



HAL
open science

Production d'arômes par fermentation en milieu solide

Sophal Try

► **To cite this version:**

Sophal Try. Production d'arômes par fermentation en milieu solide. Biotechnologies. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCK013 . tel-01830160

HAL Id: tel-01830160

<https://theses.hal.science/tel-01830160v1>

Submitted on 4 Jul 2018

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.



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE-FRANCHE COMTÉ

UNIVERSITÉ DE DIJON

AGROSUP-DIJON

INSTITUT NATIONAL SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, DE
L'ALIMENTATION ET DE L'ENVIRONNEMENT

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques
ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENTS-SANTÉ

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne-Franche Comté

Spécialité : Biotechnologie Agro-alimentaire

Options : Biotechnologie, Biochimie Microbienne, Génie des Procédés, Microbiologie

Par **Sophal TRY**

Titre :

PRODUCTION D'ARÔMES PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE

Soutenance prévue le 25 Mai 2018

Andrée VOILLEY	Pr. émérite, AgroSup Dijon	Examineur
Christian LARROCHE	Pr, Polytech Clermont-Ferrand, UCA	Rapporteur
Vincent PHALIP	Pr, Université de Lille	Rapporteur
Yves WACHÉ	Pr, AgroSup-Dijon, UBFC	Directeur de thèse
Joëlle DE-CONINCK	Dr, Welience-PPB Dijon, UBFC	Codirectrice de thèse
Thavarith CHUNHIENG	Dr, ITC, Cambodge	Codirecteur de thèse

Thèse financée par l'Ambassade de France au Cambodge.

Production d'arômes par fermentation en milieu solide

RESUME

La transposition d'un milieu liquide (FML) à un milieu solide (FMS) de la production de γ -déalactones par fermentation par *Yarrowia lipolytica* a été étudiée pour la première fois. Dans un premier temps, différentes matrices solides (rafles de maïs, éponges de cellulose, éponges de courgette et graines de ricin) ont été utilisées. L'éponge de courgette était le support sur lequel les lactones étaient produites aux concentrations les plus élevées. La production de lactones a donc été réalisée sur ce support et dans trois types de réacteurs FMS sous différentes conditions d'aérations (sans aération, avec aération statique et avec aération forcée). Une concentration élevée de 5 g/L d'hydroxy-lactone a été détectée dans la condition d'aération statique en fiole à col large. Une certaine concentration de lactones était entraînée lors de l'aération forcée au cours de la production en mini-réacteur. Pour calculer la production totale de lactones dans cette condition, un modèle mathématique a été utilisé pour modéliser les pertes. Par ailleurs, un nouveau procédé par injection d'air enrichi en oxygène (20%, 30%, 40% et 50%) a été mis en place pour étudier les effets de l'oxygène sur la β -oxydation chez *Y. lipolytica*. Dans cette partie, les résultats ont montré que l'oxygène est nécessaire pour la production d'hydroxy-lactone et la dégradation de γ -déalactone mais pas pour la dernière étape de production de cette dernière. Dans la dernière partie de ce travail, l'effet de l'activité de l'eau (A_w) a été étudié préliminairement sur la croissance en milieu gélosé, et pour la croissance et la production de lactone en FML.

Mots clés : Aération ; Air enrichi en oxygène ; β -Oxydation ; Fermentation en milieu solide ; Métabolisme des acides gras hydroxylés ; Lactones ; *Yarrowia lipolytica*.

ABSTRACT

The adaptation of the production of γ -decalactones from submerged fermentation (SmF) to solid state fermentation (SSF) by *Yarrowia lipolytica* was investigated in this work. First of all, different solid matrices (corn cob, cellulose sponge, luffa sponge, and castor seeds) were used for the first adaptation of the production of γ -decalactones. Luffa sponge appeared to be the most interesting solid support on which lactones were produced in higher concentrations than in the other solid matrices used. Then, the production of lactones using luffa sponge as the solid support was carried out in three types of SSF reactors to monitor different aeration conditions (without aeration, with a static aeration and with a forced aeration). A 5 g/L-high concentration of hydroxy-lactone was detected in the condition of static aeration using wide-mouth Erlenmeyer flasks. Furthermore, a concentration of lactones was stripped when forced aeration was used during the production using mini-reactors. To calculate the total production of lactones in this case, a mathematical model was used to evaluate the losses. Moreover, a novel alternative process using oxygen-enriched air (20%, 30%, 40% and 50%) was employed to study the effect of oxygen on β -oxidation in *Y. lipolytica*. In this part, the results showed that oxygen is required for hydroxy-lactone production and γ -decalactone degradation but not for the last step of production of this latter lactone. In the last part of this work, the effect of water activity (A_w) was preliminary studied on growth in agar medium, and for growth and lactone production in SmF.

Key words: Aeration ; Oxygen-enriched air ; β -Oxidation ; Solid state fermentation ; Hydroxylated fatty acid metabolism ; Lactones ; *Yarrowia lipolytica*.

REMERCIEMENTS

Avant de présenter ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui, sous différentes formes, ont contribué à sa réalisation. Ce travail de thèse a été réalisé en codirection au sein de l'équipe des Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques (PMB) de l'Unité Mixte de Recherche des Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR-PAM), en partenariat avec le département de Génie Chimique et Alimentaire (GCA) de l'Institut de Technologie du Cambodge (ITC).

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Yves WACHÉ, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Je le remercie également pour sa patience, son encouragement et sa confiance tout au long de ses années. Je le remercie particulièrement pour son écoute, son ouverture d'esprit, ses précieux conseils et ses connaissances scientifiques.

Mes remerciements vont également à ma codirectrice de thèse, Joëlle DE-CONINCK, pour m'avoir accueilli à son équipe PPB, ainsi que pour ses conseils et son aide précieuse tout au long de mes études doctorales.

Je souhaite remercier Dr. Thavarith CHUNHIENG, mon codirecteur de thèse pour ses conseils tout au long de mes études supérieures, pas seulement pour mes études doctorales, mais aussi depuis mon master recherche à l'INP-ENSAT et ma formation d'ingénieur et mon travail à l'ITC où il m'a prodigué de précieux conseils.

Je tiens à remercier sincèrement Madame Andrée VOILLEY, Professeur émérite à AgroSup-Dijon, pour sa gentillesse et son dévouement. Je la remercie énormément pour avoir partagé ses connaissances scientifiques avec moi, spécifiquement celles concernant les phénomènes physicochimiques des arômes et les systèmes de récupération d'arômes.

Mes remerciements s'adressent à tous les membres du comité de thèse qui se compose de : Dr. Florence HUSSON, Dr. Céline LAROCHE, et Pr. Andrée VOILLEY pour leurs conseils scientifiques qui ont contribué à l'avancement de ce travail.

Je voudrais remercier également les Pr. Christian LAROCHE et Pr. Vincent PHALIP pour avoir bien voulu juger la qualité de ce travail.

Je souhaite remercier le Dr. Thi Hanh PHAN, le Dr. Bao Ngoc PHAM-HOANG et le Dr. Pascale WINCKLER pour leur soutien technique concernant les analyses en CPG-FID, CPG-MS et en microscope à fluorescence et confocale.

Je tiens à remercier Madame Marion ALLIET pour avoir partagé avec moi ses connaissances concernant la modélisation lors de mon stage à l'INP-ENSIACET. Merci également à Madame Anne-Marie SEUVRE pour ses conseils scientifiques concernant les interactions eau-produit et l'activité de l'eau. Je remercie le Dr. Sergey KLYKOV pour la discussion concernant le modèle de croissance. J'adresse également mes remerciements au Pr. Rémy CACHON, Pr. Jean-François CAVIN et Dr. Hélène LICANDRO pour leurs conseils scientifiques.

Un grand merci à Christine et Sylvie de l'UMR-PAM pour leur soutien technique et administratif pour toutes les commandes de produits. Merci également à Guillaume pour son soutien technique au laboratoire de la PPB. Mes remerciements s'adressent également à Florence BOFFY et Alexandre GAUDRY pour leur soutien administratif et informatique.

Un grand merci à mes chers amis Bao, Dat, Antonio et Chi, pour le partage de leurs connaissances et de leurs expériences. Merci également pour les discussions scientifiques et tous les moments sympathiques de la vie au laboratoire au long de ces années. Merci aussi à mes chers amis Thu, Da, Adeline, Mai, Aurore, Maxime pour ces moments sympathiques de la vie doctorale au laboratoire.

Merci à mes stagiaires, Sotheary et Alison pour leurs résultats et pour avoir eu le courage de travailler avec moi.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de différentes subventions. Je souhaite remercier l'Ambassade de France au Cambodge pour le financement des 29 mois de bourse pour la période écoulée en France. Je n'oublie pas de remercier l'AUF pour son financement de mobilité de recherche lors de la période de travail au Cambodge.

Je dédicace ce travail à mes parents, mes frères/sœurs qui m'ont soutenu et encouragé au cours de ces années de thèse.

Enfin, j'aimerais exprimer mes sincères remerciements à ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé durant ces trois années à Dijon.

ABREVIATIONS

A_w	:	Activité de l'eau
ATP	:	Adénosine triphosphate
CoA	:	Co-enzyme A
FML	:	Fermentation en milieu liquide (en anglais SmF : Submerged fermentation)
FMS	:	Fermentation en milieu solide (en anglais SSF : Solid state fermentation)
G3P	:	Glycérol-3-phosphate
K_{La}	:	Coefficient de transfert d'oxygène (h^{-1})
NAD^+	:	Nicotinamide adénine dinucléotide sous une forme oxydée
$NADH, H^+$:	Nicotinamide adénine dinucléotide sous une forme réduite
pH	:	Potentiel hydrogène
Pa	:	Pascal
rpm	:	Rotations par minute

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures (hors publications)

Figure 1 : Structure générale de lactones	7
Figure 2 : Formation des lactones à partir d'acides hydroxylés (Dufossé et al. 1994; Pagot et al. 1998; Waché et al. 2002).....	7
Figure 3 : Intermédiaires de la bioconversion de l'acide ricinoléique (Okui et al. 1963b; Gatfield et al. 1993; Feron et al. 1996a).....	15
Figure 4 : Voie de dégradation par la β -oxydation peroxysomale, de composés en C10 issus de l'acide ricinoléique (Waché 2013b).	16
Figure 5 : Effet de l'oxygénation (haut) et de l'activité acyl-CoA oxydase (bas) sur la croissance cellulaire et sur l'accumulation de γ -décalactone et de 3-hydroxy- γ -décalactone (Waché 2013b).	17
Figure 6 : Voies métaboliques impliquées dans la dégradation de lactones par les levures (Endrizzi-Joran 1994).....	18
Figure 7 : Schéma présentant la démarche expérimentale.	61
Figure 8 : Supports et substrat utilisés. (A) éponge de cellulose, (B) éponge de courgette, (C) rafles de maïs, (D) graines de ricin.	63
Figure 9 : Bioréacteurs FMS utilisés. (A) flacon à petit espace de tête, (B) fiole à col large, (C) mini-réacteur à aération forcée, (D) photo des mini-réacteurs à aération forcée.....	64
Figure 10 : Résumé sous forme graphique de la partie 1.	70
Figure 11 : Cinétiques de croissance de <i>Y. lipolytica</i> W29 sur différentes matrices solides dans des fioles à col large.....	79
Figure 12 : Cinétiques de croissance de <i>Y. lipolytica</i> W29 dans différentes formes d'éponge de cellulose.....	80
Figure 13 : Schéma de présentation de la répartition des levures, de l'oxygène et du substrat dans différents supports (A) éponge de cellulose, (B) rafles de maïs, (C) éponge de courgette.	81
Figure 14 : Cinétiques de production de lactones en utilisant les rafles de maïs comme support inerte.....	82
Figure 15 : Cinétiques de production de lactones en utilisant l'éponge de cellulose comme support inerte.....	83
Figure 16 : Concentrations en fonction du temps de γ -décalactone « pure » en FMS en fiole à col large.	85

Figure 17 : Cinétiques d'entraînement de γ -décylactone « pure » en FMS en mini-réacteur à aération forcée.	86
Figure 18 : Cinétiques d'entraînement de γ -décylactones « naturelles » en FMS lors de l'utilisation des mini-réacteurs à aération forcée.	87
Figure 19 : Cinétiques de production de lactones par mini-réacteur à aération forcée.	89
Figure 20 : Croissance de <i>Y. lipolytica</i> à différentes A_w : nombre d'unités formant des colonies par mL et nombre de jour pour l'apparition des colonies.	114
Figure 21 : Cinétiques de croissance de <i>Y. lipolytica</i> W29 en FML à différentes A_w	115
Figure 22 : Cinétiques de croissance de <i>Y. lipolytica</i> W29 en FML à différentes A_w en présence de citrate 1 (A) et de citrate 2 (B).	117
Figure 23 : Cinétiques de production de lactones en présence de citrate 1 ou citrate 2, sans ajustement de l' A_w	118
Figure 24 : Cinétiques de production de lactones en présence de citrate 1, citrate 2, phosphate et l' A_w à 0,99.	119
Figure 25 : Cinétiques de production de lactones en présence de citrate 1, citrate 2, phosphate et l' A_w à 0,98.	119
Figure 26 : Interrelations métaboliques entre la β -oxydation, le métabolisme du glycérol et celui du citrate.	122
Figure 27 : Système de piégeage d'arômes en sortie de réacteur FMS à aération forcée.	127
Figure 28 : Système d'aération de l'air enrichi en oxygène.	128

Tableaux (hors publications)

Tableau 1 : Publications concernant l'utilisation de <i>Y. lipolytica</i> en FMS.	5
Tableau 2 : Classification scientifique de <i>Yarrowia</i> (Van der Walt and Von Arx 1980).	6
Tableau 3 : Description des propriétés sensorielles de quelques lactones (Gatfield et al. 1993; Dufossé et al. 1994; Waché et al. 2003; Waché 2013b).	8
Tableau 4 : Seuils de perception de quelques γ - et δ -lactones i) Perçues olfactivement après dispersion dans l'eau. ii) Perçues « en bouche » après dispersion en solutions aqueuse ou huileuse.	10
Tableau 5 : Propriétés physicochimiques de la γ -décylactone.	11
Tableau 6 : Procédés de production de lactones par des champignons (mis à jour d'après (Waché et al. 2003)).	12

Tableau 7 : Différentes caractéristiques de la FMS et la FML (Raimbault 1998; Durand 2003; Manpreet et al. 2005; Soccol et al. 2017a).....	19
Tableau 8 : Comparaison entre les valeurs d' A_w calculées par l'équation de Norrish, et les valeurs mesurées pour les solutions de mélange glycérol + eau distillée et du milieu YPDA + glycérol.....	114
Tableau 9 : Paramètres de modèle de croissance estimés par l'équation logistique différentielle.	115
Tableau 10 : Valeurs de l' A_w et du pH, avant et après la croissance des levures en FML...	116
Tableau 11 : Valeurs de l' A_w et du pH, avant et après la croissance des levures en présence de citrate 1 et de citrate 2.	117

SOMMAIRE

RESUME.....	i
ABSTRACT	ii
REMERCIEMENTS	iii
ABREVIATIONS	v
LISTE DES ILLUSTRATIONS	vi
Figures (hors publications)	vi
Tableaux (hors publications)	vii
SOMMAIRE	ix
I. INTRODUCTION	1
II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Quelques définitions	3
1. La levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	4
1.1. Généralités	4
1.2. Taxonomie	6
1.3. Physiologie et habitat	6
2. Les arômes de type lactone.....	7
2.1. Généralités sur les lactones	7
2.2. Propriétés sensorielles des lactones	8
2.3. Propriétés physicochimiques des lactones	10
3. Production d'arômes de type lactone par des levures.....	11
4. Bioconversion des acides gras hydroxylés en lactones (Inspiré des sources principales (Waché 2002; Escamilla-García 2008; Alchihab et al. 2010)).....	14
5. Effet de l'aération/oxygénation sur la production de lactones	16
6. Dégradation de lactones lors de la biotransformation	17
7. Fermentation en milieu solide versus fermentation en milieu liquide : le cas la production de lactones	19

8. Estimation de la croissance de biomasse en FMS	21
8.1. Mesure directe de biomasse	21
8.2. Analyse de constituants de la biomasse	22
8.3. Mesure de l'activité métabolique de biomasse	23
8.4. Estimation par la viabilité de la biomasse.....	23
8.5. Estimation par modèle mathématique.....	23
8.6. Autres techniques.....	24
9. Production d'arômes par FMS et importance des systèmes de piégeage d'arômes	24
Publication de revue « <i>Aroma compounds production by solid state fermentation, importance of recovery systems</i> »	24
10. Conclusion bibliographique et problématique.....	59
III. METHODOLOGIES.....	61
1. Démarches expérimentales	61
2. Souche de levure.....	62
3. Conservation, réactivation, pré-culture et ensemencement de levure	62
4. Matrices solides	62
5. Milieu de biotransformation	63
6. Production de lactones dans différents types de réacteurs	63
7. Etude de l'entraînement des lactones en phase gazeuse.....	64
7.1. Essais avec de la γ -décalactone « pure ».....	64
7.2. Essais avec les γ -décalactones produites par FMS	65
7.3. Modélisation des cinétiques d'entraînement de lactones.....	65
8. Effets de l'oxygène sur la croissance et le métabolisme	66
9. Effet de l' A_w sur la croissance et le métabolisme.....	66
9.1. Régulation de l' A_w	66
9.2. Condition de cultures en boîtes de Petri.....	66
9.3. Essais en FML.....	67

9.4. Evaluation de l' A_w	67
10. Estimation de la biomasse	67
11. Procédure d'extraction et d'analyse de lactones	67
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	69
Présentation des résultats	69
Partie 1 : Fermentation en milieu solide pour la production de lactones par <i>Y. lipolytica</i> ..	70
1.1. Publication 1 : Fermentation en milieu solide pour la production de γ -décalactones par <i>Y. lipolytica</i>	70
1.2. Résultats complémentaires et discussion	79
1.3. Conclusion	84
Partie 2 : Entraînement de lactones au cours de leur production.....	85
2.1. Cinétiques d'entraînement de γ -décalactone « pure »	85
2.2. Cinétiques d'entraînement des lactones produites	87
2.3. Estimation des concentrations des lactones entraînées par aération forcée	87
2.4. Discussion	89
2.5. Conclusion	91
Partie 3 : Effet de l'oxygène sur la croissance et le métabolisme chez <i>Y. lipolytica</i> utilisée pour la production de lactones	92
Publication 2 : Effet de concentrations d'oxygène élevées sur la levure <i>Yarrowia lipolytica</i> pour la production de γ -décalactones en FMS	92
Partie 4 : Effet de l' A_w sur la croissance et le métabolisme chez <i>Y. lipolytica</i> utilisée pour la production de lactones	113
4.1. Introduction	113
4.2. Culture en milieu gélosé ajusté à différentes A_w	113
4.3. Croissance en FML ajustée à différentes A_w	115
4.4. Production de lactones en FML ajustée à différentes A_w	118
4.5. Discussion	120
4.6. Conclusion	123

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	125
Conclusion	125
Perspectives	127
REFERENCES	129

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Les arômes sont extrêmement importants pour les industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et chimique. Ils peuvent être produits par trois méthodes principales, la synthèse chimique, l'extraction à partir de sources naturelles et la voie biotechnologique. La plupart des arômes sont actuellement produits par synthèse chimique ou isolés à partir de sources naturelles. L'extraction d'arômes à partir de ressources naturelles a commencé dans l'antiquité et peut bénéficier du label naturel. Les arômes obtenus par voie biotechnologique sans étape chimique peuvent également bénéficier de ce label selon les législations européenne et américaine (Europe : EC 1831/2003 et USA : CFR 201). La production d'arômes par voie biotechnologique présente donc des avantages par rapport à la synthèse chimique et à l'extraction directe à partir de matrices naturelles car elle répond à deux exigences importantes de la société moderne. La première concerne les produits obtenus qui peuvent être considérés comme naturels, et la deuxième est liée au concept de développement durable, puisque ces processus de production sont alignés sur les meilleures pratiques en matière de préservation de l'environnement (Felipe et al. 2017).

La levure *Yarrowia lipolytica* a une grande importance économique liée à sa capacité à dégrader des lipides et des alcanes lors du traitement des déchets d'huileries, à dépolluer des hydrocarbures, à produire des composés d'intérêt pharmaceutique et industriel (production de lipases, de biosurfactants, d'esters d'acides gras, de lipides). La levure oléagineuse *Y. lipolytica* est également une levure utilisée pour la biotransformation de lipides en composés d'arômes de types lactones naturelles, notamment la production de γ -décylactones à partir d'huile de ricin ou de ricinoléate de méthyle (Gatfield et al. 1993; Waché et al. 2001). Ses nombreux intérêts d'application dans des procédés ont stimulé des études du métabolisme de cette levure qui ont été conduites par plusieurs groupes de recherche. *Y. lipolytica* est une espèce alimentaire (Groenewald et al. 2014) qui peut être isolée à partir de produits souvent solides comme par exemple du fromage, des yaourts, du kéfir, des fruits de mer ou de certaines viandes fraîches ou cuites (Sinigaglia et al. 1994; Barth and Gaillardin 1996; Fickers et al. 2005). La production de lactones par ce type de levures est bien connue en fermentation en milieu liquide (FML) mais en fermentation en milieu solide (FMS), elle n'a pas encore été étudiée. Une publication récente apportée par notre équipe au sujet de la production de lactones dans un réacteur air-lift et montrant un impact des biofilms (Escamilla-García et al. 2014) nous a conduit à nous intéresser à la FMS pour la production de lactones.

L'intérêt pour la FMS a augmenté en fonction du développement d'applications pour la production de divers métabolites (Oostrá et al. 2000; Pandey 2003; Thomas et al. 2013; Aggelopoulos et al. 2014; Fadel et al. 2015; Farinas 2015; Soccol et al. 2017b). En se basant sur les études antérieures, des arômes peuvent être produits par FMS avec un rendement qui peut être plus élevé qu'en FML (Sarhy-Bagnon et al. 2000; De Araújo et al. 2002; Mantzouridou et al. 2015). En outre, les autres intérêts de la FMS sont la taille du réacteur plus petit qu'en FML, une consommation d'énergie moins élevée, l'absence de résidu liquide, et la transformation aval (downstream processing) plus simple, moins chère et plus rapide (Lapadatescu and Bonnarne 1999; De Araújo et al. 2002; Manpreet et al. 2005).

Le travail de recherche portera principalement sur la croissance et le métabolisme des lipides chez *Y. lipolytica* pour la production d'arômes de types lactones. Le travail commencera tout d'abord par l'adaptation de la production de lactones de FML en FMS. Il se poursuivra par la mise en évidence de l'importance de l'oxygène dans la voie de β -oxydation. A ce stade, différents procédés seront envisagés liés aux différents types de réacteurs FMS (sans aération, avec une aération statique ou avec une aération forcée) et à des modifications de l'environnement par exemple en enrichissant l'air en oxygène. Ces points feront l'objet de la présente étude dans le but de mieux comprendre la croissance de la levure, *Y. lipolytica* et également le fonctionnement de la voie de la β -oxydation à l'origine des lactones à dix carbones en FMS.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Quelques définitions

Selon le règlement (CE) n° 1334/2008, les « **arômes** » sont :

- des produits non destinés à être consommés en l'état, qui sont ajoutés aux denrées alimentaires pour leur conférer une odeur et/ou un goût ou modifier ceux-ci.
- des produits issus ou constitués des catégories suivantes : substances aromatisantes, préparations aromatisantes, arômes obtenus par traitement thermique, arômes de fumée, précurseurs d'arôme ou autres arômes ou leurs mélanges.

Substance aromatisante : une substance chimique définie possédant des propriétés aromatisantes.

Substance aromatisante naturelle : une substance aromatisante obtenue par des procédés physiques, enzymatiques ou microbiologiques appropriés, à partir de matières d'origine végétale ou animale ou microbiologique prises en l'état ou après leur transformation pour la consommation humaine par un ou plusieurs des procédés traditionnels de préparation des denrées alimentaires (broyage, découpage, distillation/rectification, évaporation, fermentation, filtration, macération, -etc). Les substances aromatisantes naturelles correspondent aux substances qui sont naturellement présentes et identifiées dans la nature.

Fermentation en milieu solide (FMS) : elle a été définie de plusieurs façons selon les auteurs. Quelques définitions sont présentées ici.

- Procédé microbien se produisant principalement à la surface des matrices solides qui ont la propriété d'absorber ou de contenir de l'eau, avec ou sans nutriments solubles (Vinięra-González et al. 2003).
- Culture de microorganismes sur des matrices solides humides, soit sur des supports inertes, soit sur des substrats insolubles pouvant être utilisés comme source de carbone et d'énergie (Pandey et al. 2000).
- Procédé où la croissance des microorganismes se fait sur des substrats ou supports solides ou semi-solides (Rosales et al. 2007).
- Bioprocédé réalisé en l'absence d'eau ou en la quasi-absence d'eau libre. Cependant, le substrat doit posséder suffisamment d'humidité pour supporter la croissance et l'activité métabolique du micro-organisme. La matrice solide peut être la source de

carbone (ou d'autres nutriments), ou un matériau inerte pour soutenir la croissance des micro-organismes (avec une solution de croissance imprégnée) (Thomas et al. 2013).

1. La levure *Yarrowia lipolytica*

1.1. Généralités

La levure *Yarrowia lipolytica* est une levure oléagineuse, aérobic stricte et non pathogène. Elle est souvent retrouvée dans des environnements lipidiques et elle est capable de croître sur des composés hydrocarbonés. *Y. lipolytica* est une souche modèle très intéressante pour l'étude du métabolisme des lipides ou des alcanes chez les eucaryotes ainsi que pour des applications biotechnologiques dans des procédés de bioconversion d'arômes naturels (Gatfield et al. 1993; Pagot et al. 1998; Waché et al. 2001; Waché et al. 2003; Groguenin et al. 2004; Aguedo et al. 2005; Fickers et al. 2005), de biodégradation de composés polluants (Zinjarde et al. 2014), de biosynthèse d'acides organiques (Papanikolaou et al. 2002; Finogenova et al. 2005; Förster et al. 2007; Papanikolaou et al. 2008; Coelho et al. 2010; Makri et al. 2010), de production de lipides (Beopoulos et al. 2009; Fontanille et al. 2012; Kavšček et al. 2015; Rakicka et al. 2015; Magdouli et al. 2017) et de production de lipases (Destain et al. 1997; Corzo and Revah 1999; Fickers et al. 2003; Fickers et al. 2004; Papanikolaou et al. 2007; Fickers et al. 2011). Quelques publications concernent l'application de cette levure pour la production de lipases, de lipides, d'acides organiques, de composées volatiles/non volatiles et pour l'amélioration des propriétés nutritionnelles en FMS (**Tableau 1**). De plus, *Y. lipolytica* a fait l'objet de nombreuses recherches concernant les changements physiologiques, génétiques et métaboliques (Barth and Gaillardin 1996; Barth and Gaillardin 1997; Zinjarde et al. 1998; Domínguez et al. 2000; Ruiz-Herrera and Sentandreu 2002; Madzak et al. 2004; Makri et al. 2010; Bellou et al. 2014) et les applications dans l'environnement et les industries (Bankar et al. 2009; Beopoulos et al. 2009; Nicaud 2012).

Tableau 1 : Publications concernant l'utilisation de *Y. lipolytica* en FMS.

<i>Titre des publications</i>	<i>Production</i>	<i>Matrices solides</i>	<i>Références</i>
Solid-state fermentation with <i>Rhizopus oligosporus</i> and <i>Yarrowia lipolytica</i> improved nutritional and flavour properties of Okara	Composés volatils et non volatils, amélioration des propriétés nutritionnelles	Okara (résidu de soja)	(Vong et al. 2018)
Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with <i>Yarrowia lipolytica</i> : I. Green coffee	Composés volatils et non volatils	Café vert	(Lee et al. 2017a)
Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with <i>Yarrowia lipolytica</i> : II. Roasted coffee	Composés volatils et non volatils	Café torréfié	(Lee et al. 2017b)
Okara (soybean residue) biotransformation by yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipide, acide succinique, acide glutamique	Okara (résidu de soja)	(Vong et al. 2016)
Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of <i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipide	Graisse de noix de coco	(Parfene et al. 2013)
Use of Plackett-Burman design for rapid screening of nitrogen and carbon sources for the production of lipase in solid state fermentation by <i>Yarrowia lipolytica</i> from mustard oil cake (<i>Brassica napus</i>)	Lipase	Tourteau d'huile de moutarde	(Imandi et al. 2013)
Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by <i>Yarrowia lipolytica</i> from palm Kernal cake (<i>Elaeis guineensis</i>)	Lipase	Tourteau de fruits de palme	(Imandi et al. 2010)
Lipase production by <i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate	Lipase	Son de riz, son de blé, bagasse de canne à sucre	(Imandi and Garapati 2007)

A novel application of solid state culture : Production of lipases by <i>Yarrowia lipolytica</i>	Lipase	Eponge nylon, son d'orge, coque de noix	(Dominguez et al. 2003)
---	--------	---	----------------------------

1.2. Taxonomie

Y. lipolytica est un champignon ascomycète. Sa classification scientifique (Van der Walt and Von Arx 1980), est présentée dans le **Tableau 2**. Cette levure a été renommée de *Mycotorula* vers *Monilia*, *Torula*, puis *Pseudomonilia*, *Protéomyces*, puis *Azymoprocandida*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Torulopsis*, *Saccharomycopsis* (Yarrow 1972) et finalement *Yarrowia lipolytica* (Van der Walt and Von Arx 1980). Elle a été classé comme une espèce du genre *Candida* car aucun stade sexué n'a été observé, et plus spécifiquement caractérisée comme *Candida lipolytica* due à sa capacité d'utiliser des n-paraffines et des huiles comme seule source de carbone. La forme parfaite de *C. lipolytica* a été identifiée à la fin des années 60 (Wickerham et al. 1970). Le nom de genre « *Yarrowia* » été proposé en reconnaissance d'un nouveau genre identifié par David Yarrow (Yarrow 1972) et le nom de l'espèce « *lipolytica* » a été nommé en se basant sur sa capacité à hydrolyser les lipides.

Tableau 2 : Classification scientifique de *Yarrowia* (Van der Walt and Von Arx 1980).

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Dipodascaceae</i>
Genre	<i>Yarrowia</i>

1.3. Physiologie et habitat

Y. lipolytica est une levure dimorphique. Ce type de levure peut croître sous différentes formes telles que levure, pseudo-mycélium, mycélium en fonction des conditions environnementales (Barth and Gaillardin 1997; Zinjarde et al. 1998; Domínguez et al. 2000; Ruiz-Herrera and Sentandreu 2002; Bankar et al. 2009; Beopoulos et al. 2009; Makri et al. 2010; Nicaud 2012; Bellou et al. 2014). C'est une levure mésophile qui croît entre 10 et 30 °C, 32–34 °C ou exceptionnellement jusqu'à 37 °C. *Y. lipolytica* est un organisme approuvé

comme GRAS (en anglais, « Generally Recognized As Safe ») par la FDA (« American Food and Drug Administration ») pour utilisation dans des procédés industriels alimentaires et pharmaceutiques (Groenewald et al. 2014).

2. Les arômes de type lactone

2.1. Généralités sur les lactones

Les lactones sont des esters cycliques d'un acide hydroxycarboxylique ayant une structure de 1-oxacycloalcan-2-one, ou analogues comportant une insaturation ou des hétéroatomes remplaçant un ou plusieurs atomes de carbone du cycle (Richer 1993). La structure générale des lactones est donnée (Figure 1). Les lactones les plus fréquemment identifiées dans la composition des arômes sont les γ - et δ -lactones (appelées aussi 4- et 5-olides). Elles proviennent respectivement de la cyclisation des hydroxyles en position 4 ou 5 avec celui du groupe carboxylique (Figure 2) (Dufossé et al. 1994).

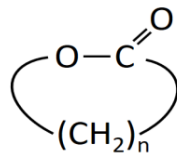


Figure 1 : Structure générale de lactones

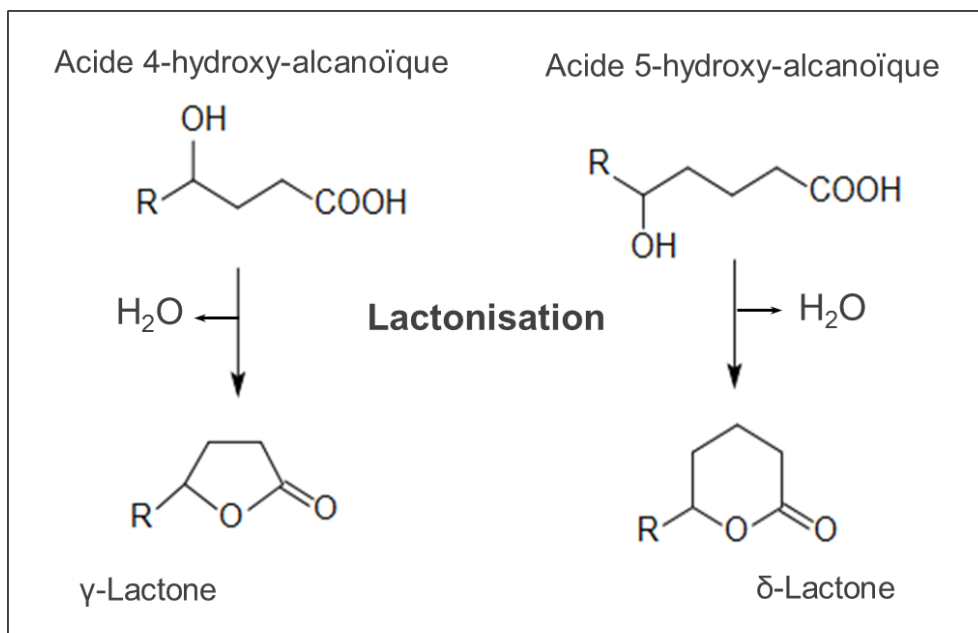

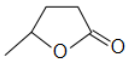
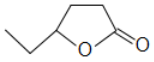
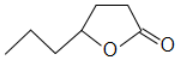
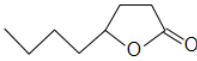



Figure 2 : Formation des lactones à partir d'acides hydroxylés (Dufossé et al. 1994; Pagot et al. 1998; Waché et al. 2002).

2.2. Propriétés sensorielles des lactones

Les lactones sont des composés d'arômes largement distribués dans les aliments et les boissons. D'un point de vue organoleptique, les lactones naturelles se caractérisent par une odeur à caractère généralement fruitée. En générale, les lactones volatiles comportent entre 4 (butyrolactone) et 12 (dodécalactone) atomes de carbone. La diversité des lactones est liée aux substituants présents sur les chaînes latérales, au nombre de doubles liaisons et à la configuration spatiale des molécules (formes énantiomériques R et S) (Dufossé et al. 1994). Les composés de ce type se trouvent naturellement dans de nombreux fruits tels que la pêche, l'abricot, la mangue, l'orange, la prune, -etc, à des concentrations de l'ordre du mg/kg, dans le lait et ses produits dérivés et dans certains produits fermentés (Dufossé et al. 1994; Alchihab et al. 2010). Le **Tableau 3** représente les propriétés sensorielles de quelques lactones de 4 à 10 atomes de carbone. Le **Tableau 4** représente les seuils de perception de quelques γ - et δ -lactones.

Tableau 3 : Description des propriétés sensorielles de quelques lactones (Gatfield et al. 1993; Dufossé et al. 1994; Waché et al. 2003; Waché 2013b).

<i>Nom du composé</i>	<i>Structure</i>	<i>Odeur ou saveur</i>
γ -Butyrolactone (C ₄ H ₆ O ₂)		Faible odeur de type beurre, âcre, fétide, caoutchouteux
γ -Pentalactone (C ₅ H ₈ O ₂)		Arôme doux, herbacé, odeur douce, légère, grasse, noix de coco, bois/résineux
γ -Hexalactone (C ₆ H ₁₀ O ₂)		Odeur chaude, puissante, douce, herbacée, arôme caramel, coumarine
γ -Heptalactone (C ₇ H ₁₂ O ₂)		Odeur douce caramel, de noisette, arôme doux, herbacé, caramel, malt
γ -Octalactone (C ₈ H ₁₄ O ₂)		Forte odeur fruitée, noix de coco, arôme très doux
γ -Nonalactone (C ₉ H ₁₆ O ₂)		Forte odeur de noix de coco, arôme gras, anis, réglisse, odeur

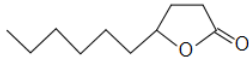

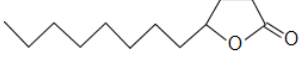
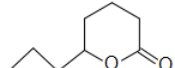
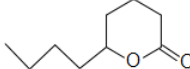
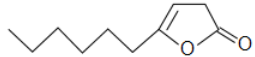

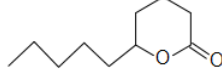
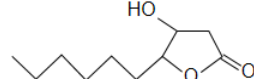
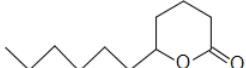
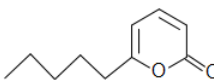
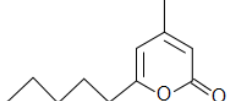
		fruitée, amande
γ -Décylactone (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)		Odeur agréable, fruitée, arôme type pêche/abricot
γ -Undécylactone (C ₁₁ H ₂₀ O ₂)		Odeur forte, fruitée, pêche, âcre, moisi, terreux
γ -Dodécylactone (C ₁₂ H ₂₂ O ₂)		Odeur grasse, pêche, beurre, musqué
δ -Octylactone (C ₈ H ₁₄ O ₂)		Arôme noix de coco, foin, chèvre, animal, vin
δ -Nonylactone (C ₉ H ₁₆ O ₂)		Arôme gras, crémeux, lait, huile, beurre
Déc-3-én-4-olide (C ₁₀ H ₁₆ O ₂)		Fruité, gras, huileux
Déc-2-én-4-olide (C ₁₀ H ₁₆ O ₂)		Champignon
δ -Décylactone (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)		Odeur de pêche, huileux, noix de coco, beurre, crémeux, doux, lait
3-Hydroxy- γ -décylactone (C ₁₀ H ₁₈ O ₃)		Sans odeur
δ -Undécylactone (C ₁₁ H ₂₀ O ₂)		Arôme crémeux, gras, pêche
6-Pentyl- α -pyrone (C ₁₀ H ₁₄ O ₂)		Arôme de noix de coco, beurre, vert, lait, pêche
3-Méthyl-5-hexyl- α -pyrone (C ₁₂ H ₁₈ O ₂)		Arôme livèche, céleri, épicé, cireux, moisi, roseau

Tableau 4 : Seuils de perception de quelques γ - et δ -lactones i) Perçues olfactivement après dispersion dans l'eau. ii) Perçues « en bouche » après dispersion en solutions aqueuse ou huileuse.

i). Perçues olfactivement après dispersion dans l'eau (seuils exprimés en $\mu\text{g/Kg}$) (Engel et al. 1989)

γ -C6	1 600		
γ -C7	400		
γ -C8	7	δ -C8	400
γ -C10	11	δ -C10	100
γ -C12	7	6-pentyl- α -pyrone	150

ii). Perçues « en bouche » après dispersion en solutions aqueuse ou huileuse (seuils exprimés en mg/Kg) (Siek et al. 1971)

	Dans l'eau	Dans l'huile		Dans l'eau	Dans l'huile
γ -C6	13	8			
γ -C7	0,52	3,4			
γ -C8	0,095	3,5	δ -C8	0,57	3
γ -C9	0,065	2,4			
γ -C10	0,088	1	δ -C10	0,16	
γ -C11	0,025	0,93			
γ -C12			δ -C12	0,1	95
γ -C14	9,8	500			

2.3. Propriétés physicochimiques des lactones

Les propriétés physicochimiques des lactones sont importantes pour expliquer leur comportement lors des procédés de production et d'extraction. Les masses molaires de γ -décalactones étudiées dans ce travail sont de 170 g/mol, 186 g/mol et 168 g/mol pour la γ -décalactone, la 3-hydroxy- γ -décalactone et les décénolides, respectivement. Parmi ces lactones, seules les caractéristiques physicochimiques de la γ -décalactone ont été étudiées. Les propriétés physicochimiques de la γ -décalactone sont données dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Propriétés physicochimiques de la γ -décylactone.

<i>Propriétés physicochimiques</i>	<i>Valeurs</i>
Coefficient de diffusion dans l'eau	$6,6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
Coefficient de diffusion dans le ricinoléate de méthyle	$0,11 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
Constante d'hydrophobicité à 25 °C (LogP)	3,35 ^a (Souchon 1994)
	2,72 ^b (US EPA 2018)
	2,38 ^c (Pham-Hoang et al. 2016)
Indice de volatilité	0,103
Pression de vapeur saturante estimée à 25 °C	0,754 Pa
Pression de vapeur saturante expérimentale à 25 °C	0,394 Pa
Solubilité dans l'eau	0,60 g/L

^a Exprimée par le logarithme de la constante de partage n-octanol-eau (calculée à partir de la méthode de contribution de groupe (Rekker 1977)).

^b Valeur expérimentale, et entre 2,39-3,15 pour les valeurs estimées.

^c Valeur obtenue par (ChemSpider 2018).

3. Production d'arômes de type lactone par des levures

En 1960, la possibilité de production de lactones par voie biotechnologique a été découverte par une équipe Japonaise (Uchiyama et al. 1963; Okui et al. 1963a; Okui et al. 1963b; Okui et al. 1963c). Ils ont étudié le catabolisme d'un acide hydroxylé par divers organismes. Les études ont montré que la levure *Candida tropicalis* dégrade l'acide ricinoléique en acides de C16, C14, C12, en γ -décylactone, et en acide hydroxylé. Par la suite, des efforts ont été consacrés à l'utilisation de souches de levures capables de produire des quantités élevées de lactones (Cabella et al. 1991; Page and Eilerman 1991; Cheetham et al. 1993; Spinnler et al. 1994; Gatfield 1995; Ambid et al. 1999; Farbood et al. 2000; Rabenhorst and Gatfield 2000). Le **Tableau 6** représente les différents procédés dans la production de lactones par des champignons ainsi que les rendements et leurs précurseurs.

Tableau 6 : Procédés de production de lactones par des champignons (mis à jour d'après (Waché et al. 2003)).

<i>Souche</i>	<i>Substrat</i>	<i>Type de lactone</i>	<i>Rendement</i>	<i>Description</i>	<i>Références</i>
<i>Y. lipolytica</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Geotrichum klebahnii</i> <i>Candida</i> spp	Huile de ricin, Huile de ricin+lipase, Huile de ricin hydroxylée	γ -Décalactone	0,69 g/L plus d'une semaine	Fiole agitée	(Farbood et Willis 1983)
<i>Candida</i> spp	Huile de ricin, Acide ricinoléique	Lactones insaturées		Aération et agitation élevées	(Farbood et al. 1990)
Levures, telles que <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> et <i>Sporidiobolus</i> spp	C18 hydroxyde, hydroxy-peroxyde	γ -Décalactone Lactones insaturées δ -lactones		Lipoxygénases de graines de soja	(Cardillo et al. 1991a)
<i>Y. lipolytica</i> <i>A. oryzae</i> <i>G. klebahnii</i> et <i>Hansenula saturnus</i>	Esters de ricinoléique	γ -Décalactone	5,1 g/L après 70 h	Lactonisation à 60-120 °C et pH 2	(Meyer 1993)
<i>Yarrowia</i> et <i>Candidat</i> spp	Acide 10-OH stéarique, Acide oléique	γ -Décalactone Lactones insaturées δ -lactones	3,5 g/L	Acide gras C18 hydroxylée	(Farbood et al. 1998)
<i>Y. lipolytica</i> <i>PO1d</i>	Ricinoléate de méthyle	γ -Décalactone	9,5 g/L après 75 h	Production de biomasse, réacteur haute densité	(Nicaud et al. 1996)
<i>Sporobolomyces</i> et <i>Yarrowia</i>	Résidus de distillerie de fermentation Cognac	γ -Décalactone et d'autres produits		Ricinoléate de méthyle ajouté comme précurseur	(Ambid et al. 1999)
<i>Y. lipolytica</i> <i>HR145</i>	Huile de ricin	γ -Décalactone Hydroxylactone	11 g/L en moins de 70 h	Réaction en une étape	(Rabenhorst and Gatfield 2000)

<i>Saccharomyces</i> et <i>Candida</i> spp	Acide 5- hydroxy- décanoïque	γ -Nonalactone		α -Oxydation	(Lange and Garbe 2000)
<i>Rhodotorula</i> <i>aurantiaca</i>	Huile de ricin	γ -Décalactone	6,8 g/L après 10 jours 6,6 g/L après 6 jours	β -Oxydation	(Alchihab et al. 2009)
<i>Y. lipolytica</i> W29	Ricinoléate de méthyle	γ -Décalactone	à 10 h	β -Oxydation Agitation : Kla 26,4 h ⁻¹	(Escamilla- García et al. 2009)
		Hydroxylactone	à 45 h	Agitation : Kla 8,1 h ⁻¹	
		Décénolides			Réacteur à biofilm
<i>Y. lipolytica</i> W29	Huile de ricin	Hydroxylactone	5 g/L après 70 h		Ce travail
		γ -Décalactone	180 mg/L à 28 h	FMS en fiole à col large	
		Déc-2-én-4- olide	680 mg/L à 28 h		
		Déc-3-én-4- olide	200 mg/L à 28 h		
		Hydroxylactone *	2,2 g/L à 40 h		
		γ -Décalactone*	200 mg/L à 19 h	FMS en mini-réacteur aération forcée	
		Déc-2-én-4- olide*	310 mg/ L à 50 h		
		Déc-3-én-4- olide*	150 mg/ L à 50 h		

* concentration extraite de support solide

4. Bioconversion des acides gras hydroxylés en lactones (Inspiré des sources principales (Waché 2002; Escamilla-García 2008; Alchihab et al. 2010))

En général, dans les cellules eucaryotes, la β -oxydation des acides gras se déroule dans les peroxysomes ou les mitochondries (Feron et al. 2005). La voie de dégradation principale des acides gras hydroxylés pour la production de lactones est la β -oxydation peroxysomale (Pagot et al. 1998; Waché et al. 2001; Waché et al. 2003; Waché 2013b). L'acide gras C18-hydroxylé (sous forme de ricinoléate de méthyle ou d'acide ricinoléique) préalablement activé en acyl-CoA, subit plusieurs cycles de β -oxydation pour former différents intermédiaires. La **Figure 3** représente les intermédiaires de la bioconversion de l'acide ricinoléique (Okui et al. 1963b; Gatfield et al. 1993; Feron et al. 1996a). Chez les levures, l'acyl-CoA oxydase joue un rôle important dans la dégradation des acides gras et également dans la production de lactones (Nicaud et al. 1998; Waché et al. 2001; Fickers et al. 2005). La voie de dégradation par la β -oxydation peroxysomale, de composés en C10 issus de l'acide ricinoléique chez la levure est représentée **Figure 4**. L'oxydation de l'acyl-CoA est catalysée par une acyl-CoA oxydase (équivalente à l'acyl-CoA déshydrogénase mitochondriale) dans les peroxysomes. Chez *Candida* ou *Yarrowia lipolytica* ou *C. tropicalis*, l'acyl-CoA oxydase peut oxyder des acides gras ayant une chaînes de 4 à 20 carbones. Cette réaction est couplée à une réaction de réduction du FAD^+ en FADH_2 , H^+ . L'oxygène est important pour réoxyder le FADH_2 , H^+ donnant de l' H_2O_2 qui sera transformé en H_2O et O_2 sans production d'ATP. L'énoyl-CoA est ensuite formé. La 2-énoyl-CoA hydratase joue le rôle de catalyseur de l'hydratation du carbone en β . Son activité peut être inversée dans le sens de la production d'énoyl-CoA en présence d'un excès d'esters de 3-hydroxyacyl-CoA. La 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, est plus active sur les substrats de chaînes moyennes et longues telles que C16. L'activité de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase est relativement sensible à l'équilibre NAD^+/NADH , H^+ (Waché et al. 2002). La dernière enzyme est la 3-cétoacyl-CoA thiolase, qui est active pour les substrats de C6 à C16 (Eaton et al. 1996). Elle permet de couper la molécule d'acyl-CoA en une molécule d'acétyl-CoA et un acyl-CoA plus court de deux carbones.

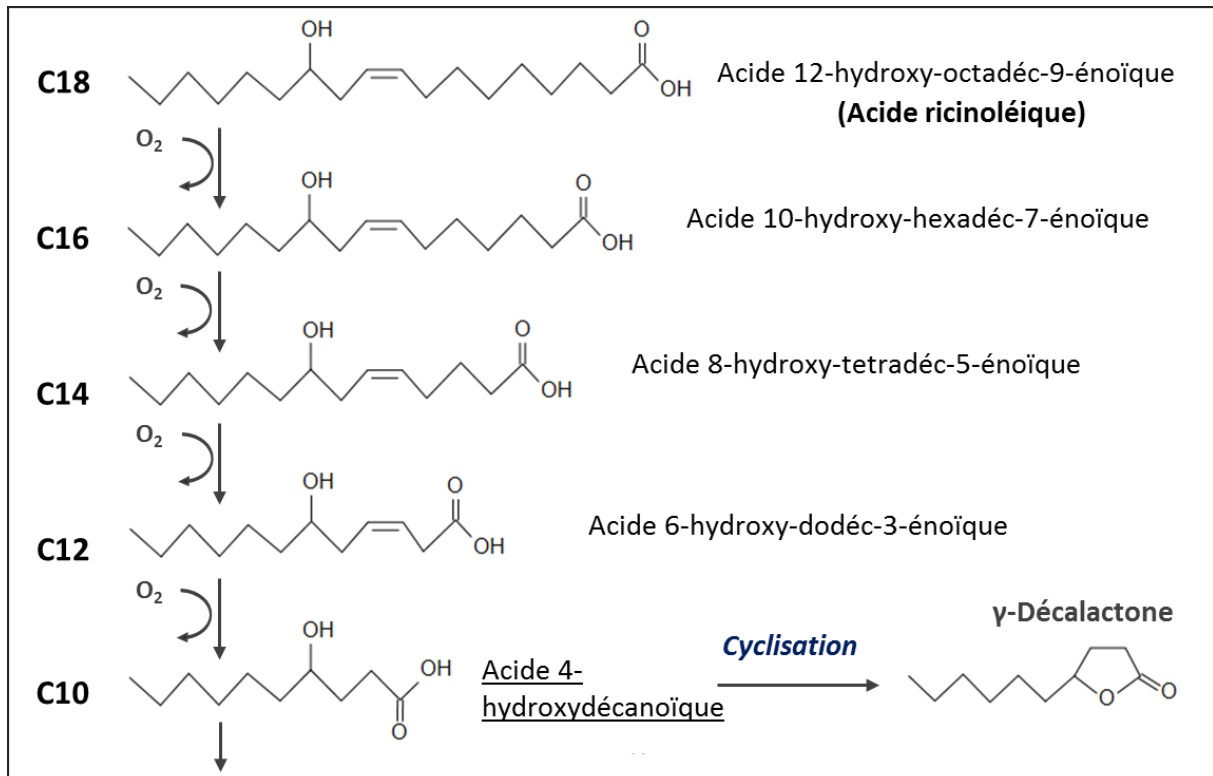


Figure 3: Intermédiaires de la bioconversion de l'acide ricinoléique (Okui et al. 1963b; Gatfield et al. 1993; Feron et al. 1996a).

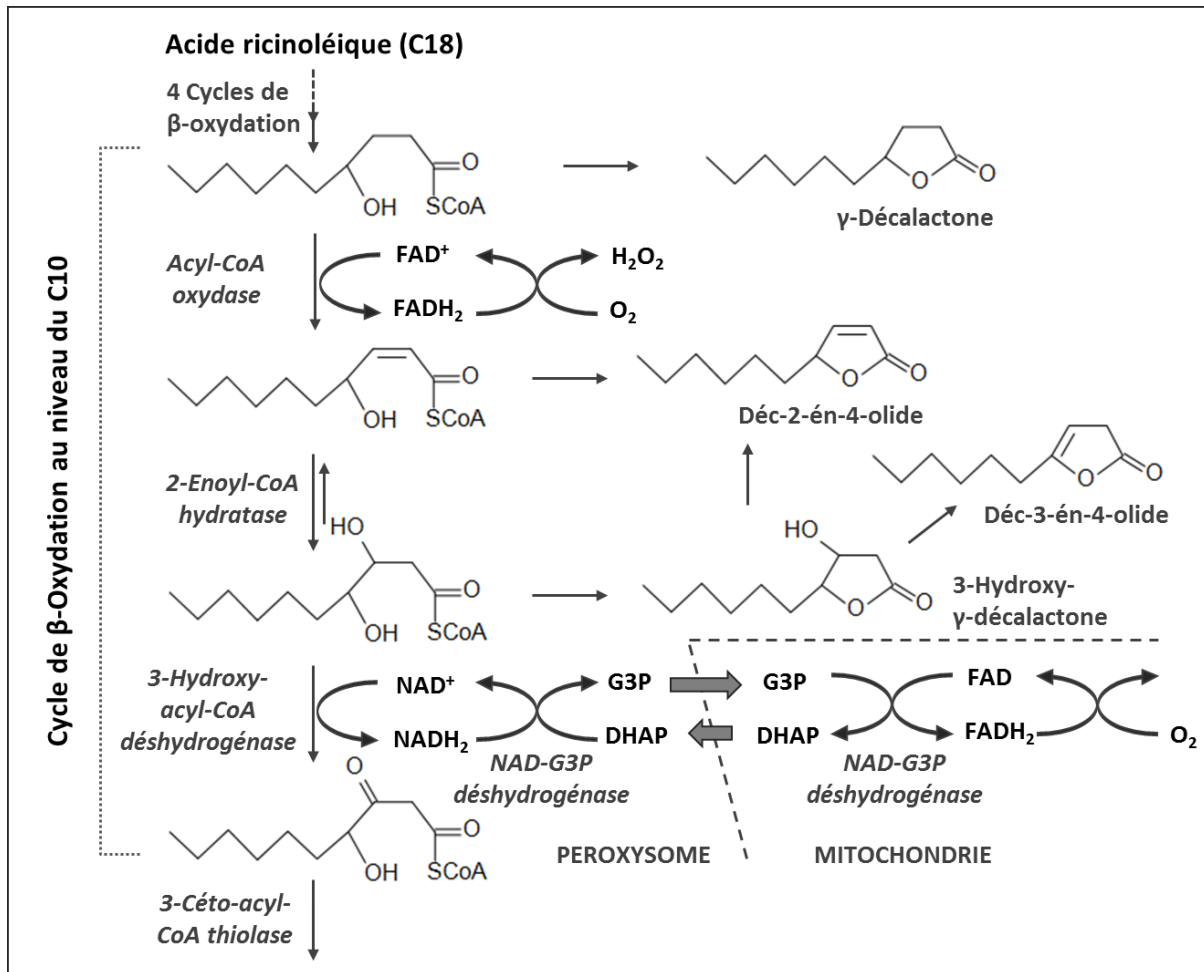


Figure 4 : Voie de dégradation par la β -oxydation peroxysomale, de composés en C10 issus de l'acide ricinoléique (Waché 2013b).

5. Effet de l'aération/oxygénation sur la production de lactones

L'aération/oxygénation est le paramètre principal influençant la β -oxydation impliquée dans la production de lactones (Waché et al. 2001; Waché et al. 2003; Escamilla-García et al. 2007a; Escamilla-García et al. 2009; Waché 2013b; Waché 2013a; Escamilla-García et al. 2014). La modification de l'aération influence l'activité acyl-CoA oxydase et également l'accumulation des deux groupes de lactones (γ -décalactone et 3-hydroxy- γ -décalactone). Les niveaux d'aération peuvent-être divisés en trois catégories pour leurs effets sur la voie de la β -oxydation des lipides chez *Y. lipolytica* (Figure 5) (Waché 2013b).

- **Aération très faible :** inhibe l'activité de l'acyl-CoA oxydase (en rendant insuffisant le co-substrat oxygène), limite la β -oxydation et favorise l'accumulation de γ -décalactone alors que la croissance diminue.

- **Aération modérée** : la β -oxydation fonctionne bien tandis que la diminution de l'oxygène augmente l'accumulation de 3-hydroxy- γ -déalactone, ce qui suggère que l'oxygénation est trop faible pour permettre de réoxyder le NADH,H^+ (de régénérer les cofacteurs NAD^+).
- **Aération très élevée** : l'accumulation de lactones augmente légèrement, ce qui montre que les conditions ne sont pas optimales pour la β -oxydation. Quand l'activité de l'acyl-CoA oxydase décroît, la 3-hydroxy- γ -déalactone s'accumule et lorsque l'activité est faible, la croissance et l'accumulation de γ -déalactone diminuent.

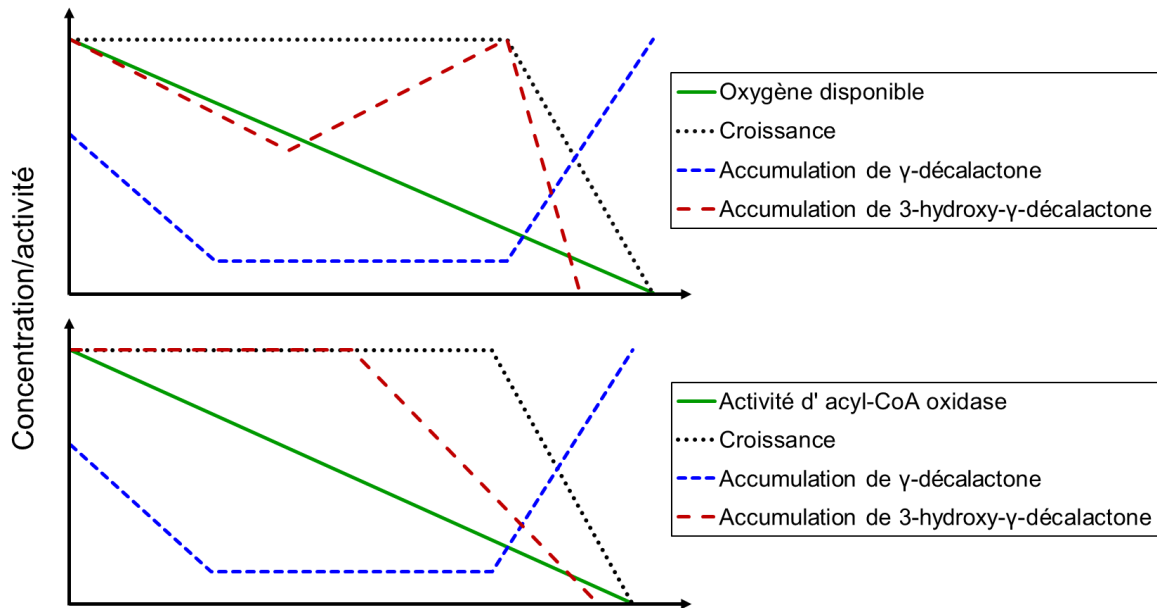


Figure 5 : Effet de l'oxygénation (haut) et de l'activité acyl-CoA oxydase (bas) sur la croissance cellulaire et sur l'accumulation de γ -déalactone et de 3-hydroxy- γ -déalactone (Waché 2013b).

6. Dégradation de lactones lors de la biotransformation

Lors de la biotransformation des acides gras hydroxylés en lactones, la concentration de γ -déalactone atteint sa valeur maximale puis diminue progressivement car ce composé est dégradé par les levures. La dégradation de lactones peut dépendre de différents facteurs comme l'aération, l'agitation, le pH, le transfert d'oxygène dans le milieu, et l'activité enzymatique du microorganisme (Waché et al. 2001; Escamilla-García et al. 2007a; Escamilla-García et al. 2007b). Jusqu'à maintenant, la voie métabolique exacte concernant cette dégradation n'a pas été prouvée. Cependant, différentes voies métaboliques peuvent-être empruntées lors de la dégradation de lactones par les levures (Endrizzi-Joran 1994; Endrizzi et al. 1996). Deux voies de dégradation possibles de la γ -déalactone ont été proposées par

Endrizzi-Joran (1994) (lactonase ou lactone-hydrolase et ω -oxydation) (Figure 6). Dans la première possibilité, la γ -décylactone peut être hydrolysée en acide 4-hydroxy-décanoïque, précurseur de l'acide 3,4-dihydroxy-décanoïque, qui peut être estérifié en 3-hydroxy- γ -décylactone (Gatfield et al. 1993). Une autre voie possible de dégradation de la γ -décylactone peut être par ω -oxydation suivie de la β -oxydation (Endrizzi-Joran 1994).

La souche sauvage *Y. lipolytica* W29 et des souches mutantes dérivées (Δ pox2, Δ pox3, Δ pox2pox3 et Δ pox2pox3pox4pox5) ont été utilisées pour étudier la dégradation de lactones (Waché et al. 2001). Les résultats ont montré que, pour la souche Δ pox2pox3pox4pox5 aucune dégradation de γ -décylactone n'a été observée, même après 8 jours, alors que la dégradation était complète pour les souches W29, Δ pox2, Δ pox3 après 3 jours et pour la souche Δ pox2pox3 après 6 jours.

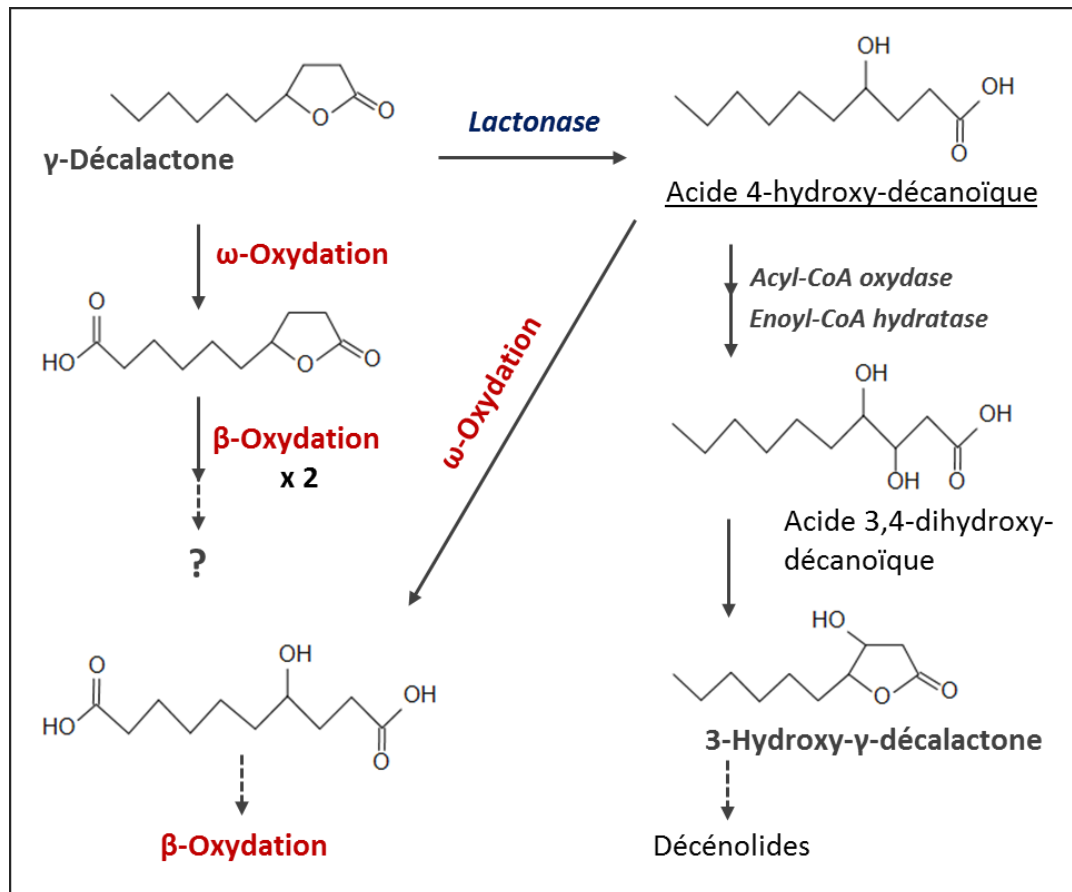


Figure 6 : Voies métaboliques impliquées dans la dégradation de lactones par les levures (Endrizzi-Joran 1994).

7. Fermentation en milieux solide versus fermentation en milieux liquide : le cas la production de lactones

La FML est généralement plus utilisée pour les cultures de microorganismes unicellulaires comme les bactéries et les levures, alors que la FMS est bien adaptée aux champignons filamenteux. Pour les microorganismes aérobies, l'agitation est nécessaire pour homogénéiser les milieux liquides. Cela, entraîne des contraintes de cisaillement que peu de souches mycéliennes sont capables de supporter. Par contre, il n'y a pas de contraintes de transfert vers le milieu lors de l'oxygénation en FMS, le microorganisme étant directement en contact avec l'oxygène de l'air (Duchiron and Copinet 2011). Toutefois, l'aération et/ou l'agitation pour renouveler l'air peuvent être nécessaire pour augmenter le contact entre l'oxygène et les microorganismes.

Les FML modernes apportent beaucoup d'avantages, par exemple un bon contrôle des paramètres environnementaux, en comparaison aux FMS (Singhania et al. 2010). Mais elles présentent également des inconvénients pour certaines productions (De Barros Soares et al. 2003). Les différentes caractéristiques de FML et FMS sont représentées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Différentes caractéristiques de la FMS et la FML (Raimbault 1998; Durand 2003; Manpreet et al. 2005; Socol et al. 2017a).

<i>Caractéristiques</i>	<i>FMS</i>	<i>FML</i>
Substrat	Substrat plutôt insoluble, support inerte (naturel ou artificiel) contient le substrat pour la croissance du micro-organisme	Substrat généralement soluble mais pas pour la production de lactone
Aseptie	Stérilisation thermique, traitement par vapeur, ou non stérile, dépend de la configuration du réacteur	Stérilisation thermique et contrôle aseptique
Consommation d'eau	Quantité limitée d'eau, faible A_w	Grande consommation d'eau
Chaleur métabolique	Faible capacité de transfert de chaleur	Température facile à contrôler
Aération	Besoin d'air saturé en eau ; Contact direct entre oxygène, substrat et microorganismes	Oxygène soluble limité dans le milieu

Contrôle du pH	Tamponner le substrat, ou le milieu de biotransformation avant d'imbiber dans le support inerte	Facile à ajuster
Agitation mécanique	Aération statique préférée	Bonne homogénéisation
Scale-up	Réacteur de type Koji disponible ; Besoin de développement d'autre type de réacteur	Equipements industriels disponibles, procédé continu
Inoculation	Difficile à homogénéiser les microorganismes dans les support/substrat	Facile et bien homogène
Contamination	Risque de contamination pour un faible taux de champignons en croissance	Risque de contamination pour certaines bactéries
Utilisation énergétique	Faible consommation d'énergie	Haute consommation d'énergie
Volume de réacteur	Faibles volumes et faibles coûts d'équipements	Volumes élevés et technologie couteuse
Effluents et pollution	Pas d'effluents, moins de pollution	Grands volumes d'effluents polluants
Productivité	Plus élevé	Plus faible

La production de lactones a été initialement menée en FML et puis, grâce aux avantages de la FMS, la production de lactones a également été menée en FMS. Sarhy-Bagnon et al. (2000) ont étudié la production de 6-pentyl- α -pyrone en comparaison entre la production en FML et en FMS pour le champignon filamentueux *Trichoderma harzianum*. Le même milieu de biotransformation qu'en FML est utilisé pour imbiber la matrice solide (bagasse de canne à sucre) en FMS. Le rendement de 6-pentyl- α -pyrone est beaucoup plus important en FMS qu'en FML (17 fois plus élevé en FMS) (Sarhy-Bagnon et al. 2000). Parmi des études similaires concernant la production de 6-pentyl- α -pyrone en FMS (Sarhy-Bagnon et al. 2000; De Araújo et al. 2002; Ladeira et al. 2010; Da Penha et al. 2012b), le rendement maximum de 6-pentyl- α -pyrone a été observé en utilisant *T. viride* (3,62 mg/g de matière sèche de support) (Fadel et al. 2015). La production de lactones en FMS versus en FML intéresse aussi notre

équipe de recherche. La 3-hydroxy- γ -décylactone est produite jusqu'à 5 g/L après 70 h d'incubation (Try et al. 2018). Pour transférer la FML en FMS, plusieurs paramètres sont importants à considérer, le choix de matrices solides, de microorganismes -etc (voir le point 9. Production d'arômes par FMS et importance des systèmes de piégeage d'arômes).

8. Estimation de la croissance de biomasse en FMS

Dans tous les bioprocédés, la biomasse constitue un paramètre fondamental de la croissance microbienne. Les bioprocédés peuvent être des procédés pour la production de biomasse ou des procédés pour la production de métabolites (primaire ou secondaire). La mesure de biomasse est importante pour contrôler la concentration souhaitée dans les procédés de production de biomasse. Par ailleurs, elle est un paramètre essentiel pour les procédés de production de métabolites car la croissance de biomasse est relativement liée aux métabolites produits.

La biomasse est difficile à évaluer directement au cours de procédés de FMS parce que les microorganismes sont intimement liés à la matrice solide, et difficile à séparer. La FMS est utilisée plus souvent avec des champignons filamenteux, le mycélium pénètre profondément dans le substrat et devient inséparable. Dans ce cas-là, il est préférable d'utiliser des méthodes indirectes pour l'estimation de biomasse. Par contre, la croissance de levures en FMS ne présente pas cette difficulté de séparation de la matrice solide.

Selon Durand et al. (1997b), les méthodes utilisées pour l'estimation de biomasse en FMS peuvent être classées en cinq catégories : (i) la mesure directe de biomasse ; (ii) l'analyse de constituants de la biomasse ; (iii) la mesure de l'activité métabolique de la biomasse ; (iv) l'estimation on-line de la biomasse ; (v) la mesure de la viabilité de la biomasse.

8.1. Mesure directe de biomasse

8.1.1. Comptage directe au microscope

La mesure directe de la croissance de biomasse n'est pas efficace dans le cas d'utilisation de champignons filamenteux à cause de la difficulté de les séparer de la matrice solide. Elle est applicable en cas d'utilisation des microorganismes qui ne sont pas strictement liés aux matières solides utilisées. Dans ce cas, les microorganismes doivent être unicellulaires, par exemple des levures ou des bactéries. La caractéristique physique de la matière solide a aussi une influence sur la séparation des microorganismes. La mesure directe de biomasse est faite en mélangeant une quantité connue de l'échantillon solide avec une quantité d'eau pour

séparer les microorganismes de la matrice solide (ou plus souvent avec la solution de Tween). L'agitation doit être mise en place pour permettre de libérer les microorganismes des matrices solides. La préparation sera filtrée pour enlever les particules provenant de la matrice solide (autres que les microorganismes) et ensuite le comptage au microscope à l'aide d'un hématomètre sera réalisé (Durand et al. 1997b).

8.1.2. Observation directe en imagerie microscopique

L'estimation de biomasse en FMS peut se faire par observation directe en imagerie microscopique. Cette technique peut être réalisée en microscopie électronique ou confocale (Raimbault 1998). Le microscope électronique à balayage est un outil essentiel qui a une haute magnitude par rapport au microscope optique. Il peut donc capter une image en très haute définition. La mesure se base sur le logiciel de l'ordinateur qui analyse les images en calculant la longueur ou les volumes totaux de mycéliums en FMS sur la surface de matrices solides (Raimbault 1998). Le microscope confocal est utilisé en se basant sur la réaction spécifique de sondes fluorochromes avec la biomasse. Des images en trois dimensions de biomasse seront observées. Pour l'application de ces techniques, il est nécessaire d'avoir des équipements coûteux et les logiciels spécifiques. Osma et al. (2011) ont développé un système par le logiciel Matlab pour déterminer le volume et la surface occupée par la biomasse en FMS. Ce logiciel ne permet que l'application avec les images en haute définition, par exemple les images observées par le microscope électronique à balayage ou le microscope électronique en transmission.

8.2. Analyse de constituants de la biomasse

L'analyse de composants de biomasse peut s'utiliser comme une méthode indirecte pour l'estimation de la croissance en FMS. Les constituants de la biomasse qui pourraient être les indicateurs sont le glucosamine, l'ergostérol, les acides nucléiques, le sucre total, et les protéines. Pour choisir un ou plusieurs indicateurs à mesurer, quatre qualités doivent être réunies : (i) l'indicateur doit être bien adapté au microorganisme utilisé, (ii) il doit pouvoir être analysé quantitativement, (iii) il ne doit pas exister ou être en quantité négligeable dans la matrice solide et/ou la solution de nutriment ajoutée, (iv) la quantité de l'indicateur sélectionné doit être constante tout au long du développement du microorganisme et doit être la même dans les différentes conditions de culture (Durand et al. 1997b).

8.3. Mesure de l'activité métabolique de biomasse

Les activités métaboliques peuvent être mesurées pour les estimations indirectes de la croissance car certaines activités métaboliques sont associées à la croissance. Les indicateurs peuvent être les enzymes extracellulaires, par exemple l' α -amylase est présente proportionnellement à la croissance d'*Aspergillus oryzae* (Okazaki et al. 1980) ; la disponibilité de l'ATP (Matcham et al. 1984; Thierry and Chicheportiche 1988) ; et la consommation du substrat (Desgranges et al. 1991a). D'autres indicateurs environnementaux pourraient être utilisées pour contrôler la croissance de microorganismes (oxygène disponible, dioxyde de carbone, température, pression et pH) (Carrizalez et al. 1981). Pour cette raison, la mesure indirecte de la croissance de biomasse pourrait se faire par l'estimation en continue de la consommation de l'oxygène (Sato et al. 1983); de la production de dioxyde de carbone (Carrizalez et al. 1981; Saucedo-Castaneda et al. 1994) ; de la chaleur produite par le métabolisme (Marison et von Stokar, 1986 ; (Ratkowsky et al. 1983) ; Bayer et Fuehrer, 1982) ; et de la pression liée à la fermentation (Auria et Revah, 1994).

8.4. Estimation par la viabilité de la biomasse

La méthode classique pour mesurer les UFC (unités formants des colonies) est utilisée pour évaluer la viabilité des microorganismes. Cette technique nécessite au moins deux jours pour l'incubation et elle n'est pas applicable pour certains mycéliums. Dans ce cas-là, la viabilité par coloration des membranes de microorganisme (bleu de méthylène), puis l'observation microscopique peut-être mise en place.

8.5. Estimation par modèle mathématique

Un modèle mathématique a été proposé par Okazaki et al. (1980), pour être utilisé pour l'estimation de la croissance en FMS. Ce modèle tient compte des pertes de poids de matière sèche et de l'évolution du dioxyde de carbone produit au cours de la FMS. Wang et al. (2010) ont utilisé ce modèle pour l'estimation de la croissance de *A. oryzae* dans des conditions de FMS. Le modèle est présenté dans l'équation suivante (Eq. 1) :

$$r = \frac{W_i(1-r_i)-W_t(1-m_t)}{W_i(1-r_i)} - \frac{W_{bi}-W_{bt}}{W_{bi}(1-r_i)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Où r : est le ratio de perte de poids sec (%) ; W_i : est le poids initial du substrat solide humide (g) ; W_t : est le poids instantané du substrat fermenté (g) ; r_i : est la teneur en eau initiale du substrat humide (substrat fermenté ou non fermenté) (%) ; m_t : est la teneur en eau instantanée

du substrat fermenté (%) ; W_{bi} et W_{bt} : représentent respectivement le poids initial et le poids instantané du substrat humide non fermenté (g).

8.6. Autres techniques

D'autres techniques pourraient être utilisées pour l'estimation de la biomasse, telles que la mesure en continue par un capteur de biomasse comme montrée dans Harris et Kell (1985). Penalosa et al. (1991) et Davey et al. (1991), ont montré que la croissance de champignon peut être mesurée en continue par la mesure de la permittivité diélectrique en basse fréquence, en utilisant une sonde de biomasse (en anglais « Bugmeter »). Davey et al. (1991) ont montré une linéarité pendant la phase de croissance, entre la permittivité diélectrique et la longueur des hyphes (déterminée microscopiquement). L'autre méthode est la mesure par la réflectance de la lumière. Cette méthode est basée sur l'ajout de mélange d'additifs permettant de relier un changement de couleur à la croissance fongique (Murthy et al. 1993). L'utilisation de ces méthodes n'a pas été reprise dans d'autres publications. Ces méthodes pourraient potentiellement être à développer.

9. Production d'arômes par FMS et importance des systèmes de piégeage d'arômes

Publication de revue « *Aroma compounds production by solid state fermentation, importance of recovery systems* »

« Soumise à *Applied Microbiology and Biotechnology* »

Résumé

La FMS a considérablement étendu ses applications à la production de nombreux métabolites. Les arômes peuvent être produits en FMS avec un rendement plus élevé et en moins de temps qu'en FML. En FMS, les arômes peuvent être produits dans la matrice solide ou produits dans la phase gazeuse par exemple lors de l'aération forcée. Cette revue focalise sur la production d'arômes en FMS, et, plus particulièrement, sur les systèmes de récupération. La présentation sera suivie par une discussion sur le choix du microorganisme, de la matrice solide utilisée, sur les productions d'arômes existantes, les aspects du bioréacteur, les facteurs affectant la production d'arômes et les systèmes de récupération d'arômes en cas d'utilisation de bioréacteur FMS à aération.

Mot clés : Fermentation en milieu solide ; Réacteur aéré ; Production d'arômes ; Libération d'arômes ; Systèmes de piégeage.

MINI-REVIEW

**Aroma compounds production by solid state fermentation,
importance of recovery systems**

Sophal TRY^{1,2,4,*}, Andrée VOILLEY¹, Thavarith CHUNHIENG², Joëlle DE-CONINCK^{1,3},
Yves WACHÉ^{1,4}

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

²Department of Chemical Engineering and Food Technology, Institute of Technology of Cambodia, Russian Federation Blvd., P.O. Box 86, Phnom Penh, Cambodia

³Welience-Plateform for Development in Biotechnology, SATT GRAND EST, 17 rue Sully, 21065 Dijon, France

⁴Network Tropical Fermentation

*Corresponding author. Address: AgroSup Dijon/University of Burgundy - Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. E-mail address: try@itc.edu.kh (S. Try).

Abstract

Flavour and fragrance compounds are extremely important for food, feed, cosmetic and pharmaceutical industries. Recently, due to consumer's increased trend towards natural products, a great interest in natural aroma compounds has arisen to the detriment of chemically synthesised ones. Solid state fermentation (SSF) process has greatly expanded its application to the production of many metabolites. Aroma compounds can be produced by SSF with a higher yield compared to submerged fermentation (SmF). In SSF processes, aroma compounds can be produced in the solid matrix or in the headspace, but they can be lost or stripped when aeration is required. This review focuses on the production of aroma compounds by SSF processes with a special highlight on the recovery systems. Following a brief presentation of specificities of SSF processes concerning the choice of microorganisms and the solid matrix used for the production of aroma compounds, the bioreactor aspects and the factors affecting production of aroma compounds and aroma recovery systems in aeration SSF bioreactors are discussed.

Key words

Solid state fermentation; Forced aeration reactor; Aroma production; Aroma release; Recovery systems.

Introduction

Flavour and fragrance compounds are very important for food, feed, cosmetic, pharmaceutical and chemical industries. In terms of value, the global aroma market is expected to grow from US\$ 21.4 billion in 2013 to US\$ 25 billion in 2018 (IAL Consultants 2014). Most of the aroma compounds are presently produced via chemical synthesis or isolated from natural resources. The extraction of aroma compounds from natural materials began in ancient times. Recently, due to consumer's increased interest in natural products and health awareness, a great interest towards natural aroma compounds has arisen compared to the chemically synthesized ones. Related to this trend, bioconversion systems have developed as promising substitutes to produce natural aroma compounds (Feron and Waché 2005; Waché 2013a). Furthermore, most legislations consider aroma compounds produced by biotechnological processes as natural as long as they are produced from plant, animal or microbial sources through physic, microbial or enzymatic transformation (Europe: EC 1988/Rule 2008 and USA: CFR 1990). Interest in SSF has been increasing due to the important applications of this process for the production of various metabolites and enzymes (Oostrá et al. 2000; Pandey 2003; Thomas et al. 2013; Aggelopoulos et al. 2014; Fadel et al. 2015; Farinas 2015; Socol et al. 2017b). Based on several studies, aroma compounds can be produced by SSF with a higher yield compared to SmF (Sarhy-Bagnon et al. 2000; De Araújo et al. 2002; Mantzouridou et al. 2015). Some authors reported also that an important amount of metabolites could be produced over a shorter period of time than by SmF (Lapadatescu and Bonnarme 1999). In SSF, aroma compounds are produced and embedded in the solid matrix or can be released in the headspace. In that case, they can be lost or stripped especially when an aeration flux is imposed to the process. Product recovery is a challenging step in biosynthesis systems, especially for aroma compounds since they are lowly soluble and highly volatile. An uncontrolled physical loss of aroma compounds occurs during γ -decalactones production in SSF by *Yarrowia lipolytica* while using a forced aeration mini-reactor (Try et al. 2018). A possible way of minimizing the losses is to use a separation technique for the recovery of aroma compounds. The outlet air from SSF may be connected to a trapping system in order to recover aroma compounds stripped by the aeration. In the bioconversion of aroma compounds, the product can be toxic to the producing microorganism. In this case, the aroma compound produced needs to be continuously recovered to avoid any inhibitory effect on the microorganism metabolism. An online extraction system has been used, based on

adsorption on adsorbents to recover aroma compounds during bioconversion (Souchon et al. 1998).

On a related topic, Soccol et al. (2008) have summarised mainly the results of the production of fruity aroma compounds concerning the environmental conditions and two reactor types used in a book chapter. The aim of the present article is to review SSF applications of production of aroma compounds with a special highlight on the recovery systems for an online use with aeration SSF reactors. The microorganisms and the solid matrix used in SSF will be described briefly followed by the presentation of aroma compounds produced in SSF processes such as lactones, esters, terpenes, pyrazines, aldehydes, alcohols and carboxylic acids. The bioreactor aspects, the factors affecting the production of aroma compounds and the recovery systems will also be underlined for the production of aroma compounds using aerated SSF processes.

Microorganisms used for the production of aroma compounds in SSF

The choice of the microorganism is significantly important for both SmF and SSF process. In SSF, it is usually dependent on the solid matrix (substrate or support), the growth requirements and the target of final products (Krishna 2005). All types of microorganisms can be used in SSF, fungi, yeast and bacteria. Table 1 shows microorganisms and solid matrices employed for the production of aroma compounds in SSF. Most of SSF processes are carried out using filamentous fungi or yeasts because of their ability to grow on a solid matrix with low water content. Fungi such as *Trichoderma viride* (Gervais et al. 1988a; De Araújo et al. 2002; Fadel et al. 2015), *T. harzianum* (Sarhy-Bagnon et al. 2000; Ramos et al. 2008; Ladeira et al. 2010; Da Penha et al. 2012a), *Rhizopus oryzae* (Bramorski et al. 1998; Christen et al. 2000), *Bjerkandera adusta* (Lapadatescu and Bonnarme 1999), *Ceratocytis fimbriata* (Christen and Raimbault 1991; Christen et al. 1994; Christen et al. 1997; Christen and Revahl 1998; Soares et al. 2000; Medeiros et al. 2003; Medeiros et al. 2006; Rossi et al. 2009) and *Aspergillus niger* (Janssens et al. 1992); yeasts such as *Yarrowia lipolytica* (Try et al. 2018), *Saccharomyces cerevisiae* (Aggelopoulos et al. 2014; Mantzouridou et al. 2015) and *Kluyveromyces marxianus* (Medeiros et al. 2000; Medeiros et al. 2001; Aggelopoulos et al. 2014); and bacteria such as *Bacillus subtilis* and *B. natto* (Larroche et al. 1999) were employed in the production of aroma compounds using SSF. Kefir culture was also used as a starter in the production of aroma compounds using SSF process (Aggelopoulos et al. 2014).

In SSF process (unmixed bioreactors), microorganism cells are generally fixed on the solid matrix. In this case, a higher cell inoculum density might be used compared to SmF in order to increase the surface of contact between microbial cells and solid matrix. In addition, a greater production yield of aroma compounds can be observed (Try et al. 2018).

Table 1 Microorganisms and solid matrices employed in SSF for the production of aroma compounds.

<i>Microorganisms</i>	<i>Solid matrices</i>	<i>Flavours and Aromas</i>	<i>References</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Luffa sponge Cellulose sponge Corncob Castor seeds	γ -Decalactone 3-Hydroxy- γ - decalactone Dec-2-en-4-olide Dec-3-en-4-olide	(Try et al. 2018)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Orange peel	Isoamyl acetate Phenyl ethyl acetate Ethyl hexanoate Ethyl octanoate Ethyl decanoate Ethyl dodecanoate	(Mantzouridou et al. 2015)
	Mixed solid and liquid food industry wastes (i.e. cheese whey, molasses, brewer's spent grains, malt spent rootlets, orange and potato pulp)	ϵ -Pinene	(Aggelopoulos et al. 2014)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Mixed solid and liquid food industry wastes (i.e., cheese whey, molasses, brewer's spent grains, malt spent rootlets, orange and potato pulp)	ϵ -Pinene	(Aggelopoulos et al. 2014)
	Cassava bagasse	Ethyl acetate Ethanol Acetaldehyde Propyl acetate Butyl acetate Ethyl propionate Ethyl isobutyrate Isoamylic alcohol Isoamyl acetate	(Medeiros et al. 2001)
	Cassava bagasse Giant palm bran	Isoamylic alcohol Ethyl acetate	(Medeiros et al. 2000)

	Apple pomace Sugar cane bagasse Sunflower seeds	Propyl acetate Butyl acetate Ethyl propionate Ethyl isobutyrate Isoamyl acetate	
<i>Candida utilis</i>	Wheat bran, sugar cane bagasse and a synthetic resin (Amberlite)	Fruity aromas	(Christen et al. 1993)
<i>Trichoderma viride</i>	Sugarcane bagasse	6-Pentyl- α -pyrone δ -Octalactone γ -Nonalactone γ -Undecalactone γ -Dodecalactone δ -Dodecalactone	(Fadel et al. 2015)
	Sugarcane bagasse	6-Pentyl- α -pyrone	(De Araújo et al. 2002)
	Emerson's yeast starch agar containing sodium octanoate	2-Heptanone	(Gervais et al. 1988a)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Sugarcane bagasse	6-Pentyl- α -pyrone	(Sarhy-Bagnon et al. 2000; Ramos et al. 2008; Ladeira et al. 2010; Da Penha et al. 2012a)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Agro-industrial solid waste (cassava bagasse, apple pomace), soybean, amaranth grain, soybean oil	Acetaldehyde Ethanol 1-Propanol Ethyl acetate Ethyl propionate 3-Methyl butanol	(Christen et al. 2000)
	Cassava bagasse, soybean meal, apple pomace	Acetaldehyde 3-Methyl butanol 1-Propanol Ethyl acetate Ethyl propionate	(Bramorski et al. 1998)
<i>Bjerkandera adusta</i>	Wheat bran, Perlite (impregnated with L-phenylalanine)	Benzaldehyde Benzyl alcohol Benzoic acid	(Lapadatescu and Bonnarme 1999)
<i>Ceratocytis fimbriata</i>	Citric pulp Soya bran	Ethyl acetate Isoamyl acetate	(Rossi et al. 2009)

<i>Ceratocytis fimbriata</i>	Coffee husk	Acetaldehyde Ethanol Isopropyl acetate Propyl acetate Ethyl propionate Ethyl isobutyrate Isobutyl acetate Ethyl butyrate Isoamyl acetate Ethyl-3-hexanoate	(Soares et al. 2000; Medeiros et al. 2003; Medeiros et al. 2006)
	Amberlite Wheat bran Sugarcane bagasse	Isoamyl alcohol Isoamyl acetate	(Christen and Revahl 1998)
	Cassava bagasse Wheat bran Sugarcane bagasse	Acetaldehyde, 3-Methyl butanol 3-Methylbutyl acetate Ethyl acetate Ethyl propionate	(Christen et al. 1997)
	Wheat bran Sugar cane bagasse and a synthetic resin	Fruity aromas	(Christen et al. 1994)
		Fruity aromas	(Christen and Raimbault 1991)
<i>Aspergillus niger</i>	Coconut fat	Blue cheese notes	(Janssens et al. 1992)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ground soybeans	2,5-Dimethylpyrazine Tetramethylpyrazine	(Larroche et al. 1999)

Solid matrices used for the production of aroma compounds in SSF

One of the important aspects that should be considered in SSF processes is the choice of the solid matrices. The solid matrices used for aroma compounds production in SSF process can be the substrate itself which can provide nutrients such as carbon and nitrogen sources for the growth and metabolites synthesis of microorganism or, when the form and structure of the substrate is inadequate for cell growth, a support can be used, providing conditions for a good access of the microorganism to its substrate and co-substrate (e.g., oxygen). Solid matrices employed in SSF processes are generally insoluble in water. Some water has to be added into the substrates for growth and metabolic activities of the microorganism and a biotransformation medium has to be added when inert supports are used. Inert supports include natural supports and synthetic supports. Solid matrices may require a pretreatment process to make their chemical constituents more accessible and physical structure more

adapted to the fermentation conditions. For example, luffa sponge and cellulose sponge were used as inert supports impregnated with biotransformation medium for γ -decalactones production in SSF. They were cut into small pieces, soaked in boiling water, washed thoroughly with tap water, and left in distilled water. They were then dried before use (Try et al. 2018). In the same study, an example of solid substrate, castor seeds, was used for the production of γ -decalactones. In that case, a pretreatment using a grinding process was conducted in order to increase the availability of oxygen in the solid-to-air interphase.

Generally, most of the solid matrices used in SSF are based on food and agro-industry crops and residues (Couto and Sanromán 2006). Solid matrices for SSF can be categorized into five groups, (I)-starchy substrates, (II)-substrates with protein, (III) substrates with soluble sugar, (IV)-cellulose or lignocellulose and (V)-synthetic support. Table 1 shows microorganisms and solid matrices employed for the production of aroma compounds in SSF. In aroma production, solid matrices that have been used include wheat bran (Christen et al. 1993; Christen et al. 1994; Christen et al. 1997; Christen and Revahl 1998; Lapadatescu and Bonnarne 1999), palm bran (Medeiros et al. 2000), soya bran (Rossi et al. 2009), ground soybeans (Larroche et al. 1999), soybean meal (Bramorski et al. 1998), orange peel (Mantzouridou et al. 2015), citric pulp (Rossi et al. 2009), coffee husk (Soares et al. 2000; Medeiros et al. 2003; Medeiros et al. 2006), apple pomace (Bramorski et al. 1998), sugarcane bagasse (Christen et al. 1993; Christen et al. 1994; Christen et al. 1997; Christen and Revahl 1998; Sarhy-Bagnon et al. 2000; De Araújo et al. 2002; Rocha-Valadez et al. 2005; Fadel et al. 2015), cassava bagasse (Christen et al. 1997; Bramorski et al. 1998; Medeiros et al. 2000; Medeiros et al. 2001), synthetic resin (Christen et al. 1994) and agro-industrial solid waste (Christen et al. 2000; Aggelopoulos et al. 2014).

Aroma compounds produced by SSF

This chapter will present lactones, esters, terpenes, pyrazines, ketones, aldehydes, alcohols and carboxylic acids that can be produced in SSF by biosynthesis or biotransformation. The scheme of the main pathways for flavour and fragrance production in SSF derived from the degradation of lipids, glucose and proteins is represented in Fig. 1.

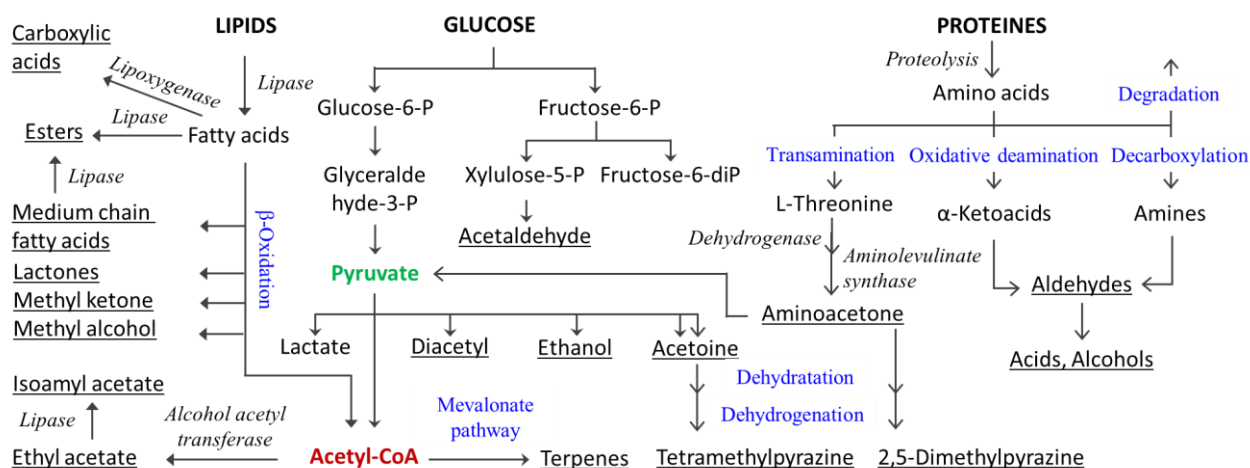


Fig. 1 Scheme of the main pathways of degradation of lipids, glucose and proteins (enzymes are in italic) to flavour or fragrance compounds (underlined) through SSF [adapted from (Larroche et al. 1999; Feron et al. 2005; Waché et al. 2006)].

Lactones

Lactones constitute an important class of value-added bioflavouring additives. Lactones exhibit strong sensorial properties often with fruity and butter notes. These flavouring compounds are present in many fruits and fermented foods. Some lactones and their precursor with the brief metabolism pathways are represent in Fig. 2. By using yeast cells, lactones can be produced relatively easily from hydroxylated fatty acids as carbon substrates (Feron and Waché 2005; Waché 2013b). Four lactones such as γ -decalactone, 3-hydroxy- γ -decalactone, dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide were detected during the degradation of hydroxylated fatty acids by *Y. lipolytica* in SSF (Try et al. 2018) as well as in SmF processes (Gatfield et al. 1993; Waché et al. 1998; Gatfield 1999; Waché et al. 2000; Waché et al. 2001; Escamilla-García et al. 2007a; Escamilla-García et al. 2007b; Escamilla-García et al. 2009; Escamilla-García et al. 2014). The flavouring notes can be described for γ -decalactone as peach-like, fatty and fruity. Dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide are two powerful aroma compounds

displaying mushroom-like and fruity-like notes, respectively. 3-Hydroxy- γ -decalactone has been reported as a non-odor lactone which can be the precursor of dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide (Gatfield et al. 1993; Waché et al. 2001; Waché et al. 2003). In a recent study, lactones were produced by SSF using different inert supports such as cellulose sponge, corncob and luffa sponge impregnated with the biotransformation medium containing castor oil 20 g.L⁻¹ (Try et al. 2018). Furthermore, castor seeds were used as solid substrate. Luffa sponge appeared as a potential inert support resulting in high productions of hydroxy-lactone (5 g.L⁻¹) among the solid supports and solid substrate used.

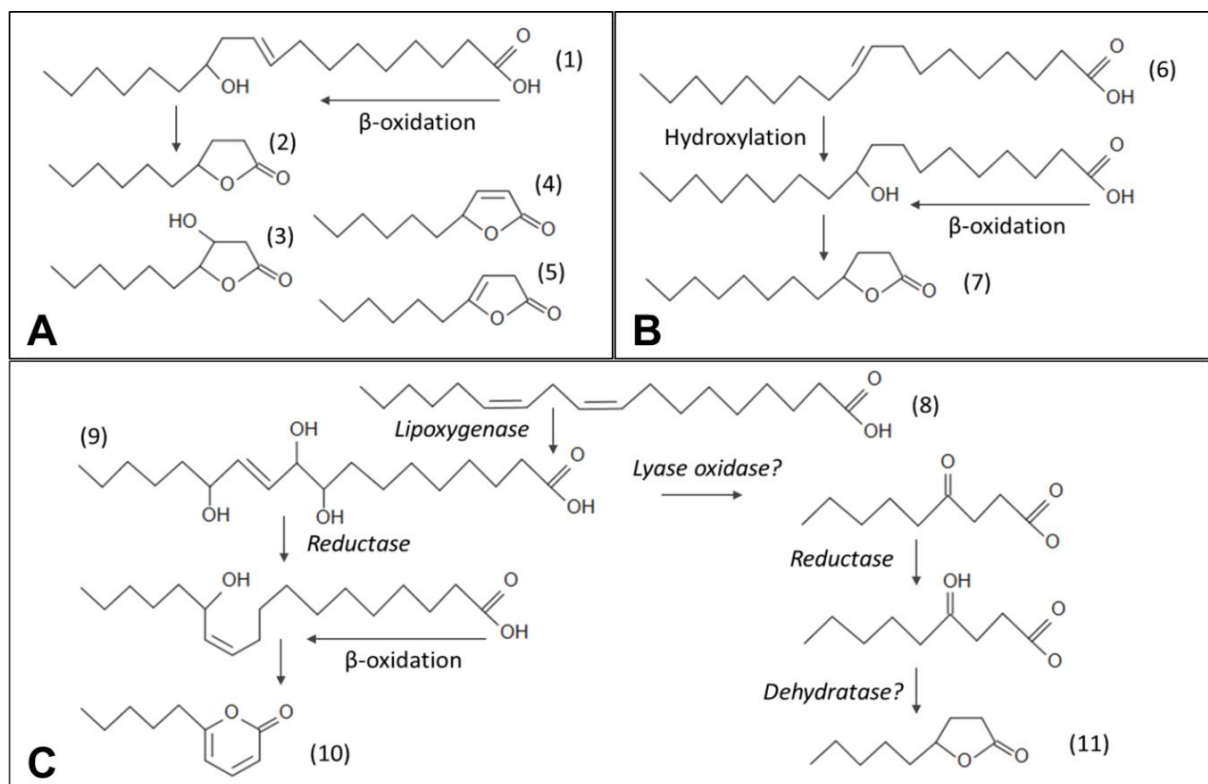


Fig. 2 Some lactones and their precursor. (A) ricinoleic acid (1), γ -decalactone (2), 3-hydroxy- γ -decalactone (3), dec-2-en-4-olide (4) and dec-3-en-4-olide (5), (B) oleic acid (6), γ -dodecalactone (7), (C) linoleic acid (8), poly-hydroxy-fatty acid (9), 6-pentyl- α -pyrone (10), γ -nonalactone (11) [adapted from (Serrano-Carreón et al. 1993; Feron and Waché 2005; Waché 2013b)]

6-Phenyl- α -pyrone (6-PP) is an unsaturated lactone known for displaying coconut flavouring notes. The production of 6-PP by chemical synthesis requires many reaction steps at thermal condition and it is considered as a difficult and costly process (Bengtson et al. 1992). For this reason, 6-PP production by alternative processes to chemical synthesis were investigated (Bonnarne et al. 1997; Sarhy-Bagnon et al. 2000; De Araújo et al. 2002; Fadel et al. 2015) Penha et al. 2012; Ramos et al. 2008; Ladeira et al. 2010. The bioconversion of 6-PP from its precursor is represented in Fig. 2C. The production of 6-PP by *T. harzianum* in SmF and SSF processes was carried out. The same liquid medium as in SmF was used to impregnate the solid support, sugarcane bagasse, in SSF. The yields of 6-PP in SSF were 17 times higher than those obtained in SmF (Sarhy-Bagnon et al. 2000). Recently, a similar study was carried out by using another *Trichoderma* species, *T. viride*. A higher production yield was reached (3.62 mg.g⁻¹ dried weight) (Fadel et al. 2015). In SSF process, the lactone production by *Trichoderma* species resulted generally in 6-PP as a major compound and other lactones were also detected such as δ -octalactone, γ -nonalactone, γ -undecalactone, γ -dodecalactone and δ -dodecalactone.

Esters

Beside their use as solvents and intermediates in chemical and pharmaceutical processes, esters are lipophilic molecules used as flavouring ingredients in the food industries. Isoamyl acetate, ethyl acetate, and ethyl hexanoate are highly valued for their flavour and scent profiles. Other esters such as butyl acetate contributes a strong fruity flavour (Park et al. 2009). A brief biosynthesis pathway for ester production derived from lipids is represented in Fig. 1. Fungi from the *Ceratocystis* genus produce a large range of fruity or flower aroma compounds, depending on the strain and the fermentation conditions. *C. fimbriata* and *Candida utilis* were first investigated in SSF for fruity aroma compounds with different solid matrices such as wheat bran, sugarcane bagasse and synthetic resin (e.g., amberlite) (Christen et al. 1993; Christen et al. 1994). Wheat bran, cassava bagasse and sugar cane bagasse were shown to be adequate solid matrices for the growth and aroma compounds production by *C. fimbriata*. A strong banana aroma (isoamyl acetate) was observed by adding leucine or valine into the synthetic medium (Christen et al. 1997). Isopropyle acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate, propionate, propyle acetate, ethyl ethyl isobutyrate, ethyl butyrate and/or ethyl-3-hexanoate were produced in SSF process by *C. fimbriata* on coffee husk as solid substrate (Soares et al. 2000; Medeiros et al. 2003; Medeiros et al. 2006). The similar esters were produced using cassava bagasse and giant palm bran under the culture of *K. marxianus*

(Medeiros et al. 2000; Medeiros et al. 2001). The production of isoamyl acetate, phenylethyl acetate and ethyl esters was also studied using cultivation of selected industrial yeast strain, *S. cerevisiae* under SSF of orange peel as solid substrate (Mantzouridou et al. 2015). The fruity esters reached the concentration of 48.7, 25.2, 9.3, 6.3 and 4.5 mg.kg⁻¹ of fermented solid substrate for isoamyl acetate, ethyl dodecanoate, decanoate, octanoate and phenyl ethyl acetate, respectively. Esters were also produced using *Rizopus oryzae* cultivated on solid agro-industrial wastes. Ethyl acetate and ethyl propionate were produced in a low or moderate concentration (Bramorski et al. 1998; Christen et al. 2000). Furthermore, authors highlighted that SSF would be an interesting process to improve the yield of the production.

Terpenes

Terpenes occur widely in nature. More than 1000 naturally occurring monoterpene have been identified (Seigler 2012). The commercial roles of monoterpenes are known as flavours, fragrances, insecticides and pharmaceuticals (Breitmaier 2006). In SSF process, ϵ -pinene was produced from the various food industry wastes which contained cheese whey, molasses, brewer's spent grains, malt spent rootlets, orange and potato pulp (Aggelopoulos et al. 2014). The formation of a high amount of ϵ -pinene was observed in SSF process with kefir culture at a yield estimated to be 4 kg.T⁻¹ of SSF culture. The bioconversion of terpenes through degradation of glucose is represented in Fig. 1.

Pyrazines

Pyrazines can be found in a wide variety of foods. They are responsible for different flavours, but they are generally considered as providing nutty, roasty and toasty tonalities (Gallois 1984; Masuda and Mihara 1988; Seitz 1994). 2,5-Dimethylpyrazine (2,5-DMP) and Tetramethyl-pyrazine (TTMP) are the main pyrazines detected in many cocoa bean-based and soybean-based fermented products (Maga 1992; Hashim et al. 1997). Both compounds were produced in SSF process by *Bacillus subtilis* using ground soybeans suspended in water (Larroche et al. 1999). L-threonine and acetoin have been known as the precursors of 2,5-DMP and TTMP respectively (Fig. 1). The concentrations of 2 to 3 g.L⁻¹ of the two above aroma compounds were reached by enriching the medium with L-threonine and acetoin in SSF.

Ketones

2-Heptanone is a ketone of cheese notes. It was produced in SSF using fungus, *T. viride* TS. Emerson's yeast starch agar containing sodium octanoate was used as substrate in an aeration SSF process. A concentration around $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ of this ketone was detected from the headspace analysis (Gervais et al. 1988a).

Aldehydes, Alcohols and Carboxylic acids

In SSF process, the production of aroma compounds such as benzaldehyde (bitter almond aroma), benzyl alcohol and benzoic acid was carried out using *Bjerkandera adusta* culture on wheat bran (organic support) and Perlite (mineral support). Benzaldehyde (1.56 g.kg^{-1}) and benzyl alcohol (4.53 g.kg^{-1}) were produced after 4 days on wheat bran impregnated with biotransformation medium containing L-phenylalanine (20 to 30 g.kg^{-1}). The SSF process has revealed a great potential for the production of benzaldehyde and benzyl alcohol since more important amounts of these compounds can be observed over a shorter period of time than by SmF (Lapadatescu and Bonnarne 1999). Another aldehyde, acetaldehyde has been reported as being produced by *C. fimbriata* and *Rhizopus* strains (Christen et al. 1997; Bramorski et al. 1998; Christen et al. 2000; Soares et al. 2000; Medeiros et al. 2003; Medeiros et al. 2006). Ethanol was produced by *Rhizopus* strains as the major volatile compound in SSF. Furthermore, 1-Propanol and 3-Methyl butanol were produced in a low or moderate concentrations by *Rhizopus* strains in SSF (Bramorski et al. 1998; Christen et al. 2000).

Aspects of design of bioreactor for the production of aroma compounds in SSF

Different types of bioreactors have been used for various purposes in SSF. In the production process of aroma compounds, bioreactor design is a key element to consider for maximizing the yield of the products/metabolites. Furthermore, the easiness of extraction of metabolites and therefore, their diffusion are parameters to take into account for the design of a bioreactor for the production of aroma compounds (Soccol et al. 2008). This part will present the general concept of SSF bioreactor classification, the bioreactors used in pilot and industrial-scale and, most important for research, the bioreactors used in laboratory-scale with some examples in the production of aroma compounds.

Important aspects of SSF bioreactor design include temperature, oxygen transfer, moisture content of solid matrix, mixing or agitation, aeration and heat transfer. To have an effective oxygen transfer, an effective heat removal, a good water distribution and solid matrix mixing/agitation, two main strategies may be used. In the first one the air circulates around the solid matrix (generally for thin layers) and in the second one, air goes through it (for unmixed, intermittently or continuously mixed beds) (Durand 2003). Depending on the strategy chosen for aeration and mixing/agitation, SSF bioreactors can be classified in four main groups (Fig. 3): (I) unforced aeration without mixing, (II) forced aeration without mixing, (III) unforced aeration with intermittent or continuous mixing and (IV) forced aeration with intermittent or continuous mixing (Mitchell et al. 2000; Mitchell et al. 2006).

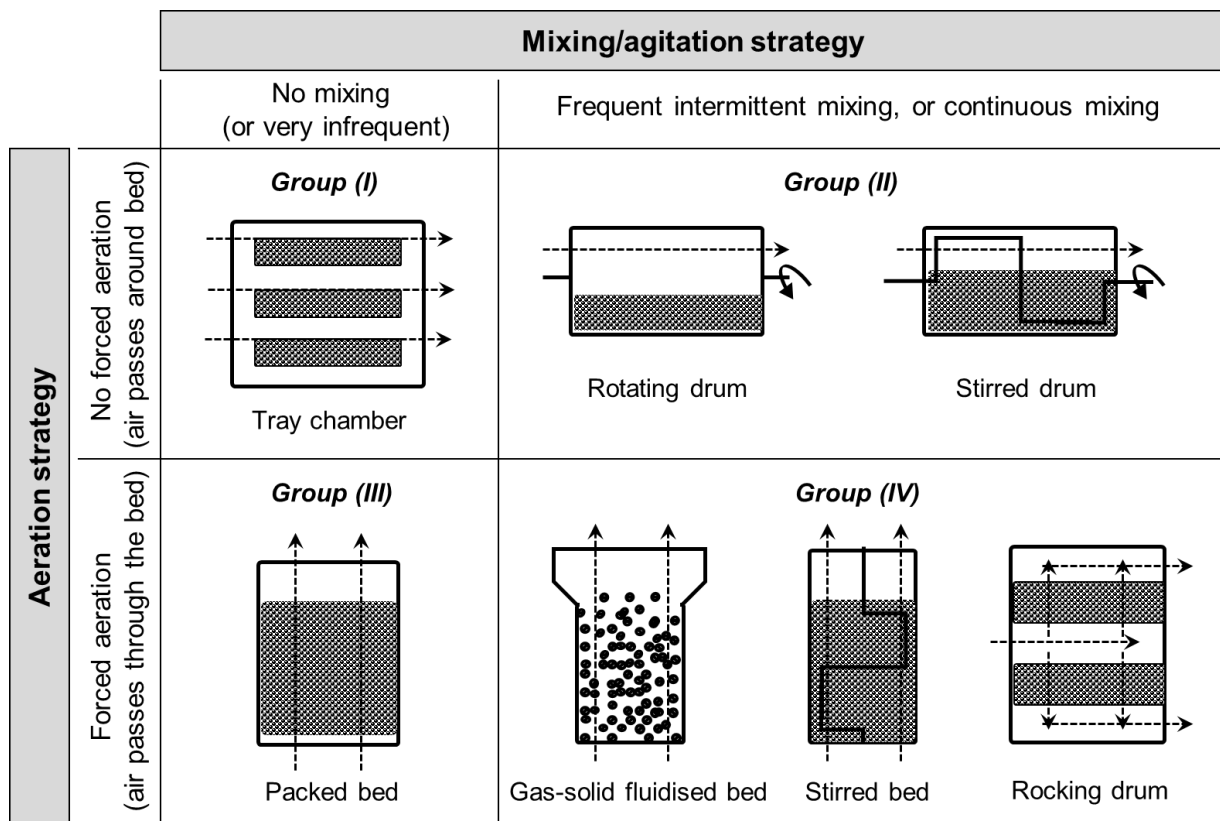


Fig. 3 Scheme of SSF bioreactor classification based on aeration and mixing strategies [adapted from (Mitchell et al. 2000; Mitchell et al. 2006)]

The variety of pilot and industrial-scale bioreactors used in SSF has been described in Durand (2003). Among aerated reactors, they include bioreactors without forced aeration (e.g., tray fermenters used in Koji process, Fig. 4C), unmixed bioreactors with forced aeration (e.g., Plafractor™ bioreactor, packed-bed bioreactor Fig. 4A), continuous mixing bioreactors with forced aeration and intermittent mixing bed bioreactors with forced aeration (e.g., Koji making equipment, ribbon mixer reactor, sterile bioreactor with planetary agitation (Fig. 4B), pilot plan reactor (Fig. 4D)).



Fig. 4 Some pre-pilot and pilot-scale bioreactors at PPB, Dijon. (A) Packed-bed bioreactor, (B) sterile reactor of 50 L developed at PPB, (C) Koji-type reactor, 18 trays (D) Pilot plan reactor of 1.6 m³ developed at PPB.

SSF in laboratory studies is generally carried out using petri dishes, jars, wide-mouth Erlenmeyer flasks, Roux bottles and roller bottles (Durand et al. 1997a; Pandey 2001; Durand 2003). Usually for these laboratory-scale equipments, neither forced aeration nor agitation is provided and scaling up or transfer to pilot scale is almost impossible. However, an interesting laboratory-scale forced-aeration-without-mixing bioreactor has been developed about 40 years ago (Raimbault and Germon 1976). This bioreactor is composed of glass columns (with 4 cm of diameter and 20 cm of length) immersed in a thermoregulated water bath, an air pump, an air filter and a humidifier (air passes through the water container) (Fig. 5A). This reactor type is very interesting for studies aiming at screening, medium optimising and measuring the production of CO₂ (Durand 2003). Using this equipment requires small amounts of solid matrix but it must be pre-inoculated before packing into the glass columns. Moreover, one entire column is sacrificed during the process for each analysis. This equipment has been used for the production of fruity aroma compounds using cassava bagasse (Medeiros et al. 2001) and coffee husk (Medeiros et al. 2006) by *K. marxianus* and *C. fimbriata*, respectively. A new generation of forced-aeration laboratory-scale bioreactor was developed by our team in Dijon (Durand et al. 1988; Durand 2003). Mini-reactors with smaller volumes but a similar principle were also designed by our team and used recently for the production of lactones by *Y. lipolytica* with an inert solid matrix (Try et al. 2018). They are composed of the mini-reactors (500 mL) placed in a thermoregulated incubator as shown in Fig. 5B with a steam injection pilot humidifier. Compared to the SSF column bioreactors described above, their main difference is the replacement of columns by mini-reactors that have also to be sacrificed for each analysis. Other laboratory scale reactors can provide an intermittent or continuous mixing of the solid matrix with a rotating or perforated drum or a horizontal paddle (Durand 2003). A stainless steel horizontal drum bioreactor was thus used for the production of fruity aromas using coffee husk (1.5 kg, 65 % of moisture content) by *C. fimbriate* (Medeiros et al. 2006). This reactor is composed of an air pump, an air filter, a humidifier, a rotary agitator, a motor and an rpm controller (Fig. 5C). Ethyl-acetate, ethanol and aldehyde were the predominant compounds detected in the headspace of the reactor.

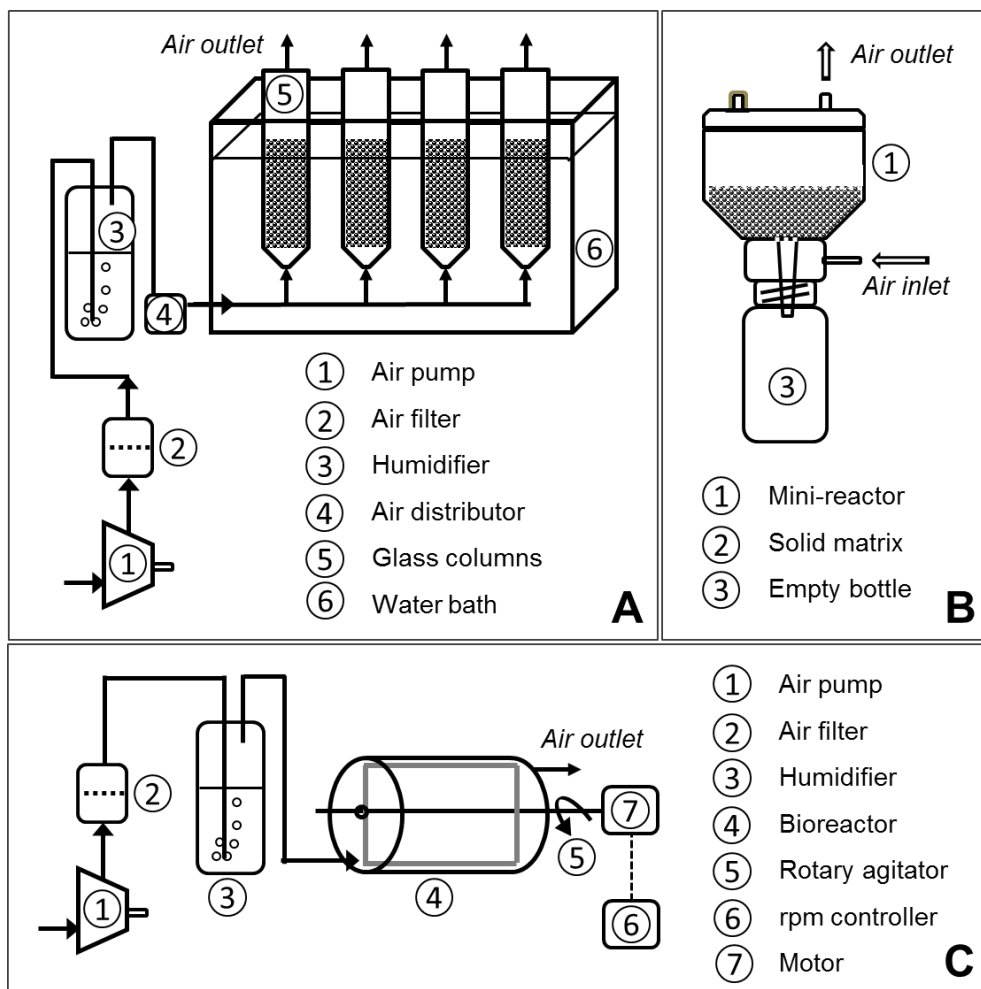


Fig. 5 Laboratory-scale SSF bioreactors for the production of aroma compounds. (A) Packed column bioreactor system, (B) Forced aeration mini-reactor, (C) Horizontal drum bioreactor with paddle agitator [adapted from (Durand 2003; Medeiros et al. 2006; Try et al. 2018)]

Factors affecting the production of aroma compounds in SSF

The major factors that affect the biosynthesis of aroma compounds in SSF can be divided into three main groups: biological, physicochemical and mechanical factors. Biological factors include solid matrix composition (nutrients), microorganism selection and inoculum (see part: Microorganisms used for the production of aroma compounds in SSF and part: Solid matrices used for the production of aroma compounds in SSF). Physicochemical factors include moisture content, water activity (A_w), pH, temperature, gaseous environment, aeration and particle size. High moisture content generally results in decreased solid matrix porosity, which decreases oxygen penetration. This could stimulate bacterial contamination.

Oppositely, low moisture content may result in poor microbial growth because of poor accessibility to nutrients (Pandey 2003). The issue of water in SSF has been addressed by Gervais and Molin (2003) who pointed out the interactions between water status, oxygen supply and heat removal from SSF. The optimal moisture content for fungi growth in SSF varies between 40 and 80 %. Optimal moisture content requirement for growth may differ widely depending on the solid matrices employed even with the same microorganism (Prior et al. 1992). A_w of solid matrices has been determined as an important factor related to the growth of microorganisms (Gervais et al. 1988b; Oriol et al. 1988; Gervais 1990). The type of microorganisms which can be used in SSF is generally determined by A_w . Most of the applications of SSF concern filamentous fungi and some yeast species, which can grow at lower A_w values (0.6-0.7) than bacteria. Furthermore, A_w has been demonstrated as being an important parameter for mass transfer of water and solutes across the microbial cells. The influence of A_w on the production of aroma compounds by the fungus *T. viride* TS cultivated on agar media has been evaluated. It appears that the modification of A_w led to an increase in the production rate of aroma compounds by the cells (300 % at 7 days) and an increase in mycelial density in SSF culture. In this case, an optimal production of aroma compounds occurred at an A_w of 0.96 and 0.98 (Gervais et al. 1988a). In SSF, the pH of culture may change according to the metabolic activities. To evaluate and control the pH is difficult because of the nature of the solid matrices, the low water content, the heterogeneity in the systems and due to the absence of suitable on-line pH measurement method for SSF processes (Durand et al. 1996). Mechanical factors include mixing and bioreactor design (see part: Aspects of design of bioreactor for the production of aroma compounds in SSF).

Online aroma recovery systems in aeration SSF

Generality on aroma compounds losses and recovery systems

In all aerated reactors but even more in SSF, flavours can be stripped during fermentation. The behaviour of aroma compounds in solid matrices depends on several parameters such as the physicochemical characteristics of the compound, the composition and properties of the matrix and the equilibrium and nature of the interactions between aroma compounds and matrices (Seuvre and Voilley 2017). Aroma compounds can be distributed between the different phases (vapour, liquid or solid) according to their affinity (Charles et al. 1996; Druaux et al. 1998; Nongonierma et al. 2003). To quantitatively describe the distribution and

release of aroma compounds, the knowledge of the thermodynamic equilibria between the phases is of great interest. They can be approached through the determination of partition coefficients and mass transfers. The phases repartition coefficients between the solid or liquid matrix and the vapour phase in equilibrium or between two liquid phases are the coefficients most commonly used. The dynamic aspect of the release of volatile compounds from the matrices is not considered in the partition study at equilibrium, but the measurement of the transport phenomena is a central preoccupation. The distribution of aroma compounds between the matrix and the gas phase depends on their diffusion in the different phases and between the phases (Seuvre and Voilley 2017).

Aroma compounds diffusion can be defined as a transfer matter within a stationary system. The diffusion of a molecule is generally caused by gradients, by its chemical potential, by the pressure and the temperature. In a steady state, the Fick's law, equation (1) expresses the amount of diffusion matter m_i of component i through the surface A (m^2) in a direction normal for a time t (s).

$$J_i = \frac{dm_i}{dt} = -AD_i \frac{dC_i}{dx} \quad (1)$$

where J_i is the flux of component i ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$), D_i is the diffusion coefficient ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) and the concentration gradient of component i in the distance x . In a given system, the diffusion coefficient D_i depends on the mass, the shape and the molar volume of the component, the viscosity and the temperature of the system (Reid et al. 1987). In the conditions at a given point that vary upon the time or in a unidirectional way, the Fick's law in steady state follows the derivation of the equation (1), equation (2). Many solutions of this equation have been provided by Crank (1975) depending on the initial conditions and the limits.

$$\frac{dC_i}{dt} = D_i \frac{d^2C_i}{dx^2} \quad (2)$$

According to Seuvre and Voilley (2017), the transfer of aroma compounds between different phases can occur between vapour-liquid or solid or liquid-liquid or solid interphases. In the case of a transfer of aroma compounds through the vapour-matrix interface, the global mass transfer can be described by the coefficient k , equation (3).

$$k = \frac{J_i}{Q(C_{mat} - C_{vap})} \quad (3)$$

where J_i and Q are the flow of component i ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) and the interfacial area between the vapour-matrix phases (m^2), respectively. C_{mat} and C_{vap} are the concentrations of aroma compounds at a given time ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$) in the matrix and in the vapour phase, respectively.

In aroma production SSF processes, this transfer may be a source of stripping and loss of compounds. For instance, in a recent study on lactones production in SSF, lactones losses due to aeration in the process have been reported (Try et al. 2018). To trap aroma compounds stripped by aeration, recovery techniques are of great interest. A model of aroma recovery system coupled with aeration SSF bioreactor is presented in Fig. 6A. The outlet air of the aeration reactor was connected to the recovery system for trapping aroma compounds that were stripped in the supplying air in the bioreactor.

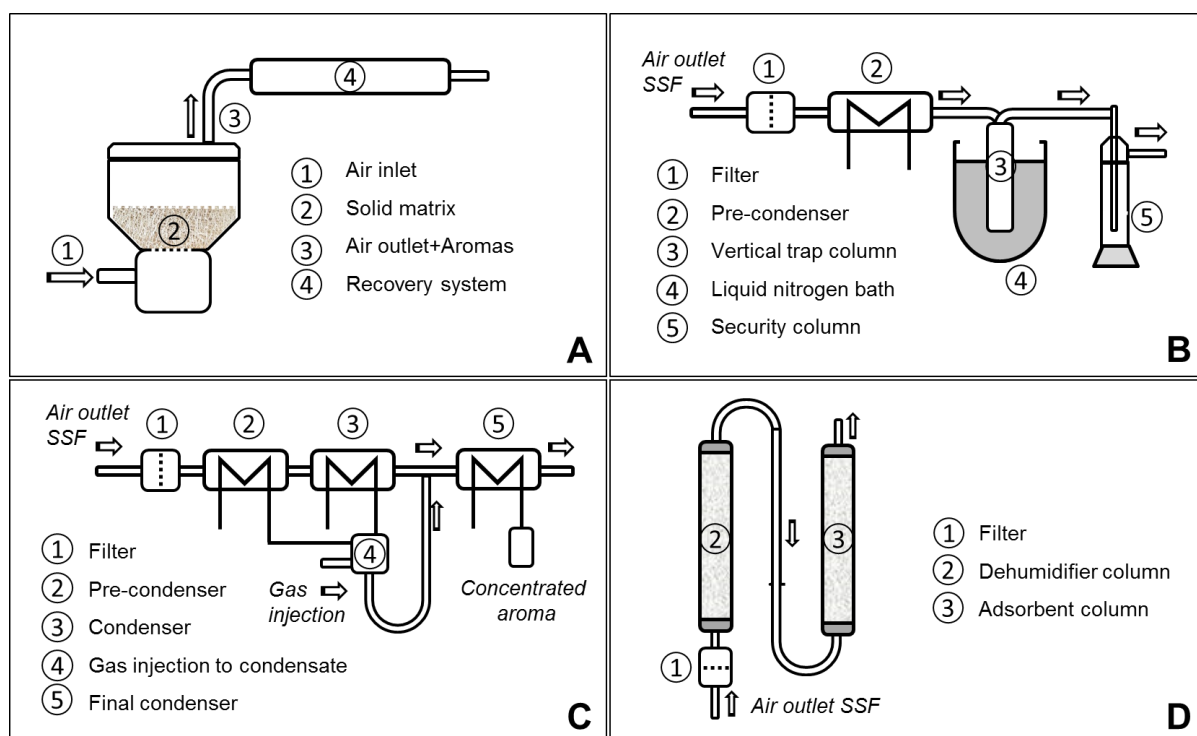


Fig. 6 Online recovery systems dealing with the issue of aroma recovery in aeration SSF. (A) SSF using forced aeration bioreactor coupled with recovery system, (B) A proposed condensation-based aroma recovery system for use coupled with forced aeration SSF processes, (C) A proposed aroma condensation coupled gas injection for aroma recovery using coupled with forced aeration SSF process, (D) A propose aroma adsorbent recovery system for using coupled with forced aeration SSF process.

According to the scientific literature, the recovery of aroma compounds in food processes has been widely used and developed in fruit juice and beverage productions (Karlsson and Trägårdh 1997; Souchon et al. 2002; Song et al. 2003; Ribeiro et al. 2004; Pereira et al. 2006; Aroujalian and Raisi 2007; Sampaio et al. 2011). On a related topic, a review paper by Wylock et al. (2015) represents the technologies that can be potentially used in food industries for recovery of flavoured volatile organic compounds from gaseous effluents. In the present paper, only recovery systems that can be used in the case of aroma compounds stripped by forced aeration will be presented. Supplying the air to the SSF process makes a stripping phenomenon. This phenomenon has been used for decades through the gas injection (e.g., nitrogen or air) into the stream to extract a compound in the vapour phase or concentrate it in the liquid phase. This methodology has been used in preparative and analytical chemistry, and it has also been employed for aroma recovery systems (Bomben et al. 1973; Poll 1983). Two potential recovery techniques are proposed here for aroma recovery from the stripping flow coming from the aeration in SSF, one based on condensation and the other on adsorption.

Aroma recovery by condensation

In SSF process, condensation can be used as a process to recover aroma compounds from the gas outlet of the SSF bioreactor. The principle of condenser is basically to cool down the outlet air from SSF bioreactor below the boiling temperature of the targeted compound to recover. From the gaseous outlet of the SSF bioreactor, a powerful condenser working at a low temperature in order to trap the aroma vapours from the outlet air is required. The use of a cryogenic system has been described by several authors for aroma compounds recovery from roasted and ground coffee. Several processes have also been disclosed in several patents based on this principle (Siedlecki and Meinhold 1977; Ghodsizadeh 1991; Carns and Tuot 1993; Carns and Tuot 1994; Budwig et al. 2000; Mandralis et al. 2000; Mazurek et al. 2000). A condensation-based recovery system proposed by Ghodsizadeh is shown in Fig. 6B. The aroma vapour from the outlet of the SSF bioreactor passes first through a filter [Filter (1)], which allows to trap any particles stripped from the SSF culture, and then passes through a pre-condenser [Pre-condenser (2)] which is cooled by cold or chilled water. The water vapour condenses from the gas outlet in the pre-condenser, and/or together with the least volatile or highest boiling aroma. This is to reduce as much as possible the water vapour from the air stream. The aroma-containing air from the pre-condenser passes through the vertical trap column placed in a cryogenic bath containing liquid nitrogen [Vertical trap column (3)] which allows aroma vapour to condense. Then, air without aroma passes through the security

column [Security column (5)]. In the condensation step, the aroma vapours pass through the cryogenic column of liquid nitrogen (-196 °C), they are cooled almost continuously to the temperature of liquid nitrogen. The aroma compounds condensed in the column are trapped in solid form, and they are then screened out of the column for further needs. Pre-condenser in this system can be replaced by the dehydrated columns described in the next section (Aroma recovery by adsorption).

To avoid any drying of the solid culture media in SSF processes, humidified air is generally prepared and supplied to the system for aeration. Some aroma compounds can be solubilised in water and condensed in pre-condenser. Control of condensate by liquid-liquid extraction is a mean to evaluate the losses during this process. It is difficult to operate condensers at the very low temperatures necessary to condense aroma compounds, especially in the case of the low pressure of the stripping partial air. Furthermore, the liquid nitrogen temperature of -196 °C is generally unrealistic in industrial scale, except in the processes of production of high-value compounds. To be more realistic for applications, temperatures of a few degrees Celsius can be reached for the condenser. A modification of the system has been proposed using gas to strip the aroma compounds contained in condensate. A scheme of a recovery system by condensation coupled with gas injection is presented in Fig. 6C. An additional gas is injected into the condensate from condensers [Condenser (2) and (3)]. Pre-condenser [Pre-condenser (2)] has the same function as in Fig. 6B. A similar principle of gas injection stripping has been described in Karlsson and Trägårdh (1997).

The main principle of condensation is heat transfer. The effects of the tubes geometry on the thermal design of condensers for the air conditioning and refrigeration has been discussed in the review paper of Cavallini et al. (2003). Furthermore, the review paper of Thonon (2008) summaries the results of research works on the hydrocarbon two-phase used as alternative fluids for refrigeration. In this review, some recommendations have been proposed for estimating evaporation and condensation heat transfer in various geometries including enhanced tubes as well as compact heat exchangers. Miyara (2008) has also summarised the results of published papers concerning the hydrocarbons that can be used to improve the property of condensation.

Aroma recovery by adsorption

Adsorption is a process based on the ability of a solid (e.g., adsorbent) to bind a component from a liquid or gas (e.g., adsorbate) on its surface (Karlsson and Trägårdh 1997). Adsorption

relies on two different phenomena called, physical and chemical adsorptions. Physical adsorption occurs on the adsorbent surface and/or adsorbent pores by Van Der Waals forces that are relatively weak and it has adsorption or condensation energies in the range of 10-40 KJ.mole⁻¹. These forces are leading generally to a fast and reversible equilibrium. Chemical adsorption occurs between the surface of the adsorbent and the component. It has a stronger bonding than physical adsorption, with adsorption or reaction energy in the range of 40-400 kJ.mole⁻¹ (Karlsson and Trägårdh 1997; Sun et al. 2016).

Applications of adsorption techniques are widely used in aroma recovery from liquid stream or in waste water treatments. Even if in this technique the desorption to regenerate the adsorbent may be difficult, it appears as the most sensitive and appropriate technique to recover volatile compounds present at low concentration in the stream (Khan and Ghoshal 2000; Wang et al. 2001; Revah and Morgan-Sagastume 2005). Furthermore, adsorption has been reported as a potential technique used for aroma recovery in liquid food processing that can be combined with thermal processing or applied as an alternative standalone technique (Saffarionpour and Ottens 2017). The main adsorption technology dealing with phenolic compounds has been described in Soto et al. (2011). Many types of adsorbents have been presented. A recovery system using an adsorbent column for aroma production in aerated SSF processes is presented in Fig. 6D. This system consists in an air filter, a dehumidifier column and an aroma recovery column. The aroma vapours from the outlet of SSF bioreactor passes firstly through a filter [Filter (1)], and then passes through a dehumidifier column [Dehumidifier column (2)] which made of a vapour-water adsorbent material. Finally, aroma vapour from the dehumidifier column passes through the aroma adsorbent column [Aroma adsorbent column (3)] resulting in the trapping of the aroma compounds. The selection of the adsorbent is important. Hydrophilic adsorbents will attract hydrophilic substances more than hydrophobic and contrariwise. In the production of aroma compounds, activated carbon from charred coconut (Acticarbone NC 35) and synthetic resins (divinyl benzene, styrene divinyl benzene) have been used for trapping γ -decalactone produced by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* (Souchon et al. 1998). Furthermore, activated carbon, Tenax-TA, and Amberlite XAD-2 were tested to recover aroma compounds from SSF processes in the production of fruity aroma compounds (Medeiros et al. 2003; Medeiros et al. 2006). In addition, the compounds present in the headspace of SSF reactors (ethanol, acetaldehyde, ethyl acetate, ethyl propionate, and isoamyl acetate) could be adsorbed on Amberlite XAD-2 or even better on Tenax-TA whereas activated carbon exhibited a very low trapping capacity.

Adsorbents used in adsorption column need to be regenerated after use. Practically, a combination of several methods such as increase in temperature, reduction in partial pressure or in concentration, purging with an inert fluid, displacement with a more strongly adsorbing species and change of chemical condition (e.g., pH) can be used to remove the adsorbate from the adsorbent surface and/or adsorbent pores (Thomas and Crittenden 1998). Furthermore, a few methods such as electron simulated desorption (Madey and Yates Jr 1977; Ahner et al. 1997), electrochemical induction (Darchen et al. 1982; Clavilier and Armand 1986; Nijhuis et al. 2005) and microwave heating desorption (Mezey and DiNovo 1982; Roussy et al. 1984; Stuerger and Gaillard 1996; Cherbański and Molga 2009; Polaert et al. 2010; Kim and Ahn 2012) have been used for regeneration of adsorbents with two main drawbacks, energy efficiency and cooling step requirement (Sun et al. 2005). The choice of suitable regeneration method(s) depends on technical and economic considerations. However, the most common methods are thermal swing technique by temperature modulation (increasing the temperature of adsorbent), pressure swing technique by pressure modulation (lowering the pressure) (Thomas and Crittenden 1998; Aroujalian and Raisi 2007) and the reduction in concentration by the displacement washing using liquid or gas (Sun et al. 2005). The applications and setting up of these methods have been described in Sun et al. (2005).

Conclusion

According to the scientific literature, there is a growing interest in SSF for aroma production. The production of aroma compounds by SSF appears to exhibit several advantages. Some literature has demonstrated that aroma production through SSF process results in higher yield and lower time compared to SmF processes. However, SSF processes are still rarely used for aroma production yet.

Even if most of SSF processes have been applied using molds, yeasts show also a powerful potential for aroma production. SSF processes using yeast cells appear easier to control, adapt and scale up for industrial applications.

Recovery systems are essential processes that have to be coupled with aeration for aroma compounds production. For aroma recovery, adsorption techniques are easier to conduct in SSF process compared to condensation techniques.

With bioreactor adaptation to aroma production and further works to adapt microbial strains and culture to SSF, SSF appears to be a powerful technology for aroma production in the future.

Acknowledgments

It is a pleasure to acknowledge with gratitude the scholarship support of the French Embassy in Cambodia as well as an attribution of financial support from AUF (Agence Universitaire de la Francophonie).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethical statement

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Aggelopoulos T, Katsieris K, Bekatorou A, Pandey A, Banat IM, Koutinas AA (2014) Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chem* 145:710-716
- Ahner J, Mocuta D, Ramsier RD, Yates Jr JT (1997) Anisotropy in the lateral momentum of CO chemisorbed on Cu (110) studied by time-of-flight electron simulated desorption ion angular distribution. *J Vacu Sci Technol A* 15(3):1548-1552
- Aroujalian A, Raisi A (2007) Recovery of volatile aroma components from orange juice by pervaporation. *J Membrane Sci* 303(1):154-161

- Bengtson G, Bøddeker KW, Hanssen H-P, Urbasch I (1992) Recovery of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by preevaporation. *Biotechnol Techni* 6(1):23-26
- Bomben JL, Bruin S, Thijssen HA, Merson RL (1973) Aroma recovery and retention in concentration and drying of foods. *Advan Food Res* 20:1-111
- Bonnarme P, Djian A, Latrasse A, Féron G, Giniès C, Durand A, Le Quéré J-L (1997) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J Biotechnol* 56(2):143-150
- Bramorski A, Christen P, Ramirez M, Soccol CR, Revah S (1998) Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. *Biotechnol Lett* 20(4):359-362
- Breitmaier E (2006) Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Wiley-VCH, Weinheim
- Budwig C, Temperini M, Rushmore D (2000) Volatile nut aroma and flavor compositions, and recovery thereof. Patent US 20020071890A1
- Carns LG, Tuot J (1993) Recovery of aroma gases. Patent US005222364A
- Carns LG, Tuot J (1994) Recovery of aroma gases. Patent US005323623A
- Cavallini A, Censi G, Del Col D, Doretto L, Longo GA, Rossetto L, Zilio C (2003) Condensation inside and outside smooth and enhanced tubes - a review of recent research. *Inter J Refri* 26(4):373-392
- Charles M, Bernal B, Guichard E (1996) Interactions of β -Lactoglobulin with Flavour Compounds. *Special Publi-Royal Soci Chem* 197:433-436
- Cherbański R, Molga E (2009) Intensification of desorption processes by use of microwaves - an overview of possible applications and industrial perspectives. *Chem Eng Process: Process Intensi* 48(1):48-58
- Christen P, Auria R, Vega C, Villegas E, Revah S (1993) Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnol Adv* 11(3):549-557
- Christen P, Bramorski A, Revah S, Soccol CR (2000) Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Biores Technol* 71(3):211-215
- Christen P, Meza JC, Revah S (1997) Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycolog Res* 101(8):911-919

- Christen P, Raimbault M (1991) Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnol Lett* 13(7):521-526
- Christen P, Revahl S (1998) Fruity aroma production in solid state fermentation by the fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Solid State Fermentation*:43-50
- Christen P, Villegas E, Revah S (1994) Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotechnol Lett* 16(11):1183-1188
- Clavilier J, Armand D (1986) Electrochemical induction of changes in the distribution of the hydrogen adsorption states on Pt (100) and Pt (111) surfaces in contact with sulphuric acid solution. *J Electroana Chem Interfa Electrochem* 199(1):187-200
- Couto SR, Sanromán MÁ (2006) Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *J Food Eng* 76(3):291-302
- Crank J (1975) *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press, Oxford
- Da Penha MP, Da Rocha-Leão MHM, Leite SGF (2012) Sugarcane bagasse as support for the production of coconut aroma by solid state fermentation (SSF). *BioRes* 7(2):2366-2375
- Darchen A, Mahe C, Patin H (1982) Electrochemical induction of successive exchanges of carbonyls by phosphorus ligands in Fe_3S_2LX clusters. *New J Chem* 6(11):539-546
- De Araújo AA, Pastore GM, Berger RG (2002) Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation *Biotechnol Fuels Chem*. Springer, pp 747-751
- Druaux C, Le Thanh M, Seuvre A-M, Voilley A (1998) Application of headspace analysis to the study of aroma compounds-lipids interactions. *J Ameri Oil Chem Soci* 75(2):127-130
- Durand A (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13(2-3):113-125
- Durand A, De la Broise D, Blachere H (1988) Laboratory scale bioreactor for solid state processes. *J Biotechnol* 8(1):59-66
- Durand A, Renaud R, Maratray J, Almanza S (1997) The INRA-Dijon reactors: designs and applications. In: Roussos S, Lonsane B, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G (eds) *Advances in solid state fermentation*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 71-92
- Durand A, Renaud R, Maratray J, Almanza S, Diez M (1996) INRA-Dijon reactors for solid state fermentation: designs and applications. *J Sci Indus Res* 55(5-6):317-332
- Escamilla-García E, Aguedo M, Gomes N, Choquet A, Belo I, Teixeira JA, Belin J-M, Waché Y (2009) Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides

- with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Molec Catal B* 57(1–4):22-26
- Escamilla-García E, Belin JM, Waché Y (2007a) Use of a Doehlert factorial design to investigate the effects of pH and aeration on the accumulation of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 103(5):1508-1515
- Escamilla-García E, Nicaud J-M, Belin J-M, Waché Y (2007b) Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A factorial approach. *Biotechnol J* 2(10):1280-1285
- Escamilla-García E, O’Riordan S, Gomes N, Aguedo M, Belo I, Teixeira J, Belin J-M, Waché Y (2014) An air-lift biofilm reactor for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* 49(9):1377-1382
- Fadel HHM, Mahmoud MG, Asker MMS, Lotfy SN (2015) Characterization and evaluation of coconut aroma produced by *Trichoderma viride* EMCC-107 in solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Elect J Biotechnol* 18(1):5-9
- Farinas CS (2015) Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew Susta Ener Rev* 52:179-188
- Feron G, Blin-Perrin C, Krasniewski I, Mauvais G, Lherminier J (2005) Metabolism of fatty acid in yeast: Characterisation of β -oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidiobolus* sp. cultivated on ricinoleic acid methyl ester. *FEMS Microbiol Lett* 250(1):63-69
- Feron G, Waché Y (2005) Microbial biotechnology of food flavor production. In: Dominick T (ed) *Food Biotechnology*, 2nd edn. Dekker, New York, pp 407-441
- Gallois A (1984) Les pyrazines présentes dans les aliments, état actuel de nos connaissances. *Sci Alim* 4:145-166
- Gatfield IL (1999) Biotechnological production of natural flavor materials. In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I (ed) *Flavor chemistry, thirty years of progress*. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, pp 211-227
- Gatfield IL, Güntert M, Sommer H, Werkhoff P (1993) Some aspects of the microbiological production of flavor: active lactones with particular reference to γ -decalactone. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 15(5-6):165-170
- Gervais P (1990) Water activity: a fundamental parameter of aroma production by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 33(1):72-75

- Gervais P, Belin JM, Grajek W, Sarrette M (1988a) Influence of water activity on aroma production by *Trichoderma viride* TS growing on a solid substrate. *J Ferm Technol* 66(4):403-407
- Gervais P, Molin P (2003) The role of water in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13(2):85-101
- Gervais P, Molin P, Grajek W, Bensoussan M (1988b) Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol Bioeng* 31(5):457-463
- Ghodsizadeh Y (1991) Cryogenic aroma recovery. Patent US005030473
- Hashim P, Selamat J, Ali A, Kharidah S (1997) Pyrazines formation in cocoa beans: changes during fermentation. *J Food Sci Technol* 34(6):483-487
- IAL Consultants (2014) An overview of the global flavours and fragrances Market, 9th Edition. http://www.ialconsultants.com/uploads/CUBE_press_release/2014-11-06/F_FPressRelease2014.pdf
- Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM, Vandamme EJ (1992) Production of flavours by microorganisms. *Process Biochem* 27(4):195-215
- Karlsson HOE, Trägårdh G (1997) Aroma recovery during beverage processing. *J Food Eng* 34(2):159-178
- Khan FI, Ghoshal AK (2000) Removal of volatile organic compounds from polluted air. *J Loss Prev Pro Indus* 13(6):527-545
- Kim K-J, Ahn H-G (2012) The effect of pore structure of zeolite on the adsorption of VOCs and their desorption properties by microwave heating. *Micropo Mesopo Materi* 152:78-83
- Krishna C (2005) Solid-state fermentation systems—an overview. *Criti Rev Biotechnol* 25(1-2):1-30
- Ladeira NC, Peixoto VJ, Penha MP, de Paula Barros EB, Leite SGF (2010) Optimization of 6-pentyl-alpha-pyrone production by solid state fermentation using sugarcane bagasse as residue. *BioRes* 5(4):2297-2306
- Lapadatescu C, Bonnarme P (1999) Production of aryl metabolites in solid-state fermentations of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Biotechnol Lett* 21(9):763-769
- Larroche C, Besson I, Gros J-B (1999) High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochem* 34(6):667-674

- Madey TE, Yates Jr JT (1977) Desorption methods as probes of kinetics and bonding at surfaces. *Surface Sci* 63:203-231
- Maga JA (1992) Pyrazine update. *Food Rev Inter* 8(4):479-558
- Mandralis ZI, Westfall S, Yunker KA (2000) Aroma recovery process. Patent US006149957A
- Mantzouridou FT, Paraskevopoulou A, Lalou S (2015) Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. *Biochem Eng J* 101:1-8
- Masuda H, Mihara S (1988) Olfactive properties of alkylpyrazines and 3-substituted 2-alkylpyrazines. *J Agri Food Chem* 36(3):584-587
- Mazurek R, Temperini M, Barfuss D, Rushmore D (2000) Natural cocoa aroma/flavor compositions and methods for preparing same. Patent US006090427A
- Medeiros ABP, Christen P, Roussos S, Gern JC, Soccol CR (2003) Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazi J Microbiol* 34(3):245-248
- Medeiros ABP, Pandey A, Christen P, Fontoura PSG, de Freitas RJS, Soccol CR (2001) Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. *World J Microbiol Biotechnol* 17(8):767-771
- Medeiros ABP, Pandey A, Freitas RJS, Christen P, Soccol CR (2000) Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochem Eng J* 6(1):33-39
- Medeiros ABP, Pandey A, Vandenberghe LPS, Pastore GM, Soccol CR (2006) Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. *Food Technol Biotechnol* 44(1):47-51
- Mezey EJ, DiNovo ST (1982) Adsorbent regeneration and gas separation utilizing microwave heating. Google Patents
- Mitchell DA, Berovič M, Krieger N (2000) Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. In: Scheper T (ed) *New Products and New Areas of Bioprocess Engineering*. vol 68. Springer, Heidelberg, Berlin, pp 61-138
- Mitchell DA, Berovič M, Krieger N (2006) Introduction to solid-state fermentation bioreactors. In: Mitchell D, Berovič M, Krieger N (eds) *Solid-State Fermentation Bioreactors*. Springer, Heidelberg Berlin, pp 33-44
- Miyara A (2008) Condensation of hydrocarbons – A review. *Inter J Refri* 31(4):621-632

- Nijhuis CA, Yu F, Knoll W, Huskens J, Reinhoudt DN (2005) Multivalent dendrimers at molecular printboards: influence of dendrimer structure on binding strength and stoichiometry and their electrochemically induced desorption. *Langmuir* 21(17):7866-7876
- Nongonierma A, Springett M, Voilley A (2003) Kinetic of flavour transfers at gas/matrix interfaces of multiphasic food models *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century*. TEC & DOC edn. Intercept, pp 240-243
- Oostra J, Tramper J, Rinzema A (2000) Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. *Enz Micro Technol* 27(9):652-663
- Oriol E, Raimbault M, Roussos S, Viniegra-Gonzales G (1988) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 27(5):498-503
- Pandey A (2001) *Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*. Asiatech, New Delhi
- Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13(2-3):81-84
- Park YC, Shaffer CEH, Bennett GN (2009) Microbial formation of esters. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(1):13-25
- Pereira CC, Ribeiro CP, Nobrega R, Borges CP (2006) Pervaporative recovery of volatile aroma compounds from fruit juices. *J Membr Sci* 274(1):1-23
- Polaert I, Estel L, Huyghe R, Thomas M (2010) Adsorbents regeneration under microwave irradiation for dehydration and volatile organic compounds gas treatment. *Chem Eng J* 162(3):941-948
- Poll L (1983) Influence of storage temperature on sensory evaluation and composition of volatiles of McIntosh apple juice. *Lebensm-Wissens Technol* 16:220-223
- Prior BA, Du Preez JC, Rein PW (1992) Environmental parameters. *Solid substrate cultivation*:65
- Raimbault M, Germon JC (1976) Procédé d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides. French Patent(76-06-677)
- Ramos AdS, Fiaux SB, Leite SGF (2008) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazi J Microbiol* 39(4):712-717
- Reid RC, Prausnitz JM, Poling BE (1987) *The properties of gases and liquids*. New York

- Revah S, Morgan-Sagastume JM (2005) Methods of odor and VOC control. In: Shareefdeen Z, Singh A (eds) *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 29-63
- Ribeiro CP, Lage PLC, Borges CP (2004) A combined gas-stripping vapour permeation process for aroma recovery. *J Membr Sci* 238(1):9-19
- Rocha-Valadez JA, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E, Serrano-Carreón L (2005) 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnol Bioeng* 91(1):54-61
- Rossi SC, Vandenberghe LPS, Pereira BMP, Gago FD, Rizzolo JA, Pandey A, Soccol CR, Medeiros ABP (2009) Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Res Inter* 42(4):484-486
- Roussy G, Zoulalian A, Charreyre M, Thiebaut JM (1984) How microwaves dehydrate zeolites. *J Phys Chem* 88(23):5702-5708
- Saffarionpour S, Ottens M (2017) Recent advances in techniques for flavor recovery in liquid food processing. *Food Eng Rev*:1-14
- Sampaio KL, Garruti DS, Franco MRB, Janzanti NS, Da Silva MAA (2011) Aroma volatiles recovered in the water phase of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice during concentration. *J Sci Food Agri* 91(10):1801-1809
- Sarhy-Bagnon V, Lozano P, Saucedo-Castañeda G, Roussos S (2000) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochem* 36(1-2):103-109
- Seigler DS (2012) *Plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media
- Seitz EW (1994) Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavors and fragrances. In: Gabelman A (ed) *Bio-process production of favor, fragrance, and color ingredients*. Wiley, New York, pp 95-134
- Serrano-Carreón L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin J-M (1993) Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl- α -pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. *Appl Environ Microbiol* 59(9):2945-2950
- Seuvre A-M, Voilley A (2017) Physico-Chemical Interactions in the Flavor-Release Process. In: Buettner A (ed) *Springer Handbook of Odor*. Springer, pp 273-302
- Siedlecki DT, Meinhold JF (1977) Method for fixing coffee grinder gas. Patent US004007291

- Soares M, Christen P, Pandey A, Soccol CR (2000) Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochem* 35(8):857-861
- Soccol CR, Da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, de Souza Vandenberghe LP (2017) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov* 1(1):52-71
- Soccol CR, Medeiros AB, Vandenberghe LP, Soares M, Pandey A (2008) Production of aroma compounds. In: Pandey A, Soccol CR, Larroche C (eds) *Current developments in solid-state fermentation*. Springer, pp 356-376
- Song K-H, Song J-H, Lee K-R (2003) Vapor permeation of ethyl acetate, propyl acetate, and butyl acetate with hydrophobic inorganic membrane. *Separ Purif Technol* 30(2):169-176
- Soto ML, Moure A, Domínguez H, Parajó JC (2011) Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review. *J Food Eng* 105(1):1-27
- Souchon I, Pierre FX, Athes-Dutour V, Marin M (2002) Pervaporation as a deodorization process applied to food industry effluents: recovery and valorisation of aroma compounds from cauliflower blanching water. *Desalination* 148(1):79-85
- Souchon I, Spinnler HE, Dufosse L, Voilley A (1998) Trapping of γ -Decalactone by adsorption on hydrophobic sorbents : Application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol Technol* 12(2):109-113
- Stuerga DAC, Gaillard P (1996) Microwave Athermal Effects in Chemistry: A Myth's Autopsy: Part I: Historical background and fundamentals of wave-matter interaction. *J Microw Pow Electroma Ener* 31(2):87-100
- Sun LM, Meunier F, Baron G (2005) Adsorption-Procédés et applications. *Biomédical - Pharma/Médicaments et produits pharmaceutiques, Techniques de l'Ingénieur J2731-V1*
- Sun LM, Meunier F, Brodu N, Manero MH (2016) Adsorption-Aspects théoriques. *Procédés chimie - bio - agro/Opérations unitaires, Génie de la réaction chimique, Techniques de l'Ingénieur J2730-V2*
- Thomas L, Larroche C, Pandey A (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 81:146-161
- Thomas WJ, Crittenden BD (1998) *Adsorption technology and design*. Butterworth-Heinemann, Great Britain, pp 119

- Thonon B (2008) A review of hydrocarbon two-phase heat transfer in compact heat exchangers and enhanced geometries. *Inter J Refri* 31(4):633-642
- Try S, De-Coninck J, Voilley A, Chunhieng T, Waché Y (2018) Solid state fermentation for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* 64(C):9-15
- Waché Y (2013a) Microbial production of food flavours. In: McNeil B AD, Giavasis I, Harvey L (ed) *Microbial production of food Ingredients, enzymes and nutraceuticals*. Woodhead, Cambridge, pp 175-193
- Waché Y (2013b) Production of dicarboxylic acids and fragrances by *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G (ed) *Yarrowia lipolytica*. vol 25. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 151-170
- Waché Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield IL, Nicaud J-M, Belin J-M (2001) Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5700-5704
- Waché Y, Aguedo M, Nicaud J-M, Belin J-M (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61(5):393-404
- Waché Y, Husson F, Feron G, Belin J-M (2006) Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89(3):405-416
- Waché Y, Laroche C, Bergmark K, Møller-Andersen C, Aguedo M, Le Dall M-T, Wang H, Nicaud J-M, Belin J-M (2000) Involvement of acyl Coenzyme A oxidase Isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 66(3):1233-1236
- Waché Y, Pagot Y, Nicaud J-M, Belin J-M (1998) Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. *J Molec Catal B* 5(1-4):165-169
- Wang X, Daniels R, Baker RW (2001) Recovery of VOCs from high-volume, low-VOC-concentration air streams. *AIChE J* 47(5):1094-1100
- Wylock C, Eloundou Mballa PP, Heilporn C, Debaste F, Fauconnier ML (2015) Review on the potential technologies for aromas recovery from food industry flue gas. *Tren Food Sci Technol* 46(1):68-74

10. Conclusion bibliographique et problématique

En conclusion, la FMS peut potentiellement être utilisée pour la production d'arômes de types lactones par la levure, *Y. lipolytica*. La croissance et le métabolisme impliqués dans la bioconversion du précurseur, l'acide ricinoléique en métabolites d'intérêts chez *Y. lipolytica* en FMS n'ont pas encore été étudiés en FMS. De plus, l'oxygène est le co-substrat le plus important dans la dégradation de lipides en lactones par β -oxydation. L'importance de l'oxygène est un sujet très important à étudier pour comprendre la voie métabolique appliquée en FMS chez *Y. lipolytica*.

La sélection de la matrice solide est essentielle pour les procédés de FMS. Lors de la première étude de ce travail, différentes matrices solides seront utilisées. A côté de la sélection des matrices solides, l' A_w est un facteur clé à considérer pour la croissance de microorganismes en FMS. Pour bien comprendre les flux de β -oxydation dans la production de lactones en FMS, les effets du co-substrat (oxygène) seront étudiés en utilisant différents procédés comme l'aération et l'injection d'air enrichi en oxygène. En outre, l'aération pourrait provoquer un effet d'entraînement des composés volatiles. Dans ce cas, la modélisation et un système de récupération pourraient permettre d'évaluer l'importance de ce phénomène dans ce travail.

En bref, cette étude s'attachera à apporter des éléments permettant d'améliorer les connaissances sur la croissance de levure, les effets de l'oxygène sur la β -oxydation en métabolites intérêts par FMS et également les outils essentiels pour la modélisation (la croissance, l'estimation de production, le modèle de l'estimation de composés entraînés lors de l'aération forcée). Ces travaux de recherche ont été divisés en quatre parties:

- 1- FMS pour la production de lactones par *Y. lipolytica* : mise au point d'un système de production de lactone en FMS et production de lactones en FMS dans différents types de réacteurs.
- 2- Effet de l'entraînement de lactones en cours de production.
- 3- Effet de l'oxygène sur la croissance et le métabolisme chez *Y. lipolytica* utilisée pour la production d'arômes : ajout de différentes concentrations d'air enrichi en oxygène à différents temps de FMS.
- 4- Effet de l' A_w sur la croissance et le métabolisme de *Y. lipolytica* utilisée pour la production d'arômes naturels : FML.

METHODOLOGIES

III. METHODOLOGIES

Afin d'éviter la répétition des matériels et méthodes des publications figurant dans la partie « RESULTATS ET DISCUSSION », seuls les principes de la méthodologie utilisée pendant la thèse seront présentés dans cette partie en faisant le lien aux publications.

1. Démarches expérimentales

Les démarches expérimentales ayant donné naissance à ce travail sont présentées dans la **Figure 7**.

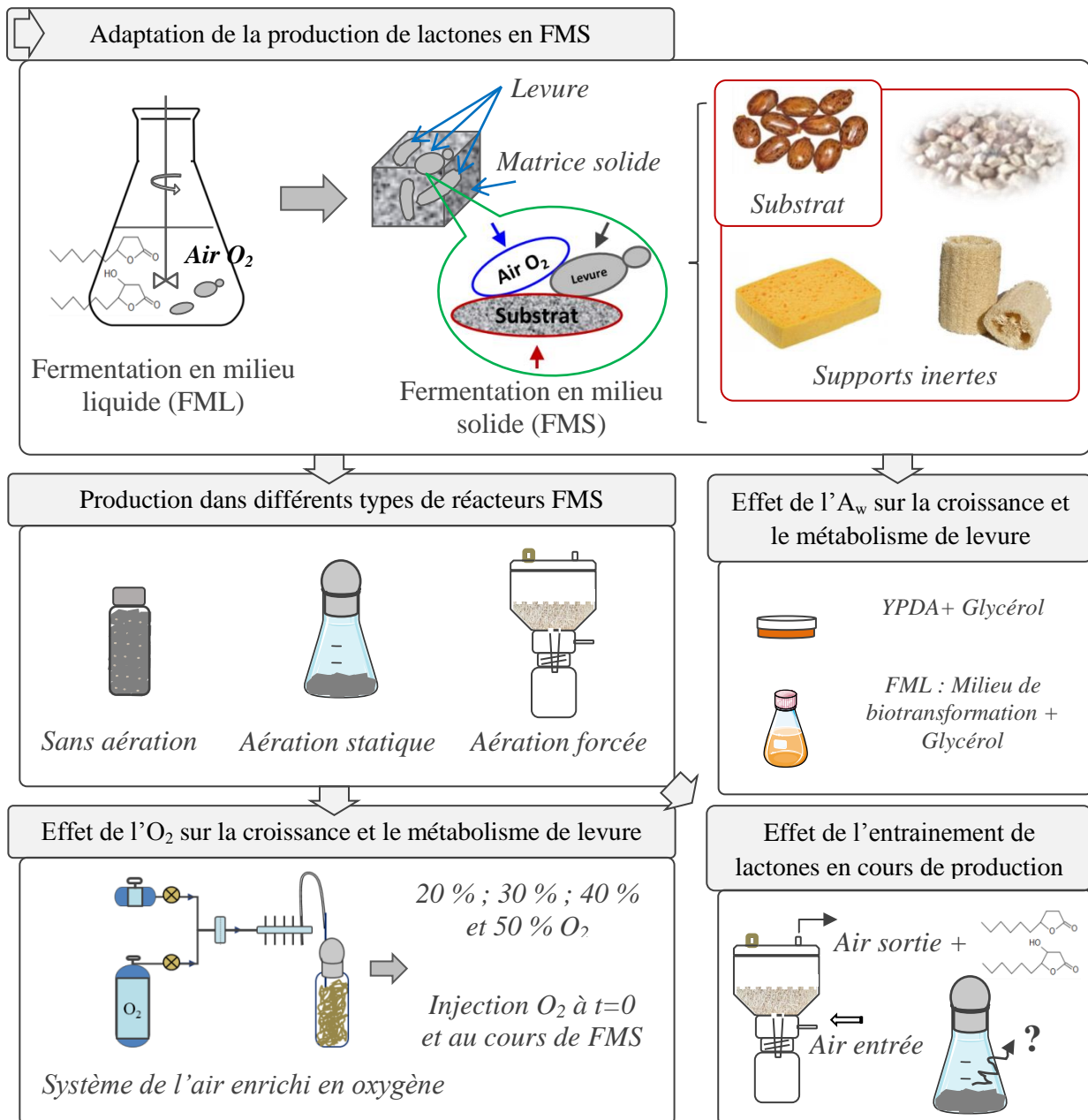


Figure 7 : Schéma présentant la démarche expérimentale.

2. Souche de levure

La levure *Yarrowia lipolytica* a été choisie comme modèle pour cette étude. La souche sauvage **W29** (ATCC 20460) qui a déjà été étudiée pour la production de lactones et le métabolisme des lipides a été choisie.

3. Conservation, réactivation, pré-culture et ensemencement de levure

La congélation des cellules de levure est faite à partir de colonies de levure cultivée sur le milieu gélosé YPDA (20 g/L de dextrose, 20 g/L de peptone et 10 g/L d'extrait de levure) pendant 48 h à 27 °C. Ces cellules sont récupérées dans de l'eau distillée contenant 9 g/L de NaCl et 30 % de glycérol. Les cryo-tubes contenant les cellules de levure sont conservés à – 80 °C. La réactivation, la pré-culture et l'ensemencement des levures sont détaillés dans *la publication 1*.

4. Matrices solides

Afin d'adapter la FML en FMS, différentes matrices solides sont utilisées. En FMS, les matrices solides utilisées peuvent être des substrats, si ceux-ci ont des propriétés permettant la croissance microbienne, ou des supports si les substrats utilisés ne sont pas solides ou ont une structure inadaptée à la croissance. Une certaine quantité d'eau est nécessaire pour donner des conditions favorables à la croissance des microorganismes sur le substrat. Par contre, l'utilisation d'un milieu de biotransformation liquide ou ayant une structure ne permettant pas la croissance en FMS rend nécessaire l'utilisation de supports inertes. Le travail de cette thèse est le premier travail sur l'adaptation de FML en FMS pour la production de lactones par *Y. lipolytica*. Dans ce but différents supports ont été choisis. La production de lactones a besoin d'une source de carbone comme de l'huile de ricin ou du ricinoléate de méthyle. Ce précurseur peut être contenu dans le substrat comme dans les graines de ricin. Par contre, il peut aussi nécessiter un ou des supports inertes comme des éponges de cellulose ou de courgette ou des rafles de maïs. La **Figure 8** représente les supports et le substrat utilisés dans ce travail. Les procédures de traitement de ces supports et du substrat sont présentées dans *la publication 1*. De plus, deux formes différentes d'éponge de cellulose ont été utilisées pour étudier l'effet de la forme sur la croissance et la production de lactones, en cube (environ 0,5 cm³) et en prisme rectangulaire (environ 1×1×0,15 cm) (**Figure 8A**).

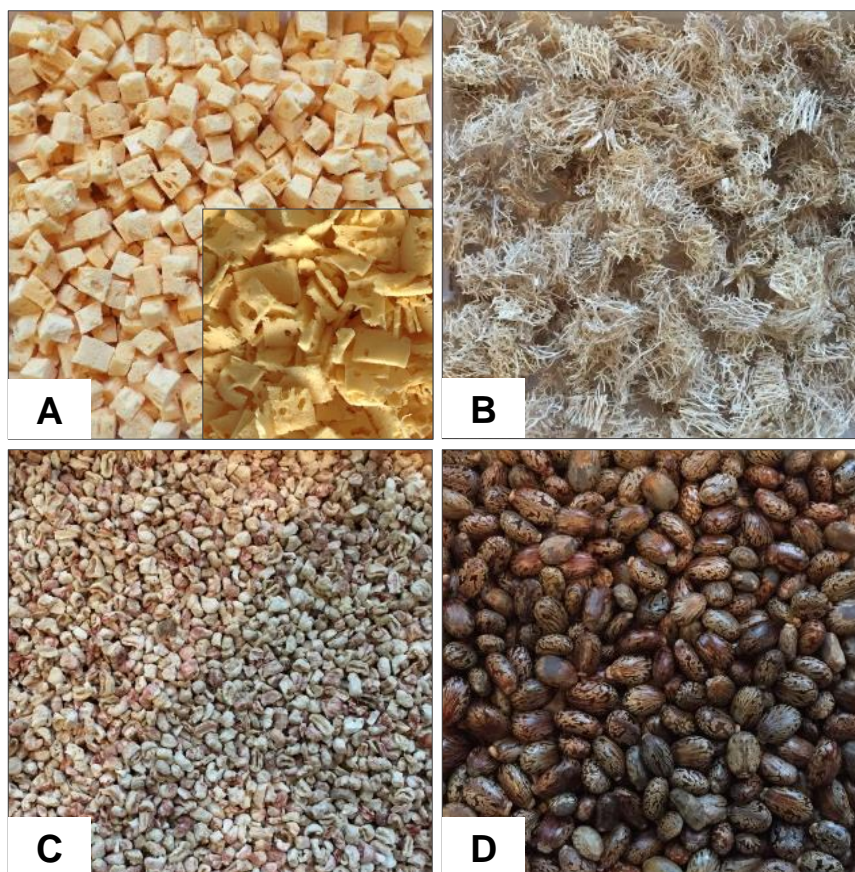


Figure 8 : Supports et substrat utilisés. (A) éponge de cellulose, (B) éponge de courgette, (C) rafles de maïs, (D) graines de ricin.

5. Milieu de biotransformation

Le milieu de biotransformation a été utilisé pour imbiber les supports inertes. Le milieu de biotransformation se compose de l'huile de ricin 20 g/L comme source de carbone, 2 g/L de Tween 80 et 6,7 g/L de YNB avec acide aminé (Yeast Nitrogen Base). L'huile de ricin et le Tween 80 sont mélangés à l'aide d'un barreau magnétique (1000 rpm) dans une fiole Erlenmeyer de 50 mL pendant 2 h puis une quantité d'environ 30 mL d'eau distillée est ajoutée au volume total. Le milieu est encore agité pendant 30 min. Ensuite, le milieu est transféré dans un flacon de 1 L. 500 mL d'eau sont ajoutés et le tout est agité pendant 1 h. Le volume est complété à 900 mL avec de l'eau distillée et le tout est agité pendant 2 h. Enfin, l'YNB est ajouté puis le milieu est rempli à 1 L et le tout est agité pendant 15 min.

6. Production de lactones dans différents types de réacteurs

Trois types de bioréacteurs FMS sont utilisés pour étudier l'effet de l'oxygène/aération sur le métabolisme de *Y. lipolytica*. Les réacteurs à l'échelle laboratoire tels que les flacons à petit espace de tête (22 mL), les fioles à col large (500 mL) et les mini-réacteurs à aération forcée

(500 mL) sont utilisés pour les conditions sans aération, avec aération statique et avec aération forcée, respectivement (**Figure 9**). La description est donnée dans *la publication 1*.

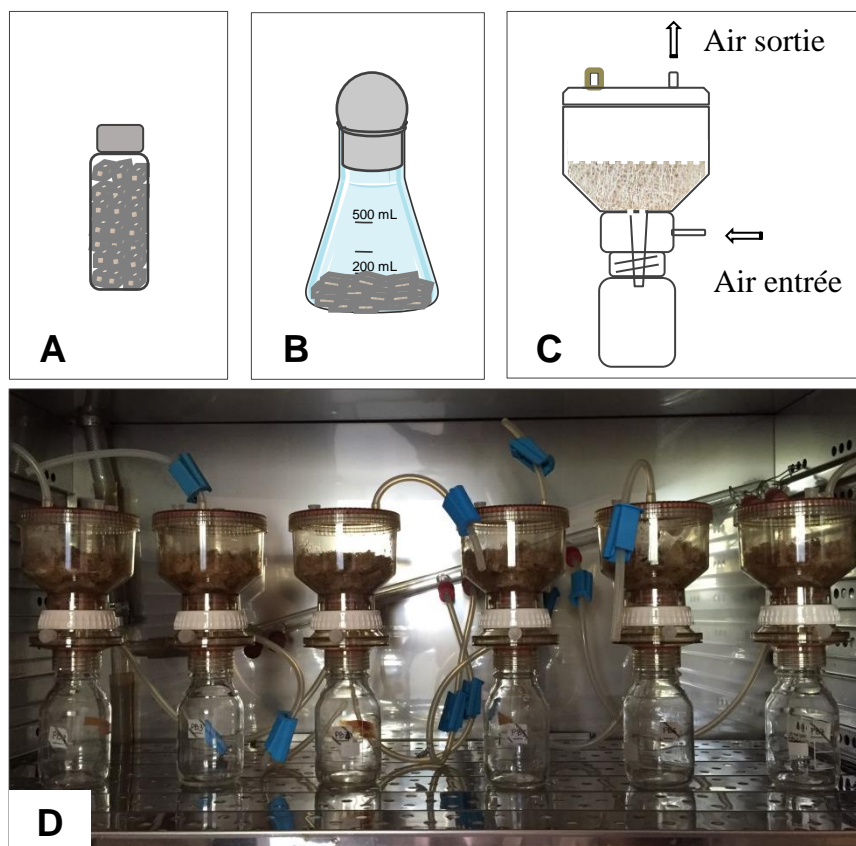


Figure 9 : Bioréacteurs FMS utilisés. (A) flacon à petit espace de tête, (B) fiole à col large, (C) mini-réacteur à aération forcée, (D) photo des mini-réacteurs à aération forcée.

7. Etude de l'entraînement des lactones en phase gazeuse

Lors de l'utilisation des mini-réacteurs à aération forcée, des lactones sont entraînées pendant la production. Pour étudier les effets de l'entraînement sur la concentration de lactones détectée dans le milieu, des expérimentations sont réalisées avec de la γ -décylactone « pure » (98 % Sigma-Aldrich, dilué dans l'éthanol absolu) et un mélange de γ -décylactones produites en FMS dans les fioles à col large.

7.1. Essais avec de la γ -décylactone « pure »

Les essais sont réalisés en fiole à col large et en mini-réacteurs à aération forcée. Les conditions de FMS sont identiques à celles des essais de production d'arômes sauf qu'il n'y a pas d'inoculation de levure. L'ajout de γ -décylactone « pure » est testé avec une concentration initiale de 300 mg/L en condition d'aération statique en fiole à col large et en trois différentes

concentrations initiales (300 mg/L, 900 mg/L et 4500 mg/L) en mini-réacteur à aération forcée.

7.2. Essais avec les γ -décalactones produites par FMS

Les essais de l'entraînement de lactones produites par FMS sont testés avec les mini-réacteurs à aération forcée. Afin d'obtenir les γ -décalactones par FMS, des essais de production en fiole à col large sont préalablement réalisés. Après 90 h de production, les cultures sont envoyées à un traitement thermique pour désactiver les activités enzymatiques des levures. Le traitement est réalisé à 55 °C pendant 3 h. Cette procédure de traitement est choisie en se basant sur la littérature. Ta et al. (2012) ont montré que le choc thermique à 50 °C provoque la mort cellulaire de différentes manières chez les cellules *Y. lipolytica* ayant poussé sur glucose et une mort de type nécrose chez les cellules ayant poussé sur oléate de méthyle. Après avoir désactivé les enzymes de levures, les cultures sont transférées aux mini-réacteurs à aération forcée. Les conditions d'aération sont identiques à la production de lactones en FMS avec des mini-réacteurs à aération forcée (diamètre de tuyaux 4 mm, vitesse d'aération $3,8 \pm 0,2$ m/s, humidité relative 90 %, température 27 °C).

7.3. Modélisation des cinétiques d'entraînement de lactones

Modèle mathématique : l'équation logistique différentielle modifiée (Eq. 2) est choisie pour étudier les cinétiques d'entraînement de lactones dans ce travail.

$$\frac{dC}{dt} = -v_{max} \times \left(1 - \frac{C}{K}\right) \times C \quad (\text{Eq. 2})$$

Où : C représente la concentration de lactone (mg/L) ; v_{max} et K sont les paramètres du modèle, représentant respectivement la vitesse spécifique d'entraînement (h^{-1}) et la constante d'entraînement de lactones.

Outil numérique : pour l'identification des paramètres des modèles cinétiques, la méthode des Moindres carrées a été utilisée suivant la formule (Eq. 3) (Noykova and Gyllenberg 2000; Donoso-Bravo et al. 2011):

$$J(\theta) = \min \sum_{t=1}^N (\delta_{exp}(t) - \delta_{mod}(t, \theta))^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Où : J représente la fonction d'objectif ; δ_{exp} représente la mesure collectée dans l'expérimentation ; δ_{mod} représente le résultat de prédiction par le modèle qui correspond au

point de mesure dans l'expérimentation ; θ représente le paramètre à déterminer ; N est le nombre de mesures.

Le solveur d'Excel est utilisé pour la minimisation.

8. Effets de l'oxygène sur la croissance et le métabolisme

Le co-substrat (oxygène) est un paramètre clé dans la β -oxydation pour la production de lactones. En outre, l'aération en mini-réacteurs à aération forcée provoque l'entraînement de lactones au cours de la production. La modification du taux d'oxygène dans l'environnement (où les micro-organismes se localisent) pourrait être une solution pour améliorer la productivité et/ou également pour étudier les effets sur le métabolisme des microorganismes. Ici, la modification de l'environnement par injection d'oxygène à différentes concentrations est utilisée pour étudier l'effet de l'aération sur la β -oxydation peroxysomale. Les conditions de 20 %, 30 %, 40 % et 50 % de l'oxygène dans l'air sont utilisées dans cette partie. La méthodologie détaillée est présentée dans *la publication 2*.

9. Effet de l' A_w sur la croissance et le métabolisme

9.1. Régulation de l' A_w

Le glycérol a été utilisé comme un agent dépresseur d' A_w . Le glycérol a été choisi car il a été considéré dans les études précédentes comme n'ayant pas d'influence physiologique sur les microorganismes (Gervais et al. 1988b; Mossel 2012; Mori et al. 2013; Liang et al. 2017). La détermination de la concentration précise de glycérol correspondant à une A_w souhaitée a été obtenue par l'équation de Norrish (Eq. 4).

$$A_w = (1 - X)e^{-Kx^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Où : X représente la fraction molaire de soluté ; K est 1,16 à 25 °C pour le glycérol.

9.2. Condition de cultures en boîtes de Petri

Le glycérol a été ajouté dans la préparation de YPDA pour ajuster l' A_w en suivant l'équation ci-dessus (Eq. 4). Le milieu a été stérilisé à 121 °C pendant 15 minutes et versé dans des boîtes de Petri (90 mm de diamètre). Les cellules de levure ont été pré-cultivées dans les fioles crantées de 500 ml contenant 200 ml de milieu YPD. Après, la pré-culture a été diluée et étalée sur des milieux préparés (différentes l' A_w). Les boîtes ont été cultivées à 27 °C.

9.3. Essais en FML

La FML a été réalisée dans les fioles crantées de 500 ml avec un volume de travail de 200 mL pendant 70 h. Le milieu de biotransformation a été stérilisé à 121 °C pendant 15 min, puis il a été inoculé avec des cellules de levure préparées à $6,5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les flacons ont été incubés dans l'étuve 27 °C sous une agitation de 140 rpm/min.

Par ailleurs, La FML est aussi réalisée à pH 4,4 (pH le plus favorable pour la production de lactones) (Escamilla-García et al. 2007a). Différentes solutions sont utilisées pour ajuster le pH du milieu (citrate 1, citrate 2 et phosphate). La solution de citrate 1 est composée de citrate trisodique dihydraté (0,1 M de $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$), ajusté à pH ~4,4. La solution de tampon citrate 2 est composée d'un mélange de 28 mL de solution d'acide citrique (0,1 M : 20,01 g de $C_6H_8O_7$ dans 1 L d'eau distillée) avec 22 mL de solution de citrate trisodique dihydraté (0,1 M : 29,41 g dans 1 L d'eau distillée), et rempli à 100 mL pour pH ~4,4 (Gomori 1955). La solution de phosphate saline a aussi été utilisée pour ajuster le pH initial. Elle est composée de 8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na_2HPO_4 et 0,24 g/L de KH_2PO_4 , ajusté à pH ~4,4 par HCl.

9.4. Evaluation de l' A_w

L'évaluation de l' A_w est effectuée à 25 °C en utilisant l'AquaLab® (Decagon Devices, Etats-Unis). L'échantillon gélosé est haché et l'échantillon liquide est homogénéisé avant la mesure.

10. Estimation de la biomasse

La population de levures a été évaluée par différentes méthodes selon les conditions de FMS. La mesure directe a consisté en un comptage direct en microscope à l'aide d'une cellule de Malassez. Le principe de la méthode est présenté dans *la partie 8.1.1 de rappel bibliographique*. L'extraction de levures à partir de matrices solides est décrite dans *la publication 1*. La mesure indirecte de biomasse est faite par des mesures de production de CO_2 au cours de la fermentation. La méthode d'analyse du CO_2 est présentée dans *la publication 2*.

11. Procédure d'extraction et d'analyse de lactones

La méthode d'extraction de lactones en FMS est donnée dans *la publication 1*. En FML, 1,5 mL d'échantillon est prélevé et 10 μ L de HCl sont ajoutés pour compléter la lactonisation de 4-hydroxy-acide et également pour arrêter le métabolisme des levures. Cinquante μ L de γ -

undécalactone (étalon interne, Sigma-Aldrich) solubilisés dans l'éthanol absolu ont été ajoutés pour atteindre une concentration finale de 100 mg/L. Les lactones ont été extraites de l'échantillon avec 1,5 mL d'éther éthylique dans un vial de 4 mL en agitant une fois par seconde pendant 90 s (Waché et al. 2001). Après avoir laissé reposer pour séparer les différentes phases, la phase d'éther éthylique a été prélevée et analysée par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Les conditions d'analyse en CPG sont présentées dans *la publication 2*.

RESULTATS ET DISCUSSION

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

Présentation des résultats

Partie 1 : Fermentation en milieu solide pour la production de lactones par *Y. lipolytica*.

Dans cette première partie, la mise au point de la production de lactones en FMS en utilisant différents matrices solides (support inerte/substrat) et la production de lactones en FMS dans différents types de réacteurs seront présentées. La présentation débutera par **la Publication 1**, intitulée « Solid state fermentation for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica* » et sera suivie par la présentation de résultats complémentaires.

Partie 2 : Effet de l'entraînement de lactones en cours de production.

Lors de l'utilisation de l'aération forcée dans les mini-réacteurs, une certaine concentration de lactones est entraînée. Dans cette deuxième partie, l'effet d'entraînement de différentes de lactones ajoutées ou produites in situ sera présenté. Les vitesses spécifiques d'entraînement seront étudiées. Un modèle mathématique pour estimer les arômes produits en cas d'utilisation de l'aération forcée sera utilisé.

Partie 3 : Effet de l'oxygène sur la croissance et le métabolisme chez *Y. lipolytica* utilisée pour la production de lactones.

Dans cette partie, la modification de l'air par enrichissement en oxygène est utilisée pour étudier la croissance et le métabolisme de *Y. lipolytica* appliquée à la production de lactones (**Publication 2**). Les vitesses spécifiques de croissance, de production de lactones, et les consommations d'oxygène dans différentes concentrations d'air enrichi en oxygène seront évaluées. La dégradation de γ -décalactone sera également discutée.

Partie 4 : Effet de l'activité de l'eau (A_w) sur la croissance et le métabolisme chez *Y. lipolytica* utilisée pour la production de lactones.

Les études préliminaires concernant l'effet de l' A_w sur la croissance et le métabolisme des lipides chez *Y. lipolytica* dans la production de lactones en FML seront présentées.

Partie 1 : Fermentation en milieu solide pour la production de lactones par *Y. lipolytica*.

1.1. Publication 1 : Fermentation en milieu solide pour la production de γ -déalactones par *Y. lipolytica*

Résumé sous forme de graphique

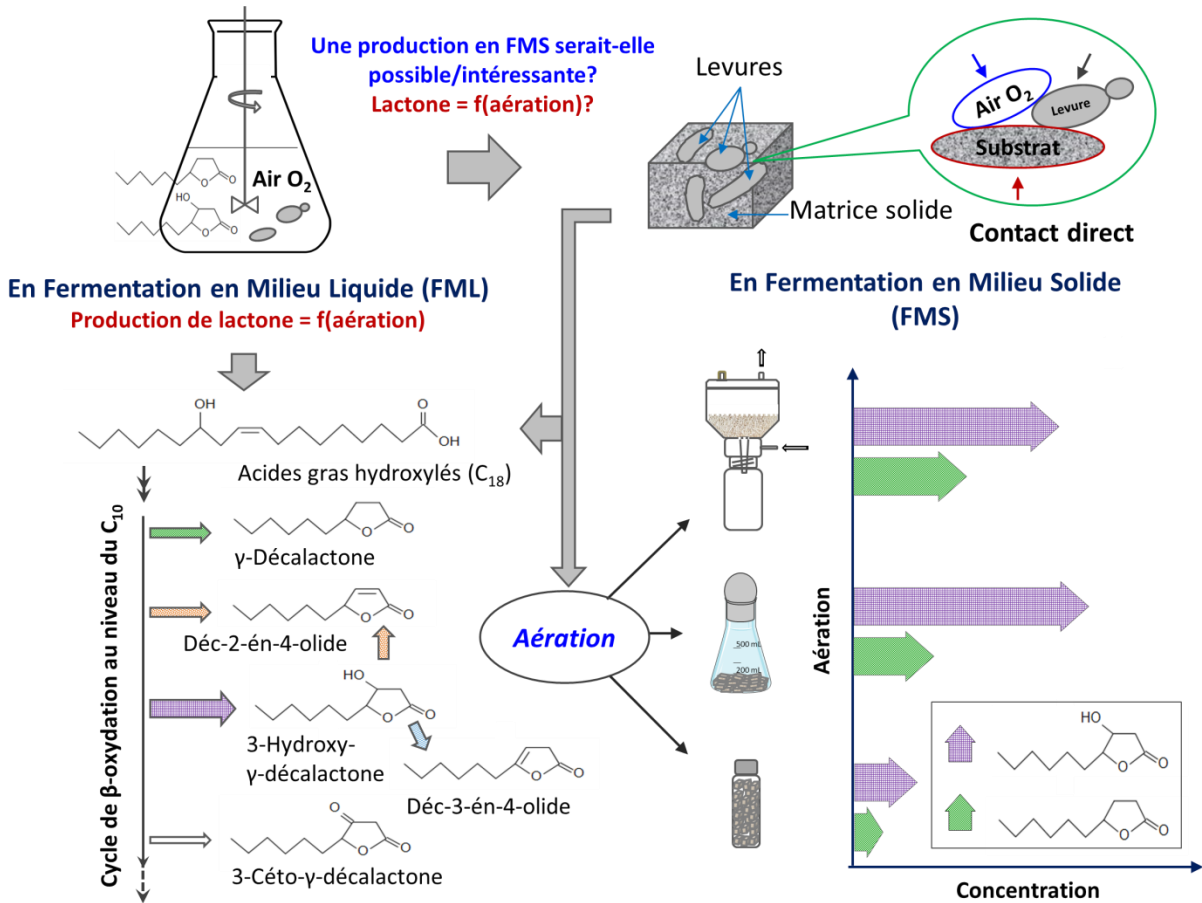


Figure 10 : Résumé sous forme graphique de la partie 1.

Publication 1 : « *Process Biochemistry*, 64 (2018) : 9-15 »

Fermentation en milieu solide pour la production de γ -décalactones par *Yarrowia lipolytica*

S. Try*, J. De-Coninck, A. Voilley, T. Chunghieng et Y. Waché

Résumé

Objectifs : Utiliser la FMS pour la production de lactones par *Y. lipolytica*. Pour cela, il faudra mettre au point le système de supports/substrat pour obtenir une croissance de *Y. lipolytica* et une production de lactones. L'impact de l'aération sur le métabolisme est également un objectif.

Méthodes et résultats : Trois supports solides (rafle de maïs, éponge de cellulose et éponge de courgette) et un substrat (graine de ricin) sont utilisés comme matrice solide. L'éponge de courgette a été utilisée dans différents types de réacteurs FMS dans trois conditions, sans aération (flacon à petit espace de tête), aération statique (fiolle à col large) et aération forcée (mini-réacteur). Quatre lactones ont été détectées par CPG-SM lors de la dégradation de de l'huile de ricin par *Y. lipolytica* W29 : la 3-hydroxy- γ -décalactone, qui atteint la concentration élevée de 5 g/L (en fiolle à col large), la γ -décalactone, le déc-2-én-4-olide et le déc-3-én-4-olide.

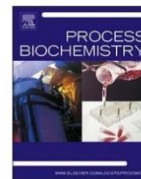
Conclusion et perspectives : Dans cette étude, certaines cellules de levure ont changé leurs propriétés morphologiques, de levure à pseudo-mycélium et à mycélium. Ces cellules peuvent subir un changement métabolique entraînant une production élevée de 3-hydroxy- γ -décalactone. Le rendement en lactone dans les flacons à petit espace de tête était très faible, ce qui suggère une disponibilité insuffisante d'oxygène. Par ailleurs, l'aération forcée dans les mini-réacteurs a provoqué de l'entraînement de lactones pendant la production. Dans ce travail, un autre procédé est proposé comme un nouveau modèle pour la production de lactone.

Mots clés : Fermentation en milieu solide ; *Yarrowia lipolytica* ; Production d'arômes ; β -Oxydation ; Eponge de courgette ; Huile de ricin ; γ -Lactones ; Aération forcée.



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Solid state fermentation for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*

Sophal Try^{a,c,*}, Joëlle De-Coninck^{a,b}, Andrée Voilley^a, Thavarith Chunhieng^{c,1}, Yves Waché^{a,1}

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

^b Welience-Platform for Development in Biotechnology, SATT GRAND EST, 17 rue Sully, 21065 Dijon, France

^c Department of Chemical Engineering and Food Technology, Institute of Technology of Cambodia, Russian Federation Blvd., P.O. Box 86, Phnom Penh, Cambodia

ARTICLE INFO

Keywords:

Solid state fermentation
Yarrowia lipolytica
 Aroma production
 β -Oxidation
 Luffa sponge
 Castor oil
 γ -Lactones
 Forced aeration

ABSTRACT

The production of γ -decalactones as aroma compounds is highly dependent on the access of the biocatalyst to substrate and co-substrate (oxygen). In this work, the potential of solid state fermentation (SSF) is investigated for this production with *Y. lipolytica* W29. Luffa sponge was used as an inert support and the investigation focused on the impact of aeration on metabolites. In that goal, experiments were carried out in three different SSF reactor types, wide-mouth Erlenmeyer flask (static aeration), forced aeration mini-reactor, and small-headspace bottle (without aeration). Four lactones were detected by GC–MS during the degradation of ricinoleic acid from castor oil by *Y. lipolytica* W29: 3-hydroxy- γ -decalactone, which reached the high concentration of 5 g/L (in wide-mouth Erlenmeyer flask), γ -decalactone, dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide. In this study, some yeast cells changed their morphological properties from the yeast-like shape to pseudo-mycelium and mycelium. These cells may undergo a metabolic shift resulting in the high production of 3-hydroxy- γ -decalactone. The yield of lactone in the small-headspace bottle was very low suggesting insufficient oxygen availability. For their part, forced-aeration conditions in mini-reactors resulted in the stripping of lactone compounds. From the present work, an alternative process is proposed as a novel model for lactone production.

1. Introduction

Lactones are aroma compounds present naturally in many fruits and fermented foods. Their biotechnological synthesis comes from C18-hydroxylated fatty acids. Five lactones may be detected during the degradation of ricinoleic acid, by yeast cells: 5-hydroxy- ϵ -dodecalactone, γ -decalactone, 3-hydroxy- γ -decalactone, dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide [1–3] (the latter decalactones are shown in Fig. 1). During the peroxisomal β -oxidation of hydroxylated fatty acids by the yeast *Y. lipolytica*, which is considered as a model organism for the metabolism of hydrophobic compounds [38], the four γ -decalactones encountered above have been detected [2–5].

The production of lactones in submerged cultures has been widely investigated, including the metabolic pathway and the improvement of the β -oxidation flux which has been studied on genetically modified yeast strains [6–10]. Some authors have focused on the effect of environmental condition changes by modifying pH, substrate concentration, inoculum density, or aeration to improve the production of active compounds [11–14]. From their studies, oxygen availability appears to be a key parameter driving the extent of oxidation [11–15].

Interestingly, an airlift biofilm reactor explored by Escamilla-García et al. [13] led to the formation of adhering biofilms of *Y. lipolytica* and to the concomitant stimulation of the production of 3-hydroxy- γ -decalactone with a ten-fold concentration increase. These results drove us to get interested in a solid state fermentation (SSF) process which would allow the microorganisms to keep in tight contact with the substrate to be in a direct contact with the air oxygen. *Y. lipolytica* has been widely used in submerged cultures in large applications such as the production of lipases, organic acids and lactones. Only few research works have investigated SSF for production by this species and these papers were limited to the production of lipase [22–25]. In recent years, SSF has greatly expanded its application to the production of various metabolites [16,39–44]. It was found that SSF has various advantages compared to submerged fermentation [17–21]. In our aim to produce lactone in SSF, by taking into account the oxygen availability as the main factor involving peroxisomal β -oxidation in lactone production, different aeration conditions will be studied. When the substrate structure does not enable microorganisms to grow in SSF, inert supports have to be used. In our study, different inert supports and substrate were selected for the first time to study the growth of *Y. lipolytica* and the

* Corresponding author. Present address: AgroSup Dijon/University of Burgundy – Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

E-mail address: try@itc.edu.kh (S. Try).

¹ Network Tropical Fermentation.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.004>

Received 3 July 2017; Received in revised form 7 September 2017; Accepted 8 October 2017

Available online 09 October 2017

1359-5113/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

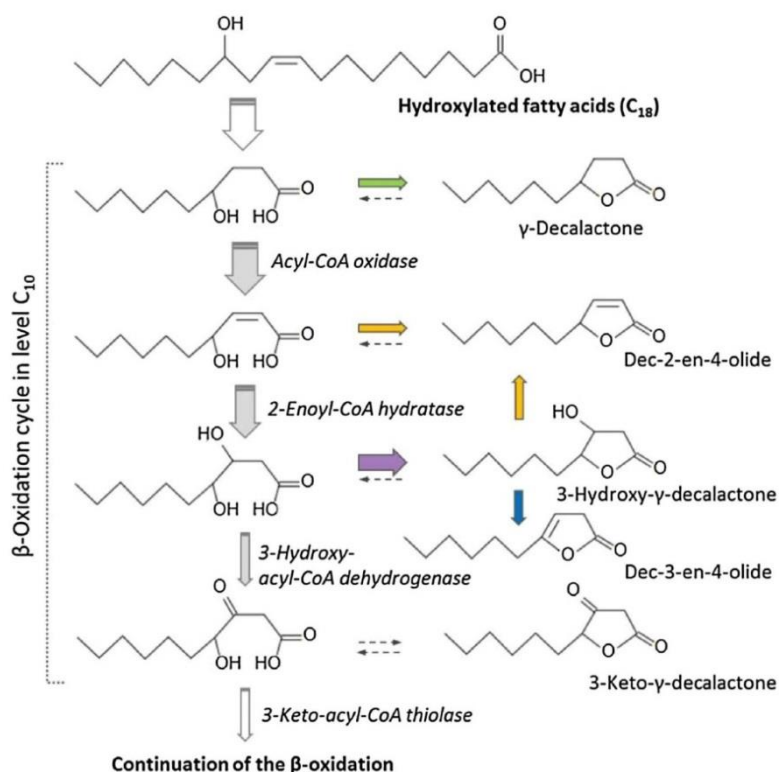


Fig. 1. Degradation pathway of hydroxylated fatty acids (in the form of esters of coenzyme A) by the biofilm of yeast *Y. lipolytica* at the C₁₀-β-oxidation cycle level. The metabolic shift is represented by the size of the arrows that refers to the activity of enzymes and subsequent lactones production.

production of γ -decalactones in SSF. Inert supports were used after impregnation with the liquid biotransformation medium containing castor oil as the substrate. The most efficient inert support or substrate for lactone production was selected for the study of the importance of oxygen in SSF. Experiments with three different conditions in SSF reactor types, wide-mouth Erlenmeyer flask (static aeration), forced aeration mini-reactor and small-headspace bottle (without aeration) have been carried out. An alternative system for lactone production by *Y. lipolytica* is proposed for the first time in this study.

2. Materials and methods

2.1. Solid supports

Corn cob, luffa sponge and cellulose sponge were used as the solid supports and castor seed was used as the substrate in this study. Corn cob (Grits[®], France) was used without any pretreatment. Luffa sponge was obtained from the dried fruit of *Luffa* free of seeds (Fig. 2) (origin Cambodia). It was cut into rectangular prism shape (approximately 1 cm by 1 cm by 0.5 cm). The pretreatment procedure was modified from Pazzetto et al. [26]: The rectangular prisms of luffa sponge were washed thoroughly with tap water, boiled using distilled water for 30 min, and left for 3 day in distilled water and changed three times. They were then dried at room temperature in thin layer (approximately 2 cm) for two days. Cellulose sponge (Spontex[®], France) was cut into a cubic shape (approximately 0.5 cm³). The pretreatment procedure was the same as the procedure used for luffa sponge, except that it was then oven-dried at 105 °C for 3–4 h. Castor seeds were grinded to the diameter sizes of approximately 0.1 cm–0.4 cm before use.

2.2. Strain and inoculum preparation

The strain used in this study was *Y. lipolytica* W29 (ATCC 20460). It



Fig. 2. Luffa sponge support.

was cultured at 27 °C for 48 h on YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar: 20 g/L of glucose, 20 g/L of tryptone pancreatic digest of casein, 10 g/L of yeast extract and 15 g/L of agar). Cells were used to inoculate a 500 mL baffled Erlenmeyer flask containing 200 mL of YPD medium to give inoculum concentration of 6×10^6 cells/mL. Flasks were shaken for 18–19 h at 140 rpm until the cultures reached the late logarithmic growth phase. Cells from the pre-culture media were harvested by centrifugation for 5 min at 4000g, washed twice with sterile saline solution (0.9% of NaCl (w/v)) and then they were recovered in biotransformation medium in order to impregnate the solid support. An inoculation concentration of 2×10^7 cells/mL (or approximately 7×10^7 cells/g of dried weight for luffa sponge and cellulose sponge, or approximately 1.6×10^7 cells/g of dried weight for corn cob) of biotransformation medium was carried out in this study. Only distilled water inoculated with yeast cells was used for impregnating the solid

substrate (castor seeds) to attend an initial water content fixed.

2.3. Biotransformation medium

For the production of decalactones in SSF using inert solid support, biotransformation medium was used to impregnate the solid support. Biotransformation medium comprising 20 g/L of Castor oil, 2 g/L of Tween 80 and 6.7 g/L of YNB (yeast nitrogen base) with amino acid was used in this study.

2.4. Solid state fermentation

2.4.1. Static aeration in a wide-mouth Erlenmeyer flask

The fermentation process was conducted for 90 h. The solid supports, which were 5 g of dried luffa sponge or cellulose sponge, were placed into a 500 mL-wide-mouth Erlenmeyer flask, humidified with 10 mL of biotransformation medium and autoclaved at 121 °C for 15 min. The luffa sponge and cellulose sponge supports were adjusted to a final moisture content of 70% with the yeast-cell-inoculated biotransformation medium. 35 g of the solid support (corn cob) or the solid substrate (castor seed) were used and humidified with 25 mL of biotransformation medium or distilled water, respectively before autoclaving. They were then adjusted to a moisture content of 60% (for a low water adsorption after inoculation, more liquid amount was added during inoculation resulting in excess of non sorbed water in the solid support) with the yeast-cells inoculated. All wide-mouth Erlenmeyer flasks were then incubated in an oven at 27 °C.

2.4.2. Forced aeration in a forced aeration mini-reactor

The SSF in the forced aeration condition was carried out using a 500 mL mini-reactor (Fig. 3). The condition of fermentation was the same as in the experiment in static aeration using the wide-mouth Erlenmeyer flask. The solid support was inoculated before transferring to the mini-reactors. To supply air to mini-reactors, a humidifying system (developed in the Welience-Plateform for Development in Biotechnology, Dijon, France) was installed to assure an air with a stable proportion of 90% of relative humidity and 27 °C of temperature (Fig. 4). The air flow-rate was adjusted to 3.8 ± 0.2 m³/second. The humidity meter (Vaisala, HMI31, Finland) and thermos-anemometer (Kimo, LV111, France) were used to measure the humidity, the temperature and the velocity of outlet air from the mini-reactors respectively.

2.4.3. No aeration in a small-headspace bottle

The SSF process without aeration was carried out in a headspace bottle of 22 mL filled with 2 g of luffa sponge support impregnated with

yeast-cell-inoculated biotransformation media. Further fermentation conditions were adjusted to the same conditions as in the wide-mouth Erlenmeyer flask and in the forced aeration mini-reactor.

2.5. Biomass estimation and image analyses

Biomass extraction was carried out in the conditions of static aeration and forced aeration. The most efficiency direct-biomass measurement method was optimized in this study. Biomass was extracted with 250 g of sterile Tween 80 solution (0.1%) into the wide mouth Erlenmeyer flask containing the solid support (12 g). The resulting preparation was then stirred at 500 rpm within 15 min and filtered with Gauze (medical compress). The cell density was determined by counting the extracted cell aliquots in a Malassez chamber (Marienfeld-Superior, Germany) under a Nikon EFD-3 microscope after sedimentation of yeast cells. Confocal microscopy with NIS software was used to observe the micrographs from extracted cells (Dima Cell, Agrosup-Dijon, France).

2.6. Extraction and quantification of lactones

Analyses were carried out on 2 g samples removed from each SSF flask or reactor and placed into 22 mL glass vials (2 samples per culture). γ -Decalactone ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) was used for analytic development. 50 μ L of γ -undecalactone (internal standard, Sigma-Aldrich) solubilized in absolute ethanol was added to reach a final concentration of 100 mg/L. To obtain a complete solid-liquid extraction in our study conditions, the lactones were extracted from the sample with 10 mL of diethyl-ether by shaking twice per second during 3 min (relax 1 min every 1 min shaking) and filtered by syringe filter (0.22 μ m PVDF membranes, Millex[®]GV). The analyses were carried out using a coupled gas chromatograph PerkinElmer (Clarus[®] 580)/mass spectrometer PerkinElmer (Clarus[®] SQ 8 S) with an Elite-5MS capillary column (30.0 m by 250 μ m by 0.25 μ m) with Helium as the carrier gas at a linear flow rate of 1.0 mL/min. The split injector (split ratio, 10:1) temperature was set to 250 °C. The oven temperature was programmed to increase from 70 °C to 85 °C at a rate of 5 °C/min, then from 85 °C to 100 °C at a rate of 1 °C/min and finally from 100 °C to 250 °C at a rate of 5 °C/min. Mass spectra were obtained by using ionization with a 60-eV electronic impact.

2.7. Statistical analysis

All experiments have been carried out at least three independent times. The STDEVPA function in Microsoft Excel was used for standard deviation calculation.

3. Results

3.1. Static aeration using wide-mouth Erlenmeyer flasks

To investigate the potential of SSF for lactone production, supports such as cellulose sponge, corn cob and luffa sponge, and castor seeds as a substrate were used. *Y. lipolytica* W29 grew well on all supports and on the substrate used. When using logistic differential equation for the growth study in different supports, the specific growth rates of *Y. lipolytica* on luffa sponge and cellulose sponge were not significantly different (approximately 0.12 h⁻¹) with the maximum biomass concentration of approximately 3.55×10^8 cells/g of dried weight. A twice higher value of specific growth rate was observed for the growth on corn cob, with the maximum biomass concentration of approximately 8.65×10^8 cells/g of dried weight. The specific growth rate of the yeast on castor seed was lower compared to the growth on inert supports. Furthermore, a maximum biomass concentration of approximately 2.5×10^8 cells/g of dried weight was reached. The most interesting support was luffa sponge on which lactone compounds were produced

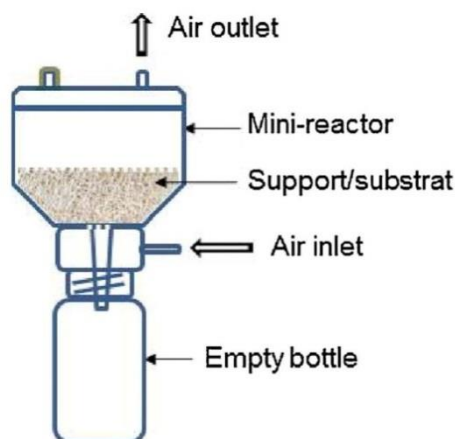


Fig. 3. Scheme of the Mini-reactor of 500 mL.

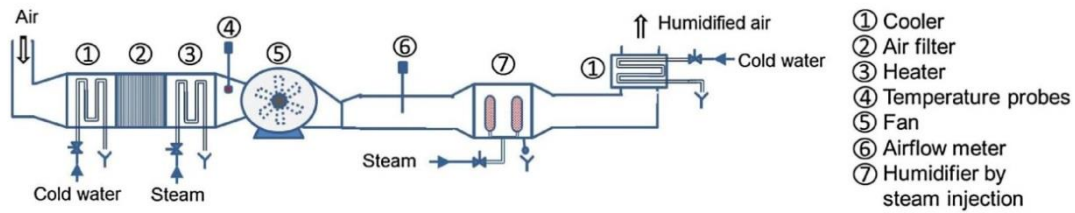


Fig. 4. Scheme of the humidifier (Inspired from Durand [35]).

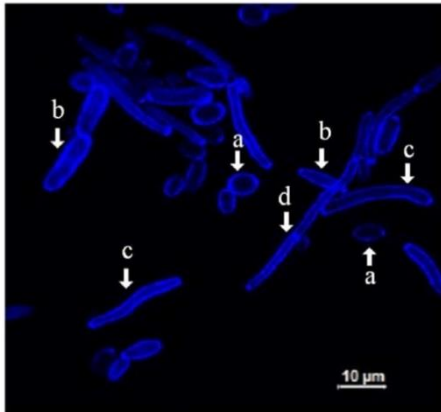


Fig. 5. Confocal micrograph of *Y. lipolytica* W29 culture on Luffa sponge. (a) Yeast-like form, (b) elongated yeast-like form, (c) pseudo-mycelial and (d) mycelial forms. The measurement of the ratios of dimensions (length divided by width) were about 1.6 for yeast like form, 2.5 for elongated yeast-like form [13], and 4.8 for pseudo-mycelial form [27].

in higher concentration than in the other supports and substrate used.

Y. lipolytica grew well on the luffa sponge impregnated with the biotransformation medium. It grew in the form of yeast, elongated yeast, pseudo-mycelium and mycelium as shown in Fig. 5. Its growth reached the early stationary phase after 28 h with a concentration of 3.3×10^8 cell/g of dry weight (Fig. 6). In addition, four lactones, γ -decalactone, dec-2-en-4-olide, dec-3-en-4-olide and 3-hydroxy- γ -decalactone were detected in this study. According to the mass spectra frequency, the peaks of the detected compounds corresponded almost exactly to those observed by Waché et al. [2]. γ -Decalactone reached 185 ± 35 mg/L at 28 h and it remained stable until 40 h, then decreased to the final concentration of 59 ± 10 mg/L at 90 h. 3-Hydroxy- γ -decalactone reached the highest concentration of 5107 ± 530 mg/L at the end of fermentation. The kinetics of production of decenolides was very similar to the one of the 3-hydroxy-lactone with a conversion reaching the maximum concentration from 50 h with the concentrations of dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide

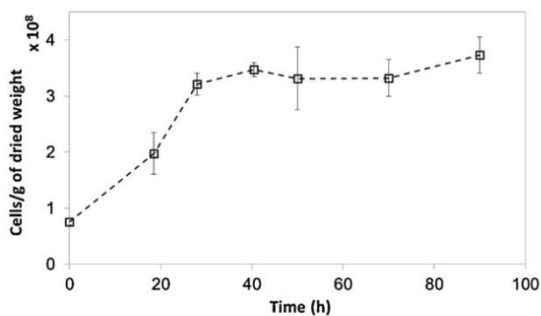


Fig. 6. Kinetics of *Y. lipolytica* W29 growth on luffa sponge during SSF in static aeration condition using wide-mouth Erlenmeyer flask.

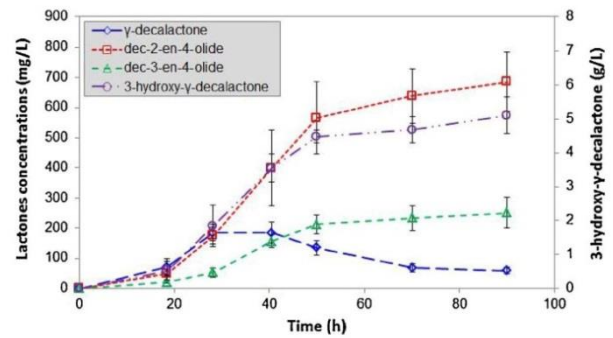


Fig. 7. Kinetics of production of lactones by *Y. lipolytica* W29 in SSF using Luffa sponge as inert support SSF in wide-mouth Erlenmeyer flask.

respectively of 686 ± 98 mg/L and 250 ± 50 mg/L (Fig. 7).

3.2. Modification of the aeration through forced aeration in mini-reactors and the use of small-headspace bottles

To study the importance of aeration, two further conditions were carried out beside essays in static aeration using wide-mouth Erlenmeyer flasks, i) forced aeration in mini-reactors and ii) unaerated small-headspace bottles. The profiles of the different lactone production kinetics are shown in Fig. 8. γ -Decalactone reached the maximum production of 196 ± 41 mg/L and 75 ± 37 mg/L, in forced aeration mini-reactor and small-headspace bottle respectively. γ -Decalactone produced from the different conditions reached their maximum production at 19 h, 28 h and 50 h in forced aeration mini-reactor, wide-mouth Erlenmeyer flask, and small-headspace bottle respectively. Furthermore, it reached a concentration of approximately 50 mg/L at 90 h of SSF (Fig. 8a). 3-Hydroxy- γ -decalactone reached the highest concentration of 2226 ± 667 mg/L in forced aeration mini-reactor, and of 383 ± 57 mg/L in small-headspace bottle, both at 40.5 h (Fig. 8b). The kinetics of decenolides produced in both conditions (forced aeration and unaerated conditions) were similar to those of 3-hydroxy- γ -decalactone. Dec-2-en-4-olide reached its maximal concentration of 311 ± 116 mg/L in forced aeration mini-reactor and of 60 ± 19 mg/L in small-headspace bottle at 50 h (Fig. 8c). Another decenolide, dec-3-en-4-olide was produced and reached its maximal concentration of 145 ± 66 mg/L in forced aeration mini-reactor and of 35 ± 18 mg/L in small-headspace bottle at 50 h (Fig. 8d).

4. Discussion

It is the first study which emphasizes the SSF process in lactones production by *Y. lipolytica*. We have investigated an adaptation from submerged fermentation to SSF by using different solid supports and a substrate using wide-mouth Erlenmeyer flask (static aeration). In SSF for lactones production, it is necessary to use a higher yeast cells inoculum density compared to the submerged fermentation. This may result from the fact that, in SSF, microbial cells are generally fixed on the solid substrate or support (unmixed bioreactors). A higher inoculum allows a higher surface of contact between microorganisms and the

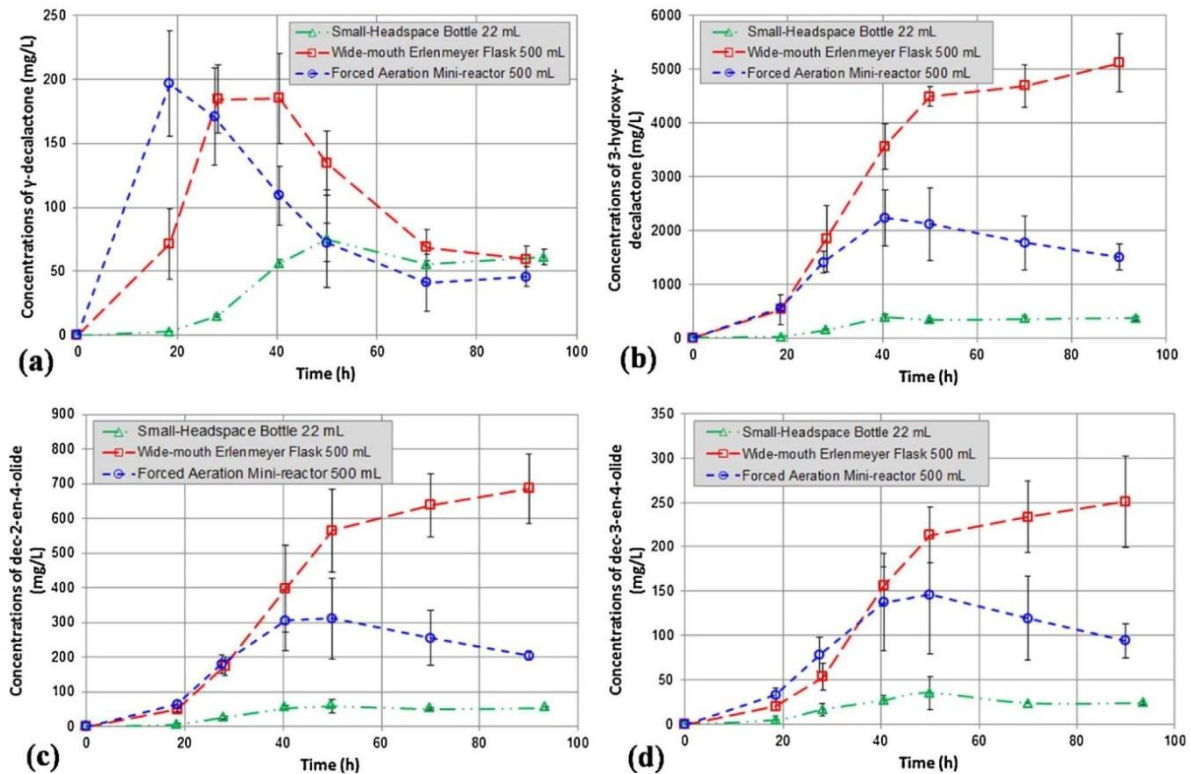


Fig. 8. Kinetics of lactone production by *Y. lipolytica* W29 in SSF using Luffa sponge as inert support, in wide-mouth Erlenmeyer flask, in forced aeration mini-reactor, and in small-headspace bottle.

substrate. In addition, a greater production yield of lactones was observed. The substrate or support texture is important for the yeast growth due to its water retention property and high air oxygen contact. Luffa sponge texture allows a higher amount of air oxygen to contact with the substrate and yeast cells. Additionally, a higher concentration of lactones was detected. Luffa sponge support was considered as an efficient support in the production of lactones in static aeration condition. It was then selected for further study in modification of the aeration through the forced aeration in mini-reactors and un-aerated small-headspace bottles.

Y. lipolytica W29 can efficiently degrade hydrophobic substrates and it can degrade lactone as it is synthesized. In SSF, the kinetics of γ -decalactone production was similar to the one in submerged fermentation. γ -Decalactone decreased after having reached its maximum concentration. Lactone degradation by Aox altered mutants has been previously discussed by Waché et al. [2]. The pathway of lactones degradation by *Y. lipolytica* has not been defined yet, but it was suggested that β -oxidation occurs to the lactone precursor based on the presence of β -oxidation intermediates shorter than C10 [1,3]. More detail was previously discussed in Waché et al. [2].

In yeast cells, peroxisomal β -oxidation is the main pathway of fatty acid degradation. Metabolites of β -oxidation can be excreted to the medium but the degradation can be completed if suitable conditions are reached. β -Oxidation in *Y. lipolytica* is normally highly sensitive to FAD and NAD regeneration (with incomplete regeneration, an exit of intermediates at the acyl-CoA oxidase step and at the 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase step, respectively, are expected) [4,8,33]. Low acyl-CoA oxidase activity thus induces the accumulation of γ -decalactone and high production of 3-hydroxy- γ -decalactone is normally a sign of insufficient NAD regeneration resulting from low aeration in peroxisomal β -oxidation [4,12,13]. Different cellular forms of *Y. lipolytica* were detected in our experiment conditions using luffa sponge as the solid

support. It is not surprising for that yeast species as different forms of *Y. lipolytica* (previously known as *Candida lipolytica*) were also reported after a three-day incubation in solid media of malt extract at 25 °C [27]. Yeast cells were long-oval to elongate; moreover, there were also short-oval cells. Similarly, in our results, cells were found in yeast-like, elongated yeast-like, pseudo-mycelial and mycelial forms with the longest structure being approximately 50 μ m long (Fig. 5). *Y. lipolytica* is a dimorphic fungus. It can grow in different forms depending on environmental conditions such as pH, carbon and nitrogen sources, and aerobic stress [28–32]. A previous study on the production of γ -decalactones by Escamilla-García et al. [13] reported for the first time an elongated yeast-like form of *Y. lipolytica* W29 for cells present in the biofilm of the air-lift bioreactor. The presence of these elongated forms was correlated to the production of hydroxylated lactones [13]. Similar hydroxylated lactone production was observed in the presence of elongated forms of *Y. lipolytica* in biofilms, suggesting an impact of oxygen availability and/or NAD regeneration in cell morphology. A very high concentration of 3-hydroxy- γ -decalactone was observed in SSF using wide-mouth Erlenmeyer flask and forced aeration mini-reactor in the present study. In addition, *Y. lipolytica* growth was rather in biofilm-like forms on the solid support. Compared to the previous study, it is very interesting that a simple process in a static aeration condition using wide-mouth Erlenmeyer flask can produce 3-hydroxy- γ -decalactone up to a concentration of 5 g/L. For their part, the yields of lactone production in the condition without aeration using small-headspace bottle were very low due to insufficient oxygen availability.

Oxygen availability appears to be the main factor driving the extent of oxidation in lactone production. A complete β -oxidation occurs for full oxygen availability, but oxygen availability limitation may cause the stop of β -oxidation at the interesting C10-level [12]. In SSF, forced aeration is a system difficult to manage, especially to supply humidified and tempered air to the bioreactor. A first forced aeration column

reactor was used in lab scale by an ORSTOM team between 1975 and 1980 [34]. A new generation of small reactors developed in our lab was described by Durand [35]. The mini-reactor used in the present study has a smaller volume but is based on a similar principle to those previously published. To avoid the stripping and subsequent drying phenomena resulting from the forced aeration, a humidifier system was installed. To verify the aeration effect on lactone stripping, experiments using wide-mouth Erlenmeyer flask and forced aeration mini-reactor were carried out with a known initial concentration of γ -decalactone. γ -Decalactone was mixed with the un-inoculated biotransformation medium to obtain the initial concentration needed. It was then used to impregnate the luffa sponge support for the experiments in both static and forced aeration conditions. For static aeration with the wide-mouth Erlenmeyer flask, no γ -decalactone loss was detectable after 90 h incubation, but for the forced aeration mini-reactors, γ -decalactone was lost with the same specific stripping rate whatever the initial concentration (results not shown). This stripping phenomenon has already been observed for other forced aeration SSF. In the production of aroma compounds by *C. fimbriata* in SSF using forced aeration in column and horizontal drum bioreactors, twelve aroma compounds were detected in the headspace. In addition, the adsorbent columns were connected to their column-type bioreactor and all compounds present in the headspace of the columns were adsorbed in adsorbents [36]. It was found that the concentration of volatile compounds in the headspace of the culture was generally affected by the nature and concentration of the fermentation medium, and by the vapor partial pressure. It can be noted that the trapping of γ -decalactone was interesting for submerged fermentations. For instance, Souchon et al. [37] have used activated carbon and synthetic polymer to adsorb lactone compounds.

5. Conclusion

A new system of lactone production in SSF using inert support impregnated with the biotransformation medium was studied for the first time in this work. Luffa sponge was found as an efficient solid support compared to the other support/substrate used. Different aeration conditions were also emphasized. Interestingly, the yield of 3-hydroxy- γ -decalactone was very high. This may be related to the morphological change of yeast cells during SSF. To gain a deeper understanding of cells morphological change linked with the metabolic flux, different mutant strains growing only in the yeast-like or in mycelium form will be used in this system. Furthermore, modeling and/or a trapping system will be used to observe the lactones stripped by using forced aeration mini-reactors. From the present work, a simple process is proposed as a novel model to investigate lactone production.

Acknowledgments

It is a pleasure to acknowledge with gratitude the scholarship support of the French Embassy in Cambodia as well as an attribution of financial support from AUF (Agence Universitaire de la Francophonie). We are also thankful to C. Bernard-Rojas, G. Pescher, and B. N. Pham-Hoang, for technical help.

References

[1] M. Okui, Metabolism of hydroxy fatty acids II. intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus candida, *J. Biochem.* 54 (6) (1963) 536–540.
 [2] Y. Waché, M. Aguedo, A. Choquet, I.L. Gatfield, J.-M. Nicaud, J.-M. Belin, Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (12) (2001) 5700–5704.
 [3] I. Gatfield, M. Güntert, H. Sommer, P. Werkhoff, Some aspects of the microbiological production of flavor-active lactones with particular reference to γ -decalactone, *chemie, mikrobiologie, Technol. Lebensm.* 15 (5–6) (1993) 165–170.
 [4] Y. Waché, M. Aguedo, J.-M. Nicaud, J.-M. Belin, Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (5) (2003) 393–404.
 [5] I.L. Gatfield, Biotechnological production of natural flavor materials, in:

R. Teranishi, E.L. Wick, I. Hornstein (Eds.), *Flavor Chemistry Thirty Years of Progress*, Plenum Press, New York, 1999, pp. 211–227.
 [6] Y. Pagot, A. Le Clainche, J.-M. Nicaud, Y. Waché, J.-M. Belin, Peroxisomal β -oxidation activities and γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 (3) (1998) 295–300.
 [7] H. Wang, A. Le Clainche, M.-T. Le Dall, Y. Waché, Y. Pagot, J.-M. Belin, C. Gaillardin, J.-M. Nicaud, Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast* 14 (15) (1998) 1373–1386.
 [8] Y. Waché, C. Laroche, K. Bergmark, C. Møller-Andersen, M. Aguedo, M.-T. Le Dall, H. Wang, J.-M. Nicaud, J.-M. Belin, Involvement of acyl coenzyme a oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ -Decalactone by *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3) (2000) 1233–1236.
 [9] A. Groguenin, Y. Waché, E.E. Garcia, M. Aguedo, F. Husson, M.-T. LeDall, J.-M. Nicaud, J.-M. Belin, Genetic engineering of the β -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 28 (2–3) (2004) 75–79.
 [10] E. Escamilla-García, J.-M. Nicaud, J.-M. Belin, Y. Waché, Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a factorial approach, *Biotechnol. J.* 2 (10) (2007) 1280–1285.
 [11] E. Escamilla-García, J.M. Belin, Y. Waché, Use of a doehlert factorial design to investigate the effects of pH and aeration on the accumulation of lactones by *Yarrowia lipolytica*, *J. Appl. Microbiol.* 103 (5) (2007) 1508–1515.
 [12] E. Escamilla-García, M. Aguedo, N. Gomes, A. Choquet, I. Belo, J.A. Teixeira, J.-M. Belin, Y. Waché, Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57 (1–4) (2009) 22–26.
 [13] E. Escamilla-García, S. O’Riordan, N. Gomes, M. Aguedo, I. Belo, J. Teixeira, J.-M. Belin, Y. Waché, An air-lift biofilm reactor for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochem.* 49 (9) (2014) 1377–1382.
 [14] A. Braga, I. Belo, Production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (3) (2015) 559–565.
 [15] A. Braga, D.P. Mesquita, A.L. Amaral, E.C. Ferreira, I. Belo, Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: differences in yeast metabolism and morphology, *Biochem. Eng. J.* 93 (2015) 55–62.
 [16] J. Oostrá, J. Tramper, A. Rinzema, Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats, *Enzyme Microb. Technol.* 27 (9) (2000) 652–663.
 [17] S. Manpreet, S. Sawraj, D. Sachin, S. Pankaj, U. Banerjee, Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation, *Malays. J. Microbiol.* 1 (2) (2005) 1–9.
 [18] A. Á. De Araújo, G.M. Pastore, R.G. Berger, Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation, biotechnology for fuels and chemicals, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98 (1) (2002) 747–751.
 [19] V. Sarhy-Bagnon, P. Lozano, G. Saucedo-Castañeda, S. Roussel, Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures, *Process Biochem.* 36 (1–2) (2000) 103–109.
 [20] F.T. Mantzouridou, A. Paraskevopoulou, S. Lalou, Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste, *Biochem. Eng. J.* 101 (2015) 1–8.
 [21] C. Lapadatescu, P. Bonnarne, Production of aryl metabolites in solid-state fermentations of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*, *Biotechnol. Lett.* 21 (9) (1999) 763–769.
 [22] A. Domínguez, M. Costas, M.A. Longo, A. Sanromán, A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnol. Lett.* 25 (15) (2003) 1225–1229.
 [23] S. Imandi, H. Garapati, Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate, *J. Microbiol.* 2 (2007) 469–474.
 [24] S. Imandi, S. Karanam, H. Garapati, Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm kernel cake (*Elaeis guineensis*), *Adv. Biosci. Biotechnol.* 1 (2) (2010) 115–121.
 [25] L.B. Ramos-Sánchez, M.C. Cujilema-Quitio, M.C. Julian-Ricardo, J. Cordova, P. Fickers, Fungal lipase production by solid-state fermentation, *J. Bioprocess. Biotech.* 5 (2) (2015) 203–212.
 [26] R. Pazzetto, S.B.d.S. Ferreira, E.J.S. Santos, C. Moriwaki, T.A. Guedes, G. Matioli, Preservation of *Bacillus firmus* strain 37 and optimization of cyclodextrin biosynthesis by cells immobilized on loofa sponge, *Molecules* 17 (8) (2012) 9476–9488.
 [27] H. Didden, J. Lodder, *Candida lipolytica*, in: J. Lodder, N.J.W. Kreger-Van Rij (Eds.), *The Yeast, A taxonomic study* Interscience publishers Inc., New York, 1952, pp. 550–553.
 [28] J.P. Van Der Walt, J.A. Von Arx, The yeast genus *Yarrowia gen. nov.*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 46 (6) (1980) 517–521.
 [29] J.A. Barnett, R.W. Payne, D. Yarrow, *Yeasts: Characteristics and Identification*, Cambridge University Press Cambridge, 1983.
 [30] J. Ruiz-Herrera, R. Sentandreu, Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*, *Arch. Microbiol.* 178 (6) (2002) 477–483.
 [31] A. Domínguez, E. Ferminan, C. Gaillardin, *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi, in: J.F. Ernst, A. Schmidt (Eds.), *Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts*, Karger, Basel, 2000, pp. 151–172.
 [32] L. Guevara-Olvera, C. Calvo-Mendez, J. Ruiz-Herrera, The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*, *Microbiology* 139 (3) (1993) 485–493.
 [33] Y. Waché, Microbial Production of Food Flavours, *Microbial Production of Food Ingredients Enzymes and Nutraceuticals*, (2013), pp. 175–193.

- [34] M. Raimbault, G. Germon, Procédé d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides, French Patent no. 76-06-677 (1976).
- [35] A. Durand, Bioreactor designs for solid state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 13 (2–3) (2003) 113–125.
- [36] A.B. Medeiros, A. Pandey, L.P. Vandenberghe, G.M. Pastore, C.R. Soccol, Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (1) (2006) 47–51.
- [37] I. Souchon, H.E. Spinnler, L. Dufosse, A. Voilley, Trapping of γ -decalactone by adsorption on hydrophobic sorbents application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast *sporidiobolus salmonicolor*, *Biotechnol. Tech.* 12 (2) (1998) 109–113.
- [38] P. Fickers, P.H. Benetti, Y. Waché, A. Marty, S. Mauersberger, Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications, *FEMS Yeast Res.* 5 (6–7) (2005) 527–543.
- [39] A. Pandey, Solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 81–84.
- [40] C.R. Soccol, E.S.F. da Costa, L.A.J. Letti, S.G. Karp, A.L. Woiciechowski, L.P. de Souza Vandenberghe, Recent developments and innovations in solid state fermentation, *Biotechnol. Res. Innov.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>.
- [41] T. Aggelopoulos, K. Katsieris, A. Bekatorou, A. Pandey, I.M. Banat, A.A. Koutinas, Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production, *Food Chem.* 145 (2014) 710–716.
- [42] H.H.M. Fadel, M.G. Mahmoud, M.M.S. Asker, S.N. Lotfy, Characterization and evaluation of coconut aroma produced by *Trichoderma viride* EMCC-107 in solid state fermentation on sugarcane bagasse, *Electron. J. Biotechnol.* 18 (1) (2015) 5–9.
- [43] L. Thomas, C. Larroche, A. Pandey, Current developments in solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 81 (2013) 146–161.
- [44] C.S. Farinas, Developments in solid-state fermentation for the production of bio-mass-degrading enzymes for the bioenergy sector, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52 (2015) 179–188.

1.2. Résultats complémentaires et discussion

La matrice solide est un aspect important à considérer en FMS. Afin d'avoir une matrice plus efficace pour la production de lactones, différentes matrices solides ont été utilisées. Dans un premier temps, des supports inertes (rafles de maïs, éponge de cellulose, éponge de courgette), des substrats (graines de ricin concassées, graines de ricin broyées), et des mélanges de support et substrat, ont été utilisés pour la croissance de levure *Y. lipolytica* W29. Cela a permis de sélectionner certaines matrices solides pour la production de lactones.

1.2.1. Cinétiques de croissance de *Y. lipolytica* sur différentes matrices solides

Les cinétiques de croissance de *Y. lipolytica* W29 sur différentes matrices solides sont présentées (Figure 11).

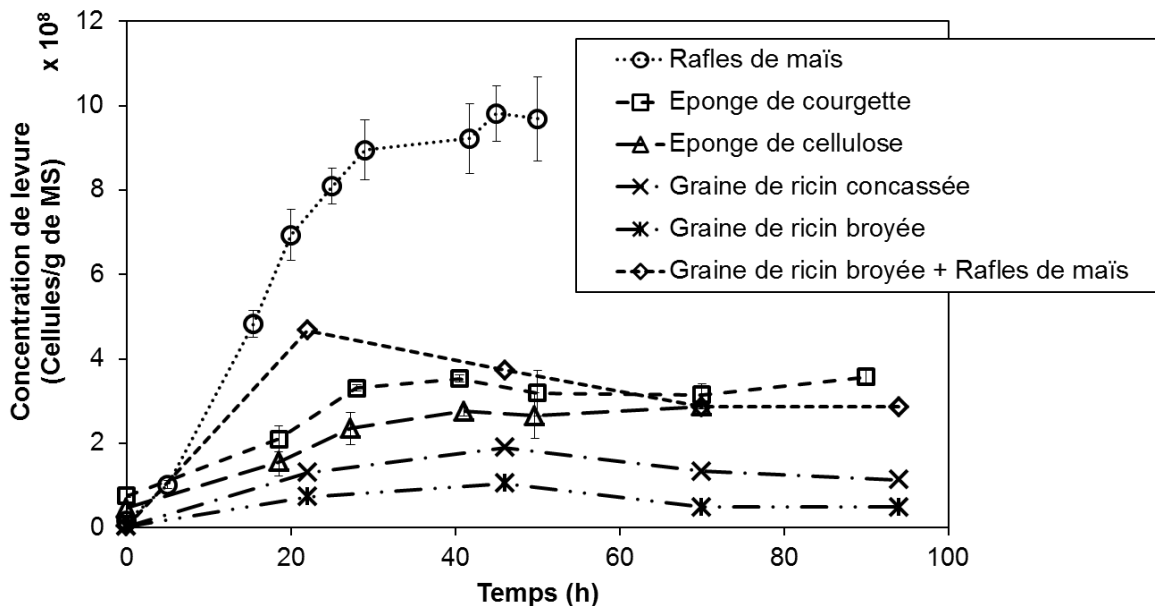


Figure 11 : Cinétiques de croissance de *Y. lipolytica* W29 sur différentes matrices solides dans des fioles à col large.

Les vitesses spécifiques de croissance et les concentrations maximales de levure ont été présentées dans *la publication 1* pour les trois supports inertes et les graines de ricin concassées. Le taux de croissance de levure sur les graines de ricin broyées a été très faible à cause du caractère compact du substrat. La disponibilité de l'oxygène autour du substrat est faible et la surface de contact entre le substrat, la levure et l'oxygène est petite. Pour améliorer l'aération en condition statique, les rafles de maïs ont été choisies pour être mélangées avec les graines de ricin broyées. Dans ce cas, la concentration maximale de levure a atteint une concentration plus élevée. Il est connu que les graines de ricin contiennent des toxines. Les

toxines comme des phytotoxines, de la ricine, de la ricinine, des hydrocyanures et des allergènes, ont été détectés dans des graines de ricin (Annongu and Joseph 2008).

Par ailleurs, la différence de forme de la matrice solide pourrait influencer la croissance des micro-organismes (Raimbault 1998). L'éponge de cellulose a été choisie car sa forme est plus facile à modifier par rapport aux autres matrices solides utilisées. Deux formes d'éponge de cellulose ont été utilisées, en cube (environ $0,5 \text{ cm}^3$) et en prisme rectangulaire (environ $1 \times 1 \times 0,15 \text{ cm}$). L'équation logistique différentielle a été utilisée pour étudier la croissance dans différentes conditions de modification de forme. Les vitesses spécifiques de croissance de *Y. lipolytica* W29 représentent $0,12 \text{ h}^{-1}$ pour les deux formes d'éponge utilisées (Figure 12). De plus, les concentrations maximales de croissance de levure représentent $2,9 \cdot 10^8$ et $6,04 \cdot 10^8$ cellules/g de MS pour la culture avec l'éponge de cellulose en forme de cube et en forme de prisme rectangulaire, respectivement. Il faut rappeler que, pour garder le même volume de culture solide qui est fixé à 200 mL dans une fiole de 500 mL, des masses différentes sont utilisées, soient 5 g d'éponge en cube et 4 g d'éponge en prisme rectangulaire. Donc, la surface de contact d'oxygène est plus élevée avec l'éponge rectangulaire. Par conséquent, la concentration maximale de levures a atteint une valeur plus élevée avec l'éponge rectangulaire.

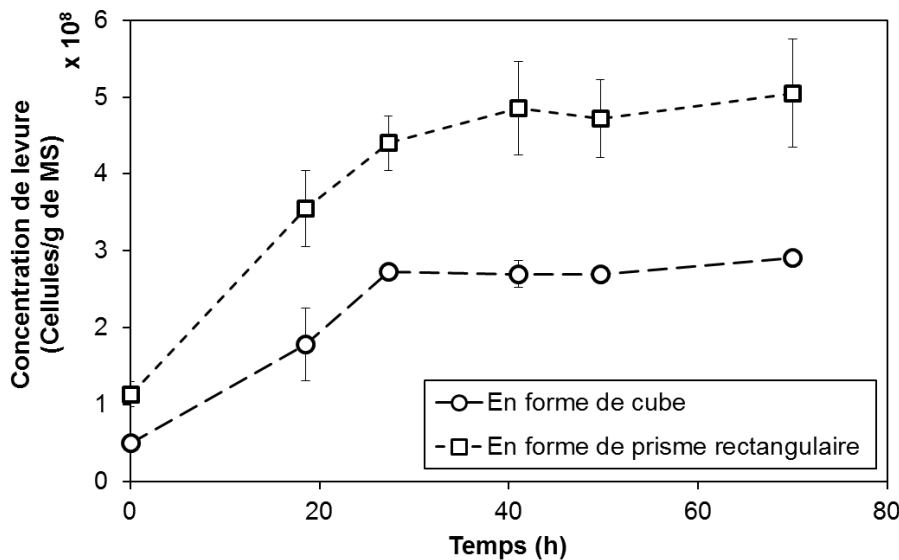


Figure 12 : Cinétiques de croissance de *Y. lipolytica* W29 dans différentes formes d'éponge de cellulose.

La **Figure 13** représente la répartition de levure dans les différents supports utilisés. Les deux formes d'éponge de cellulose contiennent des cellules de levure sur la surface et également dans l'éponge (**Figure 13A**). Sur les autres supports (rafles de maïs (**Figure 13B**) et éponge de courgette (**Figure 13C**)), les cellules de levure sont réparties sur les surfaces.

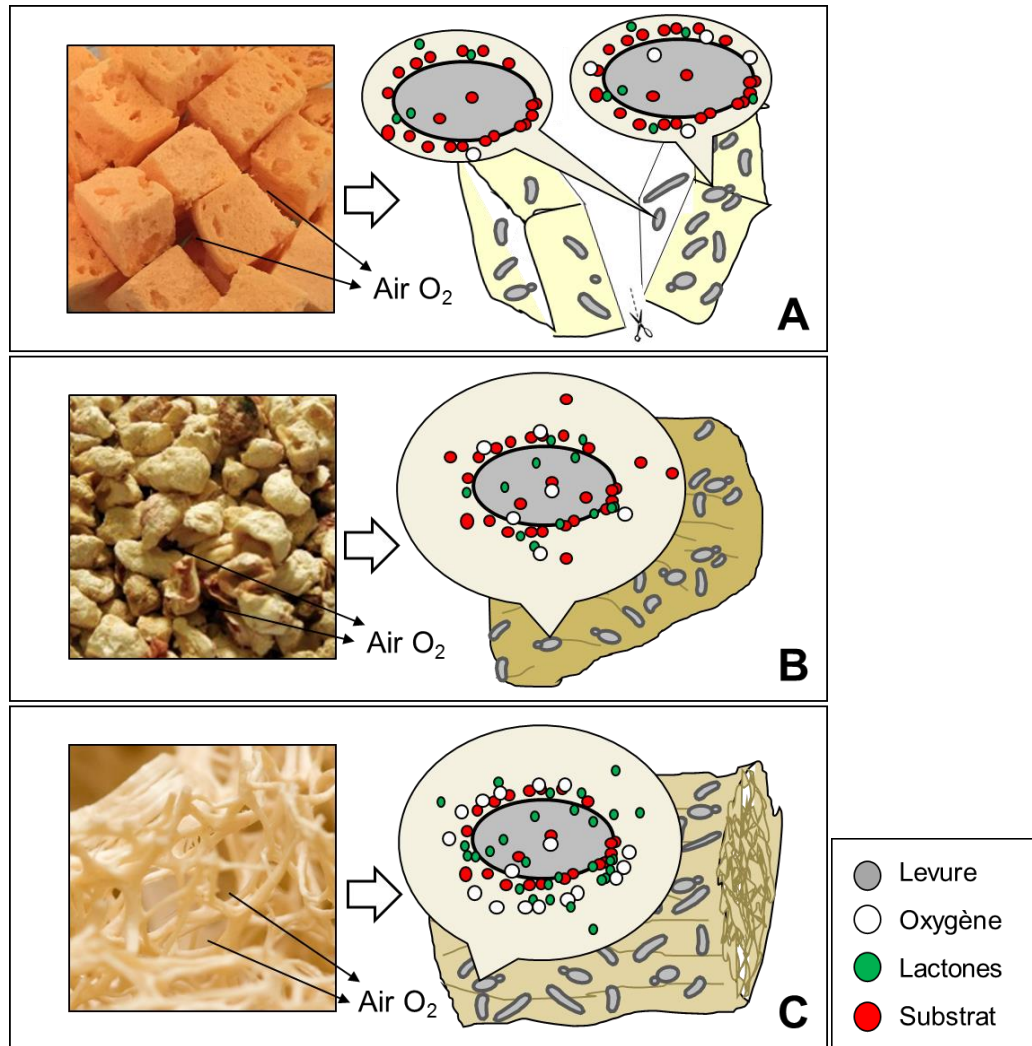


Figure 13 : Schéma de présentation de la répartition des levures, de l'oxygène et du substrat dans différents supports (A) éponge de cellulose, (B) rafles de maïs, (C) éponge de courgette.

1.2.2. Cinétiques de production de lactones sur différents supports

Les cinétiques de production de lactones en utilisant des rafles de maïs sont présentées dans la **Figure 14**. Elles sont similaires aux cinétiques de production de lactones avec l'éponge de courgette comme support solide (**Fig. 6 de publication 1**). Les concentrations maximums de lactones sont, à 29 h, de 31 mg/L, 570 mg/L, 28 mg et 16 mg/L à 42 h pour la γ -décylactone, la 3-hydroxy- γ -décylactone, la déc-2-én-4-olide et la déc-3-én-4-olide, respectivement.

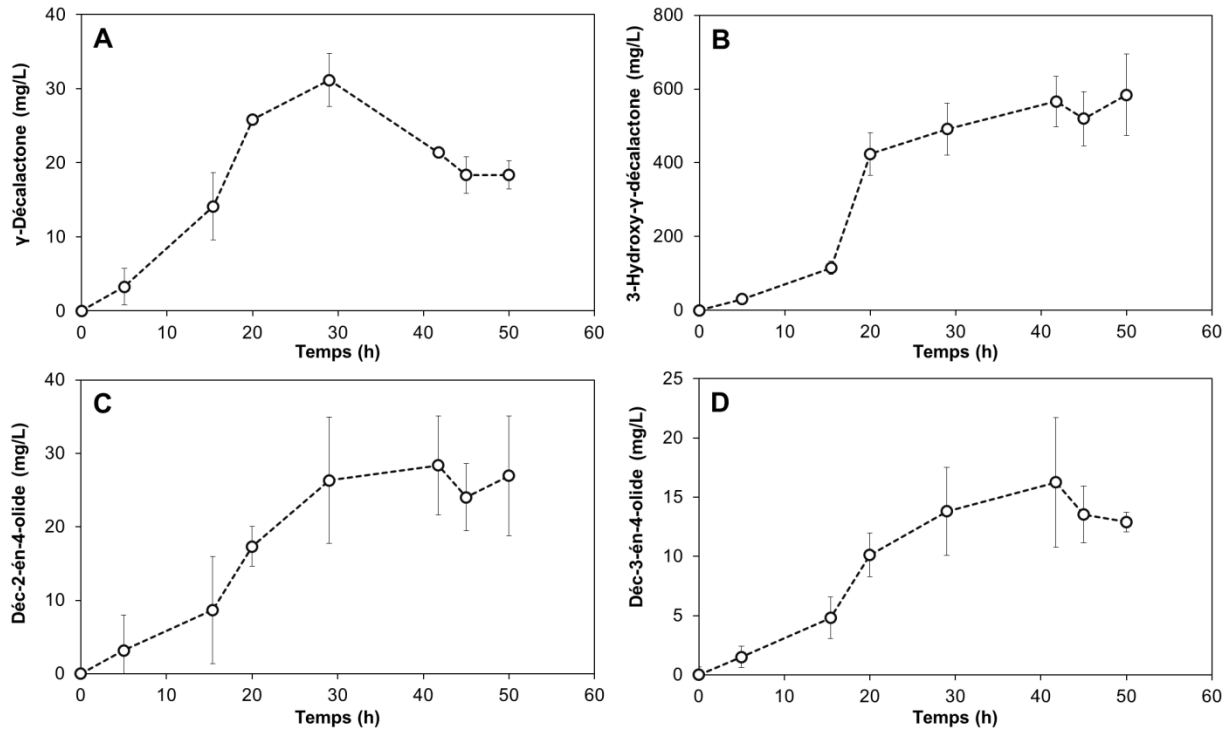


Figure 14 : Cinétiques de production de lactones en utilisant les rafles de maïs comme support inerte.

Pour la production de lactones en utilisant différentes formes d'éponge de cellulose, les cinétiques de production entre les deux conditions sont très similaires (Figure 15). Par contre, elles sont différentes des cinétiques de production de lactones avec les rafles de maïs et l'éponge de courgette comme supports solides. La γ -déalactone a été produite avec une concentration maximale de 50 mg/L à 19 h, ensuite cette concentration a diminué jusqu'à une concentration d'environ 5 mg/L à 70 h pour les deux formes d'éponges utilisées. Aussi, l'hydroxy-lactone a été produite avec une concentration de 770 mg/L à 27,5 h, et cette concentration a diminué jusqu'à une centaine de mg/L à 70 h. La dégradation de γ -déalactone a été démontrée (Endrizzi-Joran 1994; Waché et al. 2001) même si la voie de dégradation n'a pas encore été définie. Une dégradation de l'hydroxy-lactone et des décénolides dans les conditions d'utilisation l'éponge de cellulose a été observée. Dans les conditions d'utilisation de l'éponge de courgette et des rafles de maïs, les γ -déalactones ont été produites pendant la phase exponentielle de croissance. D'ailleurs, l'hydroxy-lactone et les décénolides ont continué à être produits pendant la phase stationnaire. En revanche, les quatre lactones produites dans les conditions d'utilisation des éponges de cellulose ont été produites pendant les deux tiers de la phase exponentielle de croissance et ensuite ces concentrations ont diminué pendant le dernier tiers de la phase exponentielle et la phase stationnaire de

croissance. Donc, l'hydroxy-lactone et les décénolides peuvent être dégradés comme des substrats pendant le dernier tiers de la phase exponentielle de croissance lors de l'utilisation de l'éponge de cellulose comme support chez *Y. lipolytica*. En FML, Escamilla-García (2008) a divisée la croissance de levure en trois phases. La première phase, les cellules de levure se multiplient, utilisent du substrat et de l'oxygène et elles produisent de la γ -déalactone. La deuxième phase, les cellules sont en phase stationnaire, elles dégradent la γ -déalactone, produisent l'hydroxy-lactone et continuent à utiliser de l'oxygène mais à un taux plus faible. Dans la dernière phase, les cellules se lysent, elles n'utilisent plus d'oxygène mais consomment l'hydroxy-lactone alors que la γ -déalactone et le substrat ont disparu du milieu de biotransformation.

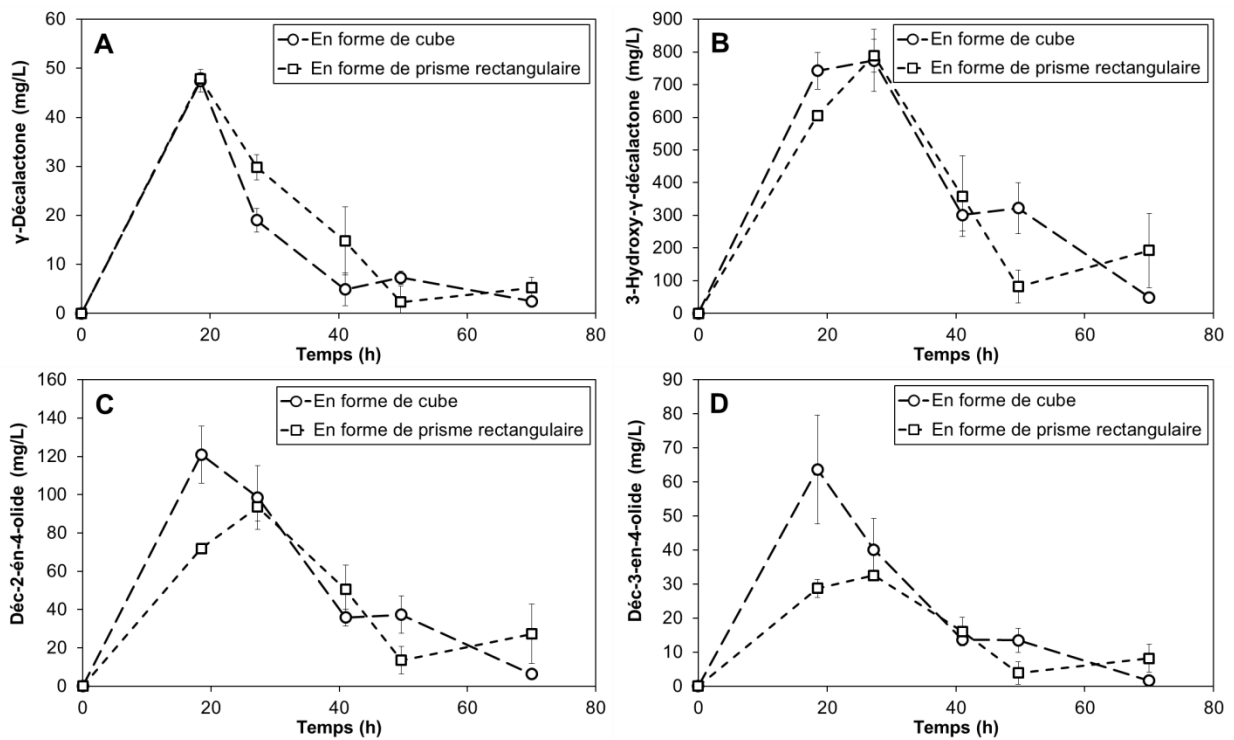


Figure 15 : Cinétiques de production de lactones en utilisant l'éponge de cellulose comme support inerte.

Pendant la croissance et la production de lactones en FMS, le substrat et la levure sont fixés sur le support et ils sont placés dans la fiole à col large en condition d'aération statique (Figure 13). La croissance sur l'éponge de courgette et sur les rafles de maïs ont lieu sur les surfaces, et il n'y a pas de dégradation d'hydroxy-lactone et de décénolides. Par contre, la croissance de levure dans l'éponge de cellulose a été localisée sur la surface et à l'intérieur de l'éponge. La croissance des levures a continué mais les lactones ne sont plus produites. Lors de la croissance, la quantité d'oxygène interne dans l'éponge est plus faible en comparaison à

celle sur la surface. Dans ce cas, le métabolisme des levures pourrait être modifié. La levure pourrait dégrader toutes les sources de carbone à proximité pour sa croissance. Donc, la texture du support peut influencer le métabolisme chez *Y. lipolytica* pour la production de lactones en FMS.

1.3. Conclusion

Suite aux résultats de *la publication 1* et aux résultats complémentaires, il apparaît que la levure, *Y. lipolytica* W29 peut croître sur toutes les matrices solides utilisées. La texture de chaque matrice solide est un paramètre important pour la croissance de la levure ainsi que la production de lactones en raison de sa propriété de rétention d'eau et de sa surface de contact avec l'oxygène de l'air. Les différents supports/substrats ont des propriétés granulométriques différentes. Il est difficile de modifier la texture d'une matrice solide naturelle. Cependant, l'impact de la forme du support a été étudié en utilisant l'éponge de cellulose. La modification de surface de contact (entre le substrat, l'oxygène et la levure) n'a pas influencé la vitesse spécifique de croissance et la production de lactones mais elle a influencé la concentration maximale de croissance. De surcroît, les cinétiques de production de lactones en FMS avec les supports inertes comme l'éponge de courgette et les rafles de maïs ressemblent aux cinétiques de production en FML. L'hydroxy-lactone a été le principal métabolite dans nos conditions expérimentales. Par ailleurs, les quatre γ -décalactones ont été dégradées lors de l'utilisation des éponges de cellulose comme supports. En résultat nous partons ici de l'hypothèse qu'une fois la production de lactones a atteint ses concentrations maximales, si la croissance des levures se poursuit, elle va se faire aux dépens de lactones.

L'éponge de courgette a été considérée comme le support inerte le plus adapté pour la production de lactones dans nos conditions car les lactones produites le sont avec un meilleur rendement. Ce support a été choisi pour étudier l'effet de l'aération/oxygénation sur la voie métabolique impliquée pour la production de lactones en FMS dans trois différents types de réacteurs FMS. Le rendement de lactones a été très faible en utilisant les flacons à petit espace de tête à cause de la faible disponibilité d'oxygène. En fiole à col large, l'hydroxy-lactone a été produite à une concentration très importante, soit 5 g/L. Les lactones produites en mini-réacteur peuvent être entraînées lors de l'aération forcée.

Partie 2 : Entraînement de lactones au cours de leur production

2.1. Cinétiques d'entraînement de γ -décylactone « pure »

Avant d'étudier l'entraînement de lactones pendant la production lors de l'aération forcée en mini-réacteur, il est important de connaître dans un premier temps s'il y a des lactones perdues pendant la production en condition d'aération statique en fiole à col large. Dans ce but, on a tout d'abord utilisé la γ -décylactone « pure » ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) pour imprégner le support solide et testé en fioles à col large et en mini-réacteurs à aération forcée. La **Figure 16** représente les concentrations en fonction du temps de γ -décylactone « pure » en fiole à col large. La **Figure 17** représente les cinétiques de l'entraînement et les courbes de modèle de l'entraînement de γ -décylactone « pure » en mini-réacteur à aération forcée.

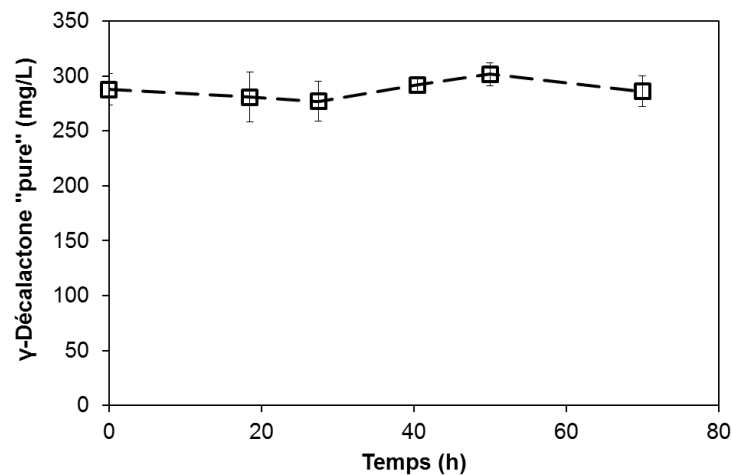


Figure 16 : Concentrations en fonction du temps de γ -décylactone « pure » en FMS en fiole à col large.

Sur la **Figure 16** : on voit que la concentration de γ -décylactone « pure » inoculée avec une concentration initiale autour de 300 mg/L en FMS reste relativement stable jusqu'à 70 h d'incubation. C'est-à-dire qu'il n'y a pas de γ -décylactone « pure » entraînée dans la condition d'aération statique en fiole à col large. Sur la **Figure 17** : les concentrations de γ -décylactone « pure » diminuent au cours du temps quelles que soient les concentrations initiales utilisées (300 mg/L, 900 mg/L, et 4500 mg/L) lors de l'aération forcée en mini-réacteurs. Pour étudier les cinétiques d'entraînement à différentes concentrations initiales de γ -décylactone « pure » utilisées, une équation logistique différentielle modifiée a été employée. Le modèle utilisé a permis de relativement bien estimer pour toutes les conditions de concentrations initiales de γ -décylactone « pure » utilisées. Les valeurs obtenues par une itération successive des paramètres de modèle avec des résultats moyens de chaque point cinétique sont physiquement

acceptables. Les vitesses spécifiques d'entraînement sont respectivement $0,060 \text{ h}^{-1}$, $0,051 \text{ h}^{-1}$ et $0,046 \text{ h}^{-1}$ avec des concentrations initiales γ -décalactone « pure » 300 mg/L, 900 mg/L et 4500 mg/L utilisées.

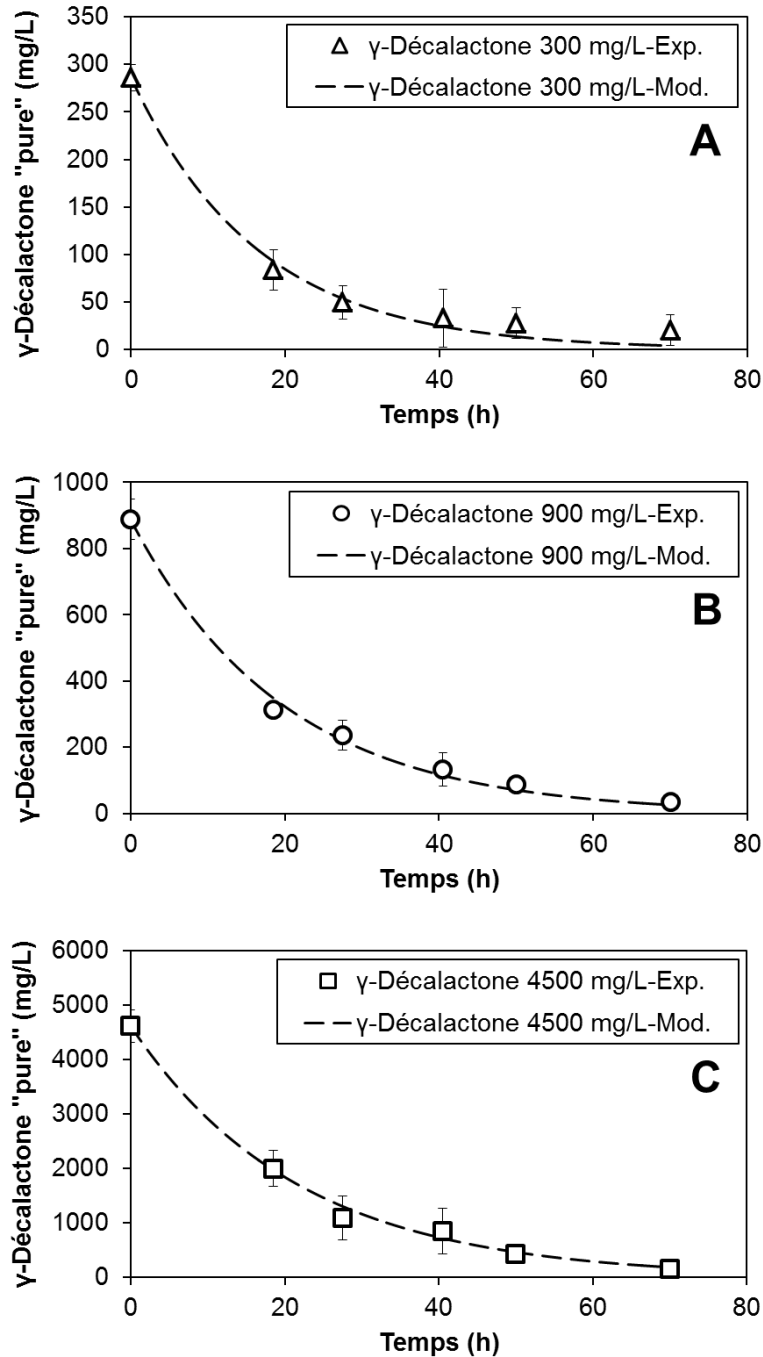


Figure 17 : Cinétiques d'entraînement de γ -décalactone « pure » en FMS en mini-réacteur à aération forcée.

2.2. Cinétiques d'entraînement des lactones produites

Afin d'obtenir des lactones « naturelles », la bioconversion dans les fioles à col large a d'abord été réalisée. Les activités de la levure dans les cultures solides (support + lactones + levures) ont été désactivées avant de les transférer dans les mini-réacteurs à aération forcée. La **Figure 18** représente les cinétiques d'entraînement des différentes lactones naturellement produites en mini-réacteurs à aération forcée. On trouve que la γ -déalactone a été entraînée rapidement pendant les 30 premières heures (**Figure 18A**). Les autres lactones, la 3-hydroxy- γ -déalactone (**Figure 18B**) et les décénolides (**Figure 18C-D**) ont eu les cinétiques d'entraînement très similaires. Les vitesses spécifiques d'entraînement de différentes lactones représentent respectivement $0,019 \text{ h}^{-1}$, $0,012 \text{ h}^{-1}$ et $0,014 \text{ h}^{-1}$ pour la γ -déalactone, la 3-hydroxy- γ -déalactone et les décénolides.

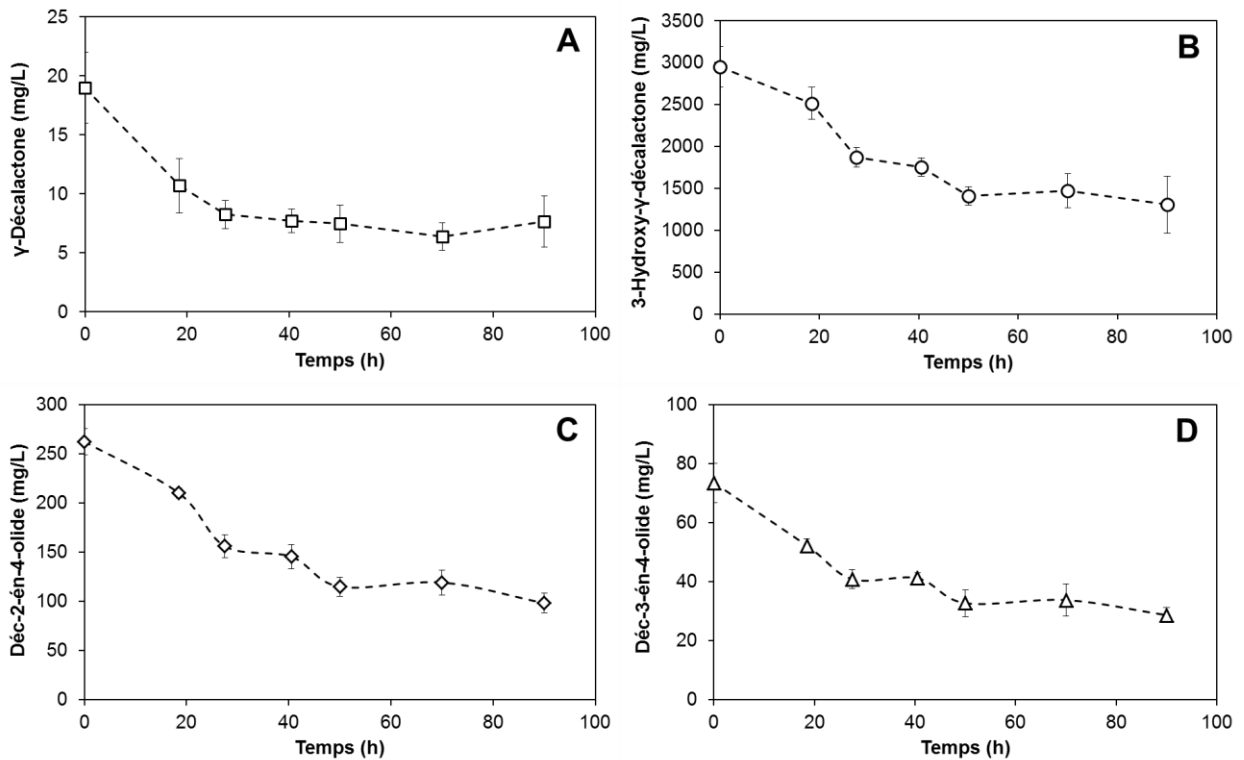


Figure 18 : Cinétiques d'entraînement de γ -déalactones « naturelles » en FMS lors de l'utilisation des mini-réacteurs à aération forcée.

2.3. Estimation des concentrations des lactones entraînées par aération forcée

La modélisation et la prédiction sont des possibilités pour étudier les lactones entraînées lors de production en utilisant l'aération forcée.

Présentation du modèle :

Pour la production de lactones en FMS, les lactones peuvent être adsorbées dans la matrice solide ou être à l'état gazeux. Surtout dans ce dernier cas, elles peuvent être entraînées par l'aération forcée. Le modèle suivant permet de prédire des concentrations totales de lactones produites en cas d'utilisation de l'aération forcée. Le modèle est présenté dans l'équation (Eq. 5):

$$A(t) = S(t) \times \left[1 + \left(\frac{S_0 - S'(t)}{S'(t)} \right) \right] \text{ ou } A(t) = S(t) \frac{S_0}{S'(t)} \quad (\text{Eq. 5})$$

A : concentration totale de composée produite (mg/L)

S : concentration de composée extrait de matrice solide (mg/L)

S' : concentration de composée extrait de matrice solide en essai d'entraînement (mg/L)

S_0 : concentration de composée extrait de matrice solide en essai d'entraînement à $t=0$ (mg/L).

Interprétation de modèle

En supposant que A , S et E représentent respectivement des concentrations de l'arôme total produit, de l'arôme extrait du support et de l'arôme entraîné dans l'essai de production d'arômes en aération forcée,

on peut écrire $A = S + E$.

Pour E on peut écrire $E = S \times \frac{\%E_{entraînée}}{100}$

En supposant encore que : S_0 , S' et E' représentent respectivement des concentrations de l'arôme initial, de l'arôme extrait du support et de l'arôme entraîné dans l'essai de l'entraînement d'arômes en aération forcée.

On peut écrire $E' = S' \times \frac{\%E'_{entraînée}}{100} \Rightarrow \% E' = \frac{E' \times 100}{S'}$

Pour le même composé d'arôme et la même condition d'aération, $\% E = \% E'$

$$\Rightarrow A = S + \left[S \cdot \frac{(S_0 - S') \times 100}{S' \cdot 100} \right] = S + \left[S \cdot \left(\frac{S_0 - S'}{S'} \right) \right] = S \cdot \left[1 + \left(\frac{S_0 - S'}{S'} \right) \right] = S \cdot \frac{S_0}{S'}$$

En utilisant l'équation (Eq. 5), les différentes lactones totales produites en mini-réacteur ont été calculées. Les cinétiques des lactones extraites du support et des lactones totales produites en mini-réacteurs avec aération forcée sont présentées dans la **Figure 19**.

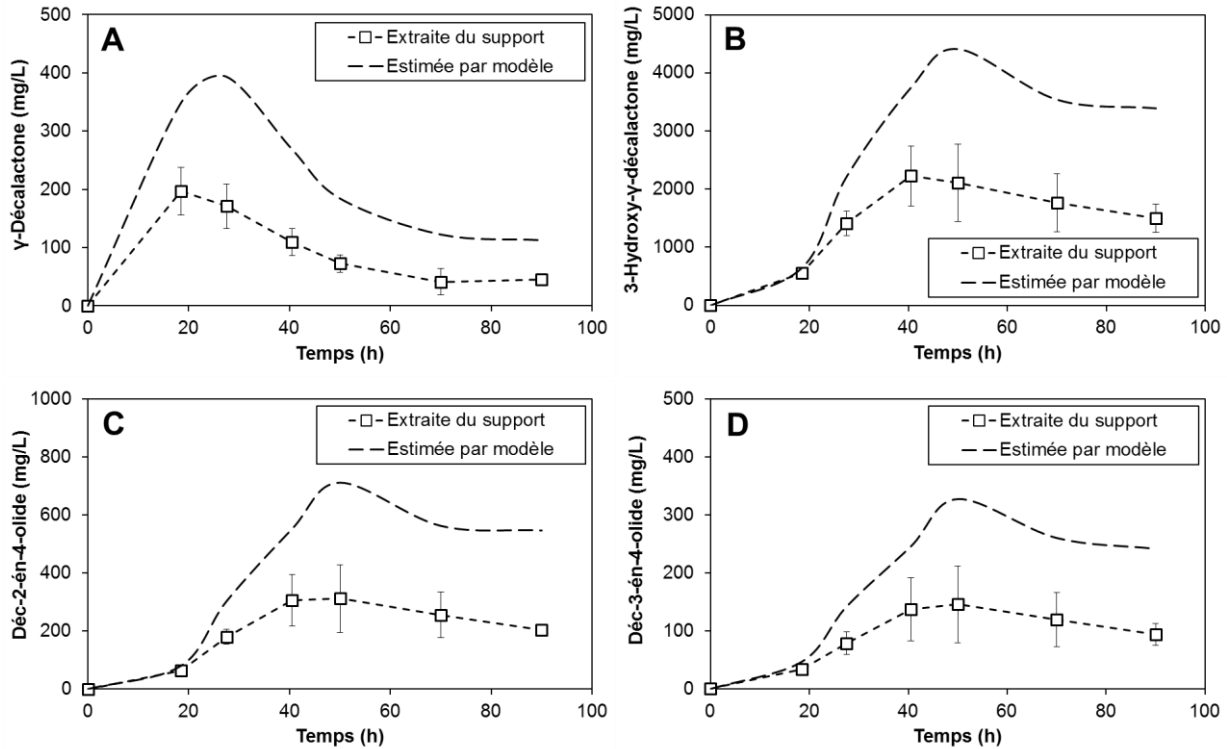


Figure 19 : Cinétiques de production de lactones par mini-réacteur à aération forcée.

2.4. Discussion

Les différentes lactones ont été utilisées pour montrer les effets d'entraînement dans différentes conditions d'aération. Les essais d'entraînement en fiole à col large et en mini-réacteur à aération forcée sont réalisés avec la γ -décalactone « pure ». Il n'y a pas d'effet d'entraînement de γ -décalactone « pure » retrouvé avec la condition d'aération statique en fiole à col large. Par contre, la γ -décalactone « pure » a été entraînée très rapidement dans la condition d'utilisation aération forcée. Ceci peut être prouvé puisque les composés d'arôme dans les matrices solides peuvent être entraînés en raison de nombreux processus impliquant des réactions chimiques, des transferts entre phases et des interactions physicochimiques (Charles et al. 1996; Druaux et al. 1998; Seuvre and Voilley 2017).

Les γ -décalactones naturellement produites ont été utilisées seulement pour les essais d'entraînement en mini-réacteur à aération forcée par ce qu'il n'y avait pas de γ -décalactone « pure » entraînée lors de l'utilisation de l'aération statique. La vitesse d'entraînement

moyenne de γ -décylactone « naturelle » a été 3,6 fois moins par rapport celle de γ -décylactone « pure » dans la même condition d'aération forcée. Quelques aspects peuvent influencer cette différence comme la concentration, la nature du composé volatile, les interactions physicochimiques et en particulier les caractéristiques hydrophobes (Le-Thanh 1992; Souchon 1994; Nongonierma et al. 2003; Seuvre and Voilley 2017). Les lactones « naturelles » utilisées sont des lactones produites par bioconversion, elles ont tendances à être fixées strictement au support et aux cellules de levure. Par contre, la γ -décylactone « pure » imbibée dans le support, est présente dans un état moins stable que celle de γ -décylactone « naturelle ».

Parmi les quatre lactones « naturelles », la γ -décylactone est entraînée plus rapidement en comparaison à la 3-hydroxy- γ -décylactone et aux décénolides. Pour expliquer cette différence, la concentration initiale pourrait influencer la vitesse d'entraînement. De plus, on peut noter les différentes caractéristiques physicochimiques, spécifiquement les fonctions chimiques de chaque composé. La 3-hydroxy- γ -décylactone a une fonction hydroxyle (-OH) sur le carbone numéro trois de la chaîne latérale. Par hypothèse, cette molécule serait plus stable dans le milieu de culture qui contient environ 70 % de teneur en eau comparé à la γ -décylactone et aux décénolides. Par ailleurs, elle a une masse moléculaire de 189 g/mol, plus grande que celle de la γ -décylactone (170 g/mol) et que celles des décénolides (168 g/mol). Pour ces deux raisons (hydrophobicité et masse molaire), la γ -décylactone et les décénolides peuvent être plus volatile que l'hydroxy-lactone. Les décénolides, déc-2-én-4-olide et déc-3-én-4-olide ont les mêmes vitesses spécifiques d'entraînement. Elles ont une masse moléculaire, très proche de celle de la γ -décylactone mais leurs vitesses spécifiques d'entraînement ont une valeur plus faible que celle de la γ -décylactone. Dans ce cas-là, la double liaison des deux molécules pourrait jouer sur leurs volatilités. Il est difficile de comparer les caractéristiques physicochimiques de ces quatre lactones seule les propriétés de la γ -décylactone ont été étudiées et non pas celles de l'hydroxy-lactone et des décénolides.

Le modèle mathématique pour estimer la production de lactones totales en mini-réacteur à aération forcée est basé sur les effets d'entraînement des mêmes types de lactones. Ce modèle est basé sur le pourcentage d'arômes entraînés dans les essais de l'entraînement. Pour pouvoir utiliser ce modèle, les essais de l'entraînement doivent être réalisés dans les mêmes conditions d'aération et spécialement sur la nature des arômes utilisés.

2.5. Conclusion

En conclusion, différentes lactones ont été utilisées pour étudier les effets de l'entraînement en aération statique et aération forcée. Aucun entraînement de lactone n'a été retrouvé lors de l'utilisation de l'aération statique en fiole à col large. En revanche, les lactones ont été entraînées lors d'utilisation de l'aération forcée en mini-réacteur. On peut dire également qu'il y a des lactones entraînées pendant la bioconversion en utilisant l'aération forcée. Pour résoudre ce problème, la modélisation et la mise en place d'un système de récupération sont importants. Dans ce travail, un modèle simple a été utilisé pour estimer la production totale de lactones en cas d'utilisation de l'aération forcée. Une validation du modèle doit être confirmée. Un système de récupération devrait être mis en place. Le principe et le choix du système à mettre en place est décrit dans *la publication de revue «Aroma compounds production by solid state fermentation, importance of recovery systems»* sur la partie : *Online aroma recovery systems in aeration SSF*.

Partie 3 : Effet de l'oxygène sur la croissance et le métabolisme chez *Y. lipolytica* utilisée pour la production de lactones

Publication 2 : Effet de concentrations d'oxygène élevées sur la levure *Yarrowia lipolytica* pour la production de γ -décalactones en FMS

S. Try*, A. Voilley, J. De-Coninck, T. Chunghieng et Y. Waché

« Soumise à *Applied Microbiology and Biotechnology* »

Résumé

Objectifs : Cette partie vise à étudier l'effet de la disponibilité de l'oxygène sur la voie métabolique de β -oxydation pour la production de lactones en FMS.

Méthodes et résultats : L'air enrichi en oxygène jusqu'à différentes concentrations initiales (20 %, 30 %, 40 % et 50 %) a été injecté dans la culture contenant l'éponge de courgette imbibée du milieu de biotransformation. Le meilleur rendement a été observé dans la condition de 30 % d'oxygène. La γ -décalactone et la 3-hydroxy- γ -décalactone ont été produites avec des concentrations maximales de 270 mg/L et 1190 mg/L, respectivement. En utilisant des ratios initiaux d'oxygène plus élevés (40% et 50%), une concentration plus élevée de levures en phase stationnaire et une accumulation légèrement plus élevée de 3-hydroxy- γ -décalactone ont été observées. Le travail a été réalisé également avec de l'injection d'air enrichi en oxygène 30 % en plusieurs fois pendant la production. Lorsque l'air enrichi en oxygène (30 %) a été injecté deux fois (à 0 h et 20 h), la 3-hydroxy- γ -décalactone a atteint une concentration plus élevée de 1620 mg/L et a atteint une concentration très élevée de 4600 mg/L pour plusieurs injections (à 0h, 20 h, 35 h, 48 h et 60 h).

Conclusion et perspectives : Cette étude suggère que l'oxygène est nécessaire à la production de 3-hydroxy- γ -décalactone. L'oxygène peut être utilisé préférentiellement pour les oxydations d'acides gras à longue chaîne plutôt que pour les acides gras à C10. D'autre part, la production de γ -décalactone peut être améliorée en optimisant une condition de croissance pour atteindre un taux de croissance spécifique très élevé. Une faible disponibilité en oxygène dans le système en phase de croissance stationnaire a conduit à une inhibition de la dégradation de la γ -décalactone. À partir du présent travail, un système alternatif est proposé comme un nouveau modèle pour étudier l'effet de la concentration élevée en oxygène dans la FMS.

Mots clés : Fermentation en milieu solide ; *Yarrowia lipolytica* ; Production d'arômes ; β -Oxydation ; Eponge de courgette ; Huile de ricin ; γ -Lactones ; Air enrichi en oxygène.

Effect of elevated oxygen concentration on the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of γ -decalactones in solid state fermentation

Sophal TRY^{1,2,4,*}, Andrée VOILLEY¹, Thavarith CHUNHIENG^{2,4}, Joëlle DE-CONINCK^{1,3},
Yves WACHÉ^{1,4}

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

²*Department of Chemical Engineering and Food Technology, Institute of Technology of Cambodia, Russian Federation Blvd., P.O. Box 86, Phnom Penh, Cambodia*

³*Welience-Plateform for Development in Biotechnology, SATT GRAND EST, 17 rue Sully, 21065 Dijon, France*

⁴*Network Tropical Fermentation*

*Corresponding author. Address: AgroSup Dijon/University of Burgundy - Franche-Comté, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. E-mail address: try@itc.edu.kh (S. Try).

Abstract

To study the effect of elevated oxygen concentrations on β -oxidation for the production of lactones by *Yarrowia lipolytica* W29 in solid state fermentation (SSF), experiments using oxygen-enriched air with different initial concentrations of oxygen ratio were carried out. Growth kinetics using oxygen ratio of 30% reached its stationary phase earlier than other conditions used. In addition, the production of γ -decalactone and 3-hydroxy- γ -decalactone reached the maximal concentrations of 270 mg L⁻¹ and 1190 mg L⁻¹, respectively. Using higher initial oxygen ratios (40% and 50%), an incomplete growth inhibition occurred and resulted in a higher concentration of yeast at stationary phase and a slightly higher 3-hydroxy- γ -decalactone accumulation. When oxygen-enriched air (oxygen ratio of 30%) was injected twice (at 0 h and 20 h), 3-hydroxy- γ -decalactone reached a higher concentration (1620 mg L⁻¹) and it reached a very high concentration of 4600 mg L⁻¹ in the condition of oxygen-enriched air injected many times (at 0 h, 20 h, 35 h, 48 h and 60 h). This study suggested that oxygen is required for the production of 3-hydroxy- γ -decalactone. Oxygen may be consumed preferentially for long chain fatty acid oxidations rather than at C10-level. Furthermore, the production of γ -decalactone may be improved by optimizing the growth conditions to reach a very high specific growth rate. A low oxygen availability in the system at stationary growth phase led to an inhibition of γ -decalactone degradation. From the present work, an alternative system is proposed as a novel model to study the effect of elevated oxygen concentration in SSF.

Keywords

Solid state fermentation; *Yarrowia lipolytica*; Oxygen-enriched air; β -Oxidation; Castor oil; Aroma production

Introduction

The catabolism of hydroxylated fatty acid by yeast results in the accumulation of the popular flavoring compounds, γ -decalactones (Endrizzi et al. 1996; Waché et al. 2003). In submerged fermentation (SmF) as well as in solid state fermentation (SSF), the degradation of C18-hydroxylated fatty acids by *Y. lipolytica* resulted in the accumulation of four interesting lactones, γ -decalactone, 3-hydroxy- γ -decalactone, dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide (Gatfield et al. 1993; Waché et al. 2001; Waché et al. 2003; Try et al. 2018). The main lactone produced, 3-hydroxy- γ -decalactone, has no sensorial properties while the initially desired lactone was γ -decalactone and the other two decenolides exhibit strong fruity notes and mushroom notes for dec-3-en-4-olide and dec-2-en-4-olide, respectively (Gatfield et al. 1993; Escamilla-García et al. 2009; Waché 2013b). β -Oxidation is the main pathway of fatty acid degradation to produce these lactones with yeast cells. *Y. lipolytica* has been known as a model organism for metabolism of hydrophobic compounds (Fickers et al. 2005). In yeast, β -oxidation is known to be located in peroxisomes. It is composed of four main reactions, two oxidations, a hydration and a cleavage reaction (Fig. 1). Waché (2013b) suggested that β -oxidation cycle could be divided into two parts, leading to intermediates exiting at two oxidation levels (oxidase and dehydrogenase). Genetic modification of metabolic pathways (Pagot et al. 1998; Wang et al. 1998; Waché et al. 2000; Groguenin et al. 2004; Escamilla-García et al. 2007b) as well as of environmental conditions (Escamilla-García et al. 2007a; Escamilla-García et al. 2009; Escamilla-García et al. 2014; Braga and Belo 2015) have been reported to impact greatly β -oxidation fluxes, with a particular effect on the accumulation of γ -decalactone and 3-hydroxy- γ -decalactone. Oxygen availability is the key parameter driving the extent of oxidation involved in the production of these lactones (Waché et al. 2001; Waché et al. 2003; Escamilla-García et al. 2007a; Escamilla-García et al. 2009; Waché 2013b; Waché 2013a; Escamilla-García et al. 2014). Recent works have proposed different processes based on the importance of aeration in β -oxidation pathways such as the control of K_{La} in a stirred tank bioreactor (Escamilla-García et al. 2007a), in an airlift biofilm reactor (Escamilla-García et al. 2014), the use of a step-wise fed-batch culture (Braga and Belo 2015) and of airlift and stirred tank bioreactors (Braga et al. 2015). To provide a tight contact of the co-substrate (oxygen) with yeast cells, a SSF process has been investigated recently for the production of lactones from castor oil as the substrate by using luffa sponge as an inert solid support (Try et al. 2018). In this work, different reactor types have been used to emphasize the importance of oxygen availability in the system. It has been reported that, 3-hydroxy- γ -

decalactone was produced up to 5 gL⁻¹ after 70 h in a wide-mouth Erlenmeyer flask. However, the use of forced aeration reactors resulted in lactones stripping. The present work aims at investigating the effect of oxygen availability on the pathway of production of lactones in SSF. In that goal, an alternative SSF system was used in order to avoid the stripping of the volatile compounds by forced aeration. To understand the effect of elevated oxygen concentration on the β -oxidation metabolic fluxes, oxygen-enriched air injections were used.

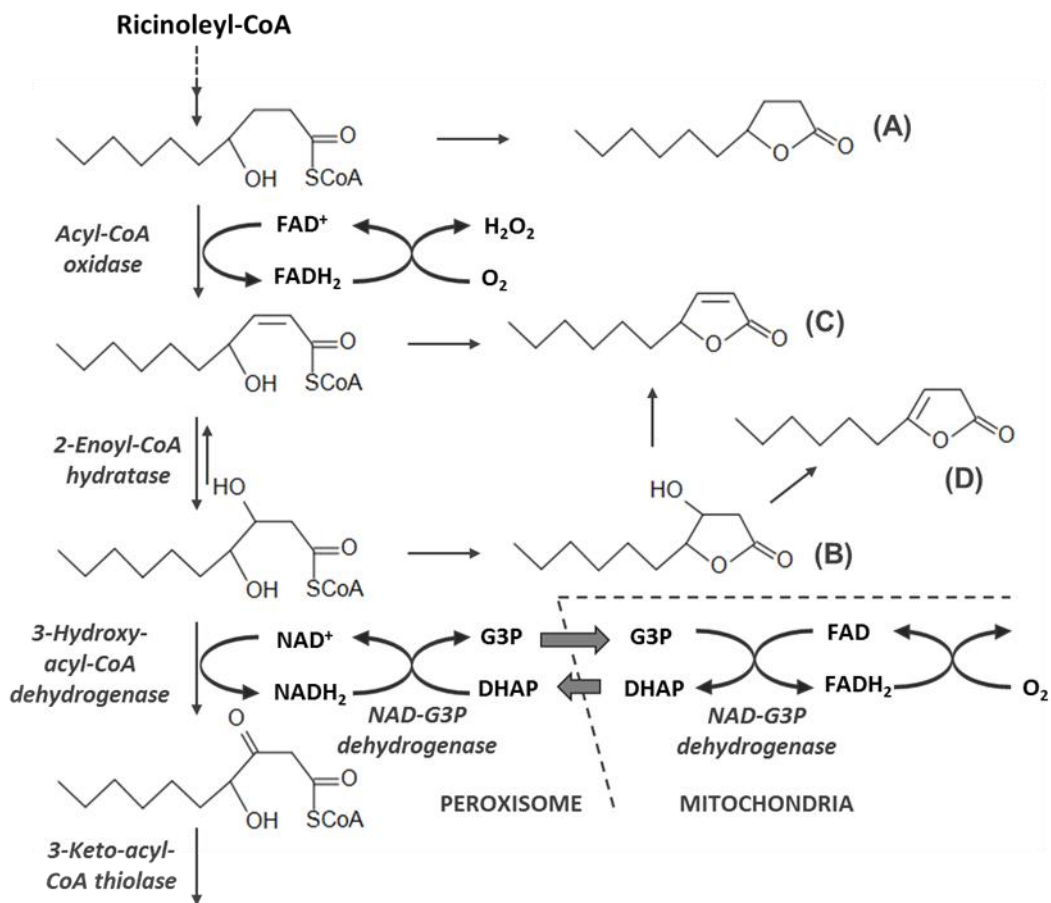


Fig. 1 β -Oxidation loop at the C10 level of the degradation of ricinoleyl-CoA, enzymatic activities, co-substrate (oxygen) cofactor requirements and reaction products.

Materials and methods

Solid support, biotransformation medium, strain and inoculum preparation

Luffa sponge was used as the solid support in this study. Luffa sponge was obtained from the dried fruit of Luffa free of seeds (origin Cambodia). It was cut into rectangular prism shape (approximately 1 cm by 1 cm by 0.5 cm). The pretreatment procedure of solid support,

biotransformation medium, strain and inoculation preparation have been described in Try et al. (2018).

Solid state fermentation conditions

The solid support was humidified by the haft of biotransformation media prepared and then autoclaved at 121 °C for 15 min. It was then adjusted to a final moisture content of 70 % with yeast-cell-inoculated biotransformation media. SSF process was carried out in 24 mL bottles filled 2 g luffa sponge support impregnated with yeast-cell-inoculated biotransformation media. SSF bottles were then sent to the injection of the oxygen-enriched air which containing different concentrations of oxygen. They were then placed upside-down during incubation in an incubator 27 °C. Two categories of oxygen-enriched air injection were carried out: a) air containing different concentrations of oxygen (20 %; 30 %; 40 % and 50 %) injection at 0 h of SSF process and b) air containing 30 % of oxygen, i) injection at 0 h and 20 h and ii) injection at 0 h, 20 h, 35 h, 48 h and 60 h.

Injection system of oxygen-enriched air

A simple of injection system was used in this work (Fig. 2). A source of compressed air and an oxygen bottle were connected with two different float flow rate meters (glass as float material 2.53 g mL⁻¹, N054-17G for compressed air and N013-88G for oxygen) in order to adjust the oxygen content in the flow stream of air before sending to the filter (0.22 µm of diameter) and oxygen-enriched air distributor via silicon tubes. From the air distributor, needles (Terumo®, 0.8 mm of diameter by 50 mm) were connected to inject the oxygen-enriched air through cotton plug into SSF bottles. Oxygen-enriched air injection was carried out during 1 min into each SSF bottles with a flowrate of 0.5 L min⁻¹ using needles. SSF bottle with cotton plug were then covered using three layers of parafilm (Parafilm® M), holed using rubber band and placed in position upside down. The empty bottles were also injected the oxygen-enriched air in different conditions to control the loss of oxygen during fermentation. No oxygen loss significantly was detected.

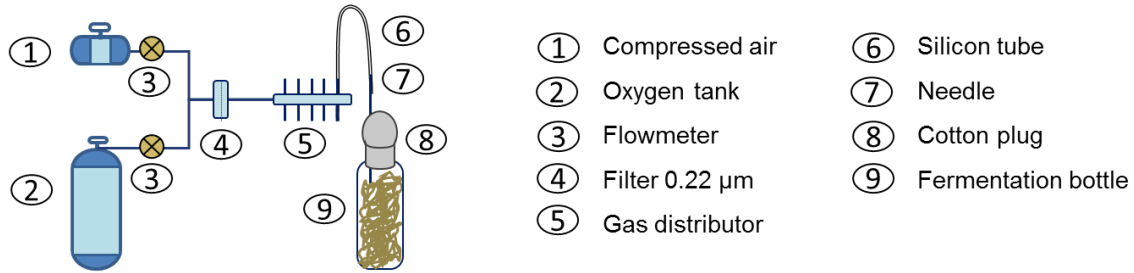


Fig. 2 Scheme of air containing different concentrations of oxygen-enriched air injection system.

Gases measurement and biomass estimation

The gases measurement, oxygen and carbon dioxide were carried out using gases analyzer (CheckMate 9900 O₂/CO₂, PBI-Dansensor A/S, Denmark). Biomass estimation was carried out following indirect method by measuring the production of carbon dioxide. This method was verified for our study conditions with the direct measurement using biomass extraction method previously described in Try et al. (2018).

Extraction and quantification of lactones

Analyses were carried out on each SSF bottles. γ -Decalactone ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) was used for analytic development. 50 μL of γ -undecalactone (internal standard, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) solubilized in absolute ethanol was added to reach a final concentration of 100 mg L⁻¹. 10 mL of diethyl-ether was then added for solid-liquid extraction. The detail extraction method was previously described in Try et al. (2018). The analyses were carried out using a coupled gas chromatograph PerkinElmer (Clarus 500)/FID detector with an Elite-Wax ETR column (60.0 m by 250 μm by 0.25 μm) with Nitrogen as the carrier gas at a linear flow rate of 4.3 mL min⁻¹. The split injector (split ratio, 7.1:1) temperature was set to 250 °C. The oven temperature was programmed to increase from 60 °C to 145 °C at a rate of 5 °C min⁻¹, then from 145 °C to 215 °C at a rate of 2 °C/min and finally from 215 °C to 250 °C at a rate of 10 °C min⁻¹.

Modelling of cells growth, oxygen consumption and lactone productions

Logistic differential equation (1) was used to estimate growth kinetics and logistic differential equation (2) was used to estimate oxygen consumption and lactone production kinetics in different conditions of oxygen ratio. The least squares method with solver function in Microsoft Excel was used for optimization of model parameters.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) X \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = q_{max} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right) X \quad (2)$$

Where, X , μ_{max} and X_{max} are the concentration (cells g^{-1} of dried weight), the specific growth rate (h^{-1}) and the maximal concentration of biomass (cells g^{-1} of dried weight), respectively. P , q_{max} and P_{max} are the concentrations of lactones ($mg L^{-1}$) or oxygen consumed ($mg L^{-1}$ of air), the specific production rates of lactones or the specific consumption rates of oxygen ($mg mg^{-1} cell h^{-1}$) and the maximal production of lactones ($mg L^{-1}$) or the maximal consumption concentration of oxygen ($mg L^{-1}$ of air), respectively.

Statistical analysis

All experiments have been carried out three independent times. The STDEVA function in Microsoft Excel was used for standard deviation calculation.

Results

Growth of *Y. lipolytica* W29 depends on the oxygen ratio

The growth of *Y. lipolytica* W29 in SSF was studied in different conditions of oxygen ratio between 20 % and 50 %, using luffa sponge as the solid support. Yeast growth was evaluated from the production of carbon dioxide (%) detected in SSF bottles and from the number of yeast cells (cells/g of dried weight). The growth kinetics of *Y. lipolytica* in different conditions of oxygen ratio are shown in Fig. 3. In the condition of initial oxygen 20 %, yeast growth reached its stationary phase at 40.5 h with a concentration of approximately 4.27×10^8 cells g^{-1} of dried weight. In the condition of 30 % initial oxygen ratio, the stationary phase was reached faster and the cell concentration was higher at approximately 5.86×10^8 cells g^{-1} of dried weight at 27.5 h. For higher initial oxygen ratio conditions of 40 % and 50 %, the time to reach the stationary phase was increased to 40.5 h and 50 h, but the maximal cell concentration increased, reaching 7.02×10^8 and 7.12×10^8 cells g^{-1} of dried weight at the early stationary phases, respectively. Logistic differential equation (1) for the growth study in different conditions was used to evaluate the specific growth rates and the maximum biomass concentrations of *Y. lipolytica* W29 (Table 1). The model parameters obtained were physically significant. The specific growth rate of *Y. lipolytica* W29 in the condition of 30 % oxygen ratio reached the highest value ($0.14 h^{-1}$) compared to other conditions.

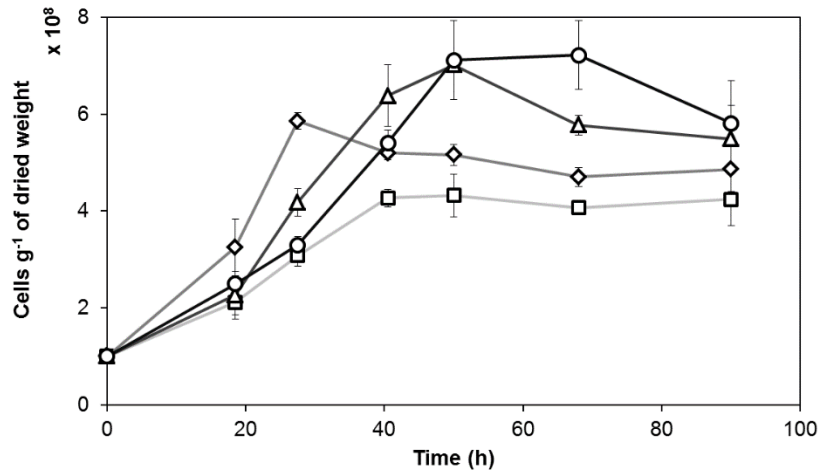


Fig. 3 Kinetics of *Y. lipolytica* W29 growth in different conditions of initial oxygen-enriched air injection. Initial oxygen ratios set to 20 % (Squares); 30 % (Diamonds); 40 % (Triangles) and 50 % (Circles).

Table 1 Specific growth rates (μ_{max}) and maximum biomass concentrations (X_{max}) of *Y. lipolytica* W29 grow in SSF in different conditions of initial oxygen-enriched air

Parameters	Experimental conditions of oxygen-enriched air			
	20 %	30 %	40 %	50 %
$\mu_{max} (h^{-1})$	0.079±0.021	0.141±0.014	0.091±0.019	0.076±0.003
$X_{max} (10^8 \text{ cells } g^{-1} \text{ of dried weight})$	4.382±0.319	5.143±0.128	6.304±0.478	6.914±0.671

Oxygen consumption of *Y. lipolytica* W29 depends on the oxygen ratio

The kinetics of oxygen availability during the growths studied in 3.1 are shown in Fig. 4. Oxygen availability in the condition of 20 % initial oxygen ratio decreased significantly from 20 % until a low concentration of approximately 0.3 % reached in SSF bottles at 40.5 h. For the conditions of 30 %, 40 % and 50 % initial oxygen ratios, the concentrations decreased to 1.4 %, 1.8 % and 2.7 % in SSF bottles at 27.5 h, 40.5 h and 50 h respectively. When using logistic differential equation (2) for the oxygen consumption study in different conditions, the model fitted relatively well with the experimental data. Furthermore, the specific oxygen consumption rates and the maximal consumption concentrations parameters represented physically acceptable values (Table 2).

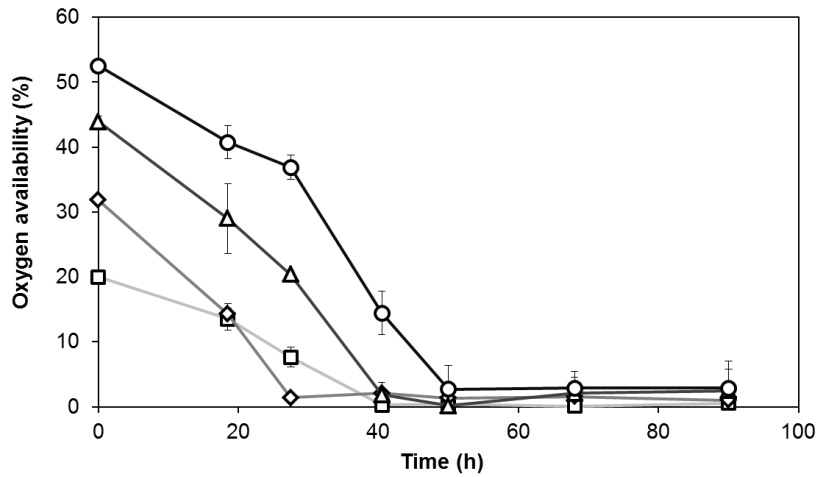


Fig. 4 Kinetics of Oxygen availability in SSF using *Y. lipolytica* W29 in different conditions of initial oxygen-enriched air injection. Initial oxygen ratios set to 20 % (Squares); 30 % (Diamonds); 40 % (Triangles) and 50 % (Circles).

Table 2 Specific oxygen consumption rates (q_{O2max}) and maximal concentration consumed (P_{O2max}) by *Y. lipolytica* W29 during the production of lactones in SSF in different conditions of initial oxygen-enriched air

Parameters	Unite	Experimental conditions of oxygen-enriched air**			
		20 %	30 %	40 %	50 %
q_{O2max}	$mg (10^8 \text{ cells})^{-1} h^{-1}$ *	5.241	9.606	7.725	6.232
P_{O2max}	$mg L^{-1}$	283.864	401.728	561.401	676.396

* 1 mg dried cells is equal to $5.016 \cdot 10^7$ cells

** Values of model parameters obtained from fitting the average results of three independent experiments.

Production of lactones depends on the oxygen ratio

Four γ -decalactones, γ -decalactone, dec-2-en-4-olide, dec-3-en-4-olide and 3-hydroxy- γ -decalactone were detected in all conditions of initial oxygen-enriched air concentrations tested. γ -Decalactone in the conditions of 30 % and 40 % of oxygen ratio reached the maximal concentrations of approximately 270 mg L^{-1} and 206 mg L^{-1} , respectively, at 68 h. In the conditions oxygen ratios of 20 % and 50 %, γ -decalactone reached its highest level at 90 h with the concentrations of approximately 143 mg L^{-1} and 216 mg L^{-1} , respectively (Fig. 5A).

3-Hydroxy- γ -decalactone reached the highest concentrations of approximately 700 mg L⁻¹, 1190 mg L⁻¹, 1440 mg L⁻¹ and 1650 mg L⁻¹ in initial oxygen ratio of 20 %, 30 %, 40 % and 50 %, respectively. 3-Hydroxy- γ -decalactone produced from the conditions of initial oxygen ratio of 20 % and 30 % reached their maximum concentrations at 40.5 h and 27.5 h, respectively. For the conditions of initial oxygen ratios of 40 % and 50 %, lactone contents reached their maximum concentrations at the same time (68 h) (Fig. 5B). The kinetics of production of dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide in all conditions were similar to those of 3-hydroxy- γ -decalactone. Dec-2-en-4-olide reached its highest concentration of approximately 118 mg L⁻¹, 212 mg L⁻¹, 148 mg L⁻¹ and 151 mg L⁻¹, in the conditions of initial oxygen ratios of 20 %, 30 %, 40 % and 50 %, respectively (Fig. 5C). Dec-3-en-4-olide reached its highest concentration of approximately 50 mg L⁻¹ in initial oxygen ratio of 20 %, 30 %, 50 % and 60 mg L⁻¹ for 40 % (Fig. 5D).

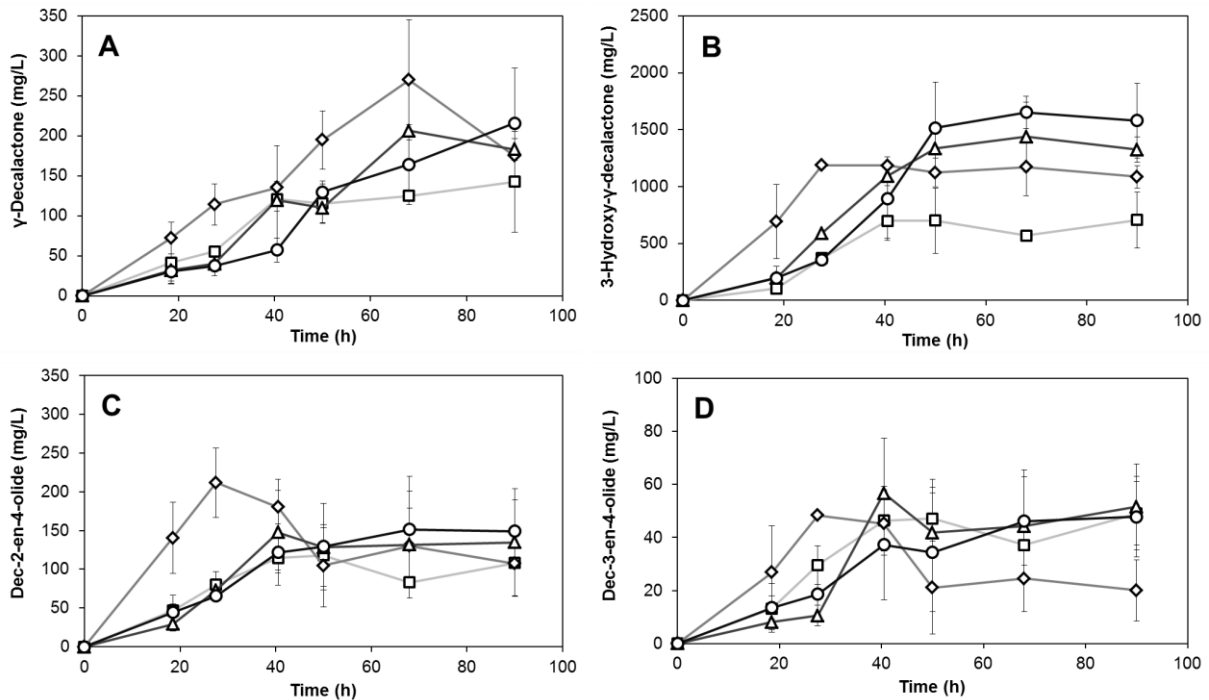


Fig. 5 Kinetics of production of lactones by *Y. lipolytica* W29 in SSF using Luffa sponge as inert support, in different conditions of initial oxygen-enriched air injection. Initial oxygen ratios set to 20 % (Squares); 30 % (Diamonds); 40 % (Triangles) and 50 % (Circles).

The logistic differential equation (2) was used as a mathematical model to study the lactone production kinetics. The results obtained from parameters fitting using experimental data in different conditions of oxygen ratio are presented in Table 3. In all conditions, the model used described the kinetics with a relatively good fit to the experimental results and the model

parameters represented the physical significance values. The specific production rates of dec-2-en-4-olide ($q_{2DECmax}$), dec-3-en-4-olide ($q_{3DECmax}$) and 3-hydroxy- γ -decalactone (q_{3OHmax}) in the condition of 30 % oxygen ratio reached higher value compared to other conditions (20 %, 40 % and 50 % of oxygen ratios). However, specific production rates of γ -decalactone decreased with the increase in oxygen concentration from 20 % to 50 %. To study the effect of oxygen concentration on the production of different lactones in SSF, the specific molar production rates of lactones related to the consumption of oxygen by yeast were determined ($n_{Lactone}$) (Table 3) by dividing the specific molar production rates of lactones by the specific molar consumption rates of oxygen by *Y. lipolytica* W29. The total molar production of lactones in the condition of 30 % oxygen reached a higher value compared to the other conditions tested (0.73 mole mole⁻¹ oxygen consumed).

Table 3 Specific production rates (q_{max}) and maximal production concentrations (P_{max}) of lactones in SSF in different conditions of initial oxygen-enriched air

Parameters	Unite	Experimental conditions of oxygen-enriched air**			
		20 %	30 %	40 %	50 %
q_{GDLmax}		1.680	1.624	0.996	0.789
$q_{2DECmax}$	$mg (10^8 cells)^{-1}$	2.068	6.459	1.722	1.589
$q_{3DECmax}$	h^{-1} *	0.829	1.063	0.454	0.429
q_{3OHmax}		10.288	30.059	12.520	11.622
P_{GDLmax}		144.50	289.87	238.31	282.29
$P_{2DECmax}$	$mg L^{-1}$	121.51	197.58	142.15	155.28
$P_{3DECmax}$		47.08	50.38	53.34	48.72
P_{3OHmax}		713.44	1163.97	1494.17	1739.31
n_{GDL}	<i>mole lactone</i>	0.060	0.038	0.024	0.021
n_{2DEC}	<i>per mole</i>	0.075	0.128	0.042	0.049
n_{3DEC}	<i>oxygen</i>	0.030	0.021	0.011	0.013
n_{3OH}	<i>consumed</i>	0.338	0.538	0.279	0.305
$n_{Total lactones}$		0.503	0.726	0.357	0.388

n : specific molar rate of lactone production/specific molar rate of oxygen consumption

GDL : γ -decalactone

2DEC : dec-2-en-4-olide

3DEC: dec-3-en-4-olide

3OH : 3-hydroxy- γ -decalactone

* 1 mg dried weight cells is equal to 5.016. 10⁷ cells

**Values of model parameters obtained from fitting the average results of three independent experiments.

Production of lactones using gas with an oxygen ratio of 30 % injected at different times

Oxygen ratio 30 % was chosen to study the effect of oxygen availability on the production of lactones using different times of injection. Two experimental conditions were used, i) injection 30 % oxygen ratio at 0 h and 20 h, ii) injection 30 % oxygen ratio at 0 h, 20 h, 35 h, 48 h and 60 h. In condition (i), γ -decalactone reached a concentration of proximately 154 mg L⁻¹ at 48 h and remained almost stable until 90 h. In contrast, in (ii) γ -decalactone reached 120 mg L⁻¹ at 42 h, then decreased to a final concentration of approximately 54 mg L⁻¹ at 90 h (Fig. 6A). 3-Hydroxy- γ -decalactone reached at 73 h the maximum concentrations of 1620 mg L⁻¹ and 4550 mg L⁻¹ for conditions (i) and (ii), respectively (Fig. 6B). For both conditions, the kinetics of dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olide production were similar to those of 3-hydroxy- γ -decalactone. Dec-2-en-4-olide reached its maximum concentration of 83 mg L⁻¹ at 35 h in condition (i) and of 263 mg L⁻¹ at 73 h in condition (ii) (Fig. 6C). Dec-3-en-4-olide reached its maximum production of 17 mg L⁻¹ at 35 h in condition (i) and of 46 mg L⁻¹ at 73 h in condition (ii) (Fig. 6D).

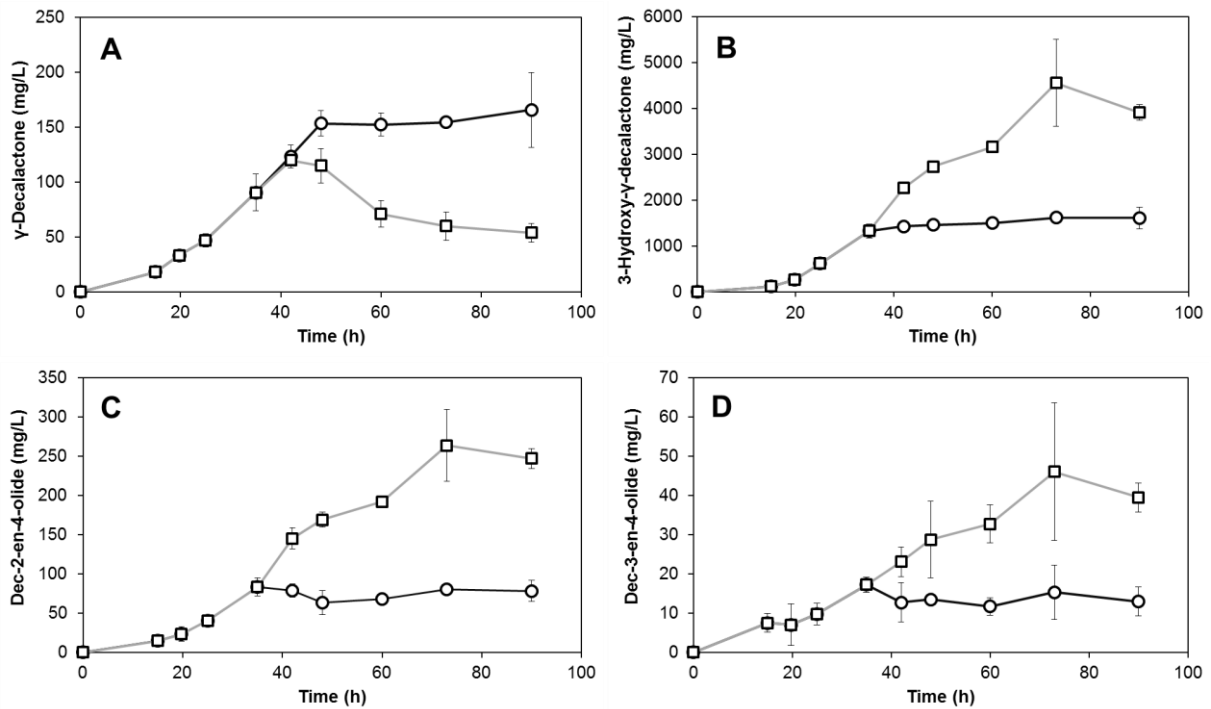


Fig. 6 Kinetics of production of lactones by *Y. lipolytica* W29 in SSF using Luffa sponge as inert support using oxygen-enriched air (30 % of oxygen ratio) injection at different times, i) at 0 h, 20 h (Circles) and ii) at 0 h, 20 h, 35 h, 48 h, 60 h (Squares).

Discussion

Using oxygen-enriched air has been reported as an interesting practice currently used to support the aerobic growth of microorganisms in SmF bioreactors, to increase the cell density and to improve process productivity (Baez and Shiloach 2014). The present work emphasizes the effect of elevated oxygen concentration on the yeast *Y. lipolytica* for the study of growth and production of lactones in SSF. The growth of *Y. lipolytica* was correlated with the availability of oxygen in the process (Fig. 3 and Fig. 4). No yeast growth was detected when oxygen decreased to a value of approximately 1 %. A condition using an initial oxygen ratio of 30 % was favorable for the yeast growth that reached a stationary phase earlier compared to the other conditions used (Fig. 3, Table 1). The conditions using initial oxygen ratios of 20 % and 40 % reached a stationary phase latter. This might be due to an insufficient level of oxygen occurring in the process for a condition using oxygen ratio of 20 %. On the other hand, a condition using an initial oxygen ratio of 40% or even 50 % reached a stationary phase later compared to all the conditions tested. Oxygen is necessary for growth and production by aerobic microorganisms. However, oxygen can also be toxic for microorganisms. This can be explained by the fact that by-products of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are produced when cells are exposed to a high oxygen concentration (Messner and Imlay 1999; Korshunov and Imlay 2006; Imlay 2008; Imlay 2013). The toxicity of concentrations of oxygen between 40 and 50 % would delay the time to reach the stationary phase of yeast without inhibiting the growth and the cell count reached even a maximal value higher than for other conditions. In these conditions, the yeast concentration increased rapidly after the oxygen ratio in the system has reached a favorable concentration. This concentration was approximately of 30 % O_2 and it occurred after 20 h and 30 h for the conditions of initial oxygen ratio of 40 % and 50 %, respectively. The effect of oxygen toxicity has been reported to impact the exponential growth phase (Harley et al. 1978). Furthermore, eukaryotic cells have been reported to be more sensitive than prokaryotic cells to atmospheric oxygen concentration above 40 % (Gille et al. 1988; Lin and Miller 1992).

In all conditions, 3-hydroxy- γ -decalactone and both decenolides (dec-2 and dec-3-en-4-olide) were not produced after the yeast growth has reached its stationary phase (Fig. 3 and Fig. 5). However, the γ -decalactone concentration increased until the end of fermentation (90 h). This suggests that the correlation of the yeast growth and the production of lactones can be divided in two periods. First, the production of lactone corresponds exactly to the yeast growth phase

(3-hydroxy- γ -decalactone, dec-2-en-4-olide and dec-3-en-4-olid). And then, the production of lactone still continues in the stationary growth phase (γ -decalactone). As previously described, no yeast growth was observed when the oxygen availability in the system reached a threshold value of approximately 1 %. This shows that oxygen is the limiting factor for yeast growth and for the production of some lactones in our study conditions. Low oxygen availability in the system allows the production of γ -decalactone to continue but not that of 3-hydroxy- γ -decalactone (Fig. 7). This may result from the fact that, oxygen, when present at very low concentration, would be directed firstly to long chain catabolism. In this case, the production of γ -decalactone results from β -oxidation at the C12 level whereas the one of 3-hydroxy- γ -decalactone comes from the C10 β -oxidation cycle (Fig. 7). To have a better understanding, the β -oxidation of the ricinoleic-hydroxylated fatty acid to shorter carbon chain intermediate compounds is represented in Fig. 7 (Okui et al. 1963b; Gatfield et al. 1993; Feron et al. 1996b; Gatfield 1999; Waché et al. 2001; Waché et al. 2003; Waché et al. 2006; Waché 2013b). β -Oxidation is a complex metabolic pathway. The main peroxisomal β -oxidation enzymes are involved in the yeast *Y. lipolytica* for the production of lactones such as acyl-CoA oxidase, 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase and 3-keto-acyl-CoA thiolase (Fig. 1) (Waché et al. 2001; Waché et al. 2003; Waché 2013b). A low activity of acyl-CoA oxidase is generally resulting in the accumulation of γ -decalactone. Similarly, a low 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase activity results in the accumulation of 3-hydroxy- γ -decalactone. When oxygen-enriched air was injected in the process, 3-hydroxy- γ -decalactone reached a very high concentration compared to the one obtained for the two-shot oxygen-enriched air injection (Fig. 5B and Fig. 6B). This suggests that oxygen availability would increase the activity of acyl-CoA oxidase and decrease the activity of 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase, resulting in a high yield of 3-hydroxy- γ -decalactone. Only in the case of oxygen-enriched air injected many times into the system, γ -decalactone degradation was observed (Fig. 6A). Yet, the degradation pathway of γ -decalactone has not been defined. However, two possible degradation pathways of γ -decalactone (lactonase/lactone-hydrolase and ω -oxidation) have been proposed by Endrizzi-Joran (1994) and it was then discussed in detail in Waché et al. (2001) emphasized with mutants of *Y. lipolytica* W29. When oxygen availability in the system is sufficient, the degradation pathways may take place (Fig. 7). In addition, γ -decalactone may be hydrolyzed to 4-hydroxy-decanoic acid, precursor of 3,4-dihydroxy decanoic acid, which can be lactonized to 3-hydroxy- γ -decalactone (Gatfield et al. 1993). Another possible way of γ -decalactone degradation which has been suggested was the way via ω -oxidation followed by further β -oxidation (Endrizzi-Joran 1994). The results of the

present study suggest that the degradation of γ -decalactone can be avoided in the case of low oxygen availability in the system in stationary growth phase.

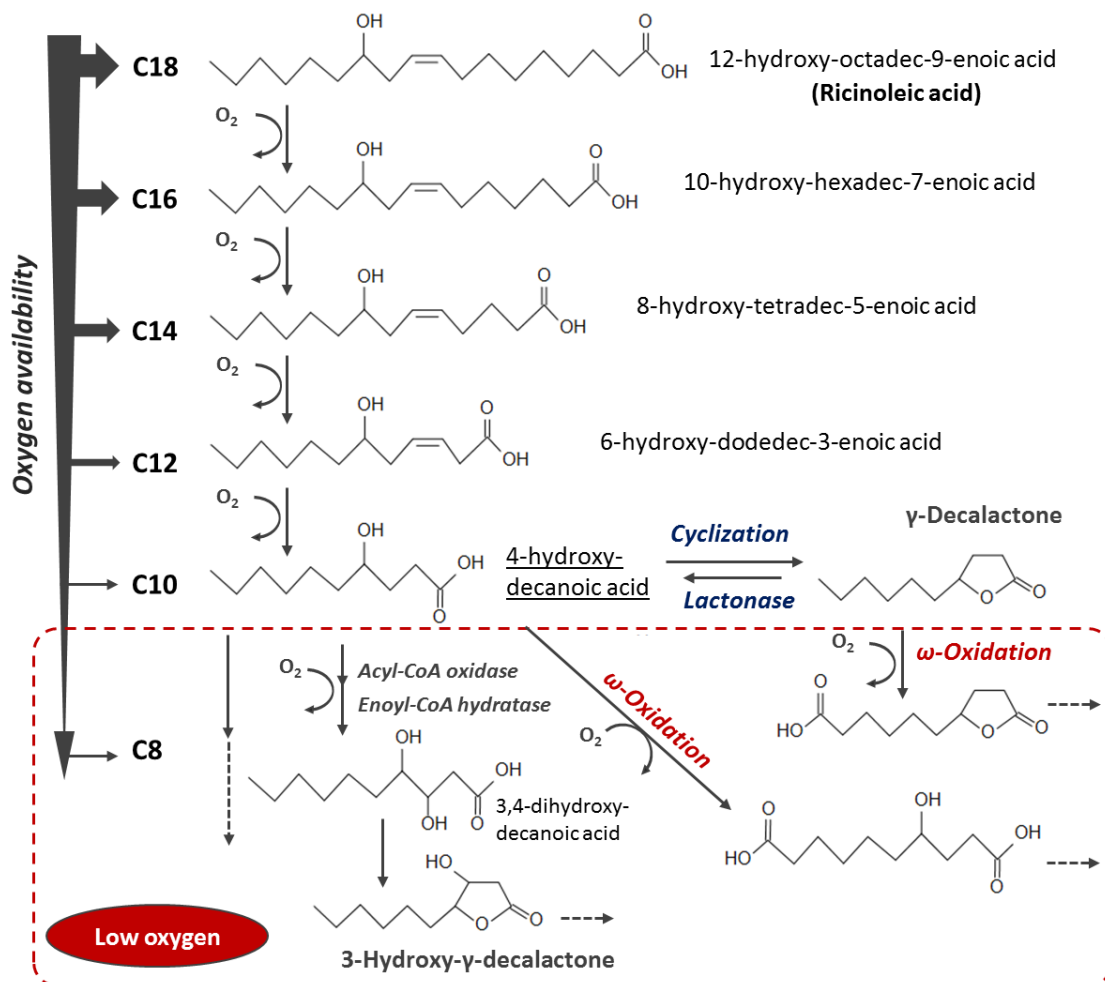


Fig. 7 Bioconversion of ricinoleic acid (C18) to shorter chain β -oxidation intermediates. C10 β -oxidation level and γ -decalactone degradation pathways are represented. Low oxygen concentration in the system would not make possible either the synthesis of 3,4-hydroxy-decanoic acid (precursor of 3-hydroxy- γ -decalactone) from 4-hydroxy-decanoic acid or the degradation of γ -decalactone.

In conclusion, this study provides an alternative model for studying the effect of oxygen using oxygen-enriched air for the production of active compounds in SSF. Different concentrations of oxygen ratios were used and experiments were also included different times of oxygen-enriched air (30 % of oxygen ratio) injection into the process. Logistic differential equations were used for modeling the growth, oxygen consumption and lactone production kinetics. All the model parameters obtained were physically significant. A condition using a 30 % oxygen ratio was a favorable condition for lactones production among the experimental conditions used. Other conditions using a 20 % oxygen ratio exhibited an insufficient oxygenation resulting in a low production of lactones. The higher concentrations of oxygen ratio (40 % and 50 %), led to an incomplete inhibition of yeast growth, resulted in a high concentration of yeast in stationary phase and a slightly higher hydroxy-lactone accumulation. A high γ -decalactone concentration can be observed when the yeast growth reached a high specific growth rate. Availability of oxygen in the stationary growth phase appeared to be an important factor for the degradation of γ -decalactone. Furthermore, oxygen may be consumed preferentially for β -oxidation of long chain fatty acids, rather than at the C10- β -oxidation level. Different strains exhibiting a modified acyl-CoA activity will be used to gain a deeper understanding in this point as well as in the β -oxidation metabolites fluxes in different conditions of oxygen ratio in SSF process.

Acknowledgments

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche Comté, the “Fonds Européen de DEveloppement Régional (FEDER)” and it is a pleasure to acknowledge with gratitude the scholarship support of the French Embassy in Cambodia as well as an attribution of financial support from AUF (Agence Universitaire de la Francophonie). We are also thankful to C. Bernard-Rojas for technical help.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical statement

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Baez A, Shiloach J (2014) Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. *Microbi cell facto* 13(1):181
- Braga A, Belo I (2015) Production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization. *J Chem Technol Biotechnol* 90(3):559-565
- Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, Ferreira EC, Belo I (2015) Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: differences in yeast metabolism and morphology. *Biochem Eng J* 93:55-62
- Endrizzi-Joran A (1994) Biotransformation de ricinoleate de méthyl en γ -décalactone par des levures. PhD Thesis, Université de Bourgogne, Dijon, France
- Endrizzi A, Pagot Y, Clainche AL, Nicaud J-M, Belin J-M (1996) Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in yeasts. *Crit Rev Biotechnol* 16(4):301-329
- Escamilla-García E, Aguedo M, Gomes N, Choquet A, Belo I, Teixeira JA, Belin J-M, Waché Y (2009) Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Molec Catal B* 57(1-4):22-26
- Escamilla-García E, Belin JM, Waché Y (2007a) Use of a Doehlert factorial design to investigate the effects of pH and aeration on the accumulation of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 103(5):1508-1515
- Escamilla-García E, Nicaud J-M, Belin J-M, Waché Y (2007b) Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A factorial approach. *Biotechnol J* 2(10):1280-1285
- Escamilla-García E, O'Riordan S, Gomes N, Aguedo M, Belo I, Teixeira J, Belin J-M, Waché Y (2014) An air-lift biofilm reactor for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* 49(9):1377-1382
- Feron G, Dufosse L, Pierard E, Bonnarme P, Quere JL, Spinnler H (1996) Production, identification, and toxicity of γ -decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl Environ Microbiol* 62(8):2826-2831
- Fickers P, Benetti P-H, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud J-M (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5(6-7):527-543

- Gatfield IL (1999) Biotechnological production of natural flavor materials. In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I (ed) Flavor chemistry, thirty years of progress. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, pp 211-227
- Gatfield IL, Güntert M, Sommer H, Werkhoff P (1993) Some aspects of the microbiological production of flavor: active lactones with particular reference to γ -decalactone. Chem Mikrobiol Technol Lebensm 15(5-6):165-170
- Gille JJP, Wortelboer HM, Joenje H (1988) Effect of normobaric hyperoxia on antioxidant defenses of HeLa and CHO cells. Free Radi Biol Medi 4(2):85-91
- Groguenin A, Waché Y, Garcia EE, Aguedo M, Husson F, LeDall M-T, Nicaud J-M, Belin J-M (2004) Genetic engineering of the β -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. J Mol Catal B 28(2):75-79
- Harley JB, Santangelo GM, Rasmussen H, Goldfine H (1978) Dependence of *Escherichia coli* hyperbaric oxygen toxicity on the lipid acyl chain composition. J Bacteriol 134(3):808-820
- Imlay JA (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Annu Rev Biochem 77:755-776
- Imlay JA (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. Nature Rev Microbiol 11(7):443-454
- Korshunov S, Imlay JA (2006) Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. J Bacteriol 188(17):6326-6334
- Lin AA, Miller WM (1992) Modulation of glutathione level in CHO cells. Annals New York Acad Sci 665(1):117-126
- Messner KR, Imlay JA (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. J Biolo Chem 274(15):10119-10128
- Okui S, Uchiyama M, Mizugaki M (1963b) Metabolism of hydroxy fatty acids. The J Biochem 54(6):536-540
- Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud J-M, Wache Y, Belin J-M (1998) Peroxisomal β -oxidation activities and γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 49(3):295-300
- Try S, De-Coninck J, Voilley A, Chunhieng T, Waché Y (2018) Solid state fermentation for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. Process Biochem 64(C):9-15

- Waché Y (2013a) Microbial production of food flavours. In: McNeil B AD, Giavasis I, Harvey L (ed) Microbial production of food Ingredients, enzymes and nutraceuticals. Woodhead, Cambridge, pp 175-193
- Waché Y (2013b) Production of dicarboxylic acids and fragrances by *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G (ed) *Yarrowia lipolytica*. vol 25. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 151-170
- Waché Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield IL, Nicaud J-M, Belin J-M (2001) Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5700-5704
- Waché Y, Aguedo M, Nicaud J-M, Belin J-M (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61(5):393-404
- Waché Y, Husson F, Feron G, Belin J-M (2006) Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89(3):405-416
- Waché Y, Laroche C, Bergmark K, Møller-Andersen C, Aguedo M, Le Dall M-T, Wang H, Nicaud J-M, Belin J-M (2000) Involvement of acyl Coenzyme A oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 66(3):1233-1236
- Wang H, Le Clainche A, Le Dall MT, Waché Y, Pagot Y, Belin JM, Gaillardin C, Nicaud JM (1998) Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14:1373-1386

Partie 4 : Effet de l' A_w sur la croissance et le métabolisme chez *Y. lipolytica* utilisée pour la production de lactones

4.1. Introduction

Lors du passage en milieu solide, les cellules de levure sont soumises à un environnement très différent au niveau de l'eau. Il s'agit dans ce travail d'étudier l'influence de l' A_w sur la croissance et les shifts métaboliques touchant la β -oxydation dans la production de lactones. Le concept principal est de modifier l' A_w pour étudier la croissance de *Y. lipolytica* en milieu solide et en milieu liquide. Différents types d'agents dépresseurs peuvent être utilisés pour modifier l' A_w . Le but de notre travail était d'établir les bases préliminaires sur le choix du système de modification de l' A_w pour pouvoir proposer dans les perspectives des essais permettant d'évaluer l'impact de l' A_w sur la FMS. Il s'agit notamment d'évaluer si le glycérol peut être considéré comme n'ayant pas d'influence par sa nature sur la physiologie de microorganismes comme cela a été postulé par (Gervais et al. 1988b). Ce composé nous permet de modifier toutes les valeurs de l' A_w souhaitées en nous basant sur l'équation de Norrish (Eq. 4). Dans cette partie, les résultats préliminaires concernant l'effet de l'ajustement de l' A_w sur la croissance de levure en milieu gélosé et en FML pour la production de lactones, seront présentés.

4.2. Culture en milieu gélosé ajusté à différentes A_w

La culture de *Y. lipolytica* W29 a été faite à différentes A_w sur milieu gélosé YPDA + glycérol. Dans un premier temps, nous ne connaissions pas la gamme d' A_w où *Y. lipolytica* pouvait se développer. Différentes A_w 0,99, 0,95, 0,90, 0,85, 0,80 et 0,75 ont été fixées. Après une semaine d'incubation, les colonies ont été retrouvées dans les milieux d' A_w à 0,99 et 0,95 mais pas pour les milieux d' A_w plus basses. Ce résultat montre que les colonies ne peuvent pas se former en une semaine pour une A_w inférieure à 0,90. Dans un second temps, la croissance a été réalisée à une A_w de 0,9 à 1 en notant le temps d'apparition des premières colonies (Figure 20). Les colonies sont apparues le premier jour dans le milieu sans A_w ajustée (blanc) et pour une A_w de 0,99, le deuxième jour à 0,98 et le troisième jour d'incubation à 0,97-0,95. Il a fallu attendre le 6^{ème} jour pour voir les colonies pour les milieux à une A_w de 0,94 et de 0,93, et le 7^{ème} jour d'incubation pour les milieux ajustés à 0,92, 0,91 et à 0,90.

Les valeurs d' A_w calculées par l'équation de Norrish, ainsi que les valeurs de l' A_w mesurées dans la solution de mélange glycérol + eau distillée et du milieu YPDA + glycérol sont

présentées dans le **Tableau 8**. Ces résultats montrent que les A_w du glycérol + eau distillée et du milieu YPDA + glycérol étaient légèrement plus élevées que celles fixées par l'équation de Norrish, mais dans une mesure acceptable.

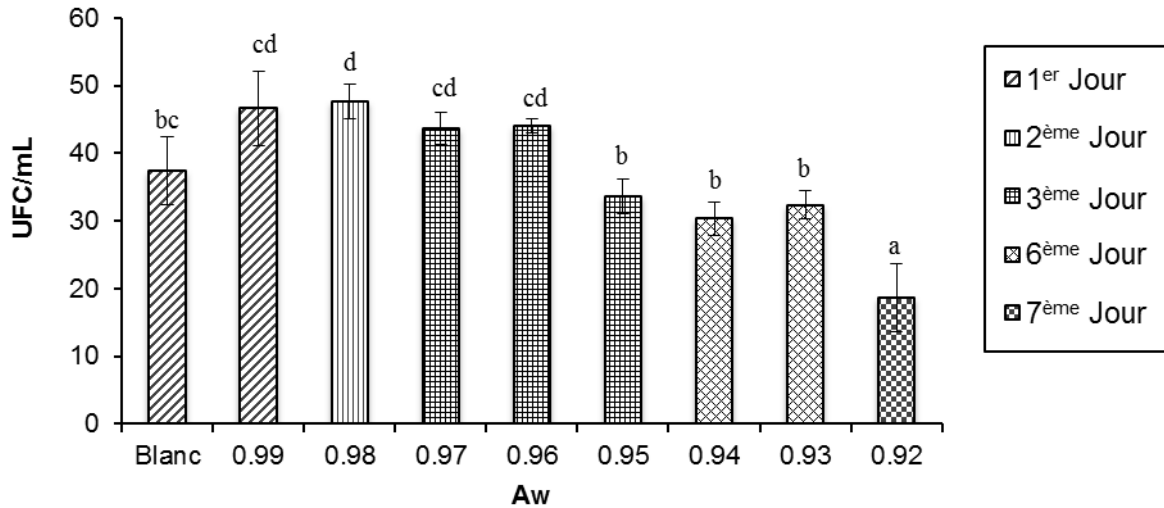


Figure 20 : Croissance de *Y. lipolytica* à différentes A_w : nombre d'unités formant des colonies par mL et nombre de jour pour l'apparition des colonies.

Tableau 8 : Comparaison entre les valeurs d' A_w calculées par l'équation de Norrish, et les valeurs mesurées pour les solutions de mélange glycérol + eau distillée et du milieu YPDA + glycérol.

A_w souhaitée	A_w	
	Glycérol + Eau distillée	YPDA + Glycérol
1.00 (eau distillée)	1,000	0,998
0,99	0,993	0,989
0,98	0,981	0,980
0,97	0,973	0,970
0,96	0,962	0,959
0,95	0,955	0,954
0,94	0,943	0,941
0,93	0,933	0,932
0,92	0,924	0,924
0,91	0,915	0,912
0,90	0,905	0,901

4.3. Croissance en FML ajustée à différentes A_w

En se basant sur le résultat de la croissance en milieu gélosé à différentes A_w , l'intervalle d' A_w en FML a été fixé au plus bas à 0,95 pour éviter une durée trop longue de croissance des levures. Les cinétiques de croissances de *Y. lipolytica* en FML (20 g/L d'huile de ricin, 2 g/L de Tween 80, 6,7 g/L d'YNB, glycérol) sont représentées dans la **Figure 21**. L'équation logistique différentielle est utilisée pour étudier les cinétiques de croissance dans différentes A_w . Les paramètres de modèle utilisés sont représentés dans le **Tableau 9**. Les valeurs d' A_w et du pH avant et après la FML sont représentées dans le **Tableau 10**.

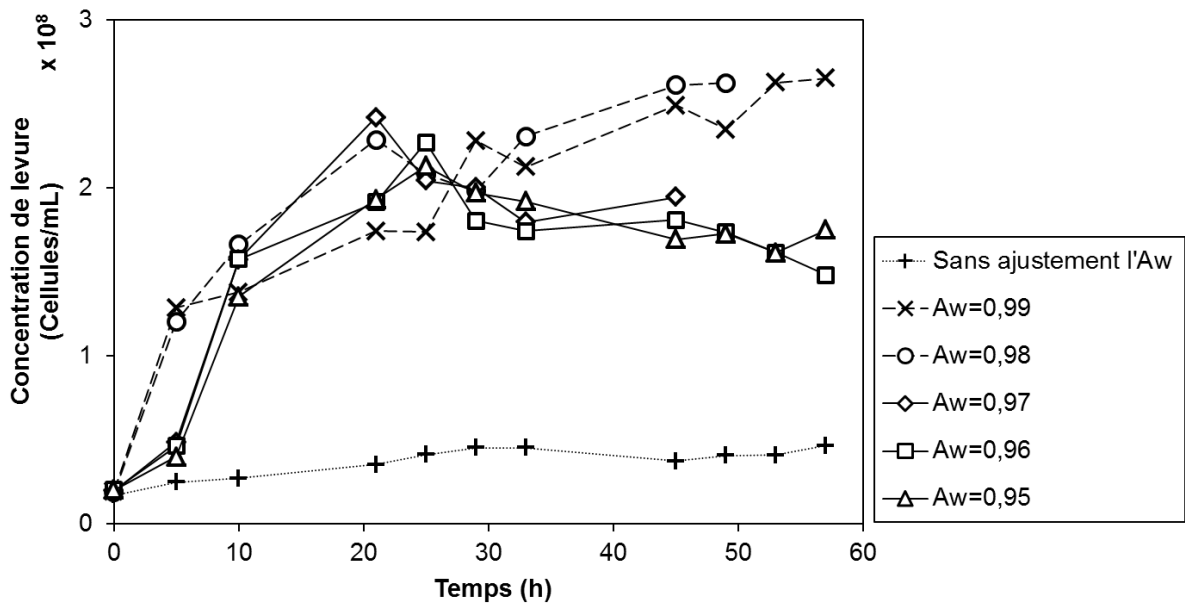


Figure 21 : Cinétiques de croissance de *Y. lipolytica* W29 en FML à différentes A_w .

Tableau 9 : Paramètres de modèle de croissance estimés par l'équation logistique différentielle.

Paramètres	Sans ajuster A_w	0,99	0,98	0,97	0,96	0,95
μ_{max} (h^{-1})	0,118	0,157	0,316	0,288	0,303	0,269
X_{max} (10^8 cellules/mL)	0,429	2,481	2,497	2,495	2,126	2,049

Tableau 10 : Valeurs de l' A_w et du pH, avant et après la croissance des levures en FML.

<i>Conditions A_w</i>	<i>A_w</i>		<i>pH</i>	
	<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>Avant</i>	<i>Après</i>
Sans ajuster	0.998	0.999	5.08	3.20
0,99	0.992	0.997	4.97	2.27
0,98	0.982	0.988	4.96	2.23
0,97	0.972	0.974	4.98	2.23
0,96	0.963	0.965	5.05	2.22
0,95	0.952	0.955	4.97	2.16

Les valeurs de pH observées après la FML sont proportionnelles à l' A_w , et inversement-proportionnelles à la quantité de glycérol ajoutée. A l'état initial, les pH de toutes les conditions d' A_w étaient d'environ 5, mais à la fin de la FML, le pH a diminué à 3,20 pour la condition sans ajustement de l' A_w et à environ 2,25 pour les autres conditions. Ces résultats ont montré un net effet de la présence de glycérol sur le pH de la fermentation. Par la suite, les expérimentations ont été réalisées avec un pH à 4,4. En présence de solution de citrate, les cinétiques de croissance de *Y. lipolytica* sont représentées dans la **Figure 22** et les valeurs de l' A_w et du pH avant et après la FML sont représentées dans le **Tableau 11**. Différentes solutions de citrate (citrate 1 ou tampon citrate noté citrate 2) ont été évaluées concernant leur effet sur la voie métabolique. En présence de solution de phosphate, les valeurs de pH observées après la FML à l' A_w de 0,99 et 0,98 sont environ 1,95.

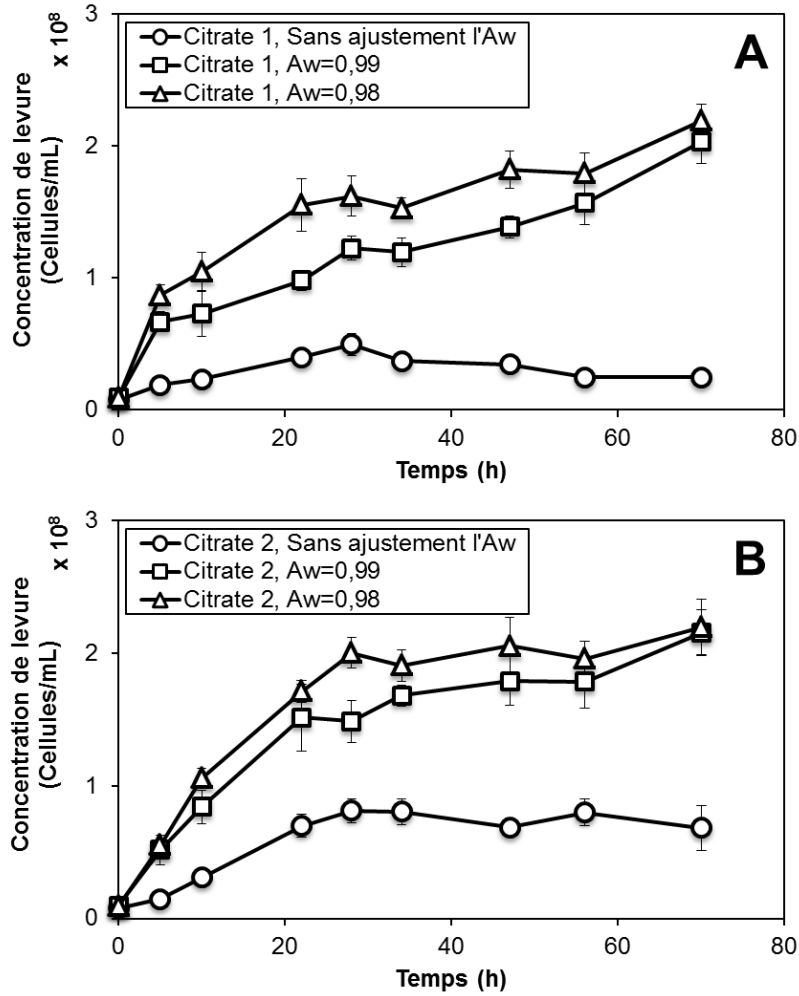


Figure 22 : Cinétiques de croissance de *Y. lipolytica* W29 en FML à différentes A_w en présence de citrate 1 (A) et de citrate 2 (B).

Tableau 11 : Valeurs de l' A_w et du pH, avant et après la croissance des levures en présence de citrate 1 et de citrate 2.

Conditions	Citrate 1				Citrate 2			
	A_w		pH		A_w		pH	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Sans ajuster	0,993	0,993	4,40	4,30	0,998	0,998	4,50	4,22
0,99	0,983	0,989	4,41	3,74	0,988	0,994	4,51	3,35
0,98	0,975	0,978	4,41	3,70	0,979	0,985	4,51	3,29

4.4. Production de lactones en FML ajustée à différentes A_w

Les Figures 23, 24 et 25 représentent les cinétiques de production de lactones en FML avec et sans ajustement du pH du milieu dans des conditions sans ajuster l' A_w et avec une A_w de 0,99 et 0,98, respectivement. En présence de solution citrate 1 ou de tampon citrate 2 sans ajustement de l' A_w , la γ -décàlactone atteint une concentration maximale d'environ 850 mg/L à 47 h (Figure 23A). La 3-hydroxy- γ -décàlactone atteint pour sa part des concentrations maximales de 1300 mg/L et 1800 mg/L pour la présence de solution citrate 1 et de tampon citrate 2, respectivement, à 56 h (Figure 23B). Les cinétiques d'accumulation de décénolides sont très similaires à celles de 3-hydroxy- γ -décàlactone dans toutes les conditions (Figure 23C, D). En présence de glycérol pour ajuster l' A_w , l'accumulation des lactones est très faible relativement à celle sans ajustement de l' A_w . L'accumulation maximale de γ -décàlactone a atteint à 70 h, 60 mg/L pour une A_w de 0,99 (Figure 24A), et 40 mg/L pour 0,98 (Figure 25A) dans la condition d'utilisation de solution citrate 1. Les décénolides produits à l' A_w de 0,99 et 0,98 pour toutes les conditions avec ou sans tampon citrate ont atteint des concentrations très faibles, de l'ordre 1 à 3 mg/L (Figure 24 C, D et Figure 25C, D).

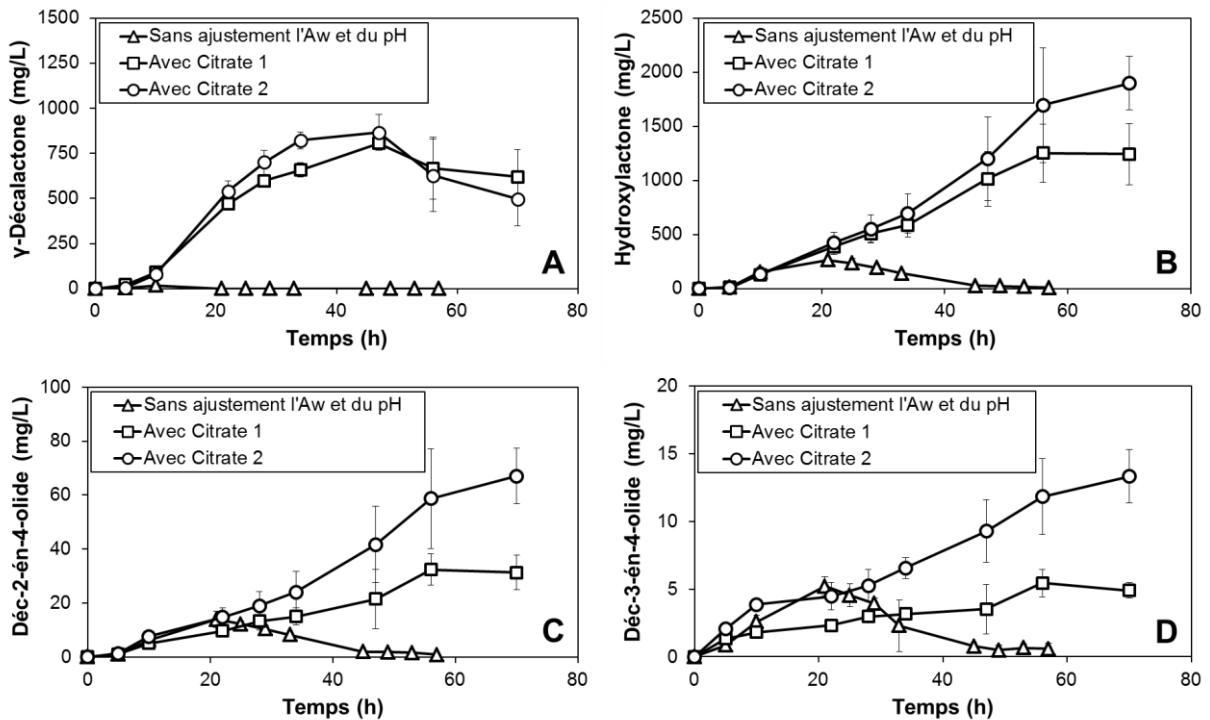


Figure 23 : Cinétiques de production de lactones en présence de citrate 1 ou citrate 2, sans ajustement de l' A_w .

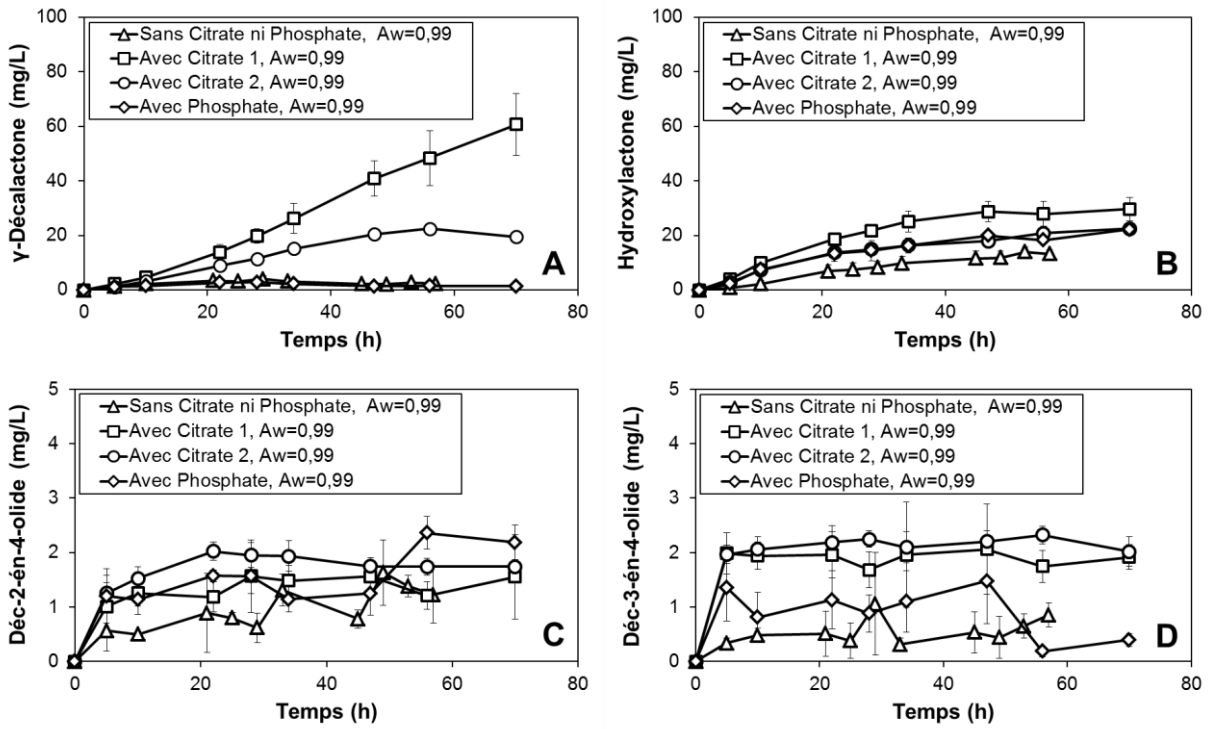


Figure 24 : Cinétiques de production de lactones en présence de citrate 1, citrate 2, phosphate et l' A_w à 0,99.

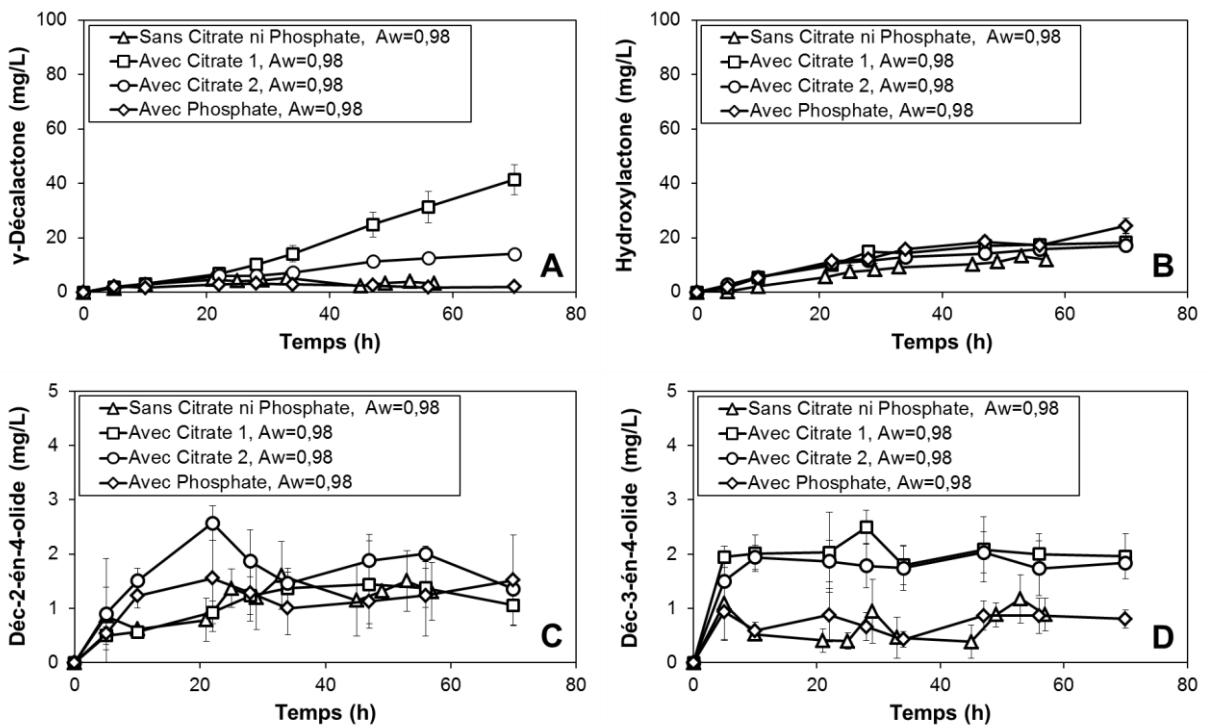


Figure 25 : Cinétiques de production de lactones en présence de citrate 1, citrate 2, phosphate et l' A_w à 0,98.

4.5. Discussion

L' A_w joue un rôle important sur la croissance microbienne et de même influe sur la production d'arômes (Gervais et al. 1988a; Gervais et al. 1988b; Oriol et al. 1988; Gervais and Battut 1989; Gervais 1990). Pour modifier l' A_w , deux méthodes peuvent être utilisées. La méthode directe par déshydratation peut être employée. Par contre, cette méthode n'est pas applicable pour ajuster l' A_w ni en FMS, ni en FML. En revanche, la méthode indirecte qui utilise des agents dépresseurs d' A_w afin de lier l'eau libre, a été appliquée dans les procédés microbiens par l'équipe de P. Gervais (Gervais et al. 1988a; Gervais et al. 1988b; Oriol et al. 1988; Gervais and Battut 1989; Gervais 1990). Le glycérol a été choisi comme agent dépresseur en nous basant sur les propositions de ce groupe. Il permet d'obtenir des valeurs assez proches de celles calculées par l'équation de Norrish avec toutefois quelques petites réserves liées à la légère activité dépresseur d'eau du milieu YPDA qui ne permet pas d'obtenir une valeur de 1 et à la probable consommation du glycérol par les cellules qui est à l'origine de valeurs plus hautes qu'attendues. Pour la croissance de *Y. lipolytica* en boîte de Petri à différentes A_w , l'un des aspects intéressants était la taille des colonies. Cette dernière est plus petite sur le milieu qui contient une quantité élevée de glycérol (correspondant à une A_w plus faible). Le glycérol a été largement utilisé dans la cryogénie et la conservation des protéines. Et, contrairement à ce qui a été rapporté par Gervais, il peut montrer des effets d'inhibition ou d'augmentation des activités enzymatiques (Yamamoto and Storey 1988) et d'inhibition de la croissance de cellules (Wiebe and Dinsdale 1991). Pour ce point de l'effet du glycérol sur la taille des colonies, il est difficile de le relier à une propriété particulière du glycérol (comme par exemple celle de dépresseur d'eau).

Pour la suite, en milieu liquide, le dépresseur d'eau utilisé pourrait avoir un impact sur la régulation du métabolisme microbien. Chez la levure, le glycérol constitue une source de carbone particulière. Par rapport aux activités de dégradation de lipides qui sont impliquées dans la production d'arômes, il a été montré chez *S. cerevisiae* qu'elles étaient réprimées en présence de glucose, dé-réprimée en présence de glycérol et induites en présence d'oléate (Veenhuis et al. 1987). Chez *Y. lipolytica*, certains métabolismes d'oxydation des lipides (ω -oxydation) peuvent être réprimés par la présence de glycérol (Mori et al. 2013) mais pour la majorité, le glycérol est neutre. Toutefois, la présence de glycérol inhibe également le shift morphologique vers les filaments observé en présence de glucose (Liang et al. 2017). Le glycérol est également le meilleur milieu utilisé pour la mise en réserve des lipides chez *Yarrowia* (Yun et al. 2018). D'après ces informations, le glycérol est peut-être le composé

dépresseur d'eau qui va le moins modifier le métabolisme de la levure (par rapport à des sels) mais, ne serait-ce que par sa nature de source de carbone efficace pour la croissance, il peut être problématique.

En FML pour la production de lactones, la levure *Y. lipolytica* peut croître dans les différentes conditions d' A_w /teneur en glycérol utilisées. L'effet du glycérol comme source de carbone est très net car on observe une croissance qui augmente quand on rajoute du glycérol avec une multiplication par 7 ou 8 de la biomasse dans la **Figure 21**. Ce substrat est au moins partiellement utilisé pour produire des acides puisque la diminution du pH liée à la présence de glycérol est également importante. Enfin, l'utilisation métabolique du glycérol entraîne également une remontée de l' A_w (**Tableau 10**). Ces résultats montrent une similarité avec les études précédentes pour la croissance de levure puisque les croissances optimales ont été observées entre A_w 0,97 et 0,99 dans la production de γ -déalactone en FML avec la levure *Sporidiobolus salmonicolor* (Gervais and Battut 1989). Ceci montre qu'un peu de glycérol permet d'augmenter la croissance mais qu'à une certaine dose, il deviendrait toxique, vraisemblablement à cause de son effet sur l' A_w . Toutefois, cela pose des questions sur la validité de l'utilisation de glycérol comme répresseur d'eau. Il y a visiblement un effet de la présence de glycérol contre la production de lactone: la souche se développe plus mais ne produit que des traces de lactones (**Figure 21** : cinétiques de croissance à différentes A_w , et **Figure 24** et **25** : conditions sans citrate ni phosphate à l' A_w 0,99 et 0,98). La levure *Y. lipolytica* peut produire des acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide isocitrique et l'acide succinique en utilisant du glycérol (Papanikolaou et al. 2002; Finogenova et al. 2005; Förster et al. 2007; Papanikolaou et al. 2008; Coelho et al. 2010; Makri et al. 2010; Cui et al. 2017; Li et al. 2017).

La production très faible de lactones pourrait être causée par le changement vers un pH non favorable pour le métabolisme de la levure dans la production de lactones. Le pH 4,4 est un pH plus favorable pour la production de γ -déalactones (Escamilla-García et al. 2007a). Plusieurs solutions ont été employées dans trois conditions d' A_w (sans ajustement et à A_w 0,99 et 0,98) pour ajuster le pH à 4,4. Le choix des trois conditions est basé sur le changement du pH en fin de FML. Les pH atteints dans les conditions d' A_w entre 0,95 et 0,98 ne sont pas très différents (**Tableau 10**). Dans les milieux sans glycérol avec la solution citrate 1 ou le tampon citrate 2 (condition sans ajustement de l' A_w), les lactones ont été produites en concentration très élevées (**Figure 23**) contrairement à la condition sans ajustement du pH. Par contre, pour une A_w à 0,99 et à 0,98, les lactones ont été produites en faible concentration (**Figure 24 et**

25). L'ensemble de ces résultats montre que le citrate, comme le glycérol pour l'effet dépresseur d'eau, modifie les flux métaboliques dans des conditions dépassant le simple effet tampon. Ces résultats ne permettent donc pas de mettre en avant un effet de l' A_w ou du pH sur la production de lactone mais par contre ils apportent des résultats concernant les interrelations métaboliques entre la β -oxydation, le métabolisme du glycérol et celui du citrate (**Figure 26**). Dans tous les cas, le métabolisme du glycérol est prioritaire sur la β -oxydation, semblant confirmer un phénomène de répression. Par contre, en l'absence de glycérol, le citrate augmente de manière très importante la production de lactone (contrairement à ce qui avait été obtenu par Escamilla-García (2008) en utilisant du ricinoléate de méthyle au lieu de l'huile de ricin). On peut imaginer que cet ajout va perturber la β -oxydation au niveau du cycle du glyoxylate et il constitue une piste importante pour augmenter la production d'arômes.

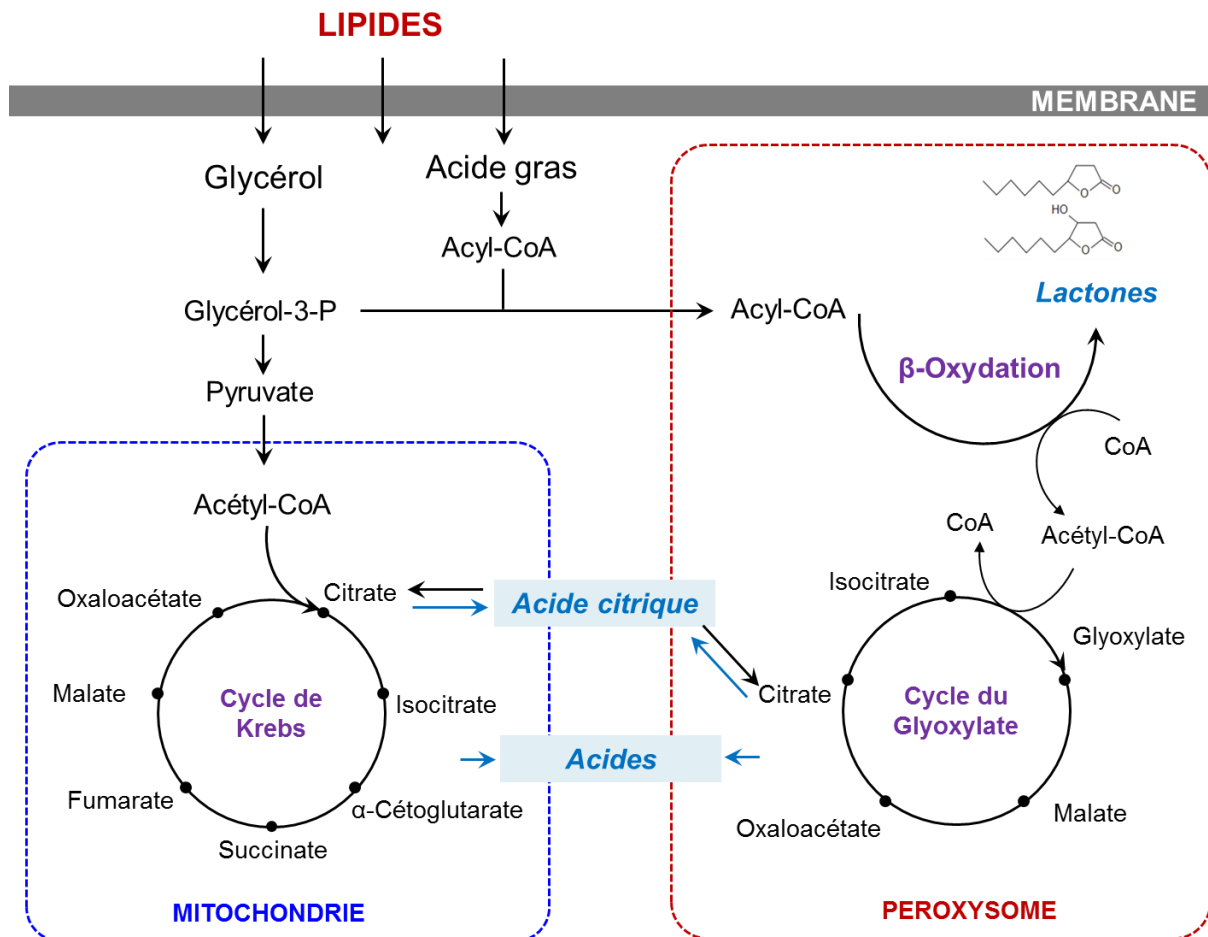


Figure 26 : Interrelations métaboliques entre la β -oxydation, le métabolisme du glycérol et celui du citrate.

4.6. Conclusion

En conclusion, l'étude de l'effet de l' A_w sur le taux de croissance et le métabolisme lipidique chez *Y. lipolytica* a démontré que le glycérol avait un effet positif sur la croissance en YPDA et en FML mais un effet négatif pour la production de lactones car *Y. lipolytica* peut utiliser le glycérol comme substrat. Un changement de l' A_w pour la production d'arôme est un sujet intéressant. D'autres méthodes pour ajuster l' A_w dans la production de lactones par cette levure devraient être utilisées. Cette étude marque en revanche des pistes intéressantes pour augmenter la β -oxydation en utilisant le métabolisme d'acides.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Ce travail concerne la production d'arômes de type lactones en FMS par la levure *Y. lipolytica* W29. Le travail a commencé par une adaptation de la production de lactone en FMS en utilisant différentes matrices solides. Ensuite, l'effet de l'oxygène a été étudié sur la voie de β -oxydation impliquée dans la production de lactones. La modification de la disponibilité de l'oxygène dans différents types de réacteurs FMS et la modification du taux, avec de l'air enrichi en oxygène, ont été réalisées. D'autre part, lors de l'utilisation de l'aération forcée en mini-réacteur, une certaine partie des lactones est entraînée. Un modèle mathématique a été utilisé pour estimer les lactones totales qui peuvent être produites dans cette condition. L' A_w est un facteur qui joue sur la croissance et le métabolisme des levures. L'effet de l' A_w a été étudié préliminairement sur la croissance en milieu gélosé, et en FML pour la croissance et la production de lactone. Les résultats obtenus au cours des travaux réalisés dans cette étude, nous ont mené aux conclusions suivantes :

La FMS peut être utilisée pour la production d'arômes de type lactone par *Y. lipolytica*. Pour transférer la FML en FMS dans des conditions d'aération statique, le choix de matrices solides, la concentration d'inoculation, et la surface de contact (entre le substrat, l'oxygène et la levure) sont des paramètres importants à considérer. Dans nos conditions d'études, les différentes textures du support peuvent influencer les flux métaboliques de *Y. lipolytica* W29. La texture de l'éponge de courgette permet une production plus élevée de γ -déalactones par rapport aux autres matrices solides utilisées. Des formes allongées de *Y. lipolytica* W29 ont été observées dans des conditions de FMS avec ce type de support. Le métabolisme de la levure sous cette forme pourrait produire une concentration élevée d'hydroxy-lactone (Escamilla-García et al. 2014). La modification des conditions d'aération a été réalisée en utilisant trois types de réacteurs avec l'éponge de courgette comme support (fioles à col large, flacons à petit espace de tête et mini-réacteur). Les lactones ont été produites à des concentrations très faibles en flacon à petit espace de tête à cause de la faible disponibilité de l'oxygène. Par contre, l'hydroxy-lactone a été produite avec une concentration élevée, soit 5 g/L en fiole à col large. La production de γ -déalactone a atteint sa concentration maximale plus rapidement en mini-réacteur à aération forcée. L'aération forcée peut provoquer l'entraînement de lactones en cours de production. La γ -déalactone « pure » et les γ -déalactones produites in situ ont été utilisées pour confirmer ce phénomène et également

pour permettre de calculer les quantités de lactones entraînées lors de l'aération. Une différence de la vitesse d'entraînement d'un facteur 3,6 a été observée pour les différentes natures de lactones dans la même condition d'aération. La stabilisation des composés dans la culture et la nature des molécules ont influencé cette différence. Au final, un modèle simple a été proposé pour estimer la production totale de lactones en aération forcée en se basant sur le pourcentage de perte de même nature des composés dans la même condition d'aération.

L'utilisation d'air enrichi en oxygène est une méthode applicable employée en bioconversion. En plus de l'utilisation de différents types de réacteurs pour modifier les conditions d'aérations dans la partie 1, l'air enrichi en oxygène a été utilisé pour étudier l'effet de l'oxygène sur la voie métabolique de *Y. lipolytica* W29 en FMS pour la production de lactones. Dans un premier temps, quatre concentrations initiales d'oxygène (20 %, 30 %, 40 % et 50 %) ont été utilisées. Une équation logistique différentielle a été utilisée pour étudier les cinétiques de croissance, d'accumulation de lactones et de consommation d'oxygène. Le modèle utilisé a permis de bien estimer les paramètres dans des conditions acceptables. La croissance de *Y. lipolytica* a été proportionnelle avec la consommation d'oxygène. L'accumulation de γ -décalactone a été observée avec une concentration plus élevée quand la vitesse spécifique de croissance était plus grande dans la condition d'utilisation de 30 % d'oxygène enrichie. Ensuite, l'air enrichi à 30 % de concentration d'oxygène a été utilisé pour injecter deux fois ou plusieurs fois pendant la FMS. L'oxygène était nécessaire pour la production d'hydroxy-lactone. Plus de l'oxygène a été ajouté, plus l'accumulation d'hydroxy-lactone a été élevée. D'autre part, une concentration très faible d'oxygène en phase stationnaire de croissance pourrait inhiber la dégradation de la γ -décalactone.

L' A_w a été démontrée comme un paramètre important concernant le transfert de l'eau et également des solutés au travers la membrane cellulaire de microorganisme. Le glycérol est utilisé comme un agent dépresseur pour ajuster l' A_w . *Y. lipolytica* W29 croit dans les milieux d' A_w plus bas qu'en milieu gélosé (YPDA) et en FML. L'accumulation de lactones a été diminuée quand l' A_w diminuait. Par ailleurs, la γ -décalactone a été produite à une concentration élevée en utilisant des solutions de citrate dans la condition sans ajuster l' A_w . En se basant sur les résultats préliminaires de cette partie, le glycérol ne pourrait pas être utilisé comme agent dépresseur dans la production de lactones par *Y. lipolytica* car cette levure peut utiliser le glycérol pour la production d'acides organiques. Il serait intéressant d'utiliser d'autres agents dépresseurs pour appliquer dans la bioconversion en utilisant *Y. lipolytica*.

Perspectives

Ce travail a soulevé plusieurs points qui mériteraient des études complémentaires.

- Etudes des différentes formes de *Y. lipolytica* agissant sur le flux métabolique de production de lactones. Deux possibilités pourraient-êre envisagées : (i) *Y. lipolytica* qui ne se développe que sous forme de levure et/ou que sous forme mycélienne pour une étude approfondie sur les flux métaboliques liés à la forme de levures. Certaines souches pourraient-êre utilisées, *Y. lipolytica* ($\Delta hoy1$), *Y. lipolytica* ($\Delta ste11$), *Y. lipolytica* ($\Delta tpk1$) sont des souches qui ne se multiplient que sous forme de levure lors de sa croissance (Domínguez et al. 2000) ; (ii) Il pourrait êre nécessaire de tamponner la matrice solide à pH acide. La levure *Y. lipolytica* se multiplie sous forme de levure à pH acide et la plupart de la population se développent sous forme mycélienne à pH neutre (Ruiz-Herrera and Sentandreu 2002).
- Validation du modèle d'estimation de lactones produites en aération forcée par un système de capture d'arômes. En se basant sur la bibliographie (**Publication de revue**), les colonnes de piégeages d'arômes pourraient êre mises en place en sortie de réacteur FMS à aération forcée. Le principe du système est représenté dans la **Figure 27** ci-dessous. Une colonne pour déshumidifier l'air en sortie de réacteur FMS, le gel de silice ou le chlorure de calcium (CaCl_2) pourraient êre utilisés. De plus, les résines hydrophobes comme l'Amberlite (XAD-2 ou XAD-4) pourraient êre utilisées pour adsorber les lactones.

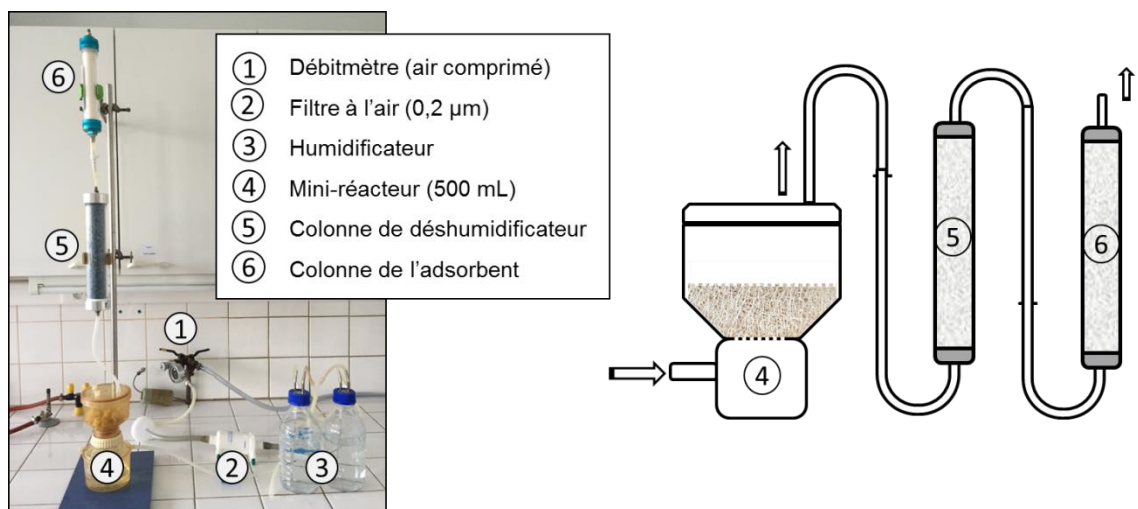


Figure 27 : Système de piégeage d'arômes en sortie de réacteur FMS à aération forcée.

D'autre part, ce travail nous a mené à nous intéresser au développement de certains points :

- Amélioration de la production de γ -décylactone : afin d'améliorer la production de γ -décylactone, un système d'utilisation d'aération forcée (30% de l' O_2) est proposé pour augmenter la valeur de μ_{max} (Figure 28).

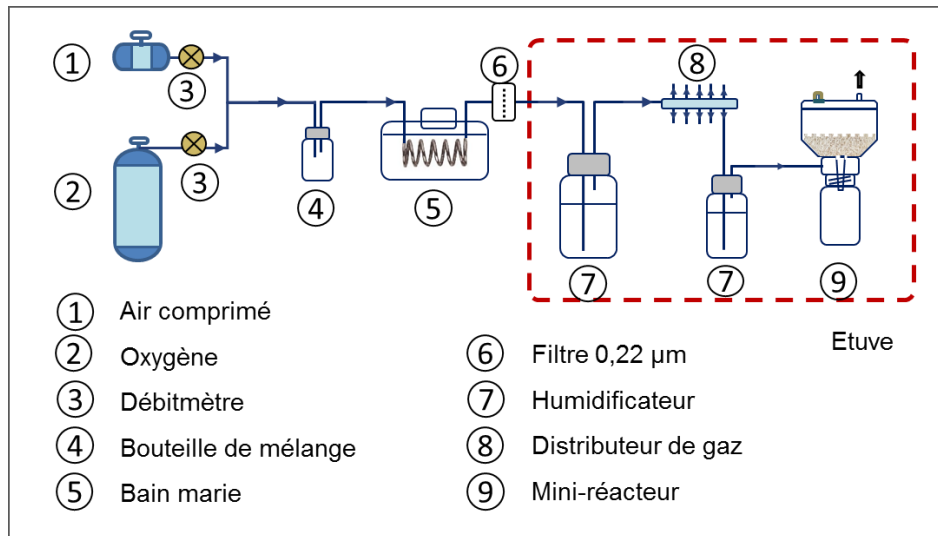


Figure 28 : Système d'aération de l'air enrichi en oxygène.

- Type de support solide et type de réacteur pour la production de lactones en FMS :
 - Les supports solides les plus adaptés doivent avoir les textures permettant le contact avec le maximum de surface possible entre les substrats, le co-substrat (O_2), et la levure. Le type de réacteur Koji semble adapté à la production de lactones en FMS.
 - Il est important de développer un réacteur de ce type à échelle laboratoire (aération, sans aération).
- Le substrat le plus adapté pour la production de lactones en FMS :
 - Les graines de ricin contiennent une quantité élevée d'huile de ricin. Un mélange de graines de ricins broyées mélangé avec d'autre support inerte serait très intéressant.
 - Les supports solides à utiliser pourraient être les rafles de maïs, la paille de riz, la paille de blé, la bourre/fibre de coco –etc.
 - Le tourteau de graines de ricin pourrait être potentiellement un substrat solide pour la production de lactones par *Y. lipolytica* en FMS.
- La déshydratation de l'hydroxy-lactone en décénolides constitue une étape qui, mieux maîtrisée, permettrait une bonne valorisation dans l'industrie des arômes.

REFERENCES

REFERENCES

- Aggelopoulos T, Katsieris K, Bekatorou A, Pandey A, Banat IM, Koutinas AA (2014) Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chem* 145:710-716
- Aguedo M, Gomes N, Garcia EE, Waché Y, Mota M, Teixeira JA, Belo I (2005) Decalactone production by *Yarrowia lipolytica* under increased O₂ transfer rates. *Biotechnol Lett* 27(20):1617-1621
- Ahner J, Mocuta D, Ramsier RD, Yates Jr JT (1997) Anisotropy in the lateral momentum of CO chemisorbed on Cu (110) studied by time-of-flight electron simulated desorption ion angular distribution. *J Vacu Sci Technol A* 15(3):1548-1552
- Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Majad L, Ghalfi H, Wathelet J-P, Thonart P (2009) Production of γ -decalactone by a psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. *Appl Biochem Biotechnol* 158(1):41-50
- Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Thonart P (2010) Production d'arômes de type lactone par des levures. *Biotechnol, Agronom, Soci Environ* 14(4):681
- Ambid C, Carle S, De Billerbeck G (1999) Method for producing and extracting aromatic compounds. WO Patent 9954432
- Annongu AA, Joseph JK (2008) Proximate analysis of castor seeds and cake. *J Appl Sci Environ Manag* 12(1)
- Aroujalian A, Raisi A (2007) Recovery of volatile aroma components from orange juice by pervaporation. *J Membrane Sci* 303(1):154-161
- Baez A, Shiloach J (2014) Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. *Microbi cell facto* 13(1):181
- Bankar AV, Kumar AR, Zinjarde SS (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84(5):847
- Barth G, Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf K (ed) *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* 19:219-237
- Bellou S, Makri A, Triantaphyllidou I-E, Papanikolaou S, Aggelis G (2014) Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiol* 160(4):807-817

- Bengtson G, Bøddeker KW, Hanssen H-P, Urbasch I (1992) Recovery of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by perevaporation. *Biotechnol Techni* 6(1):23-26
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea J-L, Molina-Jouve C, Nicaud J-M (2009) *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progre Lipid Res* 48(6):375-387
- Bomben JL, Bruin S, Thijssen HA, Merson RL (1973) Aroma recovery and retention in concentration and drying of foods. *Advan Food Res* 20:1-111
- Bonnarme P, Djian A, Latrasse A, Féron G, Giniès C, Durand A, Le Quéré J-L (1997) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J Biotechnol* 56(2):143-150
- Braga A, Belo I (2015) Production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization. *J Chem Technol Biotechnol* 90(3):559-565
- Braga A, Mesquita DP, Amaral AL, Ferreira EC, Belo I (2015) Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: differences in yeast metabolism and morphology. *Biochem Eng J* 93:55-62
- Bramorski A, Christen P, Ramirez M, Soccol CR, Revah S (1998) Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates. *Biotechnol Lett* 20(4):359-362
- Breitmaier E (2006) Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Wiley-VCH, Weinheim
- Budwig C, Temperini M, Rushmore D (2000) Volatile nut aroma and flavor compositions, and recovery thereof. Patent US 20020071890A1
- Cabella P, Guarda P, Barbeni M, Fuganti C, Allegrone G, Cardillo R (1991) Process for the microbiological production of the gamma-and delta-lactones. Patent EP 412880
- Cardillo R, Fronza G, Fuganti C, Grasselli P, Mele A, Pizzi D, Allegrone G, Barbeni M, Pisciotta A (1991a) Stereochemistry of the microbial generation of. delta.-decanolide., gamma.-dodecanolide, and. gamma.-nonanolide from C18 13-hydroxy, C18 10-hydroxy, and C19 14-hydroxy unsaturated fatty acids. *J Organic Chem* 56(18):5237-5239
- Carns LG, Tuot J (1993) Recovery of aroma gases. Patent US005222364A
- Carns LG, Tuot J (1994) Recovery of aroma gases. Patent US005323623A
- Carrizalez V, Rodriguez H, Sardina I (1981) Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol Bioeng* 23(2):321-333

- Cavallini A, Censi G, Del Col D, Doretto L, Longo GA, Rossetto L, Zilio C (2003) Condensation inside and outside smooth and enhanced tubes - a review of recent research. *Inter J Refri* 26(4):373-392
- Charles M, Bernal B, Guichard E (1996) Interactions of β -Lactoglobulin with Flavour Compounds. *Special Publi-Royal Soci Chem* 197:433-436
- Cheetham P, Maume K, De Rooij J (1993) Method of producing gamma hydroxydecanoic acid or its lactone by feeding a ricinoleic acid source to *Sporobolomyces odorus* or *Rhodotorula glutinis*. US patent 5(219.742)
- ChemSpider (2018) γ -Décalactone. Royal Society of Chemistry: www.chemspider.com
- Cherbański R, Molga E (2009) Intensification of desorption processes by use of microwaves- an overview of possible applications and industrial perspectives. *Chem Eng Process: Process Intensi* 48(1):48-58
- Christen P, Auria R, Vega C, Villegas E, Revah S (1993) Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnol Adv* 11(3):549-557
- Christen P, Bramorski A, Revah S, Soccol CR (2000) Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Biores Technol* 71(3):211-215
- Christen P, Meza JC, Revah S (1997) Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycolog Res* 101(8):911-919
- Christen P, Raimbault M (1991) Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnol Lett* 13(7):521-526
- Christen P, Revahl S (1998) Fruity aroma production in solid state fermentation by the fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Solid State Fermentation*:43-50
- Christen P, Villegas E, Revah S (1994) Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotechnol Lett* 16(11):1183-1188
- Clavilier J, Armand D (1986) Electrochemical induction of changes in the distribution of the hydrogen adsorption states on Pt (100) and Pt (111) surfaces in contact with sulphuric acid solution. *J Electroana Chem Interfa Electrochem* 199(1):187-200
- Coelho M, Amaral P, Belo I (2010) *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* 2:930-940
- Corzo G, Revah S (1999) Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Biores Technol* 70(2):173-180

- Couto SR, Sanromán MÁ (2006) Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *J Food Eng* 76(3):291-302
- Crank J (1975) *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press, Oxford
- Cui Z, Gao C, Li J, Hou J, Lin CSK, Qi Q (2017) Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH. *Metabo Eng* 42:126-133
- Da Penha MP, Da Rocha-Leão MHM, Leite SGF (2012a) Sugarcane bagasse as support for the production of coconut aroma by solid state fermentation (SSF). *BioRes* 7(2):2366-2375
- Da Penha MP, Da Rocha-Leão MHM, Leite SGF (2012b) Sugarcane bagasse as support for the production of coconut aroma by solid state fermentation (SSF). *BioRes Tecnol* 7(2):2366-2375
- Darchen A, Mahe C, Patin H (1982) Electrochemical induction of successive exchanges of carbonyls by phosphorus ligands in Fe_3S_2LX clusters. *New J Chem* 6(11):539-546
- Davey CL, Penaloza W, Kell DB, Hedger JN (1991) Real-time monitoring of the accretion of *Rhizopus oligosporus* biomass during the solid-substrate tempe fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 7(2):248-259
- De Araújo AA, Pastore GM, Berger RG (2002) Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation *Biotechnol Fuels Chem*. Springer, pp 747-751
- De Barros Soares LH, Assmann F, Záchia Ayub MA (2003) Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. *Biotechnol Appl Biochem* 37(3):295-299
- Desgranges C, Vergoignan C, Georges M, Durand A (1991a) Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 35(2):200-205
- Destain J, Roblain D, Thonart P (1997) Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 19(2):105-108
- Dominguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A (2003) A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 25(15):1225-1229
- Domínguez A, Ferminan E, Gaillardin C (2000) *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. In: Ernst JF, Schmidt A (eds) *Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts*. vol 5. Karger Publishers, pp 151-172

- Donoso-Bravo A, Mailier J, Martin C, Rodríguez J, Aceves-Lara CA, Wouwer AV (2011) Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: a review. *Water Res* 45(17):5347-5364
- Druaux C, Le Thanh M, Seuvre A-M, Voilley A (1998) Application of headspace analysis to the study of aroma compounds-lipids interactions. *J Ameri Oil Chem Soci* 75(2):127-130
- Duchiron F, Copinet E (2011) Fermentation en milieu solide (FMS). Biomédical - Pharma, Médicaments et produits pharmaceutiques, Technique de l'ingénieur BIO620
- Dufossé L, Latrassé A, Spinnler H-E (1994) Importance des lactones dans les arômes alimentaires: structures, distribution, propriétés sensorielles et biosynthèse. *Sci Aliment* 14:17-21
- Durand A (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13(2-3):113-125
- Durand A, De la Broise D, Blachère H (1988) Laboratory scale bioreactor for solid state processes. *J Biotechnol* 8(1):59-66
- Durand A, Renaud R, Maratray J, Almanza S (1997a) The INRA-Dijon reactors: designs and applications. In: Roussos S, Lonsane B, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G (eds) *Advances in solid state fermentation*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 71-92
- Durand A, Renaud R, Maratray J, Almanza S, Diez M (1996) INRA-Dijon reactors for solid state fermentation: designs and applications. *J Sci Indus Res* 55(5-6):317-332
- Durand A, vergoignan C, Desgranges C (1997b) Biomass estimation in solid state fermentation. In: Roussos S, Lonsane B, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G (eds) *Advances in solid state fermentation*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 23-37
- Eaton S, Bartlett KB, Pourfarzam M (1996) Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem J* 320(2):345-357
- Endrizzi-Joran A (1994) Biotransformation de ricinoleate de méthyl en γ -déalactone par des levures. PhD Thesis, Université de Bourgogne, Dijon, France
- Endrizzi A, Pagot Y, Clainche AL, Nicaud J-M, Belin J-M (1996) Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in yeasts. *Crit Rev Biotechnol* 16(4):301-329
- Engel K-H, Heidlas J, Albrecht W, Tressl R (1989) Biosynthesis of chiral flavor and aroma compounds in plants and microorganisms. ACS Publications
- Escamilla-García E (2008) Aspects de la dégradation de substances hydrophobes en composés d'arômes par la levure *Yarrowia lipolytica*. Thèse de l'Université de Bourgogne, Dijon, France

- Escamilla-García E, Aguedo M, Gomes N, Choquet A, Belo I, Teixeira JA, Belin J-M, Waché Y (2009) Production of 3-hydroxy- γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Molec Catal B* 57(1–4):22-26
- Escamilla-García E, Belin JM, Waché Y (2007a) Use of a Doehlert factorial design to investigate the effects of pH and aeration on the accumulation of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 103(5):1508-1515
- Escamilla-García E, Nicaud J-M, Belin J-M, Waché Y (2007b) Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of γ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A factorial approach. *Biotechnol J* 2(10):1280-1285
- Escamilla-García E, O’Riordan S, Gomes N, Aguedo M, Belo I, Teixeira J, Belin J-M, Waché Y (2014) An air-lift biofilm reactor for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* 49(9):1377-1382
- Fadel HHM, Mahmoud MG, Asker MMS, Lotfy SN (2015) Characterization and evaluation of coconut aroma produced by *Trichoderma viride* EMCC-107 in solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Elect J Biotechnol* 18(1):5-9
- Farbood MI, Kizer LE, Morris JA, Harris G, McLean LB (2000) Process for preparing saturated lactones, products produced therefrom and organoleptic uses of said products. Google Patents
- Farbood MI, Morris JA, McLean LB (1998) Fermentation process for preparing 10-hydroxy-C18-carboxylic acid and gamma-dodecalactone derivatives. European Patent 578388
- Farbood MI, Morris JA, Sprecker MA, Bienkowski LJ, Miller KP, Vock MH, Hagedorn ML (1990) Process for preparing compositions containing unsaturated lactones, products produced thereby and organoleptic uses of said products. Google Patents
- Farinas CS (2015) Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew Susta Ener Rev* 52:179-188
- Felipe LdO, Oliveira AMd, Bicas JL (2017) Bioaromas – Perspectives for sustainable development. *Trends Food Sci Technol* 62(Supplement C):141-153
- Feron G, Blin-Perrin C, Krasniewski I, Mauvais G, Lherminier J (2005) Metabolism of fatty acid in yeast: Characterisation of β -oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidiobolus* sp. cultivated on ricinoleic acid methyl ester. *FEMS Microbiol Lett* 250(1):63-69

- Feron G, Dufosse L, Pierard E, Bonnarme P, Quere JL, Spinnler H (1996a) Production, identification, and toxicity of (gamma)-Decalactone and 4-Hydroxydecanoic Acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl Environ Microbiol* 62(8):2826-2831
- Feron G, Dufosse L, Pierard E, Bonnarme P, Quere JL, Spinnler H (1996b) Production, identification, and toxicity of γ -decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl Environ Microbiol* 62(8):2826-2831
- Feron G, Waché Y (2005) Microbial biotechnology of food flavor production. In: Dominick T (ed) *Food Biotechnology*, 2nd edn. Dekker, New York, pp 407-441
- Fickers P, Benetti P-H, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud J-M (2005) Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5(6-7):527-543
- Fickers P, Marty A, Nicaud JM (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Advan* 29(6):632-644
- Fickers P, Nicaud JM, Destain J, Thonart P (2003) Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 63(2):136-142
- Fickers P, Nicaud JM, Gaillardin C, Destain J, Thonart P (2004) Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol* 96(4):742-749
- Finogenova TV, Morgunov IG, Kamzolova SV, Chernyavskaya OG (2005) Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. *Appl Biochem Microbiol* 41(5):418-425
- Fontanille P, Kumar V, Christophe G, Nouaille R, Larroche C (2012) Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biores Technol* 114:443-449
- Förster A, Aurich A, Mauersberger S, Barth G (2007) Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(6):1409-1417
- Gallois A (1984) Les pyrazines présentes dans les aliments, état actuel de nos connaissances. *Sci Alim* 4:145-166
- Gatfield IL (1995) Gamma-decalactone preparation with high stereospecificity. German Patent(4401388A1)

- Gatfield IL (1999) Biotechnological production of natural flavor materials. In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I (ed) Flavor chemistry, thirty years of progress. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, pp 211-227
- Gatfield IL, Güntert M, Sommer H, Werkhoff P (1993) Some aspects of the microbiological production of flavor: active lactones with particular reference to γ -decalactone. Chem Mikrobiol Technol Lebensm 15(5-6):165-170
- Gervais P (1990) Water activity: a fundamental parameter of aroma production by microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 33(1):72-75
- Gervais P, Battut G (1989) Influence of water potential on γ -decalactone production by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. Appl Environ Microbiol 55(11):2939-2943
- Gervais P, Belin JM, Grajek W, Sarrette M (1988a) Influence of water activity on aroma production by *Trichoderma viride* TS growing on a solid substrate. J Ferm Technol 66(4):403-407
- Gervais P, Molin P (2003) The role of water in solid-state fermentation. Biochem Eng J 13(2):85-101
- Gervais P, Molin P, Grajek W, Bensoussan M (1988b) Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. Biotechnol Bioeng 31(5):457-463
- Ghodsizadeh Y (1991) Cryogenic aroma recovery. Patent US005030473
- Gille JJP, Wortelboer HM, Joenje H (1988) Effect of normobaric hyperoxia on antioxidant defenses of HeLa and CHO cells. Free Radi Biol Medi 4(2):85-91
- Gomori G (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies.
- Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, Van Dijck PW, Wyss M (2014) *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Critic Rev Microbiol 40(3):187-206
- Groguenin A, Waché Y, Garcia EE, Aguedo M, Husson F, LeDall M-T, Nicaud J-M, Belin J-M (2004) Genetic engineering of the β -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. J Mol Catal B 28(2):75-79
- Harley JB, Santangelo GM, Rasmussen H, Goldfine H (1978) Dependence of *Escherichia coli* hyperbaric oxygen toxicity on the lipid acyl chain composition. J Bacteriol 134(3):808-820
- Harris CM, Kell DB (1985) The estimation of microbial biomass. Biosensors 1(1):17-84
- Hashim P, Selamat J, Ali A, Kharidah S (1997) Pyrazines formation in cocoa beans: changes during fermentation. J Food Sci Technol 34(6):483-487

- IAL Consultants (2014) An overview of the global flavours and fragrances Market, 9th Edition. http://www.ialconsultants.com/uploads/CUBE_press_release/2014-11-06/F_PressRelease2014.pdf
- Imandi SB, Garapati HR (2007) Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. Res. J Microbiol 2:469-474
- Imandi SB, Karanam SK, Garapati HR (2010) Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). Advan Biosci Biotechnol 1(02):115
- Imandi SB, Karanam SK, Garapati HR (2013) Use of Plackett-Burman design for rapid screening of nitrogen and carbon sources for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from mustard oil cake (*Brassica napus*). Brazi J Microbiol 44(3):915-921
- Imlay JA (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Annu Rev Biochem 77:755-776
- Imlay JA (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. Nature Rev Microbiol 11(7):443-454
- Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM, Vandamme EJ (1992) Production of flavours by microorganisms. Process Biochem 27(4):195-215
- Karlsson HOE, Trägårdh G (1997) Aroma recovery during beverage processing. J Food Eng 34(2):159-178
- Kavšček M, Bhutada G, Madl T, Natter K (2015) Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. BMC Syst Biolo 9(1):72
- Khan FI, Ghoshal AK (2000) Removal of volatile organic compounds from polluted air. J Loss Prev Pro Indus 13(6):527-545
- Kim K-J, Ahn H-G (2012) The effect of pore structure of zeolite on the adsorption of VOCs and their desorption properties by microwave heating. Micropo Mesopo Materi 152:78-83
- Korshunov S, Imlay JA (2006) Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. J Bacteriol 188(17):6326-6334
- Krishna C (2005) Solid-state fermentation systems—an overview. Criti Rev Biotechnol 25(1-2):1-30
- Ladeira NC, Peixoto VJ, Penha MP, de Paula Barros EB, Leite SGF (2010) Optimization of 6-pentyl-alpha-pyrone production by solid state fermentation using sugarcane bagasse as residue. BioRes 5(4):2297-2306

- Lange H, Garbe L (2000) Yeast alpha-oxidation enzymes, used to degrade organic compounds by one carbon atom, used to convert 5-hydroxydecanoic acid to gamma-nonalactone. Patent DE19929577
- Lapadatescu C, Bonnarme P (1999) Production of aryl metabolites in solid-state fermentations of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Biotechnol Lett* 21(9):763-769
- Larroche C, Besson I, Gros J-B (1999) High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochem* 34(6):667-674
- Le-Thanh M (1992) Extraction de substances aromatisantes produites par voie microbiologique-Etudes des interactions entre substances d'arôme et constituents d'un milieu de culture liquide. Thèse de l'Université de Bourgogne, Dijon, France
- Lee LW, Tay GY, Cheong MW, Curran P, Yu B, Liu SQ (2017a) Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: I. Green coffee. *LWT* 77:225-232
- Lee LW, Tay GY, Cheong MW, Curran P, Yu B, Liu SQ (2017b) Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowia lipolytica*: II. Roasted coffee. *LWT* 80:32-42
- Li C, Yang X, Gao S, Wang H, Lin CSK (2017) High efficiency succinic acid production from glycerol via in situ fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biores Technol* 225:9-16
- Liang S-H, Wu H, Wang R-R, Wang Q, Shu T, Gao X-D (2017) The TORC1–Sch9–Rim15 signaling pathway represses yeast-to-hypha transition in response to glycerol availability in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Molecul Microbiol* 104(4):553-567
- Lin AA, Miller WM (1992) Modulation of glutathione level in CHO cells. *Annals New York Acad Sci* 665(1):117-126
- Madey TE, Yates Jr JT (1977) Desorption methods as probes of kinetics and bonding at surfaces. *Surface Sci* 63:203-231
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich J-M (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 109(1):63-81
- Maga JA (1992) Pyrazine update. *Food Rev Inter* 8(4):479-558

- Magdouli S, Guedri T, Tarek R, Brar SK, Blais JF (2017) Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. *Biores Technol* 243:57-68
- Makri A, Fakas S, Aggelis G (2010) Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Biores Technol* 101(7):2351-2358
- Mandrallis ZI, Westfall S, Yunker KA (2000) Aroma recovery process. Patent US006149957A
- Manpreet S, Sawraj S, Sachin D, Pankaj S, Banerjee UC (2005) Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malay J Microbiol* 2(1):1-9
- Mantzouridou FT, Paraskevopoulou A, Lalou S (2015) Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. *Biochem Eng J* 101:1-8
- Masuda H, Mihara S (1988) Olfactive properties of alkylpyrazines and 3-substituted 2-alkylpyrazines. *J Agri Food Chem* 36(3):584-587
- Matcham SE, Jordan BR, Wood DA (1984) Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. *Techn Seri-Soci Appl Bacteriol*
- Mazurek R, Temperini M, Barfuss D, Rushmore D (2000) Natural cocoa aroma/flavor compositions and methods for preparing same. Patent US006090427A
- Medeiros ABP, Christen P, Roussos S, Gern JC, Soccol CR (2003) Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazi J Microbiol* 34(3):245-248
- Medeiros ABP, Pandey A, Christen P, Fontoura PSG, de Freitas RJS, Soccol CR (2001) Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. *World J Microbiol Biotechnol* 17(8):767-771
- Medeiros ABP, Pandey A, Freitas RJS, Christen P, Soccol CR (2000) Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochem Eng J* 6(1):33-39
- Medeiros ABP, Pandey A, Vandenberghe LPS, Pastore GM, Soccol CR (2006) Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. *Food Technol Biotechnol* 44(1):47-51

- Messner KR, Imlay JA (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274(15):10119-10128
- Meyer J (1993) γ -Decalactone microbial production from alkyl ricinoleate by hydrolysis, β -oxidation, and chemical cyclisation of 4-hydroxy decanoic acid produced for flavoring and perfume. German Patent DE 4:18
- Mezey EJ, DiNovo ST (1982) Adsorbent regeneration and gas separation utilizing microwave heating. Google Patents
- Mitchell DA, Berovič M, Krieger N (2000) Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. In: Scheper T (ed) *New Products and New Areas of Bioprocess Engineering*. vol 68. Springer, Heidelberg, Berlin, pp 61-138
- Mitchell DA, Berovič M, Krieger N (2006) Introduction to solid-state fermentation bioreactors. In: Mitchell D, Berovič M, Krieger N (eds) *Solid-State Fermentation Bioreactors*. Springer, Heidelberg Berlin, pp 33-44
- Miyara A (2008) Condensation of hydrocarbons – A review. *Inter J Refri* 31(4):621-632
- Mori K, Iwama R, Kobayashi S, Horiuchi H, Fukuda R, Ohta A (2013) Transcriptional repression by glycerol of genes involved in the assimilation of n-alkanes and fatty acids in yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 13(2):233-240
- Mossel DAA (2012) Water and micro-organisms in foods—a synthesis. *Water Relations of Foods*, RB Duckworth, Ed(Academic, London, 1975):347-361
- Murthy MVR, Thakur MS, Karanth NG (1993) Monitoring of biomass in solid state fermentation using light reflectance. *Biosen Bioelectro* 8(1):59-63
- Nicaud J-M, Le Clainche A, Le Dall M-T, Wang H, Gaillardin C (1998) *Yarrowia lipolytica*, a yeast model for the genetic studies of hydroxy fatty acids biotransformation into lactones. *J Mol Catal B* 5(1):175-181
- Nicaud JM (2012) *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 29(10):409-418
- Nicaud JM, Belin JM, Pagot Y, Endrizzi-Joran A (1996) Bio-conversion of substrate with microbe auxotrophic for compound in medium deficient in this compound. FR Patent FR2734843
- Nijhuis CA, Yu F, Knoll W, Huskens J, Reinhoudt DN (2005) Multivalent dendrimers at molecular printboards: influence of dendrimer structure on binding strength and stoichiometry and their electrochemically induced desorption. *Langmuir* 21(17):7866-7876

- Nongonierma A, Springett M, Voilley A (2003) Kinetic of flavour transfers at gas/matrix interfaces of multiphasic food models Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century. TEC & DOC edn. Intercept, pp 240-243
- Noykova NA, Gyllenberg M (2000) Sensitivity analysis and parameter estimation in a model of anaerobic waste water treatment processes with substrate inhibition. *Bioprocess Biosy Eng* 23(4):343-349
- Okui S, Suzuki Y, Momose K, Ogamo A (1963a) Chemical properties and enzymatic reduction of neotetrazolium chloride. *The J Biochem* 53(6):500-502
- Okui S, Uchiyama M, Mizugaki M (1963b) Metabolism of hydroxy fatty acids. *The J Biochem* 54(6):536-540
- Okui S, Uchiyama M, Mizugaki M, Sugawara A (1963c) Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by *Candida* genus. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Specialized Section on Lipids and Related Subjects* 70:346-348
- Oostra J, Tramper J, Rinzema A (2000) Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. *Enz Micro Technol* 27(9):652-663
- Oriol E, Raimbault M, Roussos S, Viniegra-Gonzales G (1988) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 27(5):498-503
- Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S (2011) Environmental, scanning electron and optical microscope image analysis software for determining volume and occupied area of solid-state fermentation fungal cultures. *Biotechnol J* 6(1):45-55
- Page GV, Eilerman RG (1991) Process for the preparation of gamma and delta lactones. Google Patents
- Pagot Y, Le Clainche A, Nicaud J-M, Wache Y, Belin J-M (1998) Peroxisomal β -oxidation activities and γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49(3):295-300
- Pandey A (2001) Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asiatech, New Delhi
- Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13(2-3):81-84
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000) New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem* 35(10):1153-1169
- Papanikolaou S, Chevalot I, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Marc I, Aggelis G (2007) Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid,

- single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electro J Biotechnol* 10(3):425-435
- Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Komaitis M, Aggelis G (2008) Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Biores Technol* 99(7):2419-2428
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* 92(4):737-744
- Parfene G, Horincar V, Tyagi AK, Malik A, Bahrim G (2013) Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem* 136(3):1345-1349
- Park YC, Shaffer CEH, Bennett GN (2009) Microbial formation of esters. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(1):13-25
- Peñaloza W, Davey CL, Hedger JN, Kell DB (1991) Stimulation by potassium ions of the growth of *Rhizopus oligosporus* during liquid-and solid-substrate fermentations. *World J Microbiol Biotechnol* 7(2):260-268
- Pereira CC, Ribeiro CP, Nobrega R, Borges CP (2006) Pervaporative recovery of volatile aroma compounds from fruit juices. *J Membr Sci* 274(1):1-23
- Pham-Hoang BN, Voilley A, Waché Y (2016) Molecule structural factors influencing the loading of flavoring compounds in a natural-preformed capsule: Yeast cells. *Colloids Surf B* 148:220-228
- Polaert I, Estel L, Huyghe R, Thomas M (2010) Adsorbents regeneration under microwave irradiation for dehydration and volatile organic compounds gas treatment. *Chem Eng J* 162(3):941-948
- Poll L (1983) Influence of storage temperature on sensory evaluation and composition of volatiles of McIntosh apple juice. *Lebensm-Wissens Technol* 16:220-223
- Prior BA, Du Preez JC, Rein PW (1992) Environmental parameters. *Solid substrate cultivation*:65
- Rabenhorst J, Gatfield I (2000) Process for the production of gamma-decalactone. *European Patent* 997533
- Raimbault M (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electro J Biotechnol* 1(3):26-27
- Raimbault M, Germon JC (1976) Procédé d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides. *French Patent*(76-06-677)

- Rakicka M, Lazar Z, Dulermo T, Fickers P, Nicaud JM (2015) Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol Biofu* 8(1):104
- Ramos AdS, Fiaux SB, Leite SGF (2008) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Braz J Microbiol* 39(4):712-717
- Ratkowsky DA, Lowry RK, McMeekin TA, Stokes AN, Chandler RE (1983) Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol* 154(3):1222-1226
- Reid RC, Prausnitz JM, Poling BE (1987) *The properties of gases and liquids*. New York
- Rekker RF (1977) The hydrophobic fragmental constant. Its derivation and applications. A means of characterizing membrane systems. *Pharmacochimistry Library* 1
- Revah S, Morgan-Sagastume JM (2005) Methods of odor and VOC control. In: Shareefdeen Z, Singh A (eds) *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 29-63
- Ribeiro CP, Lage PLC, Borges CP (2004) A combined gas-stripping vapour permeation process for aroma recovery. *J Membr Sci* 238(1):9-19
- Richer J-C (1993) *Compendium de terminologie chimique et lexique anglais/français*. Groupe Communication Canada
- Rocha-Valadez JA, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E, Serrano-Carreón L (2005) 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnol Bioeng* 91(1):54-61
- Rosales E, Rodríguez Couto S, Sanromán MA (2007) Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzy Micro Technol* 40(5):1286-1290
- Rossi SC, Vandenberghe LPS, Pereira BMP, Gago FD, Rizzolo JA, Pandey A, Soccol CR, Medeiros ABP (2009) Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Res Inter* 42(4):484-486
- Roussy G, Zoulalian A, Charreyre M, Thiebaut JM (1984) How microwaves dehydrate zeolites. *J Phys Chem* 88(23):5702-5708
- Ruiz-Herrera J, Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archi Microbiol* 178(6):477-483
- Saffarionpour S, Ottens M (2017) Recent advances in techniques for flavor recovery in liquid food processing. *Food Eng Rev*:1-14

- Sampaio KL, Garruti DS, Franco MRB, Janzantti NS, Da Silva MAA (2011) Aroma volatiles recovered in the water phase of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice during concentration. *J Sci Food Agri* 91(10):1801-1809
- Sarhy-Bagnon V, Lozano P, Saucedo-Castañeda G, Roussos S (2000) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochem* 36(1-2):103-109
- Sato K, Nagatani M, Nakamura K-I, Sato S (1983) Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. *J Fermen Technol* 61(6):623-629
- Saucedo-Castaneda G, Trejo-Hernandez MR, Lonsane BK, Navarro JM, Roussos S, Dufour D, Raimbault M (1994) On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem* 29(1):13-24
- Seigler DS (2012) Plant secondary metabolism. Springer Science & Business Media
- Seitz EW (1994) Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavors and fragrances. In: Gabelman A (ed) Bio-process production of favor, fragrance, and color ingredients. Wiley, New York, pp 95-134
- Serrano-Carreón L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin J-M (1993) Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl- α -pyrone biosynthesis by *Trichoderma* species. *Appl Environ Microbiol* 59(9):2945-2950
- Seuvre A-M, Voilley A (2017) Physico-Chemical Interactions in the Flavor-Release Process. In: Buettner A (ed) Springer Handbook of Odor. Springer, pp 273-302
- Siedlecki DT, Meinhold JF (1977) Method for fixing coffee grinder gas. Patent US004007291
- Siek TJ, Albin IA, Sather LA, Lindsay RC (1971) Comparison of Flavor Thresholds of Aliphatic Lactones with Those of Fatty Acids, Esters, Aldehydes, Alcohols, and Ketones 1, 2. *J Dairy Sci* 54(1):1-4
- Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzy Micro Technol* 46(7):541-549
- Sinigaglia M, Lanciotti R, Guerzonil ME (1994) Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can J Microbiol* 40(1):54-59

- Soares M, Christen P, Pandey A, Soccol CR (2000) Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochem* 35(8):857-861
- Soccol CR, Da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, de Souza Vandenberghe LP (2017a) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov* 1(1)
- Soccol CR, Da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, de Souza Vandenberghe LP (2017b) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov* 1(1):52-71
- Soccol CR, Medeiros AB, Vandenberghe LP, Soares M, Pandey A (2008) Production of aroma compounds. In: Pandey A, Soccol CR, Larroche C (eds) *Current developments in solid-state fermentation*. Springer, pp 356-376
- Song K-H, Song J-H, Lee K-R (2003) Vapor permeation of ethyl acetate, propyl acetate, and butyl acetate with hydrophobic inorganic membrane. *Separ Purifi Technol* 30(2):169-176
- Soto ML, Moure A, Domínguez H, Parajó JC (2011) Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review. *J Food Eng* 105(1):1-27
- Souchon I (1994) *Extraction en continu de lactones produites par voie microbiologique*. Thèse de l'Université de Bourgogne, Dijon, France
- Souchon I, Pierre FX, Athes-Dutour V, Marin M (2002) Pervaporation as a deodorization process applied to food industry effluents: recovery and valorisation of aroma compounds from cauliflower blanching water. *Desalination* 148(1):79-85
- Souchon I, Spinnler HE, Dufosse L, Voilley A (1998) Trapping of γ -Decalactone by adsorption on hydrophobic sorbents : Application to the bioconversion of methyl ricinoleate by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnol Techni* 12(2):109-113
- Spinnler HE, Dufossé L, Souchon I, Latrasse A, Piffaut-Juffard C, Voilley A, Delest P (1994) Production of gamma-decalactone by bioconversion. FR patent 2705971
- Stuerga DAC, Gaillard P (1996) Microwave Athermal Effects in Chemistry: A Myth's Autopsy: Part I: Historical background and fundamentals of wave-matter interaction. *J Microw Pow Electroma Ener* 31(2):87-100
- Sun LM, Meunier F, Baron G (2005) Adsorption-Procédés et applications. *Biomédical - Pharma/Médicaments et produits pharmaceutiques, Techniques de l'Ingénieur* J2731-V1

- Sun LM, Meunier F, Brodu N, Manero MH (2016) Adsorption-Aspects théoriques. Procédés chimie - bio - agro/Opérations unitaires, Génie de la réaction chimique, Techniques de l'Ingénieur J2730-V2
- Ta TMN, Cao-Hoang L, Romero-Guido C, Lourdin M, Phan-Thi H, Goudot S, Marechal P-A, Waché Y (2012) A shift to 50 C provokes death in distinct ways for glucose-and oleate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(5):2125-2134
- Thierry A, Chicheportiche R (1988) Use of ATP bioluminescence measurements for the estimation of biomass during biological humification. *Appl Microbiol Biotechnol* 28(2):199-202
- Thomas L, Larroche C, Pandey A (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 81:146-161
- Thomas WJ, Crittenden BD (1998) Adsorption technology and design. Butterworth-Heinemann, Great Britain, pp 119
- Thonon B (2008) A review of hydrocarbon two-phase heat transfer in compact heat exchangers and enhanced geometries. *Inter J Refri* 31(4):633-642
- Try S, De-Coninck J, Voilley A, Chunhieng T, Waché Y (2018) Solid state fermentation for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem* 64(C):9-15
- Uchiyama M, Sato R, Mizugaki M (1963) Characterization of hydroxy acids in depot fat after feeding of ricinoleic acid. *Biochim Biophys Acta* 70:344-346
- US EPA (2018) γ -Decalactone, Chemistry Dashboard. United States Environmental Protection Agency:<https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?utf8=%E2%9C%93&search=%CE%B3-decalactone>
- Van der Walt JP, Von Arx JA (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46(6):517-521
- Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH, Harder W (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 3(2):77-84
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, de Jesus Romero-Gomez S, Diaz-Godinez G, Augur C (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J* 13(2):157-167
- Vong WC, Au Yang KLC, Liu S-Q (2016) Okara (soybean residue) biotransformation by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Inter J Food Microbiol* 235:1-9

- Vong WC, Hua XY, Liu S-Q (2018) Solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Yarrowia lipolytica* improved nutritional and flavour properties of okara. LWT 90:316-322
- Waché Y (2002) Les acyl-Coenzymes de *Yarrowia lipolytica*, rôle dans la production d'arômes. Thèse de l'Université de Bourgogne, Dijon, France
- Waché Y (2013a) Microbial production of food flavours. In: McNeil B AD, Giavasis I, Harvey L (ed) Microbial production of food Ingredients, enzymes and nutraceuticals. Woodhead, Cambridge, pp 175-193
- Waché Y (2013b) Production of dicarboxylic acids and fragrances by *Yarrowia lipolytica*. In: Barth G (ed) *Yarrowia lipolytica*. vol 25. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 151-170
- Waché Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield IL, Nicaud J-M, Belin J-M (2001) Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol 67(12):5700-5704
- Waché Y, Aguedo M, LeDall M-T, Nicaud J-M, Belin J-M (2002) Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β -oxidation pathway for γ -decalactone production. J Mol Catal B 19:347-351
- Waché Y, Aguedo M, Nicaud J-M, Belin J-M (2003) Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Appl Microbiol Biotechnol 61(5):393-404
- Waché Y, Husson F, Feron G, Belin J-M (2006) Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. Antonie Van Leeuwenhoek 89(3):405-416
- Waché Y, Laroche C, Bergmark K, Møller-Andersen C, Aguedo M, Le Dall M-T, Wang H, Nicaud J-M, Belin J-M (2000) Involvement of acyl Coenzyme A oxidase Isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol 66(3):1233-1236
- Waché Y, Pagot Y, Nicaud J-M, Belin J-M (1998) Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. J Molec Catal B 5(1-4):165-169
- Wang H, Le Clainche A, Le Dall MT, Waché Y, Pagot Y, Belin JM, Gaillardin C, Nicaud JM (1998) Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. Yeast 14:1373-1386
- Wang R, Shaarani SM, Godoy LC, Melikoglu M, Vergara CS, Koutinas A, Webb C (2010) Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. Enzy Micro Technol 47(3):77-83

- Wang X, Daniels R, Baker RW (2001) Recovery of VOCs from high-volume, low-VOC-concentration air streams. *AIChE J* 47(5):1094-1100
- Wickerham LJ, Kurtzman CP, Herman AI (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Sci* 167(3921):1141-1141
- Wiebe JP, Dinsdale CJ (1991) Inhibition of cell proliferation by glycerol. *Life Sci* 48(16):1511-1517
- Wylock C, Eloundou Mballa PP, Heilporn C, Debaste F, Fauconnier ML (2015) Review on the potential technologies for aromas recovery from food industry flue gas. *Tren Food Sci Technol* 46(1):68-74
- Yamamoto S, Storey KB (1988) Influence of glycerol on the activity and tetramer-dimer state of lactate dehydrogenase isozymes. *Inter J Biochem* 20(11):1267-1271
- Yarrow D (1972) Four new combinations in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 38(1):357-360
- Yun EJ, Lee J, Kim DH, Kim J, Kim S, Jin Y-S, Kim KH (2018) Metabolomic elucidation of the effects of media and carbon sources on fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 272-273:7-13
- Zinjarde S, Apte M, Mohite P, Kumar AR (2014) *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnol Adv* 32(5):920-933
- Zinjarde S, Pant A, Deshpande MV (1998) Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. *Mycol Res* 102(5):553-558

