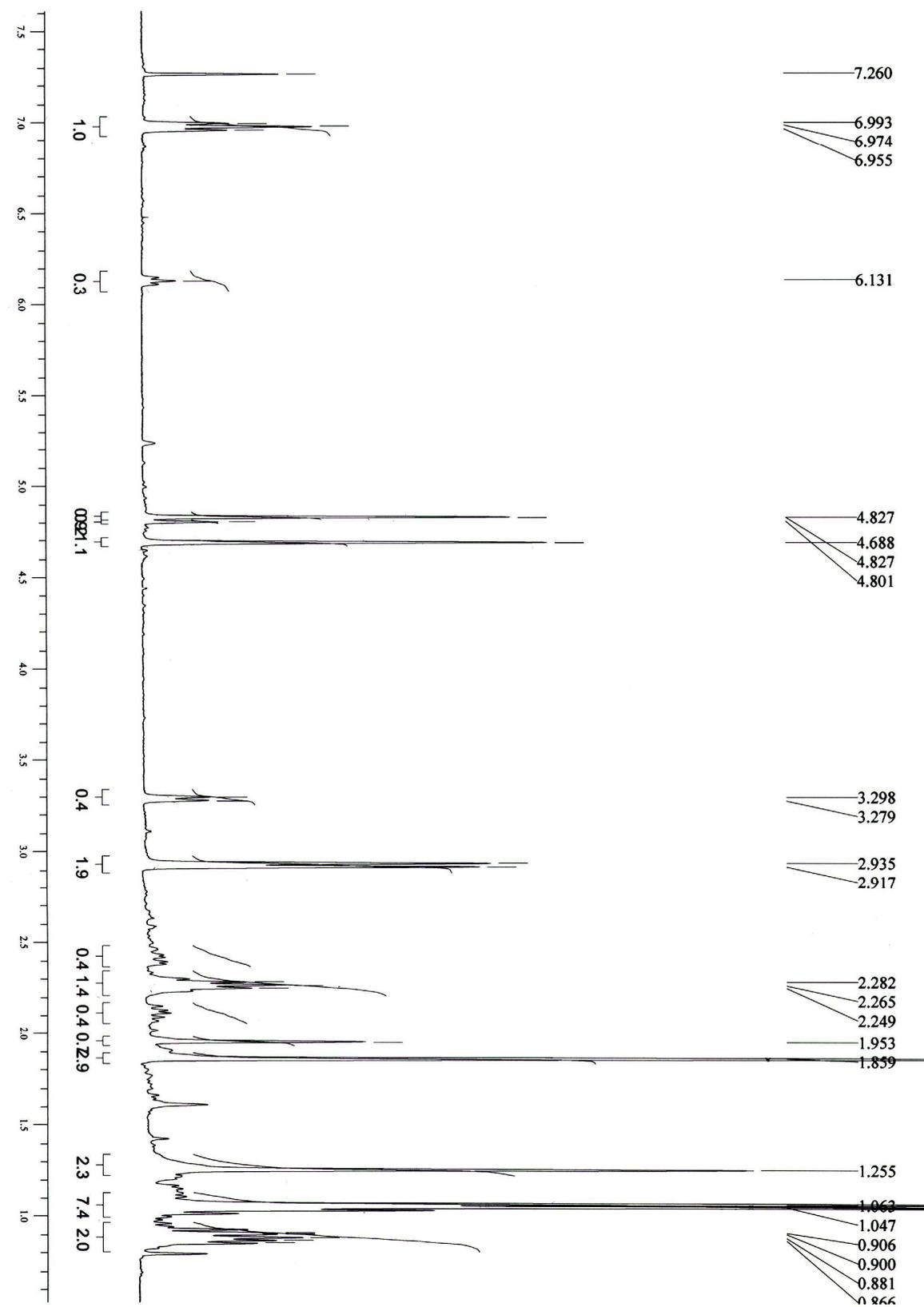
Spectre de masse du produit de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde 4 (pab4) : *trans*-sobrerol.



Spectre de masse du produit de dégradation abiotique de l' $\alpha$ -pinène oxyde 5 (pab5).

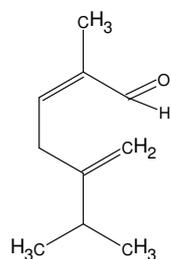
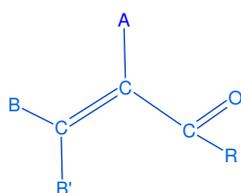
**Annexe E**

Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'acide novalique et de l'acide isonovalique



## Annexe F

Estimation théorique de la longueur d'onde maximum d'absorption de l'isonovalal dans l'UV par la méthode empirique de WOODWARD-FIESER.



Isonovalal

Groupement	Correspondance	Contribution (nm)
R	H	210
A	R (Groupement alkyl)	+ 10
B	H	0
B'	R (Groupement alkyl)	+ 12
$\lambda_{\text{max}}$ :		<b>232</b>

## Annexe G

## Estimation de la densité de l'isonovalal

\* Méthode de GIROLAMI (1994)

La masse volumique d'un composé à  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ,  $\rho$  ( $\text{g.mL}^{-1}$ ) est estimée par l'équation suivante :

$$\rho = \frac{M}{5 \cdot \sum n_i \cdot V_{a,i}} \quad (\text{AG.1})$$

Avec  $M$  la masse molaire ( $M_I = 152 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et  $\sum n_i \cdot V_{a,i}$  la somme des groupes atomiques de contribution de la molécule concernée.

Pour l'isonovalal ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ ), les groupes de contributions atomiques sont les suivants :

Incrément	$n_i$	$V_{a,i}$
C	10	2
O	1	2
H	16	1
Somme :		<b>38</b>

A partir de AG.1 :

$$\rho_I = \frac{152}{5 \cdot 38} = 0,8 \text{ g.mL}^{-1}$$

\* Méthode de CANSTANTINO et al. (1994)

La masse volumique d'un composé à  $25^\circ\text{C}$ ,  $\rho$  ( $\text{g.mL}^{-1}$ ), est définie par l'équation suivante :

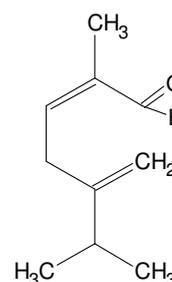
$$\rho = \frac{M}{V_m} \quad (\text{AG.2})$$

$M$  est la masse molaire et  $V_m$  est le volume molaire ( $\text{cm}^3.\text{mol}^{-1}$ ), estimé par la relation suivante :

$$V_m = \sum n_i \cdot V_{m,i} \quad (\text{AG.3})$$

Les groupes de contributions de l'isonovalal sont fixés de la façon suivante :

Incrément	$n_i$	$V_{m,i}$
<i>1<sup>er</sup> ordre :</i>		
$\text{CH}_3$	3	26,14
$\text{CH}_2$	1	16,41
CH	1	7,11
$\text{CH}_2=\text{C}$	1	26,97
$\text{CH}=\text{C}$	1	16,10
$\text{C}=\text{C}$	2	2,96
CHO	1	20,02



2<sup>ème</sup> ordre :

(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	1	1,33
CCH=O	1	0,09
CH <sub>3</sub> -C=CH	1	0,09
CH <sub>2</sub> -CH=C	2	0,12
CH-C=CH <sub>2</sub>	1	1,42
Somme :		<b>174,12</b>

A partir de AG.2 :

$$\rho_l = \frac{152}{174,12} = 0,87 \text{ g.mL}^{-1}$$

\* Méthode de GRAIN (décrite par NELKEN, 1990)

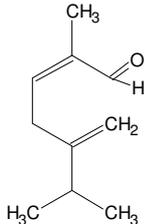
La masse volumique d'un composé à température T (°K), ρ (g.mL<sup>-1</sup>), est estimée par l'équation suivante :

$$\rho = \frac{M}{V_b} \cdot \left( 3 - 2 \cdot \frac{T}{T_b} \right)^n \quad (\text{AG.4})$$

Avec M la masse molaire, T la température appliquée (20°C=293,15°K), T<sub>b</sub> la température d'ébullition du composé (T<sub>b,I</sub> = 475,15°K), n= 0,31 et V<sub>b</sub> le volume molaire à la température d'ébullition (cm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>) estimé par la méthode empirique de SCHROEDER (décrite par NELKEN, 1990) selon l'équation suivante :

$$V_b = \sum n_i \cdot V_{b,i} \quad (\text{AG.5})$$

Les groupes de contribution de l'isonovalal (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O) sont les suivants :

Incrément	n <sub>i</sub>	V <sub>b,i</sub>	
C	10	7	
O	1	7	
H	16	7	
Doubles liaisons	3	7	
Somme :		<b>210</b>	

A partir de AG.4 :

$$\rho_l = \frac{152}{210} \cdot \left( 3 - 2 \cdot \frac{293,15}{475,15} \right)^{0,31} = 0,86 \text{ g.mL}^{-1}$$

## Annexe H

## Estimation de la température d'ébullition et de la température de fusion de l'isonovalal

\* Méthode de JOBACK et REID (1987)

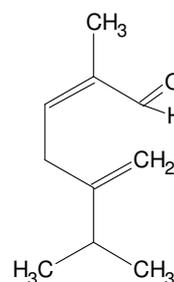
La température d'ébullition,  $T_b$  (°K) et la température de fusion,  $T_m$  (°K), d'un composé donné sont estimées par les relations empiriques suivantes :

$$T_b = 198,2 + \sum n_i \cdot \Delta_{b,i} \quad (\text{AH.1})$$

$$T_m = 122 + \sum n_i \cdot \Delta_{m,i} \quad (\text{AH.2})$$

Les groupes de contribution de l'isonovalal sont fixés à partir des tables de JOBACK et REID de la façon suivante :

Incrément	$n_i$	$\Delta_{b,i}$	$\Delta_{m,i}$
=C<	2	+23,58	+11,40
=CH-	1	+27,95	+8,73
>CH <sub>2</sub>	1	+24,22	+11,27
>CH-	1	+11,86	+12,64
-CH <sub>3</sub>	3	+21,98	-5,10
=CH <sub>2</sub>	1	+16,44	-4,32
-CHO	1	+83,38	+36,90
Sommes :		<b>276,95</b>	<b>72,72</b>



A partir de AH.1 :

$$T_{b,l} = 198,2 + 276,95 = 475,15^\circ K = 202,00^\circ C$$

A partir de AH.2 :

$$T_{m,l} = 122 + 72,72 = 194,72^\circ K = -78,43^\circ C$$

\* Méthode de MEISSNER (1949)

La température d'ébullition,  $T_b$  (°K), d'un composé est calculée par la relation suivante :

$$T_b = \frac{637 \cdot (R_D)^{1,47} + B}{P} \quad (\text{AH.3})$$

$R_D$  est l'indice de réfraction molaire, B est une constante dépendant de la fonction de la molécule (B=15000 pour les aldéhydes) et P est le parachor ( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{1/4} / \text{S}^{1/2} \cdot \text{mol}$ ), estimé par la relation empirique de SUGDEN (décrite par MEISSNER, 1949) :

$$P = \sum n_i \cdot \Delta_{P,i} \quad (\text{AH.4})$$

Les groupes de contribution de l'isonovalal sont fixés de la façon suivante :

Incrément	$n_i$	$\Delta_{p,i}$
C (liaison simple)	10	+9,2
C-H	16	+15,4
C=O	1	+39,0
Double liaisons	3	+19,0
Somme :		<b>434,4</b>

$$T_{b,l} = \frac{637 \cdot (49,22)^{1,47} + 15000}{434,4} = 485^\circ K = 211,88^\circ C$$

\* Méthode de LYDERSEN - FORMAN – THODOS (décrite par RECHSTEINER, 1990)

La température d'ébullition,  $T_b$  (°K), d'un composé est définie par sa relation de proportionnalité avec la température critique,  $T_c$  (°K), de ce même composé :

$$T_b = \theta \cdot T_c \quad (\text{AH.5})$$

#### Estimation de $\theta$ :

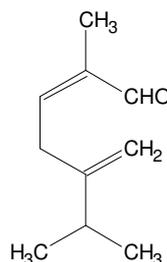
Le ratio entre la température d'ébullition et la température critique peut être estimée par la relation empirique de LYDERSEN :

$$\theta = 0,567 + \Delta T - \Delta T^2 \quad (\text{AH.6})$$

$\Delta T$  est déterminé empiriquement à partir de la structure de la molécule concernée.

Les groupes de contribution de l'isonovalal sont les suivants :

Incrément	$n_i$	$\Delta T_i$
-CH <sub>3</sub>	3	0,020
-CH <sub>2</sub> -	1	0,020
-CH<	1	0,012
=CH <sub>2</sub>	1	0,018
=CH-	1	0,018
=CH<	2	0,000
Fonction aldéhyde	1	0,048
Somme :		<b>0,176</b>



$$\theta = 0,567 + 0,176 - 0,176^2 = 0,712$$

#### Estimation de $T_c$ :

La température critique d'un composé,  $T_c$  (°K) est estimée par la relation empirique de FORMAN - THODOS :

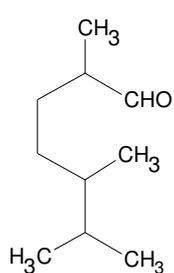
$$T_c = \frac{8 \cdot a}{27 \cdot b \cdot R} \quad (\text{AH.7})$$

R est la constante des gaz parfait ( $82,05 \text{ cm}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) et les constantes a et b sont déterminées à partir de la structure de la molécule étudiée.

Le calcul de  $a^{2/3}$  et de  $b^{3/4}$  pour la molécule d'isonovalal se fait dans l'ordre des étapes suivantes :

- Contribution de la « chaîne aliphatique » :

Type de carbone	Nombre	$a^{2/3}$	$b^{3/4}$
1	4	14690	11,453
2	2	13678	6,262
3	4	8182	1,683
Sommés :		<b>118844</b>	<b>51,604</b>



- Contribution des chaînes latérales :

Les constantes  $a^{2/3}$  et  $b^{3/4}$  sont corrigées par deux facteurs correctifs  $f_a$  et  $f_b$  :

$$f_a = \frac{1}{3} \cdot \left( \frac{W_i}{W_n} + 2 + 0,087 \cdot m + 0,0045 \cdot \sum_{k=1}^m k \cdot (k-1) \right)$$

$$f_b = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{W_i}{W_n} + 1 + 0,101 \cdot m - 0,005 m^2 \right)$$

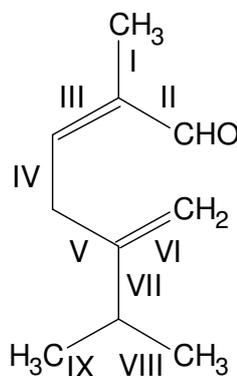
$m$  est le nombre de chaîne(s) latérale(s) ( $m=3$ ),  $W_i$  et  $W_n$  sont les nombres de WIENER, déterminés de la façon suivante :

$$W_n = \frac{(N-1) \cdot (N) \cdot (N+1)}{6} \quad (\text{AH.8})$$

$N$  étant le nombre d'atome de carbone dans la molécule ( $N=10$ ),  $W_n = 165$ .

$W_i$  est déterminé de la façon suivante :

Lien C-C	Nombre de C avant	Nombre de C après	Produit
I	1	9	9
II	1	9	9
III	3	7	21
IV	4	6	24
V	5	5	25
VI	1	9	9
VII	3	7	21
VIII	1	9	9
IX	1	9	9
Somme :			<b>136</b>

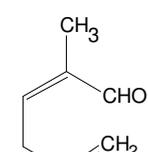


$$a^{2/3}(\text{corrigé}) = f_a \cdot a^{2/3} = 1,0404 \cdot 118844 = 123645$$

$$b^{3/4}(\text{corrigé}) = f_b \cdot b^{3/4} = 1,0410 \cdot 51,604 = 53,720$$

- Contribution des liaisons multiples :

Type de double liaison	Correction $a^{2/3}$	Correction $b^{3/4}$
3-2	-928	-1,820
3u-3	-1316	-1,979



- Contribution des groupes fonctionnels :

Les éléments  $\Delta a^{2/3}$  et  $\Delta b^{3/4}$  sont ajoutés aux valeurs  $a^{2/3}$  et  $b^{3/4}$  calculées précédemment :

$$\Delta a^{2/3} = \frac{k1}{n} + k2 \quad (\text{AH.9})$$

$$\Delta b^{3/4} = \frac{k3}{n} + k4 \quad (\text{AH.10})$$

n est le nombre total d'atome de carbone et de groupe fonctionnel dans la molécule (n=11) et les constantes k pour une fonction carbonyle sont les suivantes : k1=62800, k2=16700, k3=27,20, k4=4,55.

$$a = (123657,2-928-1316+22409)^{3/2} = 54542984$$

$$b = (53,720-1,82-1,979+7,0227)^{4/3} = 219,057$$

A partir de AH.7 :

$$T_{c,l} = \frac{8.54542984}{27.219,057.82,05} = 899,14^\circ K$$

A partir de AH.6 :

$$T_{b,l} = 0,7120.899,14 = 640,19^\circ K = 367^\circ C$$

#### \* Méthode de MILLER (1980)

La méthode de MILLER reprend l'équation AH.5 de la méthode de LYDERSEN-FORMAN-THODOS. La température critique ( $^\circ K$ ) est calculée à partir de l'équation suivante :

$$T_c = \frac{e^\beta}{R} \quad (\text{AH.11})$$

Avec R la constante des gaz parfaits ( $82,054 \text{ cm}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $\beta$  est calculé de la façon suivante :

$$\beta = \frac{[(1-\theta)^{2/7} - 0,048] \cdot \ln(V_c) + [1-\theta]^{2/7} \cdot \ln(P_c) + 1,255}{[1-\theta]^{2/7}} \quad (\text{AH.12})$$

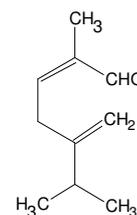
Avec  $P_c$  et  $V_c$  la pression critique (atm) et le volume molaire critique ( $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ), calculés grâce aux relations suivantes :

$$P_c = \frac{M}{(0,34 + \sum \Delta P)^2} \quad (\text{AH.13})$$

$$V_c = 40 + \sum \Delta V \quad (\text{AH.14})$$

$\Delta P$  et  $\Delta V$  sont des groupes de contributions donnés par la structure de l'isonovalal :

Incrément	Nombre de groupe	$\Delta P$	$\Delta V$
-CH <sub>3</sub>	3	0,227	55
-CH <sub>2</sub> -	1	0,227	55
-CH<	1	0,210	51
=CH <sub>2</sub>	1	0,198	45
=CH-	1	0,198	45
=C<	2	0,198	36
-CH=O (aldehyde)	1	0,33	73
Sommés :		<b>2,24</b>	<b>506</b>



A partir de AH.13, AH.14 et de AH.12 :

$$P_c = \frac{152}{(0,34 + 2,24)^2} = 22,835 \text{ Atm}$$

$$V_c = 40 + 506 = 546 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\beta = \frac{[(1 - 0,712)^{2/7} - 0,048] \cdot \ln(546) + [1 - 0,712]^{2/7} \cdot \ln(22,835) + 1,255}{[1 - 0,712]^{2/7}} = 10,79$$

A partir de AH.11 :

$$T_{c,l} = \frac{e^{10,79}}{82,054} = 591,48^\circ \text{K}$$

A partir de AH.5 :

$$T_{b,l} = 0,712 \cdot 591,48 = 421,13^\circ \text{K} = 147,98^\circ \text{C}$$

## Annexe I

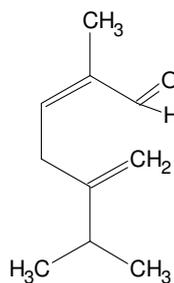
Estimation du logarithme du coefficient de partage de l'isonovalal dans un système eau / octanol ( $\log K_{ow}$ )\* Méthode de KLOPMAN et al. (1994)

Le coefficient de partition eau / octanol d'un composé est donné par la relation suivante :

$$\log K_{ow} = a + \sum_i b_i \cdot B_i + \sum_j c_j \cdot C_j \quad (\text{AI.1})$$

Avec  $a=-0,703$ ,  $c=0$  et  $b$  calculé de la façon suivante :

Incrément	$b_i$	$B_i$
-CH <sub>3</sub>	3	0,661
-CH <sub>2</sub> -	1	0,415
-CH<	1	0,104
=CH <sub>2</sub>	1	0,553
=CH-	1	0,315
=C<	2	0,470
-CHO	1	0,009
Somme :		<b>4,319</b>



A partir de AI.1 :

$$\log K_{ow} = -0,703 + 4,319 = 3,62$$

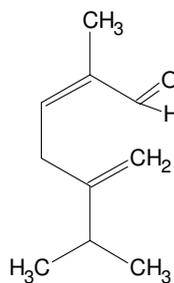
\* Méthode de HANSH et LEO (1979)

Le coefficient de partition eau / octanol d'un composé est donné par la relation suivante :

$$\log K_{ow} = \sum_i a_i \cdot f_i + \sum_j b_j \cdot f_j \quad (\text{AI.2})$$

Les contributions de groupe sont calculées de la façon suivante :

Incrément	$a_i$	$f_i$
-H	16	0,23
-CH <sub>3</sub> -	3	0,89
=C<	2	0,13
=CH-	1	0,355
-CHO	1	-1,10
Incrément	$b_i$	$B_i$
Liaison double	2	-0,09
Chaîne CH	7	6.(-0,12)
Chaînes branchées	3	-0,13
Log $K_{ow}$ :		<b>4,925</b>



\* Méthode de MEYLAN et HOWARD (1995)

Le coefficient de partition eau / octanol d'un composé est donné par la relation suivante :

$$\log K_{ow} = \sum_i n_i \cdot f_i + \sum_j m_j \cdot c_j + 0,229 \quad (\text{AI.3})$$

Les contributions de groupe sont calculées de la façon suivante :

Incrément	$n_i$	$f_i$	
-CH <sub>3</sub>	3	0,5473	
-CH <sub>2</sub> -	1	0,4911	
-CH-	1	0,4911	
=CH- ou =C<	3	0,3836	
=CH <sub>2</sub>	1	0,5184	
-CHO	1	-0,9422	
<b>Log K<sub>ow</sub> :</b>		<b>3,3511</b>	

A partir de AI.3 :

$\log K_{ow} = 3,3511 + 0 + 0,229 = 3,58$

## Annexe J

Estimation du coefficient d'activité à dilution infinie ( $\gamma^\infty$ ) de l'isonovalal

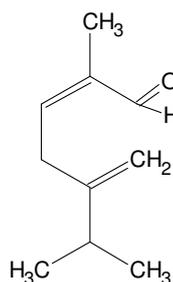
## \* Méthode AQUAFAC

Le coefficient d'activité à dilution infinie de l'isonovalal dans l'eau,  $\gamma_w^\infty$ , est donné par la relation suivante :

$$\log \gamma_w^\infty = \sum_i n_i \cdot Q_i \quad (\text{AJ.1})$$

Les contributions de groupe de l'isonovalal sont calculées de la façon suivante :

Incrément	$n_i$	$Q_i$
-CH <sub>3</sub>	2 sp <sup>3</sup>	0,706
	1 sp <sup>2</sup>	0,204
-CH <sub>2</sub> -	1	0,149
-CH<	1	0,085
=CH <sub>2</sub>	1	0,579
=CH-	1	0,321
=C<	1 sp <sup>3</sup>	0,525
	1 sp <sup>2</sup>	0,319
-CHO	1	-0,772
Somme :		<b>2,822</b>



A partir de AJ.1 :

$$\gamma_w^\infty = 10^{2,822} = 663,74$$

## \* Méthode de PIEROTTI et al. (1959)

Le coefficient d'activité à dilution infinie de l'isonovalal,  $\gamma_w^\infty$ , est donné par la relation suivante :

$$\log \gamma_w^\infty = A_{1,2} + B_2 \cdot \frac{N_1}{N_2} + \frac{C_1}{N_1} + D \cdot (N_1 - N_2)^2 + \frac{F_2}{N_2} \quad (\text{AJ.2})$$

$N_1$  et  $N_2$  sont les nombres d'atomes de carbone dans le soluté et le solvant, respectivement.  $A_{1,2}$ ,  $B_2$ ,  $C_1$ ,  $D$  et  $F_2$  sont des constantes dépendant de la structure du soluté et du solvant.

Dans le cas de la dilution d'un aldéhyde dans de l'eau, l'équation AL.2 se simplifie :

$$\log \gamma_w^\infty = B_2 \cdot N_2 \quad (\text{AJ.3})$$

Avec  $N_2=10$  et  $B_2=0,622$  :

$$\gamma_w^\infty = 10^{6,22} = 1659587,91$$

Dans le cas de la dilution d'un aldéhyde dans l'octanol :

$N_1$	10
$N_2$	8
$A_{1,2}$	-0,701
$B_2$	0,176
$C_1$	0,320
$D$	-0,00049
$F_2$	-0,630

A partir de AJ.2 :

$$\log \gamma_o^\infty = -0,701 + 0,176 \cdot \frac{10}{8} + \frac{0,320}{10} - 0,00049 \cdot (10 - 8)^2 - \frac{0,630}{8} = -0,53$$

$$\boxed{\gamma_o^\infty = 10^{-0,53} = 0,29}$$

## Annexe K

Estimation de la solubilité ( $S_{w,I}$ ) de l'isonovalal\* Méthode d'IRMANN (1965)

La solubilité de l'isonovalal,  $S_{w,I}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  d'eau) est déterminée par la relation suivante :

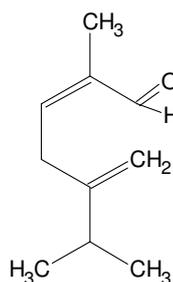
$$-\log S_{w,I} = x + \sum_i n_i \cdot y_i + \sum_j n_j \cdot z_j \quad (\text{AK.1})$$

Les contributions de groupe de l'isonovalal ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ ) sont calculées de la façon suivante :

Incrément	$n_i$	$y_i$
C	10	0,25
H	16	0,25
Somme :		<b>4,42</b>

Incrément	$n_j$	$z_j$
-C=C-	1	-0,35
>C<R	1	-0,10
Somme :		<b>-0,80</b>



A partir de AK.1 avec  $x=1,5$  :

$$-\log S_{w,I} = 1,5 + 4,42 - 0,80 = 5,12$$

$$S_{w,I} = 10^{-5,12} = 7,586 \cdot 10^{-6} \text{ g}\cdot\text{g}^{-1} = 7,586 \cdot 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} = 4,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \approx 0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

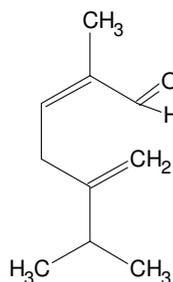
\* Méthode de KLOPMAN (1992)

La solubilité de l'isonovalal,  $S_{w,I}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  d'eau) est déterminée par la relation suivante :

$$\log S_{w,I} = C_0 + \sum_i n_i \cdot G_i \quad (\text{AK.2})$$

Les contributions de groupe de l'isonovalal sont les suivants :

Incrément	$n_i$	$G_i$
-CH <sub>3</sub>	3	-0,3361
-CH <sub>2</sub>	1	-0,5729
-CH<	1	-0,6057
=CH <sub>2</sub>	1	-0,6870
=CH-	1	-0,3230
=C<	2	-0,3345
-CHO	1	0,4476
Somme :		<b>-3,4183</b>



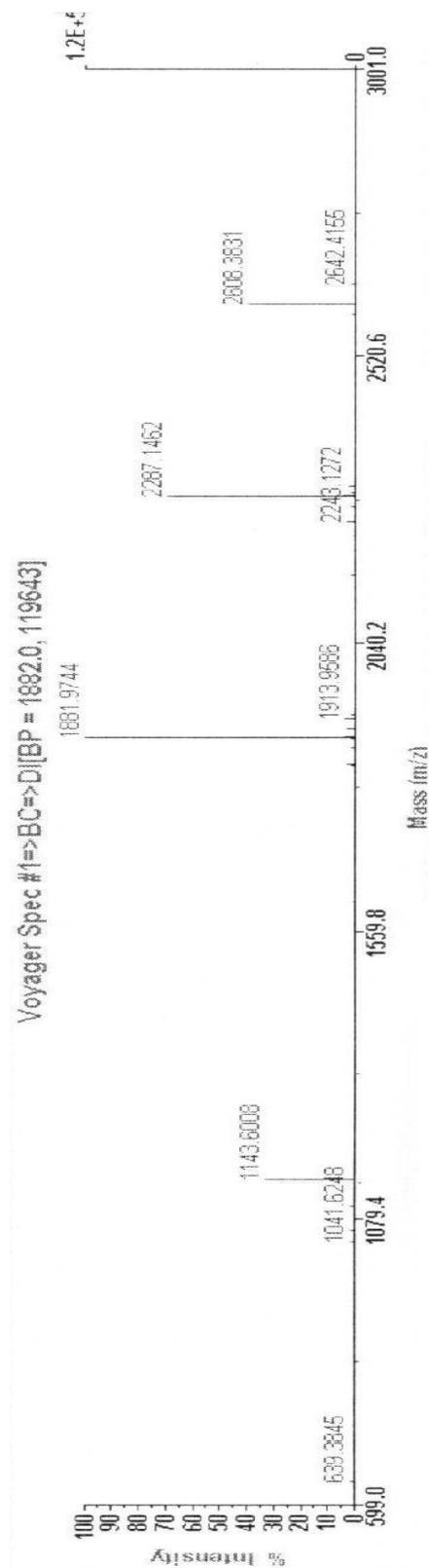
A partir de AK.2 avec  $C_0=3,5650$  :

$$\log S_{w,I} = 3,5650 - 3,4183 = 0,1467$$

$$S_{w,l} = 10^{0,1467} = 1,402 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} = 1,402 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} = 9,22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

**Annexe L**

Spectre de masse MALDI-TOF de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase  
(après digestion trypsique)





# Publications

---



## Liste des publications

### Revue spécialisée avec comité de lecture

- **D. LINARES, P. FONTANILLE, C. LARROCHE (2008)**. Protective effect of biomass components against interfacial inactivation of  $\alpha$ -pinene oxide lyase from *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Food Technol. Biotechnol., in press.
- **D. LINARES, D. MARTINEZ, P. FONTANILLE, C. LARROCHE (2008)**. Production of *trans*- 2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Biores. Technol., 99, 4590-4596.

### Colloques avec actes publiés sous n° ISSN ou ISBN

**D. LINARES, P. FONTANILLE, C. LARROCHE, C. LARROCHE (2004)**. Obtention de composés aromatiques par biotransformation de l' $\alpha$  pinène et de ses dérivés par *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Actes des Rencontres AGORAL 2004, ed Lavoisier.

### Communications à des colloques

- **D.E. LINARES, P. FONTANILLE, C. LARROCHE, C. LARROCHE (2004)**. Production of 3,4-dimethylpentanoic acid by *Pseudomonas* strains. ICBF-2004, Clermont-Ferrand.
- **C. LARROCHE, D. LINARES, P. FONTANILLE, C. LARROCHE (2005)**. Purification et caractérisation de l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. 2<sup>ème</sup> rencontres des microbiologistes du pôle clermontois, Clermont-Ferrand.
- **D. LINARES, P. FONTANILLE, C. LARROCHE (2006)**. Effect of biomass components on interfacial inactivation of  $\alpha$ -pinene oxide lyase in biphasic biotransformation media. ICBF-2006, Patras, Grèce.



## Protective Effect of Biomass Components Against Interfacial Inactivation of $\alpha$ -Pinene Oxide Lyase from *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491

Denis Linares, Pierre Fontanille, Christian Larroche\*

Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, Polytech' Clermont-Ferrand-Université Blaise Pascal, BP 206, FR-63174 Aubière Cedex, France

Received: June 3, 2006

Revised version: January 11, 2007

Accepted: September 12, 2007

### Summary

Alpha-pinene oxide lyase is able to catalyze the cleavage of both rings of  $\alpha$ -pinene oxide to form *cis*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal) with no cofactor requirements. This bioconversion, when carried out under biphasic conditions (water/hexadecane) by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, allows the accumulation of a very high concentration of the product. Nevertheless, the reaction stopped due to the loss of enzyme activity, which has been demonstrated to be an irreversible phenomenon. The enzyme was purified by chromatographic methods to study the reasons of its instability. Bioconversion with pure enzyme showed that a protein precipitation occurred at the liquid-liquid interface, giving rise to a decrease in soluble protein and in residual enzymatic activity. The rate of decrease in soluble protein concentration was not related to the presence of the precursor, which indicated that the inactivation was interfacial, *i.e.* due to the direct contact of the enzyme with the hexadecane layer. This phenomenon was not present when crude enzymatic extract was used as a biocatalyst. Biomass components present in this extract thus had a protective effect against interfacial phenomena, demonstrating that  $\alpha$ -pinene oxide lyase purification does not attract much practical interest for isonovalal production.

*Key words:* bioconversion, isonovalal, interfacial inactivation, *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, protective effect

### Introduction

Terpenes and terpenoids are the primary flavour and fragrance molecules found in the essential oils of higher plants. They are naturally branched chain C10 hydrocarbons formed from isoprene units and are widely distributed in nature (1). Terpenes are traditionally isolated from essential oils. Biotransformations of these compounds remain of great commercial interest for the food and perfume industry since one of the main advantages of using biotechnological methods for the production of flavour and fragrances is to avoid drawbacks associated with natural extraction processes. Compre-

hensive reviews by Krasnobajew (2) and more recently by Schrader and Berger (3) focused on many transformations of terpenoids for the flavour and fragrance industry.

Nevertheless, these compounds are generally both volatile and lipophilic, which poses several problems. Their low water solubility often leads to the presence of an excess substrate that gives an organic layer. They also often exhibit a rather low chemical stability when poured into an aqueous environment, and undergo spontaneous autooxidation processes. Their high volatility can additionally give rise to loss by air stripping, especially

\*Corresponding author; Phone: ++33 47 34 07 429; Fax: ++ 33 47 34 07 829; E-mail: christian.larroche@univ-bpclermont.fr

when the reaction is performed aerobically (4,5). Another difficulty, encountered when whole cells are used as biocatalyst, is their high toxicity. This feature is generally attributed to their high concentration in the cytoplasmic membrane, where hydrophobic compounds accumulate preferentially (1,6). As a consequence, only a few biotransformation processes in the area of terpenes have been proposed up to now at an industrial scale.

Among them, the bacterial synthesis of acyclic metabolites of  $\alpha$ -pinene oxide has led to a patent (7) that claims the production of isonovalal (*cis*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal), a citrus, woody and spicy fragrance molecule (Fig. 1). Studies of  $\alpha$ -pinene metabolism from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 (7–9) or *Nocardia* sp. P18.3 (10) reported that the enzyme catalysing this reaction,  $\alpha$ -pinene oxide lyase, is able to cleave both rings of the epoxide to form isonovalal with no cofactor requirement (Fig. 1).

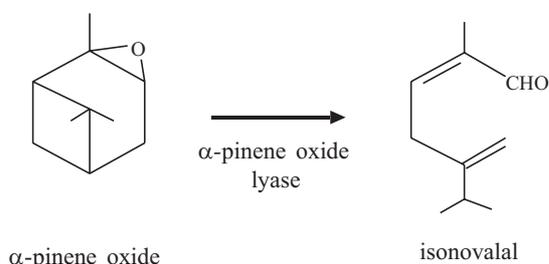


Fig. 1. Reaction giving isonovalal (*cis*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal) from  $\alpha$ -pinene oxide

More recently, bioconversion of  $\alpha$ -pinene oxide into isonovalal by a new strain, *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, in a biphasic medium has been described (11). Three key parameters have been evidenced. The first is the need for a cell permeabilization by freezing and further contact with the thawed material by an organic solvent such as chloroform, toluene or diethyl ether. This operation allows both an enzyme release in the aqueous phase outside the cells and an improvement of transport properties of the substrate and product across the cell membrane, strongly increasing reaction rates. It also inactivates other enzymes of the precursor degradation pathway, enabling high yields to be achieved. The second one is that the enzyme  $\alpha$ -pinene oxide lyase, which exhibits an irreversible inactivation, probably by a metabolite in the medium, presents a constant turnover, *i.e.* the total product synthesis is proportional to the biomass loading, and close to 16.4 g isonovalal/L-g biomass. The third phenomenon is that the biphasic system used is not limited by phase transfers, a feature attributed to the spontaneous formation of an oil-in-water emulsion. It has then been possible to carry out a very efficient process allowing to recover 400 g/L of isonovalal with 25 g/L of biomass in 2.5-hour reaction, corresponding to an average reaction rate as high as 160 g/(L·h).

Then, in order to get a better understanding of the mechanisms involved in isonovalal formation by *P. rhodesiae*, and to increase the achievements of this process, the enzyme was purified. The purification method and

the enzyme characterization have recently been published (12).

Results presented here aim at (i) determining if this additional step in the bioconversion process can, from a process point of view, be interesting for isonovalal production, and (ii) to gain further insights in the mechanism of the above-mentioned inactivation phenomenon.

## Materials and Methods

### Microorganism

*Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 (11) was maintained on nutrient agar (Difco) in Petri dishes and held at 30 °C. Successive replications were performed every 3 or 4 weeks. A stock material was also prepared using the Protect Bacterial Preserver System (Technical Service Consultants Ltd, Heywood, Lancashire, UK) which is made of porous ceramic beads immersed in a cryopreservative fluid stored at –75 °C (13).

### Biocatalyst production

Two precultures were prepared in 500-mL Erlenmeyer flasks filled with 250 mL of *Pseudomonas* basal medium (14) and with 8 g/L of sodium lactate as carbon source (15). Flasks were inoculated with colonies picked out from an agar plate (see above). After 24-hour growth at 30 °C in a rotary shaker operated at 200 rpm, the absorbance at 600 nm ( $A_{600}$ ) was close to 3 (biomass concentration 1.3 g/L).

Precultures were used to inoculate an aerated, stirred bioreactor (Biostat MD, B. Braun, Melsungen, Germany) of a 5-litre working volume. The medium was made of 4.3 L of *Pseudomonas* basal medium where sodium lactate is replaced by glucose (5.6 g/L) and 200 mL of an organic solution made of 15 mL of  $\alpha$ -pinene in hexadecane (62 g/L of  $\alpha$ -pinene per litre of hexadecane). The stirring rate was maintained at 500 rpm, the temperature at 30 °C and aeration rate at 30 L/h (0.05 vvm). pH decrease was limited to 6.0 using 0.5 M NaOH solution. The process was stopped after 9 to 12 h of cultivation.

The resulting broth was then centrifuged for 10 min at 5000×g and ambient temperature. The obtained pelleted cells were resuspended in an appropriate volume of  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer (20 mmol/L, pH=7.1) to yield a biomass concentration close to 7 g/L (the relationship between biomass and absorbance was established as  $X=0.447 A_{600}$ ). This concentrated suspension was stored frozen at –20 °C.

### Purification of $\alpha$ -pinene oxide lyase

Protocol for  $\alpha$ -pinene oxide lyase purification from *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 has recently been described (12).

### Biotransformations media

Reaction medium was a two-phase system comprising an organic phase made of an organic solution of  $\alpha$ -pinene oxide in hexadecane. Initial substrate concentration was 20 g of  $\alpha$ -pinene oxide per litre of hexadecane. According to the experiments, the aqueous phase

was composed of different fractions: (i) permeabilized biomass: cell suspension in phosphate buffer was thawed and poured in an Erlenmeyer flask. Before reaction, diethylether was added to the aqueous suspension (5 % by volume) for 1 hour at 30 °C with the flask being placed in a rotary shaker operated at 200 rpm; (ii) biomass supernatant: fraction made of permeabilized biomass was centrifuged (10 min, 10000 $\times$ g) and filtered using 0.22  $\mu$ m filter in order to remove cell debris and residual viable cells; (iii) crude extract: thawed biomass disrupted by sonication (Ikasonic U50H) at a maximal energy of 125 W/cm. Three cycles of 2 min were performed for each sample, maintaining the tubes on ice, and with 5-minute cooling intervals. Suspensions were centrifuged at 20000 $\times$ g for 45 min at 20 °C and then filtered using 0.22- $\mu$ m filter; (iv) purified enzyme: solution of purified enzyme in  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer (20 mmol/L, pH=7.1).

The phase volume ratio was 2:5 (aqueous/organic phase), and reaction temperature was 30 °C. Bioconversions were carried out in 100-mL Erlenmeyer flasks placed in a rotary shaker (200 rpm).

#### Biotransformation analysis

Organic phase was directly analysed by gas chromatography by injecting 1  $\mu$ L of the sample into the apparatus. The chromatograph (HP 6890, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was fitted with an apolar SPB-5 (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) capillary column (30 m $\times$ 0.32 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu$ m) and a flame ionisation detector. The carrier gas was nitrogen, and the oven temperature was kept at 80 °C for 5 min, then raised to 200 °C at an interval of 20 °C/min. Both the injector and detector temperatures were 250 °C; the split ratio for the injection was 1:5. Concentrations were calculated by assuming that all compounds had the same response factor as  $\alpha$ -pinene oxide. Internal standard was heptadecane (1 g per litre of hexadecane).

#### Determination of protein content

Protein content of the samples was determined at each step using three different methods: Lowry method modified by Peterson (16), Coomassie Blue method (17) and bicinchoninic acid method (18). Crystalline bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

#### Zymography

A volume of 10  $\mu$ L of samples (80  $\mu$ L of protein solutions with 20  $\mu$ L of Bromophenol Blue) was applied to polyacrylamide gel (12 % of acrylamide:N,N'-methylene-bisacrylamide 37.5:1, 1 mm thickness, 8 $\times$ 6 cm, buffer: Tris/HCl, pH=8.9). The migration was carried out in vertical mode in a Bio-Rad protean II apparatus (Bio-Rad) at 150 V with Tris/glycine migration buffer (pH=8.3) for 2 h until Bromophenol Blue (tracking dye) was 5 mm from the bottom of the gel. Gel was then immersed in an emulsion containing 20 mM  $\alpha$ -pinene oxide in 20 mM phosphate buffer (pH=7.1). After 30 min of incubation, the position of lyase band was visualized by the presence of a white precipitate. Known quantities of purified  $\alpha$ -pinene oxide lyase were used as standards. Unknown quantity bands were quantified using Quantity One Biorad software (version 4) in 'trace density' mode.

## Results and Discussion

#### Estimation of $\alpha$ -pinene oxide lyase content in different fractions

The purification process allowed the determination of the lyase content in crude extract based on bioconversion activity. Crude extract contained 200 mg of proteins in 50 mL of the solution, with an activity of 45  $\mu$ mol/(min $\cdot$ mg), whereas after purification on DEAE-Sephacel column, the resulting sample consisted of about 40 mg of proteins with a 5-fold higher activity (120  $\mu$ mol/(min $\cdot$ mg)). After purification on Superdex 75 column, around 15 mg of proteins were recovered, with an activity of 600  $\mu$ mol/(min $\cdot$ mg). These data allowed to conclude that a 13-fold purification was obtained, indicating that  $\alpha$ -pinene oxide lyase accounted for about 7.5 % of the proteins in the crude extract (12).

In order to confirm this result, a zymogram method was developed. Zymography is a routine electrophoretic technique to identify proteolytic activities in polyacrylamide gels under nondenaturing conditions. This method was adapted to detect  $\alpha$ -pinene oxide lyase. Indeed, immersion of gels in a suspension containing 20 mM  $\alpha$ -pinene oxide in phosphate buffer (pH=7.1) allowed to visualize the lyase band due to the presence of a white precipitate of the insoluble reaction product, *cis*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal). Lyase concentration could be correlated to the trace intensity of the precipitate. Calibration curve was established with purified enzyme thanks to Quantity One software (Bio-Rad) (Fig. 2). This method gave the same results as previously reported, *i.e.* the lyase content in the crude extract proteins was also close to 7.5 %.

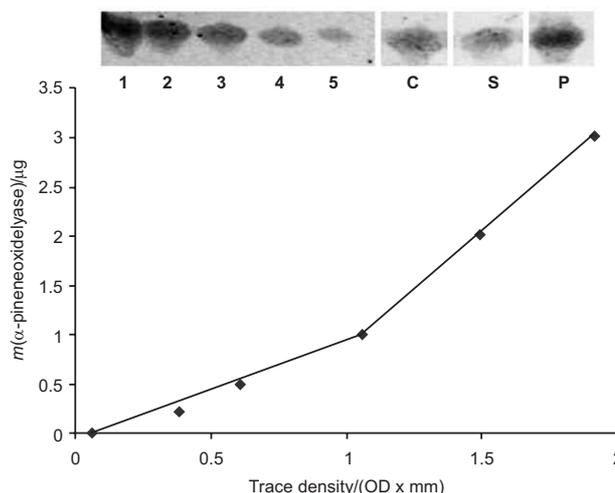


Fig. 2. Calibration curve obtained from zymogram technique. Lanes 1 to 5: zymogram obtained with different known quantities (3.02 to 0.22  $\mu$ g) of pure  $\alpha$ -pinene oxide lyase, C: zymogram of crude extract, S: zymogram of biomass supernatant, P: zymogram of permeabilized biomass

Then, zymogram method was applied to determine lyase content in other fractions like permeabilized biomass classically used for bioconversion or biomass supernatant. Results in Table 1 indicate that lyase content

Table 1. Determination of  $\alpha$ -pinene oxide lyase content of several fractions by zymography

Fractions	$m(\text{lyase})$ $\mu\text{g}$	$\gamma(\text{lyase})$ $\text{g/L}$	$\gamma(\text{total protein})$ $\text{g/L}$	Content %
Crude extract	2.15	0.27	3.61	7.5
Biomass supernatant	1.23	0.15	1.37	11.3
Permeabilized biomass	2.23	0.28	4.29	6.5

in crude extract (7.5 % of proteins) was slightly higher than in permeabilized biomass (6.5 %). Indeed, total protein concentration was higher in permeabilized biomass than in crude extract due to the presence of membrane proteins (see Materials and Methods section). However, the lyase concentration is practically the same in both cases, indicating that enzyme extraction during crude extract preparation was efficient. A more surprising result was the content of lyase in biomass supernatant (11.3 %), which seemed to indicate that the permeabilization step allowed the release of mainly  $\alpha$ -pinene oxide lyase out of the cells. Results in Fig. 3 further confirmed that zymogram was a reliable method to quantify  $\alpha$ -pinene oxide lyase content of a sample since for the same estimated quantity of lyase, rate of bioconversion and maximal isovalal production are close for all fractions (crude extract, permeabilized biomass, biomass supernatant).

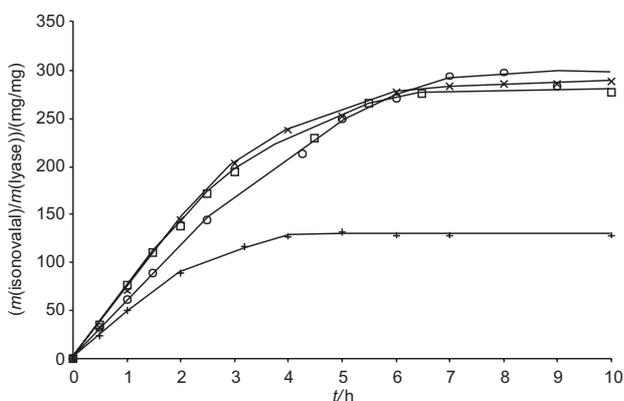


Fig. 3. Evolution with time of isovalal production performed with purified enzyme (+), biomass supernatant (o), permeabilized biomass (x) and crude extract (□). Bioconversions were carried out with an estimated quantity of 0.15 mg of  $\alpha$ -pinene oxide lyase in each fraction. Aqueous phase volume was 2 mL, hexadecane 5 mL. Initial concentration of  $\alpha$ -pinene oxide 20 g/L, temperature 30 °C, stirring rate 200 rpm

Thanks to this estimation, it has been possible to compare purified enzyme to other fractions as a biocatalyst for isovalal production. Results revealed that the purified enzyme appeared to be less efficient for  $\alpha$ -pinene oxide bioconversion (Fig. 3). In all cases, a progressive inactivation took place, leading to a reaction stopping at about 6 h. Furthermore, for the same estimated quantity of  $\alpha$ -pinene oxide lyase, the reaction rate

and the maximal isovalal concentration obtained were lower with pure enzyme than with other fractions. This result led to consider that a new, specific inactivation phenomenon took place with the purified enzyme.

#### Interfacial inactivation of $\alpha$ -pinene oxide lyase

A soluble protein assay carried out during bioconversion with purified enzyme indicated a gradual decrease in soluble (active) lyase concentration (Fig. 4). This phenomenon was accompanied by the accumulation of a white precipitate at the water/organic interface. This material was shown to become blue in the presence of Bradford reagent, indicating that it could be considered as denaturated protein.

The enzyme behaviour in the presence or not of an organic layer during 5 h at 30 °C and 200 rpm without substrate was examined. The soluble enzyme concentration was almost constant in a homogenous aqueous system, whereas a rapid decrease in this concentration, comparable to that observed during the course of a bioconversion, was evidenced in the presence of the organic phase (Fig. 4).

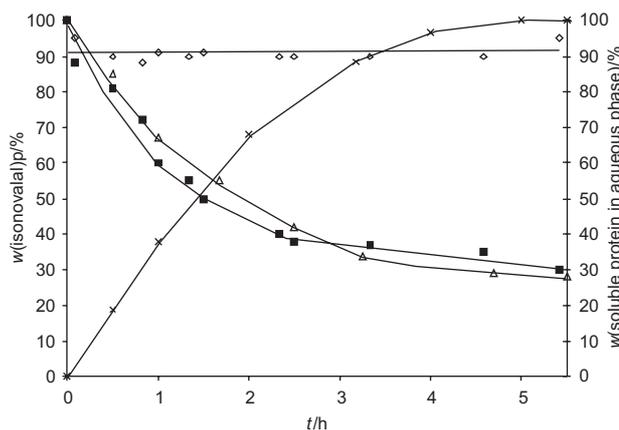


Fig. 4. Evolution of soluble protein concentration during incubation of purified  $\alpha$ -pinene oxide lyase solution without precursor and with (■) or without (◇) hexadecane; typical concentrations of  $\alpha$ -pinene oxide lyase ( $\Delta$ ) and of isovalal (x) during the course of bioconversion carried out with the purified enzyme. Experimental conditions as in the legend of Fig. 3

This decrease in soluble protein content could be related to the loss of enzymatic activity (Table 2). Data in this table also demonstrated that the enzyme was stable in an aqueous medium and that it was protected against hexadecane in the presence of the other bacterial constituents. These results clearly indicate that inactivation of purified enzyme was mainly due to its direct contact with the hexadecane/water interface leading to precipitation. Baldascini and Jansen (19) have recently shown a similar inactivation for an epoxide hydrolase at the octane/water interface. Interfacial inactivation can occur by enzyme adsorption to the interface followed by enzyme structural rearrangement (20,21). Fig. 5 illustrates a mechanism of enzyme inactivation at the aqueous-organic interface which takes place by unfolding of enzyme molecules adsorbed at the interface, followed by enzyme aggregation and finally precipitation.

Table 2. Behaviour of various enzymatic systems after incubation without a precursor in the presence or not of an organic phase

	Activity/%		
	No incubation time*	5-hour incubation with hexadecane	5-hour incubation without hexadecane
Pure enzyme	100	0	100
Permeabilized biomass	100	93	88
Supernatant of biomass	100	94	100

\*Reference conditions of bioconversion: the organic layer composed of  $\alpha$ -pinene oxide in hexadecane is directly added to the aqueous phase

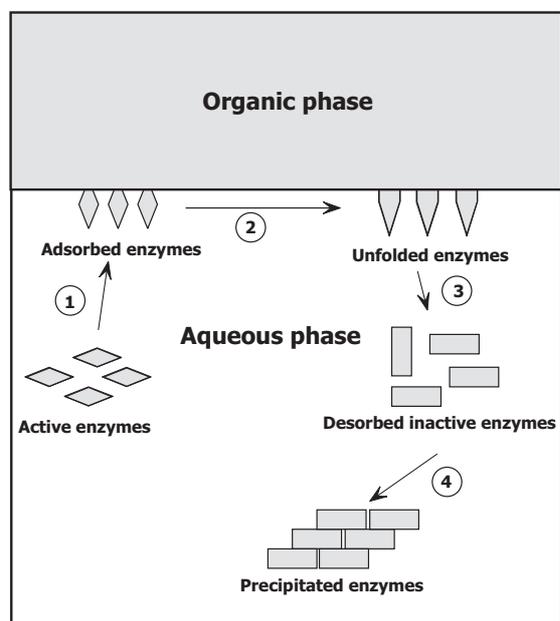


Fig. 5. Schematic representation of enzyme inactivation mechanism at an aqueous/organic interface, adapted from Baldascini and Janssen (19). Step 1: reversible enzyme adsorption to the interface and concomitant enzyme structural rearrangement at the interface; step 2: unfolding of enzyme molecule at the interface; step 3: rate-limiting desorption of inactivated/unfolded enzyme molecules from the interface; step 4: irreversible aggregation and precipitation of inactivated enzyme

#### Protective effect of biomass components

When both permeabilized biomass and biomass supernatant were in contact with hexadecane for 24 hours, no reduction of soluble protein concentration was measured. In all cases, no effect of contact with an organic layer was observed on bioconversion efficiency (data not shown). It could thus be considered that biomass and biomass supernatant contained soluble compound(s) which prevented  $\alpha$ -pinene oxide lyase from the water/organic interface denaturation. Among these compounds, membrane components could be eliminated since they were not present in the fraction of biomass supernatant

(see Materials and Methods). Thus, this 'protective effect' could be mainly attributed to saturation agents like surfactants or surface proteins which are able to enter in competition for enzyme adsorption at the liquid-liquid interface.

Addition of surfactants like Triton X-100 or Tween 80 at different concentrations to purified enzyme in bioconversion medium had no effect on  $\alpha$ -pinene oxide lyase stability (data not shown). More experiments carried out with the addition of bovine serum albumin (BSA/lyase 40:1) allowed reaching the same final concentration of isonovalal as with other fractions (Fig. 6). This protective effect could thus be related to surface proteins, acting as a 'sacrificial protein', which could prevent adsorption of the catalytic enzyme at the interface by a competitive phenomenon (19).

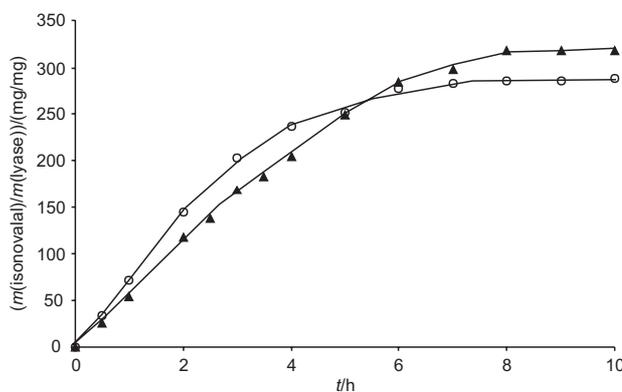


Fig. 6. Time course of isonovalal production with 0.15 mg of purified  $\alpha$ -pinene oxide lyase and BSA (3 g/L) (▲), and 0.15 mg of  $\alpha$ -pinene oxide lyase estimated in the biomass supernatant (○). Experimental conditions as in Fig. 3

#### Conclusion

Organic/aqueous biphasic mixtures are generally used to increase productivity of biocatalytic reactions when substrates and/or products are poorly soluble in water. Large interfacial contact areas allow rapid mass transfer between phases. Unfortunately, biphasic systems can also lead to interfacial inactivation of enzymes. This phenomenon has actually been observed in this study with purified  $\alpha$ -pinene oxide lyase at the hexadecane/water interface. We suggest that inactivation takes place by unfolding the enzyme molecules adsorbed at the interface, followed by enzyme aggregation and finally precipitation. Purification of  $\alpha$ -pinene oxide lyase is then interesting for a better characterisation of the reaction but attracts a limited interest for optimizing isonovalal production. A protective effect of surface proteins produced by the biomass confirms that purification is not interesting for this process. However, a progressive inactivation always takes place, stopping the biocatalytic process. Results obtained here clearly show that inactivation of cellular extracts is not interfacial but can probably be an enzyme turnover due to the catalytic process itself. This point needs further investigations.

## References

1. R.G. Berger, J.A.M. de Bont, G. Eggink, M. R. da Fonseca, M. Gehrke, J.B. Gros, F. Van Keulen, U. Krings, C. Larroche, D.J. Leak, M. van Der Werf: Biotransformation in the Flavour Industry. In: *Current Topics in Flavours and Fragrances*, K.A.D. Swift (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1999) pp. 139–170.
2. V. Krasnobajew: Terpenoids. In: *Biotechnology – Biotransformations*, Vol. 6a, K. Kieslich (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany (1984) pp. 98–125.
3. J. Schrader, R.G. Berger: Biotechnological Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. In: *Biotechnology*, Vol 10, H.J. Rehm (Ed.), VCH-Wiley, Weinheim, Germany (2001) pp. 374–415.
4. F. Grivel, Biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*, *PhD Thesis*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France, N°1176 (1999).
5. F. Grivel, C. Larroche, Phase transfer and biocatalyst behaviour during biotransformation of  $\beta$ -ionone in a two phase liquid system by immobilised *Aspergillus niger*, *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 27–34.
6. J. Sikkema, J.A.M. de Bont, B. Poolman, Mechanisms of membrane toxicity of cyclic hydrocarbons, *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 201–222.
7. A.G. Burfield, D.J. Best, K.J. Davis, Production of 2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dien-1-al and of 2-methyl-5-isopropyl-hexa-2,4-dien-1-al in microorganisms. *European patent EP 0304318* (1989).
8. D.J. Best, N.C. Floyd, A. Magalhaes, A. Burfield, P.M. Rhodes, Initial enzymatic steps in the degradation of  $\alpha$ -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, *Biocatalysis*, 1 (1987) 147–159.
9. A. Colocousi, K.M. Saqib, D.J. Leak, Mutants of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 defective in the catabolism of  $\alpha$ -pinene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 (1996) 822–830.
10. E.T. Griffiths, P.C. Harries, R. Jeffcoat, P.W. Trugdill, Purification and properties of  $\alpha$ -pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. strain P18.3, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 4980–4983.
11. P. Fontanille, A. Le Flèche, C. Larroche, *Pseudomonas rhodesiae* PF1: A new and efficient biocatalyst for production of isonovalal from  $\alpha$ -pinene oxide, *Biocatal. Biotran.* 20 (2002) 413–421.
12. C. Larroche, P. Fontanille, C. Larroche: Purification of  $\alpha$ -Pinene Oxide Lyase from *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. In: *Current Topics on Bioprocess in Food Industry*, C. Larroche, A. Pandey, C.G. Dussap (Eds.), Asiatech Publisher, New Delhi, India (2006) pp. 98–108.
13. R.K.A. Felthman, A.K. Power, P.A. Pell, P.H.A. Sneath, A simple method for storage of bacteria at  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ , *J. Appl. Bacteriol.* 44 (1978) 313–316.
14. G. Cohen-Bazire, W.H. Sistrom, R.Y. Stanier, Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J. Cell Comp. Physiol.* 49 (1957) 25–68.
15. C. Pequignot, C. Larroche, J.B. Gros, A spectrophotometric method for determination of bacterial biomass in the presence of a polymer, *Biotechnol. Tech.* 12 (1998) 899–903.
16. G.L. Peterson, A simplification of the protein assay of Lowry *et al.* which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346–356.
17. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
18. P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hemanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
19. H. Baldascini, D.B. Janssen, Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system, *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 285–293.
20. A. Sadana, Interfacial protein adsorption and inactivation, *Bioseparation*, 3 (1993) 297–320.
21. W. Norde, C.E. Giacomelli, BSA structural changes during homomolecular exchange between adsorbed and the dissolved states, *J. Biotechnol.* 79 (2000) 259–268.

# Production of *trans*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491

Denis Linares, Daniela Martinez, Pierre Fontanille, Christian Larroche \*

Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, Polytech'Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal, BP 206, F-63174 Aubière Cedex, France

Received 2 December 2006; received in revised form 17 July 2007; accepted 18 July 2007

Available online 12 September 2007

## Abstract

The feasibility of *trans*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid (novalic acid) accumulation using the  $\alpha$ -pinene degradation pathway of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 was studied. This appeared possible by using concentrated living bacterial cells produced under oxygen limitation with  $\alpha$ -pinene as sole carbon source. The second step of the process, the bioconversion itself, had to be performed without oxygen limitation due to the need for cofactor regeneration. Results showed that a not yet reported cofactor-dependent enzymatic isomerization of isonovalal into novalal was likely to occur and that both aldehyde isomers could be oxidized to the corresponding acid. Precursors tested,  $\alpha$ -pinene oxide and isonovalal had a strong permeabilization effect on bacterial cells. This effect, which increased from the oxide to the aldehyde, led to an inactivation of the respiratory chain and to acids synthesis stop. Present results allowed to obtain about 12 g/L acids (80% novalic acid) with an average yield close to 50% after 12 h reaction in a biphasic system using  $\alpha$ -pinene oxide as precursor.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Terpenoid; Biphasic medium; Bioconversion;  $\alpha$ -Pinene oxide; Novalic acid

## 1. Introduction

Terpenes and terpenoids are the primary flavour and fragrance impact molecules found in the essential oils of higher plants. They are naturally branched chain C-10 hydrocarbons formed from isoprene units and are widely distributed in nature. Terpenes are traditionally isolated from essential oils. Biotransformations of these compounds remain of great commercial interest for the food and perfume industry since one of the main advantages in using biotechnological methods for the production of flavour and fragrances is to avoid drawbacks associated to natural extraction processes. Several comprehensive reviews (Krasnobajew, 1984; Schrader and Berger, 2001; de Carvalho and da Fonseca, 2006) focussed on many

transformations of terpenoids for the flavour and fragrance industry.

Nevertheless, these compounds are generally both volatile and lipophilic, which poses several problems. Their low water solubility often leads to the presence of an excess substrate that gives an organic layer. They also often exhibit a rather low chemical stability when poured into an aqueous environment, and undergo spontaneous autooxidation processes. Their high volatility can additionally give rise to loss by air stripping, especially when the reaction is performed aerobically (Grivel, 1999; Grivel and Larroche, 2001). Another difficulty, encountered when whole cells are used as biocatalyst, is their high toxicity. This feature is generally attributed to a high concentration in the cytoplasmic membrane, where hydrophobic compounds preferentially accumulate (Berger et al., 1999; Sikkema et al., 1992, 1994, 1995). As a consequence, only a few biotransformation processes have been proposed up to now at an industrial scale in the area of terpenes.

\* Corresponding author. Tel.: +33 47 34 07 429; fax: +33 47 34 07 829.  
E-mail address: [christian.larroche@univ-bpclermont.fr](mailto:christian.larroche@univ-bpclermont.fr) (C. Larroche).

Most abundant terpene in nature is  $\alpha$ -pinene. It has always constituted important resources in aroma industry. Many works led to the characterisation of different metabolic pathways allowing bioconversion of this substrate by both fungi and bacteria. Among them, a microbial catabolic pathway leading to acyclic “nova” compounds was described (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00903.html>) and could be globally interpreted as follows. The route started with the oxidation of  $\alpha$ -pinene in  $\alpha$ -pinene oxide by monooxygenase NADH-dependant reaction (Best et al., 1987).  $\alpha$ -pinene oxide formed was decyclized by  $\alpha$ -pinene oxide lyase without cofactors need, conducing to *cis*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal). *Trans*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (novalal) production additionally appeared in fresh cell culture. Aldehydes were then probably degraded by NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase(s) in *cis* and *trans*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acids (Griffiths et al., 1987a). Acids were finally metabolized in acetyl-CoA and propanoyl-CoA by a presumed  $\beta$ -oxidation-like catabolism pathway accumulating 3,4-dimethylpentanoic acid (DMPA) as an intermediary metabolite (Zorn et al., 2004).

A highly efficient bioconversion process of  $\alpha$ -pinene oxide into isonovalal by a new strain, *Pseudomonas rhodesiae* CIP107491, in a biphasic medium has been reported (Fontanille et al., 2002; Fontanille and Larroche, 2003). Several key parameters have been evidenced. Among them, the need for a cell permeabilization by freezing and further contacting the thawed material by an organic solvent such as chloroform, toluene or diethyl ether has to be pointed out. This operation allows both an enzyme release in the aqueous phase outside cells and an improvement of transport properties of substrate and product across the cell membrane, strongly increasing reaction rates. It also inactivates other enzymes of the precursor degradation pathway, enabling isonovalal to be an end-product obtained with high yields.

*Trans*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid (novalic acid) presents a potential interest in perfumes and industrial aroma production. It is thought that its esterification or carboxylation would lead to the formation of compounds with specific aroma properties not found in plants (Berlitz et al., 2004).

This compound is obtained in the following step in this  $\alpha$ -pinene degradation pathway which involves oxidases using NAD<sup>+</sup> as acceptor (see above). As a result, accumulation of such compounds implies the use of active whole cells exhibiting a functional respiratory chain to re-oxidise cofactors. Preliminary studies with *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 have shown that use of viable cells actually allowed to produce novalic acid with  $\alpha$ -pinene oxide as substrate. A two step process was then designed, comprising a biomass production step (by cultivation) and a second one, called bioconversion, using concentrated resting cells in biphasic conditions. We present here some results obtained with this system.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganism

*Pseudomonas rhodesiae* CIP107491 (Fontanille et al., 2002) was maintained on Nutrient Agar (Difco) poured in Petri dishes held at 30 °C. Successive replications were performed every 3 weeks. A stock material was also prepared using the Protect Bacterial Preserver system (Technical Service Consultants Ltd., Heywood, Lancashire, UK) which is made of porous ceramic beads immersed in a cryopreservative fluid stored at –75 °C (Felthman et al., 1978).

### 2.2. Biomass production

#### 2.2.1. Preculture

Precultures were prepared in Erlenmeyer flask of 500 mL volume filled with 250 mL “*Pseudomonas* Basal Medium” (Cohen-Bazire et al., 1957) and with 8 g/L of sodium lactate as carbon source (Pequignot et al., 1998). Flasks were inoculated with colonies picked out an agar plate (see above). After 24 h growth at 30 °C in a rotary shaker operated at 200 rpm the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of the media was close to 3.

#### 2.2.2. Culture in Erlenmeyer flask

Forty milliliter of preculture were used to inoculate Erlenmeyer flasks of 2 L. The medium was made of 1 L “*Pseudomonas* Basal Medium” with different carbon sources according experiments. Addition of 50 mL of hexadecane has been done in presence of  $\alpha$ -pinene or  $\alpha$ -pinene oxide. The stirring rate was maintained at 200 rpm, the temperature at 30 °C.

#### 2.2.3. Culture in bioreactor

Two hundred fifty milliliter of preculture were used to inoculate a bioreactor (Biostat MD, B. Braun, Melsungen, Germany) of 5 L working volume equipped with a partial pressure in oxygen (pO<sub>2</sub>) sensor (Mettler-Toledo, Switzerland). The medium was made of 4.3 L *Pseudomonas* Basal Medium and 200 mL of an organic solution made of 30 mL  $\alpha$ -pinene in hexadecane (150 g of  $\alpha$ -pinene per liter of hexadecane). Aeration flow was controlled at 9 or 30 L/h according to the experiments. Measurement of O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production rates were done by a gas analyzer Servomex Xentra 4100 (Servomex Company Inc., Nerwood, USA) connected to the gas exhaust of the reactor. Decrease in pH was limited to 6.0 using 0.5 M NaOH solution. The stirring rate was maintained at 500 rpm and the temperature at 30 °C.

#### 2.2.4. Concentration of biomass

The resulting biomass was centrifuged for 10 min and 5000g at ambient temperature. The pelleted cells obtained were resuspended in an appropriate volume of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (20 mM, pH 7.5) to yield a biomass concentration close to 7 g/L (OD<sub>600</sub> close to 15.5). This con-

concentrated biomass was immediately used for bioconversion assays.

### 2.3. *Novalic acid production (bioconversion)*

Ability of the concentrated biomass to produce 2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acids was tested by performing bioconversions in biphasic liquid/liquid conditions. Organic layer, made of substrate in organic solvent (hexadecane), was added to the resting cells concentrated in phosphate buffer. Acids production was then routinely followed by injecting organic phase in the gas chromatography (GC) apparatus. Acids at pH values in the range 6–8 were found to highly partition towards the organic phase, allowing to neglect their concentration in the aqueous layer. Presence of acids in organic phase at pH 6 to 8 was controlled as highly predominant. “Activity” of the biomass was assessed by three variables, initial rate of acid production ( $V_i$  in g/L h), maximal metabolite concentration ( $C_{max}$  in g/L) and mass production yield ( $Y$  in %). Concentrations were expressed in g per liter of hexadecane.

#### 2.3.1. *Bioconversion in Erlenmeyer flask*

The reaction medium was a two-phase system comprising an organic phase made of an organic solution of different substrates ( $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -pinene oxide, isonovalal or novalal according to experiments) in 25 mL of hexadecane. Aqueous phase was composed of concentrated biomass in phosphate buffer. The phase volume ratio was 1:1 (aqueous/organic phase), and reaction temperature was 30 °C. Erlenmeyer flasks of 250 mL total volume were placed in a rotary shaker (200 rpm).

#### 2.3.2. *Bioconversion in reactor*

A 1.5 L working volume reactor (Applikon Dependable Instruments), containing 300 mL of concentrated biomass in phosphate buffer and an organic phase comprising 4 mL of  $\alpha$ -pinene oxide in 200 mL hexadecane (20 g of  $\alpha$ -pinene oxide per liter of hexadecane) was used. The aeration was controlled as described in experiments. Temperature and stirring rate were regulated at 30 °C and 200 rpm, respectively.

### 2.4. *Acids extraction*

Acids were first extracted in an aqueous alkali phase (NaOH 0.25 M) then in a fresh organic phase (hexane) by decreasing pH with sulfuric acid. This procedure allowed to discard neutral products such as residual  $\alpha$ -pinene oxide. Sample was concentrated by solvent evaporation using a rotating evaporator (Büchi) fitted with a refrigerated condenser and operated under controlled vacuum (–900 mBar).

### 2.5. *Identification and quantitation of metabolites*

#### 2.5.1. *Gas chromatography*

Quantification of substrate consumed and metabolites produced was done by gas chromatography (GC) analyses.

1  $\mu$ L of organic phase was directly injected into the apparatus. The chromatograph (HP 6890, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was fitted with an apolar SPB-5 (Supelco Inc., Bellefonte, PA) capillary column (30 m  $\times$  0.32 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu$ m) and a flame ionization detector. The carrier gas was nitrogen, and the oven temperature was kept at 80 °C for 5 min, then raised to 200 °C at 20 °C/min. The injector and detector temperatures were 250 °C for both; the split ratio for injection was 1:5. Concentrations were calculated by assuming that all compounds had the same response factor as  $\alpha$ -pinene oxide. Internal standard was heptadecane (1 g per liter of hexadecane).

#### 2.5.2. *GC–MS*

Identification of produced metabolites was done by GC–Mass Spectral (MS) analyses performed on an apolar HP-5MS (Agilent Technologies) capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu$ m). The carrier gas was helium, other operating parameters were as above. The gas chromatograph was an Agilent 6890-plus, which was coupled to a 5973 N MS-engine. MS conditions were electron-impact ionization energy 70 eV, accelerating voltage 1.1 kV, emission current 35  $\mu$ A, and quadrupole, ion source and interface (line transfer) temperature 150, 230 and 280 °C, respectively. Library searches were performed using the NIST/EPA/NIH mass spectral library (version 1.7a, 2000).

#### 2.5.3. *NMR spectrometry*

Identification of produced acids was done by proton and  $^{13}$ C nuclear magnetic resonance (NMR). Spectra were obtained with a Bruker AC-400 spectrometer at 400 MHz in  $^1$ H and 100 MHz in  $^{13}$ C. About 10 mg of sample were diluted in 0.5 mL  $CDCl_3$ . Chemical shifts ( $\delta$ ) were expressed in ppm with tetramethylsilane (TMS) as reference.

### 2.6. *Viability test*

Two hundred microliter of aqueous phase were mixed with 800  $\mu$ L of methylene blue solution (NaCl: 0.9 g, KCl: 0.042 g,  $CaCl_2$ : 0.048 g,  $NaHCO_3$ : 0.02 g, glucose: 1 g, methylene blue: 0.025 g for 100 mL distilled water). After 10 min of staining, cells were observed with microscope ( $\times$ 1000). Uncolored cells were considered as viable whereas blue cells were considered as permeabilized.

## 3. Results

### 3.1. *Identification of acids produced*

#### 3.1.1. *GC–MS analyses*

Acids produced in the organic phase during bioconversion of  $\alpha$ -pinene oxide by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 resting cells were extracted in hexane and concentrated by evaporation. GC–MS analysis of the samples gave a recurrent chromatogram with a major peak at

Rt = 10.2 min. Mass spectra of the 10.2 min peak was assigned as 2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid. GC–MS analyses did not allow for specific identification of *cis* and *trans* isomers.

### 3.1.2. RMN analyses

$^{13}\text{C}$  RMN spectrum of the same sample gave the following major peaks: RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 173.6 ( $\text{C}_1$ ); 152.3 ( $\text{C}_2$ ); 143.0 ( $\text{C}_3$ ); 127.9 ( $\text{C}_5$ ); 108.7 ( $\text{C}_6$ ); 34.2 ( $\text{C}_8$ ); 33.6 ( $\text{C}_4$ ); 21.6 ( $\text{C}_9$  et  $\text{C}_9'$ ); 11.9 ( $\text{C}_7$ ) corresponding to those observed by Griffiths et al., (1987a) during bioconversion of  $\alpha$ -pinene oxide by *Nocardia* sp. strain P18.3 and by Tudroszen et al. (1977) during RMN analyses of novalic and isonovalic standards (Table 1). The carbon 7 signal was found specific of the isomer; it was at 20.5 ppm and 12 ppm for isonovalic acid and novalic acid, respectively. Results showed clearly that the major acid produced was novalic acid.

$^1\text{H}$  RMN spectrum gave the following major peaks: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 6.97 (t, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{H}_3$ ); 4.83 (s, 1H,  $\text{H}_6\text{a}$ ); 4.69 (s, 1H,  $\text{H}_6\text{b}$ ); 2.92 (d, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{H}_4$ ); 2.26 (m, 1H,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{H}_8$ ); 1.86 (s, 3H,  $\text{H}_7$ ); 1.05 (d, 6H,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{H}_9$ ) corresponding to novalic acid. Other minor peaks corresponding to isonovalic acid were also detected (data not shown). Comparison of integrated peak areas at 2.92 ppm (novalic acid) and 3.28 ppm (isonovalic acid) allowed to calculate novalic/isonovalic ratio at about 5/1, i.e. novalic acid accounted for ca. 80% of the mixture.

The following study was carried out assuming that the novalic acid concentration in a sample obtained during a bioconversion process was proportional to the area of the peak eluted from 10 min in GC analysis. It was referred to as “acids” production and was, in fact, a mixture where the *trans* isomer was highly predominant.

Table 1  
Identification of acids produced during bioconversion of  $\alpha$ -pinene oxide by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 resting cells

Carbon $\text{N}^\circ$	$^{13}\text{C}$ NMR peaks (ppm)				
	Reaction products <sup>a</sup>		2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acids standards <sup>b</sup>		Reaction products <sup>c</sup>
	Major	Minor	<i>Cis</i> (isonovalic acid)	<i>Trans</i> (novalic acid)	Major
1	171.6	171.8	173.7	173.7	173.6
2	154.2	152.3	154.1	154.1	152.3
3	144.1	142.9	144.6	144.6	143.0
5	126.6	127.6	126.9	126.9	127.9
6	107.9	108.7	107.9	107.9	108.7
8	34.6	33.6	35.2	35.2	34.2
4	34.2	29.7	34.6	34.6	33.6
9 and 9'	21.6	21.6	21.6	21.6	21.6
<b>7</b>	<b>20.6</b>	<b>12.0</b>	<b>20.5</b>	<b>12.1</b>	<b>11.9</b>

<sup>a</sup> Values reported by Griffiths et al. (1987a,b).

<sup>b</sup> Values reported by Tudroszen et al. (1977).

<sup>c</sup> Values observed in our study.

## 3.2. Influence of conditions for biomass production on further bioconversion activity

### 3.2.1. Carbon source(s)

Several bacterial cultivations were carried out in Erlenmeyer flasks with  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -pinene oxide, lactate and glucose as carbon sources, sodium lactate being the substrate used in the precultivations. Results showed that biomass obtained by culture with  $\alpha$ -pinene as sole carbon source allowed to achieve the best acids production (Table 2). A significant  $C_{\text{max}}$  of 15.1 g/L associated to a yield of 53% and an initial rate  $V_i$  of 1.6 g/L h were achieved in these conditions.

### 3.2.2. Use of a bioreactor for cell production

Cultures in Erlenmeyer flasks are simple to use but control of some culture parameters (pH, aeration) is difficult. This behaviour is even worse when cultures involve biphasic conditions. Preliminary study on the use of a stirred aerated tank reactor allowed a 21-fold increase of the biomass concentration obtained (1.8 g/L biomass in reactor against 0.36 g/L in Erlenmeyer flasks) (Table 3). Nevertheless, biomass obtained in reactor showed lower activity than that obtained in Erlenmeyer flasks. Hence, the maximal acid concentration obtained was decreased to 13 g/L with a yield of 31% while  $V_i$  was roughly the same (1.55 g/L h). The major difference between the two processes was the cultivation duration (29 h in Erlenmeyer flask against 19 h in reactor), which probably indicated a strong oxygen limitation in flasks.

### 3.2.3. Duration of cultivation and oxygen limitation

A first set of experiments, allowing biomass recovery after different cultivation times (9, 15, 19 and 23 h), was

Table 2

Influence of carbon sources used for bacterial growth on resulting biomass activity, described by the initial rate  $V_i$ , the maximal product concentration  $C_{\text{max}}$ , and the molar yield  $Y$ , for production of acids from  $\alpha$ -pinene oxide

Carbon source(s) used for biomass production <sup>a</sup>	Activity of biomass <sup>b</sup>		
	$V_i$ (g/L h)	$C_{\text{max}}$ (g/L)	$Y$ (%)
$\alpha$ -Pinene oxide and glucose	0	0	0
$\alpha$ -Pinene oxide	0.1	1.1	3.6
Lactate and $\alpha$ -pinene	0.25	1.6	6
Glucose and $\alpha$ -pinene	0.28	3	24.5
Lactate	0.37	2.07	31
<b><math>\alpha</math>-Pinene</b>	<b>1.6</b>	<b>15.1</b>	<b>53</b>

<sup>a</sup> Cultivations were performed in 2 L Erlenmeyer flasks filled 1 L of MBP medium and 40 mL of inoculum coming from preculture on lactate. Initial concentrations of carbon sources were:  $\alpha$ -pinene 76.8 g/L in organic phase; lactate 2 g/L or glucose 10 g/L in aqueous phase. Stirring rate 200 rpm, temperature 30 °C.

<sup>b</sup> These values were measured for bioconversions carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks with 25 mL of biomass concentrated at 8 g/L and 25 mL of an organic phase made of a solution of  $\alpha$ -pinene oxide in hexadecane. Initial substrate concentration 30 g/L, stirring rate 200 rpm, temperature 30 °C.

**Table 3**  
Influence of cultivation duration and oxygen limitation on the activity of the biomass in bioconversion processes carried out in Erlenmeyer flasks with  $\alpha$ -pinene oxide as precursor

Cultivation duration (h) <sup>a</sup>	Time elapsed since oxygen limitation (h) <sup>b</sup>	Activity of biomass <sup>c</sup>		
		$V_i$ (g/L h)	$C_{max}$ (g/L)	Y (%)
9	0	1.1	9	15
15	1	0.7	8	27
19	5	1.6	13	31
23	9	1.6	14	34
15 <sup>d</sup>	–	0.8	7	8
35 <sup>e</sup>	26	1.6	14	47

<sup>a</sup> Cultures carried out in a 5 L bioreactor filled with 4.5 L of MBP medium, 40 mL of inoculum (grown on lactate),  $\alpha$ -pinene being used as the sole carbon source and incorporated under the form of 200 mL of a 150 g/L solution in hexadecane. Stirring rate 500 rpm, temperature 30 °C, pH = 6, aeration rate 30 L/h (0.11 VVM).

<sup>b</sup> Oxygen limitation was considered as taking place when the dissolved oxygen tension became equal to zero.

<sup>c</sup> See Table b legend for parameter definitions.

<sup>d</sup> Oxygen limitation was avoided by increasing the stirring rate at 12 h (500–600 rpm) and 14 h (600–800 rpm).

<sup>e</sup> Oxygen limitation occurred earlier due to the lowered aeration rate used, 9 L/h (0.03 VVM).

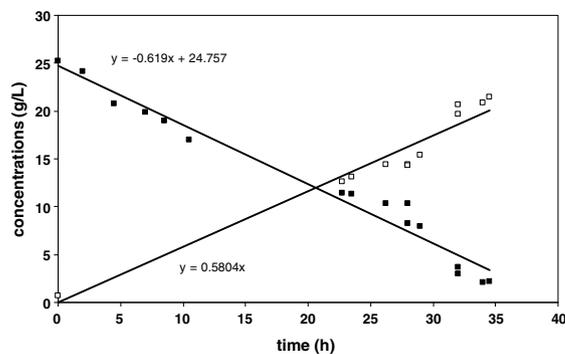
carried out in the reactor. Data in Table 3 showed that the activities were improved by lengthening the oxygen limitation period rather than by the cultivation time itself. This finding was supported by a second set of experiments, where two cultivations were carried out with opposite aeration strategies. In the first, oxygen limitation was avoided by increasing the stirring rate when necessary while in the second, an early oxygen limitation took place, due to the lowering of the aeration rate from 30 to 9 L/h. The second approach allowed to reach the results obtained with Erlenmeyer flasks (Table 3). These results showed clearly that oxygen limitation during biocatalyst production allowed later increasing of acid production yields and rates.

### 3.3. Bioconversion conditions

#### 3.3.1. Nature of the precursor

Biomass was produced in the bioreactor with  $\alpha$ -pinene as sole carbon source and an aeration rate of 9 L/h (0.03 VVM) ensuring an early oxygen limitation. After recovery and concentration (see Section 2), this material was used in Erlenmeyer flasks for bioconversion processes using several precursors. They were the different intermediates of the pathway leading to the acids, i.e.  $\alpha$ -pinene, -pinene oxide, isonovalal, and novalal. This last aldehyde was obtained by chemical isomerization of a hexadecane solution of isonovalal poured in an aqueous NaOH-glycine buffer 1 mol/L, pH = 11 for 48 h at 30 °C (Fig. 1).

Results in Table 4 showed that surprisingly  $\alpha$ -pinene was not consumed in bioconversion conditions while it served as sole carbon source during biomass production. Oxidation of  $\alpha$ -pinene to  $\alpha$ -pinene oxide is carried out by  $\alpha$ -pinene monooxygenase, a NADH-dependent reaction



**Fig. 1.** Typical time-course of isomerization of isonovalal (■–■) into novalal (□–□). Twenty milliliter of aqueous buffer NaOH-glycine 1 mol/L pH = 11 contacted with 20 mL of a 25 g/L solution of isonovalal in hexadecane in a 200 mL Erlenmeyer flask maintained at 30 °C and stirred at 200 rpm. Data corresponding to novalal during the first 10 h revealed that quantitation of low amounts of this isomer in the presence of high concentrations of isonovalal gave over-estimated values and were not reported on the figure.

**Table 4**  
Influence of the nature of the precursor on acids accumulation during bioconversion reactions

Substrate <sup>a</sup>	$V_c$ (g/L h) <sup>b</sup>	Activity <sup>c</sup>		
		$V_i$ (g/L h)	$C_{max}$ (g/L)	Y (%)
$\alpha$ -Pinene	0	0	0	0
$\alpha$ -Pinene oxide	3.36	1.6	14	47
Isonovalal	0.37	0.2	2	55
Novalal <sup>d</sup>	0.60	0.2	5	50

<sup>a</sup> Biomass production was carried out in the 5 L bioreactor filled with 4.5 L of MBP medium with  $\alpha$ -pinene as sole carbon source (76.8 g/L of organic phase). Stirring rate 500 rpm, temperature 30 °C, pH = 6, aeration rate 9 L/h.

<sup>b</sup> Average substrate consumption rate.

<sup>c</sup> Initial concentrations of  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -pinene oxide, isonovalal and novalal were 30, 30, 7 and 11.8 g/L organic phase, respectively. See legend of Table 2 for parameter definitions.

<sup>d</sup> Novalal was chemically obtained from isonovalal in the presence of glycine at basic pH (see Fig. 1).

(Best et al., 1987). It could be assumed that the biomass treatment (centrifugation, suspension in buffer) prior to carry out a bioconversion led to a dramatic decrease of this monooxygenase activity. Omitting this step by direct use of  $\alpha$ -pinene oxide as substrate allowed a high acids accumulation (14 g/L). In the same way, bioconversion with isonovalal and novalal as precursors gave high acids production yields (Table 4).

#### 3.3.2. Cell viability

A typical time course of a bioconversion using  $\alpha$ -pinene oxide as precursor is given in Fig. 2. It shows that the beginning of a process took place with acids being the sole compounds detected in significant amounts. Aldehydes (isonovalal and novalal) became significant after only 8 h of reaction, novalal being the first accumulated. Cell viability tests using methylene blue staining (see Section 2)

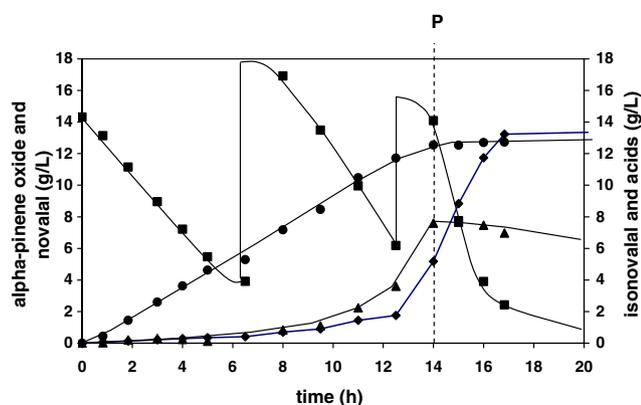


Fig. 2. Time course of of  $\alpha$ -pinene oxide (■-■), isonovalal (◆-◆), novalal (▲-▲) and acids (●-●) concentrations during a bioconversion process carried out in an Erlenmeyer flask. Twenty five milliliter of fresh concentrated biomass (7 g/L) was added to an organic solution of  $\alpha$ -pinene oxide in 25 mL of hexadecane. Sequential additions of  $\alpha$ -pinene oxide were performed to avoid substrate limitation. Time of permeabilization is represented by dashed line (P). Temperature 30 °C, stirring rate 200 rpm.

performed during this kind of experiments revealed that bacteria were permeabilized after 15 h of process. This time corresponded to the end of both acids and novalal accumulation while isonovalal production continued with a high yield (80%). This last feature was consistent with that observed during degradation of  $\alpha$ -pinene oxide in isonovalal by permeabilized biomass (Fontanille and Larroche, 2003). It could thus be considered that  $\alpha$ -pinene oxide had a permeabilizing effect on *Pseudomonas rhodesiae* cells, giving rise to a gradual increase in the precursor penetration rate inside the cells. This, in turn, could give an increase in intracellular precursor concentration allowing an improvement in the aldehydes synthesis rates that could become higher than the acids synthesis process.

This permeabilizing effect finally led to an inactivation of the bacterial respiratory chain, thus preventing oxidation-reduction phenomena. This hypothesis would lead to consider that novalal biosynthesis took place through such a cofactor-dependent process, using probably isonovalal as precursor.

### 3.3.3. Toxicity of precursors

Since cell viability appeared as an important limitation factor in our system, it was important to study the toxic effect of the different precursors. A preliminary study of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 cells poured in bioconversion conditions, but without substrate revealed that cells remained intact for at least 24 h. This feature confirmed that the biphasic medium used for bioconversion experiments did not affect cell integrity. Increasing initial concentrations of  $\alpha$ -pinene oxide led to a shortening of the active period for acids synthesis due to a faster cell permeabilization (Fig. 3). The maximal acid concentration achieved remained almost constant, close to 12 g/L while the bioconversion yield exhibited a plateau near 52% for initial

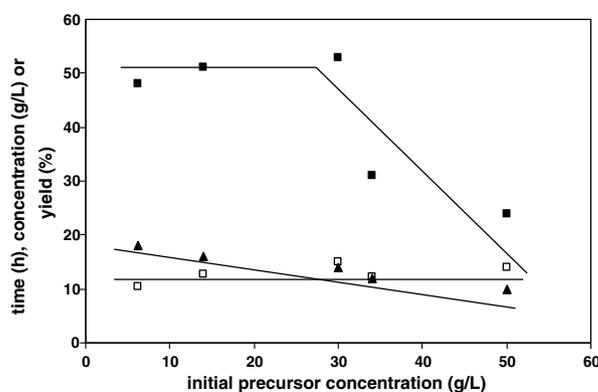


Fig. 3. Toxic effect of  $\alpha$ -pinene oxide on living *P. rhodesiae* cells, expressed as the time elapsed before cell permeabilization (▲-▲), the final concentration of acidic metabolites (□-□) and the final yield of acids (■-■) during the course of experiments carried out in Erlenmeyer flasks. Sequential precursor feedings were performed when necessary in order to avoid any substrate limitation.

precursor concentrations lower than 30 g/L. A rapid decrease in this parameter was evidenced for higher concentrations. Isonovalal exhibited a much more marked toxic effect and 30 g/L of isonovalal lead to instant cell permeabilization (Table 5). Data in Table 5 revealed that it was necessary to use very low isonovalal concentrations, less than 2.5 g/L, to achieve valuable acids synthesis. This situation will imply to perform fed-batch feedings with short time intervals between two addings.

### 3.3.4. Feasibility of the bioconversion in a bioreactor

Fig. 4 shows the time course of a process performed using  $\alpha$ -pinene oxide as precursor. Data confirmed unambiguously that acids accumulation needed aeration of the medium, since only aldehydes were produced at the beginning of the reaction, carried out without aeration. Here again, novalal was the first aldehyde accumulated, isonovalal becoming important at the end of the cultivation, when acid accumulation stopped i.e. when cells became permeabilized. This result was still consistent with the fact that isonovalal synthesis is known to be cofactor independent (Fontanille and Larroche, 2003). A final concentration of 8 g/L acids was obtained, value slightly lower than that achieved in Erlenmeyer flasks. This demonstrated the need for further studies on the aeration strategy to be used during this process.

Table 5  
Toxicity of isonovalal to *P. rhodesiae* cells

Initial concentration of isonovalal (g/L)	$V_i^a$ (g/L h)	$C_{max}^a$ (g/L)	$Y^a$ (%)	Permeabilization time (h) <sup>b</sup>
3.2	0.22	1.5	61	10
32.5	0.017	0.6	32	2
38	0	0	0	1

<sup>a</sup> Values were measured as in Table 2.

<sup>b</sup> Cells permeabilization was evidenced by methylene blue staining test as described in "Methods" section.

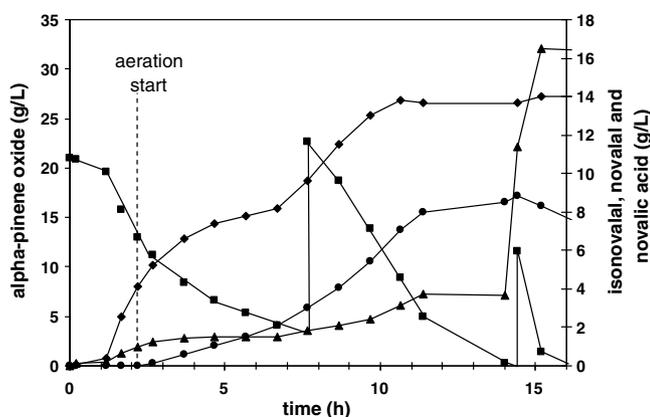


Fig. 4. Time course of  $\alpha$ -pinene oxide (■—■), isonovalal (◆—◆), novalal (▲—▲) and acids (●—●) concentrations during bioconversion process carried out in the bioreactor. The biocatalyst consisted of 300 mL fresh concentrated biomass, aeration (12 L/h) started at 2.5 h (dashed line), temperature 30 °C, stirring rate 200 rpm.

#### 4. Conclusions

This study has shown the feasibility of novalic acid production by *P. rhodesiae* CIP 107491. Biomass has to be produced with  $\alpha$ -pinene as sole carbon source and under oxygen limitation. The production of the enzymatic material needed for acids synthesis from  $\alpha$ -pinene oxide seemed thus to be induced both by  $\alpha$ -pinene and by the intracellular redox potential. Conditions needed for acid production were completely different from those used for isonovalal synthesis. Hence, aldehyde was in fact produced by a crude enzymatic extract (Fontanille et al., 2002; Fontanille and Larroche, 2003) while acid accumulation implied the use of intact whole cells of the same bacterial strain. This approach, which deals with the so-called metabolic engineering area, allowed to evidence new features. Among them, the well known toxic effect of terpenoids on bacterial cells was once again demonstrated. In the case of *P. rhodesiae* this effect was mostly due to a cell permeabilization leading to intracellular compounds release and inactivation of metabolic pathways such as the electron transport chain. However, isonovalal, an intermediate of  $\alpha$ -pinene degradation, appeared more toxic than the precursor itself. This behaviour was unusual since organic compounds breakdown is generally considered as a detoxifying mechanism. The pathway for isonovalal breakdown involves a series of acidic compounds (Best et al., 1987; Zorn et al., 2004). Results obtained in this work allowed to demonstrate that the main compound accumulated by *P. rhodesiae* was novalic acid, even if the direct oxidation compound, isonovalal, was present. It indicated that a *cis-trans* isomerization took place probably at the aldehyde level. Also, synthesis of novalal from isonovalal was necessarily an enzymatic process, and some evidences that it was cofactor dependent have been provided. However, more studies on this point would be needed. Present results demonstrated the feasibility of novalic acid production by living cells of *P. rhodesiae* CIP 107491. Simplest conditions involved  $\alpha$ -

pinene oxide as precursor and about 12 g/L acids (80% novalic acid) were obtained after 12 h reaction with an average yield close to 50%. A careful optimization of precursor addition strategy would allow to significantly improve these results.

#### References

- Berger, R.G., De Bont, J.A.M., Eggink, G., Da Fonseca, M., Gehrke, M., Gros, J.B., Van Keulen, F., Krings, U., Larroche, C., Leak, D., Werf, M. Van Der, 1999. Biotransformations in the flavour industry. In: Swift, K.A.D. (Ed.), *Current Topics in Flavours and Fragrances*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 139–170.
- Berlitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., 2004. *Food Chemistry*, third ed. Springer Verlag, Berlin.
- Best, D.J., Floyd, N.C., Magalhaes, A., Burfield, A., Rhodes, P.M., 1987. Initial enzymatic steps in the degradation of  $\alpha$ -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Biocatalysis* 1, 147–159.
- Cohen-Bazire, G., Siström, W.H., Stanier, R.Y., 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell Comp. Physiol.* 44, 25–68.
- De Carvalho, C.C.C.R., da Fonseca, M.M.R., 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* 24, 134–142.
- Felthman, R.K.A., Power, A.K., Pell, P.A., Sneath, P.H.A., 1978. A simple method for storage of bacteria at  $-76$  °C. *J. Appl. Bacteriol.* 44, 3131–3136.
- Fontanille, P., Lefleche, A., Larroche, C., 2002. *Pseudomonas rhodesiae* PF1: a new and efficient biocatalyst for production of isonovalal from  $\alpha$ -pinene oxide. *Biocatal. Biotrans.* 20, 413–421.
- Fontanille, P., Larroche, C., 2003. Optimisation of isonovalal production from  $\alpha$ -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Appl. Microb. Biotech.* 60, 534–540.
- Griffiths, E.T., Bociek, S.M., Harries, P.C., Jeffcoat, R., Sissous, D.J., Trugdill, P.W., 1987a. Bacterial metabolism of  $\alpha$ -pinene: pathway from  $\alpha$ -pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. Strain P18.3. *J. Bacteriol.* 169, 4972–4979.
- Griffiths, E.T., Harries, P.C., Jeffcoat, R., Trugdill, P.W., 1987b. Purification and properties of  $\alpha$ -pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. Strain P18.3. *J. Bacteriol.* 169, 4980–4983.
- Grivel, F., 1999. Biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger* PhD Thesis, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France, No. 1176.
- Grivel, F., Larroche, C., 2001. Phase transfer and biocatalyst behaviour during biotransformation of  $\beta$ -ionone in a two phase liquid system by immobilised *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* 7, 27–34.
- Krasnobajew, V., 1984. Terpenoids. In: Kieslich, K. (Ed.), *Biotechnology*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 98–125, No. 6a.
- Pequignot, C., Larroche, C., Gros, J.B., 1998. A spectrophotometric method for determination of bacterial biomass in the presence of a polymer. *Biotechnol. Tech.* 12, 899–903.
- Schrader, J., Berger, R.G., 2001. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Rehm, H.-J. (Ed.), *Biotechnology*, 10. VCH-Wiley, Weinheim, pp. 374–415.
- Sikkema, J., Poolman, B., Konings, W.N., de Bont, J.A.M., 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* 174, 2986–2992.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022–8028.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microb. Rev.* 59, 201–222.
- Tudroszen, N.J., Kelly, D.P., Millis, N.F., 1977.  $\alpha$ -Pinene metabolism by *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.* 168, 312–318.
- Zorn, H., Neuser, F., Berger, R.G., 2004. Degradation of  $\alpha$ -pinene oxide and [2H7]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *J. Biotechnol.* 107, 255–263.

## RESUME

La première partie du travail présenté porte sur la bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en *cis*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal) par l' $\alpha$ -pinène oxyde lyase de *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 en milieu biphasique eau / hexadécane. Le produit de la bioconversion est purifié et ses caractéristiques physico-chimiques sont estimées. La correction de phénomènes de dégradation thermique, de perte par dégradation chimique et par entraînement dans la phase gazeuse montre que le rendement réel de bioconversion est proche de 100 %. L' $\alpha$ -pinène oxyde lyase est également purifiée et des éléments concernant sa structure sont recueillis. Ses constantes cinétiques sont estimées ( $K_S = 27 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $r_{S\text{max}} = 97 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  et  $\text{turn-over} = 230.000 \text{ mol.mol}^{-1}$ ). Une inactivation interfaciale de l'enzyme purifiée au contact d'une interface eau/hexadécane est mise en évidence. Une inactivation par le produit de bioconversion est également démontrée. Enfin, l'étude met en évidence une induction de la production de l'enzyme par l' $\alpha$ -pinène au cours de la production du biocatalyseur. La deuxième partie du travail présenté concerne la mise au point et l'optimisation d'un procédé de bioconversion de l' $\alpha$ -pinène oxyde en acide *trans*-2-méthyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoïque (acide novalique) par des cellules intactes de *P.rhodesiae*. Les étapes métaboliques initiales de la voie de dégradation de l' $\alpha$ -pinène selon les composés « novas » sont étudiées en parallèle. Le procédé final permet d'obtenir  $16 \text{ g.L}^{-1}$  d'acide novalique produit en environ 7,5 h, ce qui correspond à une vitesse de  $2,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , avec un rendement moyen de 47 %, à partir de  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de biomasse.

**Mots clefs :** Bioconversion - *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 - milieu biphasique eau/solvant organique - isonovalal - acide novalique - terpènes

## ABSTRACT

The first part of the study deals with the bioconversion of  $\alpha$ -pinene oxide into *cis*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal) by purified  $\alpha$ -pinene oxide lyase from *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 in a water-organic solvent, two-phase medium. The product is purified and its physicochemical properties are estimated. Correction for precursor losses by thermal degradation during GC analysis, by spontaneous auto-oxidation and by air stripping shows that the true bioconversion yield is close to 100 %.  $\alpha$ -pinene oxide lyase is also purified and some structural elements are given. Kinetic constants are estimated ( $K_S = 27 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $r_{S\text{max}} = 97 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  and  $\text{turn-over} = 230,000 \text{ mol.mol}^{-1}$ ). It is shown that an interfacial inactivation of the purified lyase takes place when the enzyme is contacted with the water/hexadecane interface. Inactivation by isonovalal is also proved. Finally, a strong induction of the enzyme synthesis by  $\alpha$ -pinene during the biocatalyst production step is evidenced. The second part of the study reports feasibility and optimization of  $\alpha$ -pinene oxide bioconversion to *trans*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid (novalic acid) with *P. rhodesiae* fresh cells. Initial metabolic steps of the  $\alpha$ -pinene degradation pathway of « novas » compounds are also investigated. The final process allows the recovery of  $16 \text{ g.L}^{-1}$  novalic acid after 7.5 h process, which corresponds to an average rate of  $2.2 \text{ g.L.h}^{-1}$ , the average yield being 47 % and the biocatalyst content  $7 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Key words :** Bioconversion - *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491 - water-organic solvent, two-phase system - isonovalal - novalic acid - terpenes