



**HAL**  
open science

**Identification de facteurs opératoires influents en vue  
d'une production microbienne optimale de torularhodine  
et de sa fonctionnalisation enzymatique, à partir  
d'études cinétiques**

Ligia Alves da Costa Cardoso

► **To cite this version:**

Ligia Alves da Costa Cardoso. Identification de facteurs opératoires influents en vue d'une production microbienne optimale de torularhodine et de sa fonctionnalisation enzymatique, à partir d'études cinétiques. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008. Français. NNT : 2008INPL082N . tel-01753061

**HAL Id: tel-01753061**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01753061>**

Submitted on 29 Mar 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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

IDENTIFICATION DE FACTEURS OPÉRATOIRES INFLUENTS EN VUE  
D'UNE PRODUCTION MICROBIENNE OPTIMALE DE  
TORULARHODINE ET DE SA FONCTIONNALISATION ENZYMATIQUE,  
À PARTIR D'ÉTUDES CINÉTIQUES

**Thèse**

Présentée devant

l'Institut National Polytechnique de Lorraine  
pour obtenir le grade de

**Docteur de l'I.N.P.L.**

École doctorale : Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement  
Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Soutenue publiquement par

Ligia Alves Da Costa Cardoso

le 14 novembre 2008 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

Mme Fabienne Guérard, professeur  
M. Stéphane Guillouet, maître de conférences

Université de Bretagne Occidentale  
I.N.S.A. – Université de Toulouse

Examineurs :

M. Séraphim Papanikolaou, maître de conférences  
Mme Annie Marc, directeur de recherche au C.N.R.S

Université Agronomique d'Athènes  
Nancy université

Directeur de thèse :

Ivan Marc, directeur de recherche au C.N.R.S

Nancy université

Co-directeur de thèse :

Mme Isabelle Chevalot, maître de conférences

Nancy université

Invité :

M. Frantz Fournier, maître de conférences

Nancy université



IDENTIFICATION DE FACTEURS OPÉRATOIRES INFLUENTS EN VUE  
D'UNE PRODUCTION MICROBIENNE OPTIMALE DE  
TORULARHODINE ET DE SA FONCTIONNALISATION ENZYMATIQUE,  
À PARTIR D'ÉTUDES CINÉTIQUES

**Thèse**

Présentée devant

l'Institut National Polytechnique de Lorraine  
pour obtenir le grade de

**Docteur de l'I.N.P.L.**

École doctorale : Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement  
Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Soutenue publiquement par

Ligia Alves Da Costa Cardoso

le 14 novembre 2008 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

Mme Fabienne Guérard, professeur  
M. Stéphane Guillouet, maître de conférences

Université de Bretagne Occidentale  
I.N.S.A. – Université de Toulouse

Examineurs :

M. Séraphim Papanikolaou, maître de conférences  
Mme Annie Marc, directeur de recherche au C.N.R.S

Université Agronomique d'Athènes  
Nancy université

Directeur de thèse :

Ivan Marc, directeur de recherche au C.N.R.S

Nancy université

Co-directeur de thèse :

Mme Isabelle Chevalot, maître de conférences

Nancy université

Invité :

M. Frantz Fournier, maître de conférences

Nancy université



*A mon mari Rodrigo,  
A mes parents Fábio et Elinete.*





## *Remerciements*

C'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à l'aboutissement de ce travail de thèse.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (L.S.G.C.) dans le groupe du Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires (G.P.B.A.). Je remercie le Professeur Michel Sardin de m'avoir accueilli au sein du L.S.G.C.

Je remercie Monsieur Ivan Marc, directeur de recherche, pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail ainsi que pour son encadrement et ses conseils. Je remercie Madame Isabelle Chevalot, maître de conférences à l'E.N.S.A.I.A., pour avoir accepté de co-diriger cette thèse, pour son aide et ses conseils.

Je voudrais ensuite exprimer ma reconnaissance à tous les membres du jury pour le temps investi dans la réalisation ou l'évaluation de cette étude.

Je remercie Madame Fabienne Guérard et Monsieur Stéphane Guillouet qui ont accepté de porter un jugement expert en tant que rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Madame Annie Marc et Monsieur Seraphim Papanikolaou pour avoir participé à la soutenance en qualité d'examineurs.

Je remercie Monsieur Frantz Fournier pour sa collaboration primordiale dans la partie modélisation.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux nombreux étudiants dont les compétences, les efforts et la motivation ont permis de mener à bien ce travail. Un grand merci particulièrement à Steffi, Ana-Adelina, Marcela, Camelia et David.

Un grand merci à Xavier Framboisier pour sa disponibilité, sa bonne humeur et pour tous les efforts fournis pour l'identification de la torularhodine, et à Fabrice Blanchard pour l'aide qu'il m'a apporté pour le démarrage de ma thèse, ses qualités de bricoleur, et pour tous les bons moments de discussions et détente que nous avons partagé.

Merci également à Cédric Paris pour les efforts fournis en spectrométrie de masse.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Christelle Harscoat-Schivao pour sa collaboration dans la partie analytique de ce travail, à Emmanuel Rondags pour l'aide à la mise en œuvre des cultures en bioréacteur, à Emmanuel Guédon pour son aide avec la presse de French, à Evelyne Ronat pour ses solutions informatiques, à Sylvia L'Huillier pour son

aide administrative, ainsi qu'à l'ensemble des permanents composant le G.P.B.A. pour leur bonne humeur, particulièrement à Romain Kapel.

Merci également pour leur amitié à tous les thésards que j'ai eu l'occasion de croiser durant ces 3 ans : Anissa, Françoise, Eric, Emma, Marie, Kenza, Naziha, Jamila, Tatiana, et Rizwan. Je pense aussi à tous les stagiaires passés dans le laboratoire, Paula, Bubu, Annia, Christina, Jeremy, Marilena, Mohammed..., pour leur amitié inconditionnelle et leurs encouragements qui ont contribué à ce séjour agréable. Les histoires de leurs vies et de leurs cultures marqueront ma mémoire.

Merci aussi à tous ceux de la plateforme SVS et particulièrement à Zehra la « chef ».

Enfin, je remercie mes parents Fabio et Elinete pour leur amour et soutien inconditionnel.

Je remercie de tout mon cœur mon mari Rodrigo pour son amour, son soutien et sa patience tout au long de ma thèse.

## Sommaire

---



## SOMMAIRE

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

## NOMENCLATURE

INTRODUCTION GENERALE .....	2
CHAPITRE I – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	6
<b>I.1. Caroténoïdes</b> .....	6
I.1.1. Introduction générale .....	6
I.1.2. Les pigments naturels .....	7
I.1.3. Structure chimique.....	8
I.1.4. Propriétés physiques et chimique .....	8
I.1.5. Propriétés biologiques.....	9
I.1.6. La torularhodine.....	9
I.1.7. La bixine et la norbixine .....	9
I.1.8. Biosynthèse des caroténoïdes .....	11
<b>I.2. Levures à pigment rouges</b> .....	17
I.2.1. <i>Sporobolomyces ruberrimus</i> .....	18
I.2.2. Facteurs influençant la production des caroténoïdes par voie microbienne .....	18
I.2.2.1. Influence des paramètres physico-chimiques .....	19
I.2.2.2. Composition du milieu de culture.....	20
I.2.2.3. Rôle des acides gras dans le comportement des levures.....	21
<b>I.3. Extraction, analyse et purification des caroténoïdes</b> .....	23
I.3.1. Extraction et stabilité des caroténoïdes.....	23
I.3.1.1. Extraction .....	23
I.3.1.2. Stabilité .....	25
I.3.2. Techniques d'analyse et de purification des caroténoïdes.....	26
<b>I.4. Optimisation et modélisation</b> .....	27
I.4.1. Modélisation .....	27
I.4.1.1. Introduction.....	27
I.4.2. Généralités .....	27
I.4.2.1. Notion du système.....	27
I.4.2.2. Notion du modèle.....	28
I.4.3. La planification expérimentale .....	28
I.4.3.1. La démarche expérimentale .....	29
I.4.3.2. Les plans d'expériences optimaux .....	29
I.4.3.3. Propriétés du modèle.....	30
I.4.3.4. Les critères de qualité d'un plan optimal.....	31
I.4.4. Optimisation multicritère.....	32
I.4.4.1. Introduction.....	32
I.4.4.2. Définitions.....	32
I.4.4.3. Algorithmes évolutionnaires .....	32
I.4.4.3.1. Les approches non basées sur l'optimalité de Pareto.....	33
I.4.4.3.2. Les approches basées sur l'optimalité de Pareto.....	33

<b>I.5. La réaction d'acylation</b> .....	33
I.5.1. La catalyse chimique .....	33
I.5.2. La catalyse enzymatique .....	34
I.5.3. Les enzymes .....	35
I.5.4. Les lipases .....	36
I.5.4.1. La structure des lipases .....	36
I.5.4.2. Mécanisme d'action de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> .....	37
I.5.4.3. Applications industrielles .....	39
I.5.4.4. Les types de réactions catalysées par les lipases .....	39
I.5.4.5. Paramètres influençant la réaction de synthèse .....	40
I.5.4.5.1. Le milieu réactionnel .....	40
I.5.4.5.2. Enzyme .....	41
I.5.4.5.3. La nature des substrats .....	41
I.5.4.5.4. Effet de l'eau .....	41
I.5.5. Acylation des caroténoïdes .....	42
I.5.5.1. Acylation chimique de caroténoïdes .....	43
I.5.5.2. Acylation enzymatique de caroténoïdes .....	45
 CHAPITRE II – MATERIEL ET METHODES .....	 48
<b>II.1. Matériel</b> .....	48
II.1.1. Souche de levure .....	48
II.1.2. Réactifs .....	48
II.1.2.1. Réactifs pour milieu de culture et conservation de la souche .....	48
II.1.2.2. Réactifs pour analyses .....	48
II.1.2.3. Effluents gazeux .....	49
II.1.3. Analyseurs .....	49
II.1.3.1. Chromatographie liquide haute performance .....	49
II.1.3.2. Chromatographie en phase gazeuse .....	50
II.1.4. Préparation des cultures et fermenteur .....	50
II.1.5. Préparation pour les synthèses .....	50
II.1.6. Divers .....	50
<b>II.2. Milieux de culture</b> .....	51
II.2.1. Milieu de conservation « YM » .....	51
II.2.2. Milieu de pré-culture et de culture .....	51
<b>II.3. Conduite des cultures</b> .....	52
II.3.1. Milieu de pré-culture 1 .....	52
II.3.2. Milieu de pré-culture 2 .....	53
II.3.3. Conditions de cultures discontinues en fermenteur 3 L .....	53
<b>II.4. Méthodes analytiques</b> .....	54
II.4.1. Prélèvement des échantillons .....	54
II.4.2. Séparation cellules – milieu .....	55
II.4.3. Détermination de la concentration en levure .....	55
II.4.4. Dosage du glycérol .....	56
II.4.5. Désintégration des cellules, extraction des pigments et caractérisation protéique des extraits .....	57
II.4.5.1. Identification par spectrométrie de masse .....	59

II.4.5.2. Dosage des protéines dans les extraits de caroténoïdes .....	59
II.4.5.3. Étude de la dégradation des caroténoïdes .....	60
II.4.6. Capacité antioxydante des caroténoïdes .....	61
II.4.7. Dosage des acides gras dans le glycérol technique .....	61
II.4.8. Estérification méthylique .....	62
II.4.9. Analyse des esters méthyliques .....	63
<b>II.5. Interprétation des résultats .....</b>	<b>64</b>
II.5.1. Calcul des vitesses .....	64
II.5.2. Rendements .....	65
<b>II.6. Outils de planification expérimentale, de modélisation et d'optimisation .....</b>	<b>65</b>
II.6.1. Mise en œuvre de la stratégie expérimentale multicritère .....	66
II.6.2. Description du système .....	66
II.6.2.1. Facteurs d'action .....	67
II.6.2.2. Réponses à modéliser .....	67
II.6.2.3. Choix des critères de construction .....	67
II.6.2.4. L'algorithme génético-évolonnaire .....	67
II.6.2.5. Adaptation de l'algorithme pour l'optimisation multicritère .....	68
II.6.2.6. Réglages de l'algorithme et temps de calculs .....	69
<b>II.7. Synthèses enzymatiques .....</b>	<b>69</b>
II.7.1. L'enzyme .....	69
II.7.2. La bixine .....	70
II.7.3. Réacteur .....	70
II.7.4. Techniques analytiques .....	71
II.7.4.1. Analyse qualitative sur couche mince .....	71
II.7.4.2. Analyse par chromatographie liquide haute performance .....	72
II.7.4.3. Spectrométrie de masse .....	73
II.7.4.4. Séparation des produits réactionnels et de synthèse sur colonne .....	73
<b>CHAPITRE III – RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>III.1. Analyses des acides gras présents dans le glycérol technique .....</b>	<b>77</b>
III.1.1. Conclusion .....	79
<b>III.2. Influence des acides gras sur la croissance de la levure en conditions non   contrôlées .....</b>	<b>80</b>
III.2.1. Croissance en fioles d'Erlenmeyer .....	80
III.2.2. Production de caroténoïdes en boîtes de Pétri .....	82
III.2.3. Hypothèse de l'utilisation des acides gras par la levure .....	83
III.2.4. Conclusion .....	83
<b>III.3. Réglages pour la mise en œuvre et le suivi des cultures en bioréacteur .....</b>	<b>84</b>
III.3.1. Influence de la nature et de la concentration des caroténoïdes sur la mesure de la biomasse .....	84
III.3.2. Coagulation des acides gras pendant la stérilisation .....	85
III.3.3. Dosage des acides gras du milieu de culture .....	87
III.3.4. Extraction, analyse et identification des caroténoïdes .....	88

III.3.4.1. Étude de la stabilité des caroténoïdes au cours du temps.....	91
III.3.5. Conclusion .....	95
III.3.6. Cultures comparées de <i>SP. Ruberrimus</i> sur différentes sources de glycérol .....	95
III.3.6.1. Introduction .....	95
III.3.6.2. Résultats cinétiques comparés de <i>SP. ruberrimus</i> sur trois sources de glycérol différentes : croissance et production de caroténoïdes.....	97
<b>III.4. Etude de l'influence des différents ajouts d'acide gras.....</b>	<b>103</b>
III.4.1. Influence de la supplémentation du milieu de culture contenant du glycérol pur en différents acides gras .....	104
III.4.2. Influence de la supplémentation du milieu de culture contenant du glycérol technique B avec différents acides gras .....	107
III.4.3. Influence de la supplémentation du milieu de culture contenant du glycérol technique B avec différentes concentrations d'acide oléique.....	108
III.4.4. Influence de l'oxygène dissous sur le comportement métabolique de <i>SP. ruberrimus</i> .....	111
III.4.5. Conclusion .....	114
<b>III.5. Optimisation des conditions opératoires .....</b>	<b>115</b>
III.5.1. Définition du problème .....	116
III.5.2. Pertinence du choix des facteurs .....	117
III.5.3. Plan d'expériences multicritère pour la modélisation des performances du procédé... ..	119
III.5.4. Construction du plan d'expériences .....	119
III.5.5. Description de la construction et la représentation de la zone de Pareto obtenue .	120
III.5.6. Représentation mathématique .....	122
III.5.7. Conclusion .....	126
<b>III.6. Fonctionnalisation enzymatique de caroténoïdes porteur d'une fonction carboxylique .....</b>	<b>128</b>
III.6.1. Caractérisation d'un caroténoïde modèle, la bixine extraite d'annatto.....	129
III.6.1.1. Analyse qualitative par CCM.....	129
III.6.1.2. Mise en évidence des produits de dégradation de la bixine par CLHP couplée à la spectrométrie de masse.....	130
III.6.2. Mise en œuvre de l'acylation enzymatique de la lysine par la bixine .....	136
III.6.2.1. Analyse qualitative des produits de synthèse .....	137
III.6.2.2. Influence de certains paramètres opératoires .....	139
III.6.2.2.1. Choix de la température .....	139
III.6.2.2.2. Choix du rapport molaire en substrat .....	140
III.6.2.3. Purification du produit de synthèse .....	142
III.6.2.4. Activité antiradicalaire de la bixine et de son dérivé .....	143
III.6.3. Fonctionnalisation de la torularhodine.....	145
III.6.4. Conclusion .....	147
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>149</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>155</b>



## **LISTE DES FIGURES**

### **CHAPITRE I**

Figure I.1. Structure chimique des principaux caroténoïdes.....	6
Figure I.2. Représentation des ventes des caroténoïdes (März, 2005).....	7
Figure I.3. Structure chimique générale des caroténoïdes.....	8
Figure I.4. Structure chimique de la torularhodine.....	9
Figure I.5. Structure chimique de la bixine et de la norbixine.....	10
Figure I.6. Mécanisme de l'élimination du m-xylène (a) et du toluène (b). En I, la 9'-cis-bixine, - II, le m-xylène, - III, la molécule C17 formée par la dégradation, - IV, le toluène et en V, la molécule C18 formée par la dégradation (Scotter et al., 1994).....	11
Figure I.7. Schéma des principales étapes de la biosynthèse des caroténoïdes.....	11
Figure I.8. Premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes (Goldstein et Brown, 1990).....	12
Figure I.9. Schéma de conversion du phytoène en lycopène (Porter et Lincoln, 1950).....	13
Figure I.10. Formation des caroténoïdes cycliques.....	14
Figure I.11. Formation des xanthophylles à partir du $\alpha$ -carotène (a) et $\beta$ -carotène (b).....	15
Figure I.12. Voie proposée pour la biosynthèse des caroténoïdes par <i>Rhodotorula glutinis</i> (Simpson et al., 1964).....	16
Figure I.13. Voie de synthèse de la bixine et norbixine proposé par Jako et al. (2002).....	17
Figure I.14. Schéma de dégradation des acides gras par $\beta$ -oxydation (Gilber, 2008).....	21
Figure I.15. Voie de biosynthèse des caroténoïdes (Moraes et al., 2002).....	22
Figure I.16. Techniques de désintégration de la paroi des microorganismes, d'après la proposition modifiée de Edebo et Magnusson (2008).....	24
Figure I.17. Structure de deux des principaux antioxydants de synthèse, BHT et TBHQ, de qualité alimentaire utilisés dans diverses applications.....	25
Figure I.18. Schéma simplifié d'un système (Muniglia, 2001), avec $u$ : vecteur des variables d'entrées, $y$ : vecteur des sorties mesurées, $x$ : vecteur des variables d'état.....	27
Figure I.19. Schéma du repliement $\alpha/\beta$ . Les flèches représentent les feuilletts $\beta$ et les rectangles les hélices $\alpha$ (Uppenberget al., 1994).....	37

Figure I.20. Mécanisme d'acylation catalysée par la triade catalytique de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> selon le modèle bi-ping-pong d'après Malcata et al., 1992 et Lopez-Serrano et al., 2001. A) Conformation initiale de l'enzyme et approche du substrat. B) Formation et stabilisation du premier intermédiaire tétraédrique. C) Libération de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme. D) Attaque nucléophile. E) Formation et stabilisation du deuxième intermédiaire tétraédrique. F) Libération du produit acylé et retour à la conformation initiale de l'enzyme.....	38
Figure I.21. Ensemble des différentes réactions catalysées par des lipases.....	40
Figure I.22. Structure chimique des diesters formés (a) lutéine disodium disiccinique et (b) lutéine disodium diphosphate (Nadolski et al., 2006).....	44
Figure I.23. Structure chimique des monoesters formés (a) Caro-Trolox et (b) Caro-BHT (Karagiannidou et al., 2003).....	44
Figure I.24. Structure chimique des monoesters formés par la transesterification de la bixine ou par l'estérification de la norbixine (Humeau et al., 2000).....	45

## CHAPITRE II

Figure II.1. Schéma global des différentes étapes de pré-culture avant fermentation.....	52
Figure II.2. Schéma général du réacteur 3L utilisé et de ses périphériques.....	54
Figure II.3. Corrélation obtenue entre l'absorbance à 600 nm et la concentration cellulaire massique de <i>SP. ruberrimus</i> .....	56
Figure II.4. Corrélation obtenue entre la concentration de glycérol pur et l'aire de pic.....	57
Figure II.5. Profil d'élution utilisé pour la séparation des caroténoïdes (d'après Weber et al. (2007)).....	58
Figure II.6. Corrélation obtenue entre la concentration de $\beta$ -carotène et l'aire de pic.....	59
Figure II.7. Schéma du montage pour l'estérification méthylique.....	62
Figure II.8. Profil de température utilisé pour la séparation des acides gras par CPG.....	63
Figure II.9. Schéma du réacteur wheaton® et de son environnement.....	71
Figure II.10. Profil d'élution, utilisé pour le dosage de la bixine et du produit résultant de l'acylation de la bixine.....	73
Figure II.11. Schéma du système utilisé pour la collecte des fractions purifiées.....	74

## CHAPITRE III

Figure III.1. Schéma général de l'ensemble de la démarche suivie pour cette étude.....	77
Figure III. 2. Analyse des acides gras présents dans le glycérol technique A (a) et B (b) par Chromatographie phase gazeuse (CPG).....	78

Figure III.3. Culture de <i>SP. ruberrimus</i> en boîtes de Pétri avec un milieu contenant du glycérol pur (a) glycérol technique A (b) et glycérol technique B (c).....	79
Figure III.4. Culture de <i>SP. ruberrimus</i> en boîtes de Pétri avec un milieu contenant du glycérol pur (contrôle) et additionné de différents acides gras à différents concentrations.....	82
Figure III.5. Mesure de la densité optique, par spectrophotométrie à 600 nm, dans pour une même concentration en biomasse obtenue dans différentes conditions opératoires.....	84
Figure III.6. Corrélation mesurée, entre l'absorbance à 600 nm d'un échantillon de fermentation et la masse sèche des cellules de <i>Sp. ruberrimus</i> (a) 24 h;(b) 48 h;(c) 72 h;(d) 96 h.....	85
Figure III.7. Insolubilité des acides gras saturés, palmitique et stéarique, créant leur accumulation dans certaines parties du bioréacteur.....	86
Figure III.8. Chromatogramme UV-visible obtenu après séparation, par CLHP, du mélange des caroténoïdes produits par <i>Sporobolomyces ruberrimus</i> (A = torularhodine; B = torulene; C = $\gamma$ -carotène; D = $\beta$ -carotène).....	88
Figure III.9. Spectre de masse APCI-SM en mode positif des caroténoïdes produits par <i>Sporobolomyces ruberrimus</i> . Le pic A de la figure III.8 correspond à (a), torularhodine; le pic B à (b), torulene; le pic C à (c), $\gamma$ -carotène et le pic D à (d), $\beta$ -carotène.....	89
Figure III.10. Voie proposée pour la biosynthèse des caroténoïdes chez <i>Rhodotorula glutinis</i> (Simpson et al., 1964).....	90
Figure III.11. Étude d'effet de l'ajout des antioxydants sur la dégradation des caroténoïdes. (a) échantillon témoin, (b) BHT à 0,04 %, (c) BHT à 0,1 %, (d) BHT à 0,2 %, (e) TBHQ à 0,04 %, (f) TBHQ à 0,1 et (g) TBHQ à 0,2 %.....	92
Figure III.12. Représentation semi-logarithmique, en fonction du temps, des courbes cinétiques de dégradation de la torularhodine (a), du torulène (b) et du $\beta$ -carotène (c), obtenue à l'abri de la lumière à 4 °C et en présence d'air.....	94
Figure III.13. Bioréacteur de 3 L (a) et les conditions opératoires (b) utilisées pour les cultures comparées sur différentes sources de glycérol.....	96
Figure III.14. Cinétique de croissance de <i>Sporobolomyces ruberrimus</i> et de consommation du glycérol à 23 °C, pH 6 et taux d'oxygène dissous = 50 %. Symboles : $\blacklozenge$ Glycérol pur, $\blacksquare$ Glycérol technique A, $\bullet$ Glycérol technique B.....	98
Figure III.15. Cinétique d'accumulation des caroténoïdes produits par <i>SP. ruberrimus</i> à 23 °C, pH 6, OD = 50 % à partir de glycérol pur (33,5 g/L). Symboles: $\blacklozenge$ torularhodine, $\blacksquare$ torulene, $\bullet$ $\beta$ -carotène et $\blacktriangle$ $\gamma$ -carotène.....	99
Figure III.16. Cinétique de formation des caroténoïdes en concentration spécifique en UA/gX/L (a) et de formation du $\beta$ -carotène mg/gX (b) produits par <i>SP. ruberrimus</i> à 23 °C, pH 6, OD = 50 % et glycérol technique B (33,5 g/L). Symboles: $\blacklozenge$ torularhodine, $\blacksquare$ torulene, $\bullet$ $\beta$ -carotène et $\blacktriangle$ $\gamma$ -carotène.....	100
Figure III.17. Influence de différentes sources de glycérol sur le pourcentage de répartition intracellulaire des caroténoïdes (UA/gX/L). (a) glycérol pur; (b) glycérol technique A; (c) glycérol technique B.....	101
Figure III.18. Cinétiques de croissance et consommation du glycérol pur de <i>SP. ruberrimus</i> à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %. Cultures réalisées avec ajout de différents acides gras (palmitique, stérique, oléique et linoléique) à une même concentration de 2 g/L.....	105
Figure III.19. Influence de différents ajouts d'acide gras dans le glycérol pur (33,5 g/L) sur l'accumulation des caroténoïdes (aire du pic/g de cellules). (a) sans ajout; (b) acide palmitique; (c) acide stérique; (d) acide oléique; (e) acide linoléique.....	106

Figure III.20. Cinétiques de croissance et de consommation du glycérol technique B de <i>SP. ruberrimus</i> à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %. Cultures réalisées avec ajout de différents acides gras (palmitique, stérique, oléique et linoléique) à la même concentration, 2 g/L.....	107
Figure III.21. Cinétiques de croissance et de consommation du glycérol technique B de <i>SP. ruberrimus</i> à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %. Cultures réalisées avec ajout d'acide oléique à 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L et 20 g/L.....	109
Figure III.22. Cinétique de formation des caroténoïdes (UA/g/L) chez <i>SP. ruberrimus</i> avec l'ajout d'acide oléique à 2 g/L (a), à 10 g/L (b) et à 15 g/L (c) à 23 °C, pH 6, OD = 50 % et glycérol technique B (33,5 g/L). Symboles : ♦ torularhodine, ■ torulene, ● β-carotène et ▲ γ-carotène.....	110
Figure III.23. Cinétiques de croissance et de consommation du glycérol technique B par <i>SP. ruberrimus</i> à 23 °C, pH 6 et différents OD. Cultures réalisées avec ajout d'acide oléique à 2 g/L. (a) 10 %, (b) 50 % et (c) 80 % d'oxygène dissous.....	111
Figure III.24. Cinétique de formation des caroténoïdes produits par <i>SP. ruberrimus</i> avec ajout d'acide oléique à 2 g/L et OD à 10 % (a) et à 80 % (b) à 23 °C, pH 6 et glycérol technique B (33,5 g/L). Symboles : ♦ torularhodine, ■ torulene, ● β-carotène et ▲ γ-carotène.....	112
Figure III.17. Influence du taux d'oxygène dissous sur l'accumulation des caroténoïdes (aire du pic/g de cellules). (a) 10 %; (b) 50 % et (c) 80 %.....	113
Figure III.26. Méthodologie générique d'optimisation du procédé de fermentation.....	115
Figure III.27. Représentation des critères de construction, zone de Pareto finale.....	121
Figure III.28 Optimisation multicritère de la concentration de torularhodine et le taux de croissance maximum de la levure. (a) Front de Pareto et (b) Zone de Pareto. T = température (°C); OD = taux d'oxygène dissous (%) et AO = concentration d'acide oléique (g/L).....	125
Figure III.29. Structure chimique de la cis-bixine.....	129
Figure III.30. Analyse en chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait de l'annatto poudre issue de la graine de <i>Bixa orellana</i> . Le solvant de migration utilisé est le butanol/acide acétique/eau (60/20/20).....	130
Figure III.31. Chromatogramme UV ( $\lambda = 460$ nm) de la bixine (Tr = 5,61 minutes).....	131
Figure III.32. Spectre de masse – electro-spray en mode positif pour le pic à 5,4 mn de l'extrait éthanolique de la poudre issue de la graine de <i>Bixa orellana</i> .....	131
Figure III.33 : Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique correspondant à m/z de 395 (a) montrant les deux pics à des temps de 5,28 et 5,49 mn correspondants aux deux isomères de la bixine pour un m/z de 395 ; spectre de masse (b).....	132
Figure III.34 : Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique de l'ion 381 à un temps de rétention de 2 mn (a), correspondant à m/z de 381 (norbixine + H <sup>+</sup> ) (b).....	133
Figure III.35 : Produit majoritaire de la dégradation thermique de la bixine : ester monométhyle de l'acide 4,8-diméthyl-tétradécahexanoïque (C17), selon Scotter <i>et al.</i> (2001).....	133
Figure III.36 : Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique total à un temps de rétention de 3 mn (a), correspondant à m/z = 288 pour la molécule C17 et m/z de 310 (M+Na <sup>+</sup> ).....	134

---

Figure III.37 : Suivi, par spectrométrie de masse (courant ionique pour $m/z = 395$ ), des deux isomères de la bixine placée dans $M_2B_2$ à $50^\circ C$ pour les temps $t_0$ , 24 et 72h.....	135
Figure III.38. Schéma réactionnel de formation potentielle de composés mono et/ou diacylés lors de l'acylation de la lysine avec la bixine ou la norbixine.....	136
Figure III.39. Suivi d'une réaction préliminaire en chromatographie sur couche mince sur gel de silice comprenant quatre échantillons prélevés au cours de la réaction d'acylation. Solvant de migration : butanol/ acide acétique/ eau (60/ 20/ 20) (v/v/v) et révélation à la ninhydrine.....	138
Figure III.40. Spectres de masse, obtenus à l'aide d'une source ESI, en mode positif, avec extraction de l'ion 509 du mélange réactionnel à 72 h.....	138
Figure III.41. Suivi de la formation du produit de synthèse par Novozym 435 (20 g/L) sur CCM (gel de silice) en fonction du RM (rapport molaire lysine / bixine) (a) RM = 1/1 ; (b) RM = 2/1 et (c) RM = 1/2. Concentrations molaires des substrats : 1 = 0,06 M et 2 = 0,12 M.....	141
Figure III.42. Analyse d'évaluation, par CCM, de la pureté de l'échantillon purifiée à partir d'un milieu réactionnel de fin de réaction (72 h) et le produit purifié sur colonne de silice.....	142
Figure III.43. Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique de l'ion 509 du produit purifié. Analyse par spectrométrie de masse-ESI en mode positif.....	143
Figure III.44. Mesure de l'activité anti-radicalaire envers le DPPH' pour différentes concentrations de caroténoïdes (a) $\beta$ -carotène, (b) canthaxanthine, (c) bixine et (d) du dérivé de la bixine.....	144
Figure III.45. CCM après révélation à la ninhydrine des échantillons prélevés au cours de la réaction d'acylation de la torularhodine. Rapport 1/2 (Lysine/Torularhodine). T-o correspond au temps juste avant l'ajout de l'enzyme et To le temps du prélèvement 2 mn après l'ajout d'enzyme.....	146



## **LISTE DES TABLEAUX**

### **CHAPITRE I**

Tableau I.1. Principaux critères de qualité pour la construction de plans optimaux (Muniglia, 2001) .....	31
Tableau I.2. Avantages à utiliser les enzymes en milieu organique (Sheldon, 1996).....	35
Tableau I.3. Applications industrielles des lipases (Enaud, 2004).....	39

### **CHAPITRE II**

Tableau II.1. Ingrédients pour la préparation du réactif de Bradford .....	60
Tableau II.2. Composition de la solution standard utilisée pour l'identification des esters méthyliques .....	64
Tableau II.3. Réglages de l'algorithme génético-évolonnaire.....	69
Tableau II.4. Temps de calculs moyens pour l'optimisation.....	69

### **CHAPITRE III**

Tableau III.1. Effet de l'ajout de différents acides gras à différentes concentrations sur la concentration de <i>SP. ruberrimus</i> , après 144 h de culture en température régulée (24 °C) et sous agitation constante. Oxygène dissous et pH non régulés.....	81
Tableau III.2. Temps de rétention en CLHP-phase inverse associés aux caractéristiques d'absorption maximale dans le visible et aux masses correspondantes déterminées par APCI-SM des caroténoïdes produits par <i>SP. ruberrimus</i> .....	91
Tableau III.3. Caractéristiques quantitatives de <i>SP. ruberrimus</i> en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et OD = 50 % avec différentes sources de carbone (33,5 g/L) : glycérol pur, glycérol technique A et glycérol technique B.....	103
Tableau III.4. Caractéristiques quantitatives de <i>SP. ruberrimus</i> en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et OD = 50 % avec du glycérol pur (33,5 g/L) et supplémentation de différents acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) à une même concentration, 2 g/L.....	106
Tableau III.5. Caractéristiques quantitatives de <i>SP. ruberrimus</i> en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et OD = 50 % avec du glycérol technique B (33,5 g/L) et supplémentation de différents acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) à une même concentration, 2 g/L).....	108

Tableau III.6. Caractéristiques quantitatives de <i>SP. ruberrimus</i> en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et OD = 50 % avec du glycérol technique B (33,5 g/L) et supplémentation d'acide oléique à 2 g/L, 5 g/L, 15 g/L et 20 g/L .....	109
Tableau III.7. Caractéristiques quantitatives de <i>SP. ruberrimus</i> en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et à différents OD (10 % ; 50 % et 80 %), avec du glycérol technique B et supplémentation d'acide oléique 2 g/L.....	114
Tableau III.8. Facteurs considérés et intervalles d'étude.....	116
Tableau III.9. Indicateurs de performances du procédé de production de torularhodine.....	116
Tableau III.10. Conditions opératoires retenues pour l'analyse des facteurs : taux d'oxygène dissous et concentration d'acide oléique.....	117
Tableau III.11. Analyse des effets des facteurs taux d'oxygène dissous (OD) en % et concentration d'acide oléique (AO) en g/L sur les indicateurs de performance du procédé. En grisé : effets non significatifs.....	118
Tableau III.12. Critères de qualité choisie pour la construction du plan d'expériences.....	120
Tableau III.13. Caractéristiques des expériences à réaliser.....	121
Tableau III.14. Résumé des coefficients des modèles polynomiaux obtenus pour chaque indicateur de performance du procédé. T = température (°C) ; OD = taux d'oxygène dissous (%) et AO = concentration d'acide oléique (g/L).....	122
Tableau III.15. Optimisation de la concentration en torularhodine et taux de croissance maximum en monocritère. ND : non déterminé.....	123
Tableau III.16. Résultats des conditions optimales pour la maximisation de la concentration de torularhodine et du taux de croissance maximum. T = température (°C) ; OD = taux d'oxygène dissous (%) et AO = concentration d'acide oléique (g/L).....	126
Tableau III.17. Composition du milieu réactionnel et conditions opératoires de la réaction d'acylation.....	137
Tableau III.18. Activité antiradicalaire de différents caroténoïdes pour une concentration de 0,16 mM.....	145
Tableau III.19. Conditions opératoires mises en œuvre pour la réaction d'acylation de la torularhodine.....	145



## Nomenclature

$\mu$ :	Vitesse spécifique de production de biomasse (g/g.h)
Acétyl-coA :	Acétyl-coenzyme A
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AO :	Acide Oléique (g/L)
APCI :	Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
BHT :	Butyl-Hydroxy-Toluène
C :	Atome (s) de carbone
CCM :	Chromatographie en Couche Mince
CLHP :	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPG :	Chromatographie en Phase Gazeuse
DMSO :	Diméthyl-sulfoxyde
DO :	Densité Optique
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
ESI :	Ionisateur par électro-spray
GB :	Glycérol technique B
GDP :	Géranyl-diphosphate
GGDP :	Géranylgéranyl-diphosphate
GP :	Glycérol Pur
IPP :	Isopentényl-pyrophosphate
LC-SM :	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
M <sub>2</sub> B <sub>2</sub> :	2-MéthylButanol-2
MM :	Masse Molaire (g/mol)
OD :	taux d'Oxygène Dissous (%)
RF :	Rapport Frontal
RM :	Rapport Molaire
R <sub>x/s</sub> :	Rendement global de formation de la biomasse à partir de la consommation du substrat (g/g)
<i>Sp. ruberrimus</i> :	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>
T :	Température (°C)
TBHQ :	Tert-butyl-hydroquinone

TFA :	Acide trifluoroacétique
to :	Temps initial (0 h)
tr :	Temps de rétention (mn)
UA :	Unité Arbitraire (signal électronique/L)
UV :	Ultra Violet
X :	Concentration en biomasse (g/L)
YM :	Yeast Malt
Cts :	Constantes
$Y_{p/x}$ :	Rendement global de formation du produit P à partir de la concentration de biomasse (g/g)

# Introduction

---



## **INTRODUCTION GENERALE**

Les caroténoïdes représentent une grande famille de pigments naturels ou de synthèse très répandus. Les végétaux sont leur source classique de production, mais ils sont aussi présents dans les algues et les microorganismes – bactéries, levures et champignons filamenteux. Depuis longtemps, ils sont employés en tant qu'additifs aux propriétés colorantes dans l'industrie alimentaire. A côté de cela, ils ont suscité un intérêt grandissant grâce à leurs propriétés provitaminique (vitamine A), antioxydante et antiradicalaire.

De nombreuses souches sauvages ou génétiquement modifiées, principalement issues des genres *Rhodotorula* et *Phaffia* ont été étudiées pour la production de caroténoïdes. Les levures du genre *Sporobolomyces* font partie de ces microorganismes variés, connus ou non, qui n'ont pas encore été soumis à toutes sortes d'investigations. Connue depuis 1950, l'espèce *ruberrimus* n'a été officiellement répertoriée qu'en 2000, alors que les premières véritables mais encore rares études la concernant sont apparues depuis 1995.

Récemment, une première étude d'isolement et de détermination des conditions de mise en œuvre en bioréacteur d'une nouvelle souche de *Sporobolomyces ruberrimus* a été réalisée par Razavi (2004) au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, en raison de l'intérêt que présentait sa couleur rouge vif. Ce travail a permis de mettre en évidence l'aptitude de cette souche à croître à partir de glycérol technique, issu de la filière de production de biocarburants de type Gazole, et ses capacités élevées pour la production de torularhodine.

Concernant ce pigment, si une multitude de travaux ont traité du  $\beta$ -carotène, de la canthaxantine ou encore de l'astaxanthine, qui sont les principaux caroténoïdes actuellement recherchés pour des applications à gros volume, rares sont les informations rapportées sur la torularhodine. Pour l'essentiel, les quelques données disponibles sont apparues depuis l'année 2000, provenant presque exclusivement d'équipes japonaises. La torularhodine, qui n'est pas disponible commercialement, est présentée comme possédant une activité antioxydante très élevée (Sakaki et *al.*, 2002) et servant de précurseur à la vitamine A (Myers, 1996) ; elle est l'un des deux seuls caroténoïdes naturels possédant une fonction acide carboxylique, avec la bixine/norbixine qui est, par contre, très utilisée en Amérique du Sud.

L'existence d'une fonction carboxylique terminale sur la chaîne poly-isoprénique de la torularhodine ouvre, *a priori*, de nombreuses possibilités réactionnelles afin de modifier cette

molécule ; les caroténoïdes étant connus pour leur instabilité/réactivité, la fonctionnalisation de la torularhodine pourrait, peut-être, accroître sa « stabilité » (augmentation de sa stabilité thermique, diminution de sa sensibilité à la lumière ou modification de sa solubilité, par exemple), ou lui conférer des propriétés/activités nouvelles. Ceci peut être réalisé de manière spécifique par l'utilisation d'enzymes, de type lipase notamment, en milieu organique. Toutefois, les lipases sont capables de catalyser des réactions inverses de l'hydrolyse, permettant ainsi de réaliser des réactions d'estérification, de transestérification et d'aminolyse en milieu non conventionnel. L'équilibre entre la réaction d'hydrolyse et la réaction réverse de synthèse est contrôlé par l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel. Ce type de réaction entre, par exemple, un caroténoïde à fonction carboxylique insoluble en milieu aqueux, et un acide aminé/peptide, reste un défi puisqu'aucune réaction de ce type n'a été tentée ou, plus exactement, proposée dans la littérature.

La possibilité de poursuivre l'étude de la mise en œuvre de *Sporobolomyces ruberrimus*, synthétisant la torularhodine, en vue d'optimiser, au sens multicritère, des facteurs opératoires du procédé discontinu pour une production satisfaisante de ce caroténoïde, a représenté une opportunité pour :

- développer une méthodologie de planification expérimentale multicritère basée sur l'utilisation de plans optimaux,
- envisager une réaction d'acylation d'un acide aminé, la lysine.

Ceci a permis de définir, dans les grandes lignes, les objectifs de cette thèse en considérant, par ailleurs, que le substrat utilisé sera du glycérol technique dont la composition en constituants annexes (acides gras) est susceptible de varier. Ainsi, ce travail pourra également être considéré comme une contribution à une valorisation potentielle de ce co-produit de l'agro-industrie.

L'objectif premier est donc d'optimiser les conditions de mise en œuvre de la levure en bioréacteur régulé. Pour cela, deux étapes seront nécessaires.

Le substrat carboné, de type glycérol technique, pouvant provenir de diverses origines et aboutir à des performances de culture, supérieures à celles obtenues avec du glycérol pur (Razavi, 2004), il sera nécessaire, dans une première étape :

- d'identifier le contenu de ce substrat et, dans une approche globale et qualitative, d'évaluer comparativement le potentiel de deux de ces substrats et celui du glycérol pur, au regard de la croissance et de la production des caroténoïdes,
- de réaliser une première étude comparée du comportement de *Sp. ruberrimus* en bioréacteur sous conditions de température, pH et aération contrôlées afin de choisir un seul des deux glycérol technique pour la suite du travail.

La deuxième étape sera, d'abord, une étape expérimentale consacrée à l'identification de facteurs influants sur la cinétique de croissance et de production de torularhodine en bioréacteur régulé. Il s'agira d'étudier la supplémentation du milieu de culture par quatre acides gras, choisis essentiellement parmi ceux présents dans le glycérol technique, puis de choisir celui paraissant le plus performant par rapport aux résultats attendus, pour valider, ensuite, un potentiel effet concentration de cet acide gras. Enfin, l'influence du taux d'oxygénation sera observée et quantifiée sur les paramètres cinétiques. Cette partie conduira à proposer trois variables supposées avoir une action sur le comportement de la levure, soit sur la croissance, soit sur la production de torularhodine, ou sur les deux objectifs.

La deuxième partie de cette deuxième étape, consistera, alors, à proposer une démarche de planification expérimentale multicritère répondant à deux types de plans optimaux, et intégrant les résultats quantitatifs obtenus en bioréacteur dans la première partie de cette étape. Dès lors, des expériences nouvelles devront être réalisées pour pouvoir modéliser les effets des facteurs opératoires sur des variables quantitatives discriminantes ; leur optimisation sera proposée par deux approches, l'une monocritère et l'autre multicritère.

L'objectif second est d'aborder la réaction d'acylation enzymatique d'un acide aminé, la lysine, en utilisant les potentialités de donneur de groupe acyle que sont potentiellement les caroténoïdes carbonylés. Avant de tenter la réaction d'amidation souhaitée, à l'aide de la lipase B de *Candida antarctica* en milieu organique, il sera nécessaire de mettre au point les conditions réactionnelles ainsi que les techniques analytiques adéquates. Une réaction modèle sera, dans un premier temps, réalisée en utilisant la bixine/norbixine. Les résultats de cette réaction serviront à formuler une analyse critique sur les conditions réactionnelles.





Chapitre I  
Étude bibliographique

---



## CHAPITRE I – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1. Caroténoïdes

#### I.1.1. Introduction générale

Les caroténoïdes représentent une grande famille de pigments naturels très répandus dans la nature, plus de 700 ont été isolés et caractérisés, on peut les trouver en multiples nuances de jaune, d'orange ou rouge (Oliver et Palou, 2000). Présents dans les végétaux, les algues, les microorganismes – bactéries, levures et champignons filamenteux, ils sont employés en tant qu'additifs dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Sandmann *et al.*, 1999). Ils suscitent un intérêt grandissant grâce à leurs propriétés provitaminique (vitamine A), antioxydante et antiradicalaire (Gu *et al.*, 2007).

Les caroténoïdes ont généralement une structure chimique de quarante carbones composés de huit unités isopréniques (à 5 C) organisées en un hydrocarbure acyclique (fig. I.1). La structure de base des caroténoïdes est linéaire et symétrique, mais une cyclisation d'une des extrémités ou des deux est possible. D'autres transformations de la structure comme l'hydrogénation, la déshydrogénation ou l'oxydation sont responsables pour la grande variété des caroténoïdes connues. Les doubles liaisons confèrent à la molécule un caractère chromophore et sont responsables de la coloration des caroténoïdes (Nicol et Maudet, 2000).

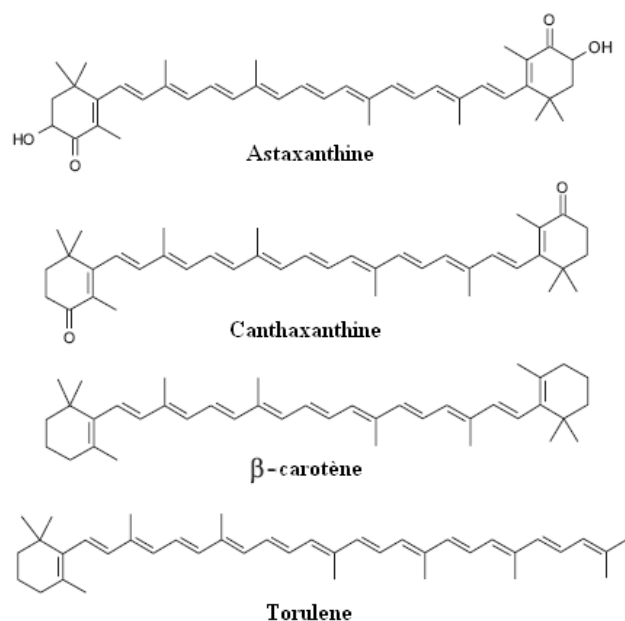


Figure I.1. Structure chimique des principaux caroténoïdes.

### I.1.2. Les pigments naturels

Les pigments naturels sont utilisés par l'homme pour améliorer l'aspect des aliments produits artisanalement et pour colorer le corps. Le safran, un pigment naturel de couleur jaune orangé, a longtemps été utilisé pour conférer la couleur jaune au beurre.

L'utilisation des pigments artificiels date du XIX<sup>ème</sup> siècle, depuis ces pigments sont très utilisés dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. En 1938, l'utilisation de 200 pigments artificiels différents ont été répertoriés, mais de nos jours, l'utilisation de seulement sept de ces pigments est autorisée pour la coloration des aliments. Ces colorants artificiels ont causé de sérieux problèmes de santé (Downham et Collins, 2000). Pour cela, la demande des consommateurs et de l'industrie alimentaire pour l'utilisation de pigments naturels est en grande expansion au cours ces 30 dernières années. Les pigments naturels ne sont pas nocifs pour la santé et, de plus, ils peuvent posséder des propriétés biologiques représentant ainsi des avantages certains par rapport à l'utilisation de colorants artificiels.

D'après une étude réalisée par BCC (Business Communications Company Inc.), le marché mondial des caroténoïdes a été de 887 millions de dollars en 2004 et est estimée à plus de 1 milliard de dollars en 2009, avec une croissance moyenne annuelle de 2,9 %. L'alimentation est le plus important secteur d'utilisation des caroténoïdes où le  $\beta$ -carotène est le caroténoïde les plus utilisé (fig. I.2), représentant 242 millions de dollars en 2004.

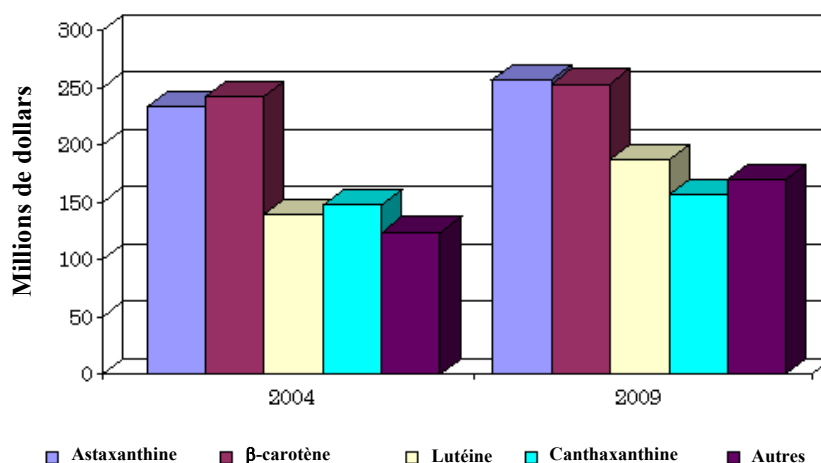


Figure I.2. Représentation des ventes des caroténoïdes (März, 2005).

La production des caroténoïdes est dominée par la synthèse chimique et l'extraction à partir des plantes. La production à partir de la biosynthèse microbienne n'est pas très

importante par rapport aux autres types d'obtention. Cependant, la recherche pour la réduction des coûts de production des colorants naturels issus de microorganisme est en expansion. Ces recherches visent à découvrir des souches microbiennes sauvages nouvelles qui favoriseraient le développement de procédés d'obtention des colorants au label « naturel » par rapport à ceux obtenus par synthèse chimique ou même par extraction à partir des plantes (Dufossé, 2006).

### I.1.3. Structure chimique

Les caroténoïdes constituent une classe de composés chimiques comprenant les carotènes et les xanthophylles. Ils font partie d'une grande classe de composés caractérisés par la présence d'un enchaînement de 8 unités isopréniques ( $C_5H_8$ ) qui forment ainsi la structure de base  $C_{40}H_{56}$ , représentée dans la figure I.3. Les différents caroténoïdes dérivent de cette structure acyclique par hydrogénation, déshydrogénation, cyclisation, oxydation ou tout autre combinaison des ces réactions (Morais *et al.*, 2002).

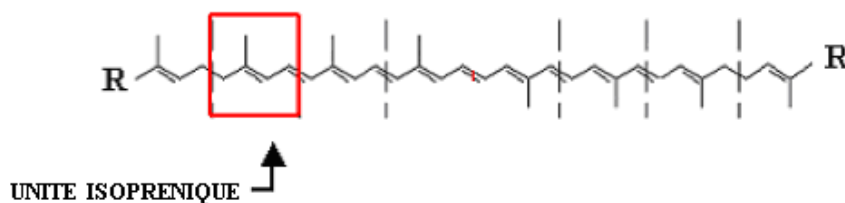


Figure I.3. Structure chimique générale des caroténoïdes.

### I.1.4. Propriétés physiques et chimiques

Les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants apolaires et également dans les graisses alimentaires. Le spectre d'un caroténoïde possède trois maxima, dont les longueurs d'onde dépendent du nombre de liaisons doubles conjuguées. Les longueurs d'onde d'absorption des caroténoïdes colorés sont comprises entre 400-700 nm, dans le spectre de lumière visible (Frigaard, 2008).

A l'opposé des colorants artificiels, les colorants naturels sont très sensibles à l'oxygène, la lumière et la chaleur ; cette instabilité est liée à la longue chaîne carbonée insaturée. Les caroténoïdes sont aussi sensibles au pH et aux ions métalliques, qui augmentent la dégradation des pigments conduisant à la perte de la couleur.

### I.1.5. Propriétés biologiques

Les caroténoïdes sont employés dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique en tant qu'additifs, pour leurs caractéristiques biologiques et colorantes (Sandmann *et al.*, 1999). Les caroténoïdes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (Palozza *et al.*, 1996), activité anti-radicalaire (Faure *et al.*, 1999) et activité pro-vitaminique A (Fontana *et al.*, 1997). Les avantages des caroténoïdes en tant que colorants sont leur stabilité aux différents pH (4,0-7,0) des nombreux aliments (Kusdiyantini, 1998) et le fait que l'addition des différents additifs, comme l'acide ascorbique, n'affecte pas leur structure.

### I.1.6. La torularhodine

La torularhodine (acide 3', 4'-Didéhydro- $\beta,\psi$ -catotène-16'-oïque) (Pfander et Verlag, 1987) est un pigment trouvé uniquement chez quelques levures rouges. Elle possède un groupe carboxylique terminal sur le C (1) de la chaîne acyclique et un cycle  $\beta$ -ionone. Sa formule brute est  $C_{40}H_{52}O_2$  et sa masse molaire vaut 564,6 g/mol (fig. I.4).

La torularhodine possède une activité pro-vitaminique A et une forte activité antioxydante (Sakaki *et al.*, 2002 ; Eugeina *et al.*, 1997). Elle est sensible notamment à la lumière ainsi qu'à l'oxygène.

La poudre de torularhodine est fine et de couleur rouge intense. Ce caroténoïde est soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'hexane et d'autres solvants non polaires.

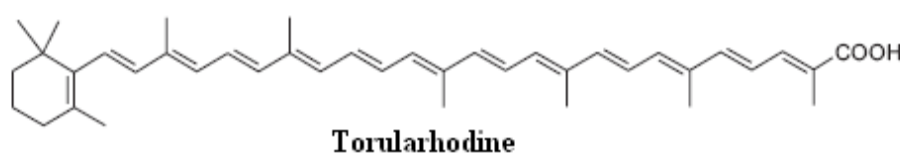


Figure I.4. Structure chimique de la torularhodine.

### I.1.7. La bixine et la norbixine

La cis-bixine se trouve dans l'enveloppe externe des graines de rocou (*Bixa orellana*), qui représente 80 % de la bixine trouvée dans la graine. Ce colorant naturel est très utilisé par l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, grâce à sa coloration jaune vif et son activité antioxydante. Elle représente 90 % des colorants utilisés au Brésil et 70 % des colorants employés dans l'industrie alimentaire mondiale (Cardarelli *et al.*, 2008). Elle est

liposoluble et existe sous les formes *cis* et *trans*. La forme *cis* est moins stable et hydrosoluble que la forme *trans* (Scotter *et al.*, 2001 ; Alves *et al.*, 2006).

La norbixine est le produit de saponification de la bixine. Elle est le caroténoïde principalement présent dans les solutions aqueuses, et est présente en faibles quantités dans les gaines de rocou (Tocchini et Mercadante, 2001).

La formule brute de la bixine est  $C_{25}H_{30}O_4$  et sa masse molaire vaut 394 g/mol (fig. I.5), la norbixine, de formule  $C_{24}H_{28}O_4$ , a sa masse molaire de 380 g/mol (fig. I.5). Les poudres de bixine et de norbixine sont colorées dans les tons orangés.

La bixine et la norbixine sont instables à la lumière, la bixine ne supporte pas des températures supérieures à 100 °C (Shuhama *et al.*, 2003) et la norbixine est instable à des changements de pH (Faria et Rocha, 2000). Selon Lyng *et al.* (2005), la dégradation (près de 50 %) de la bixine est déjà très intense dès qu'elle est placée à 70 °C.

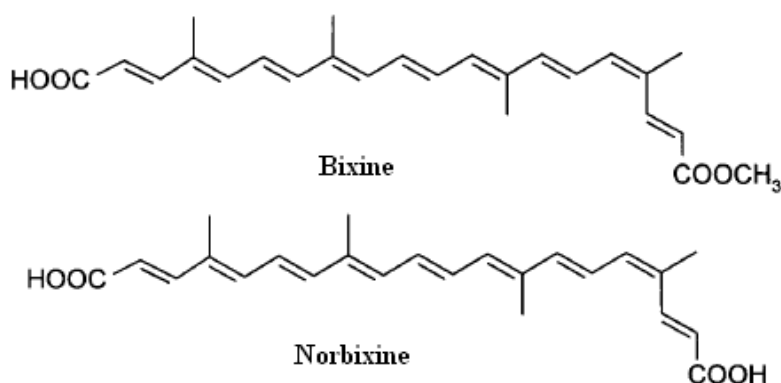


Figure I.5. Structure chimique de la bixine et de la norbixine.

Scotter *et al.*, (2001), ont étudié la formation des composés de dégradation thermique de la bixine et de la norbixine. La dégradation de la bixine ou de la norbixine, conduit à la formation du *m*-xylène et du toluène, résultant de la formation d'une molécule  $C_{17}$ . Le taux de dégradation des caroténoïdes est directement lié à l'augmentation de la température ; la dégradation de la norbixine est plus lente par rapport à la dégradation de la bixine, néanmoins les produits résultant de la dégradation sont identiques dans les deux cas. Ces auteurs ont aussi observé, que la formation du *m*-toluène est supérieure à la production du toluène. Le schéma des molécules formées après la dégradation des caroténoïdes, est montré dans la figure I.6 (a) pour la formation du *m*-xylène et en (b) pour la formation du toluène.

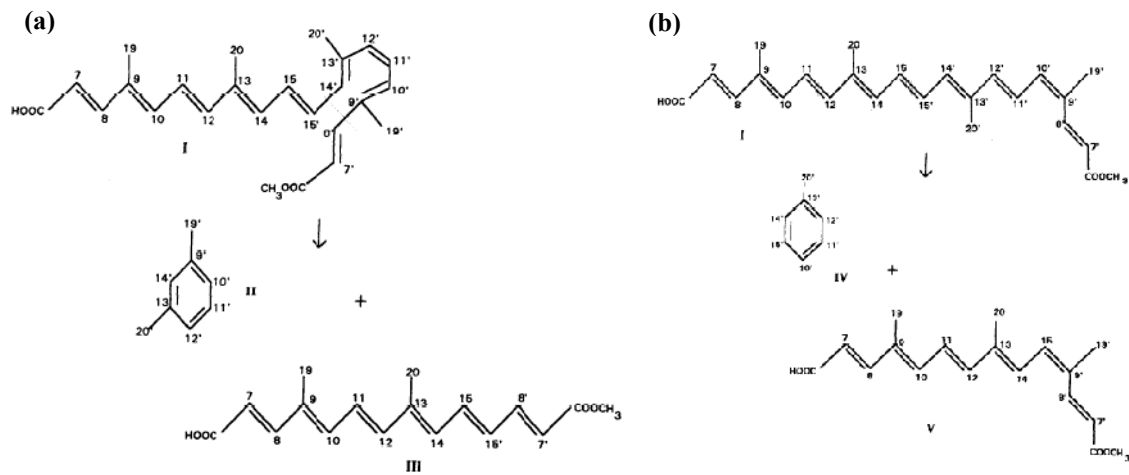


Figure I.6. Mécanisme de l'élimination du m-xylène (a) et du toluène (b). En I, la 9'-cis-bixine, - II, le m-xylène, - III, la molécule C17 formée par la dégradation, - IV, le toluène et en V, la molécule C18 formée par la dégradation (Scotter *et al.*, 1994).

### I.1.8. Biosynthèse des caroténoïdes

Le schéma de biosynthèse des caroténoïdes proposé par (Britton, 1989) est divisé en cinq étapes, constituées en une première phase, la formation du phytoène, la dénaturation, la cyclisation et la formation des xanthophylles (fig. I.7).

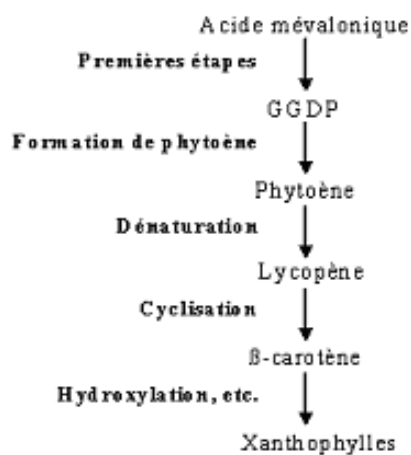


Figure I.7. Schéma des principales étapes de la biosynthèse des caroténoïdes.



Les premières étapes (Davies et Taylor, 1976 ; Calo *et al.*, 1995) sont communes à toutes les réactions de biosynthèse des terpénoïdes et résultent de la formation d'un composé à vingt carbones, le géranyl géranyl diphosphate (GGDP) (fig. I.8).

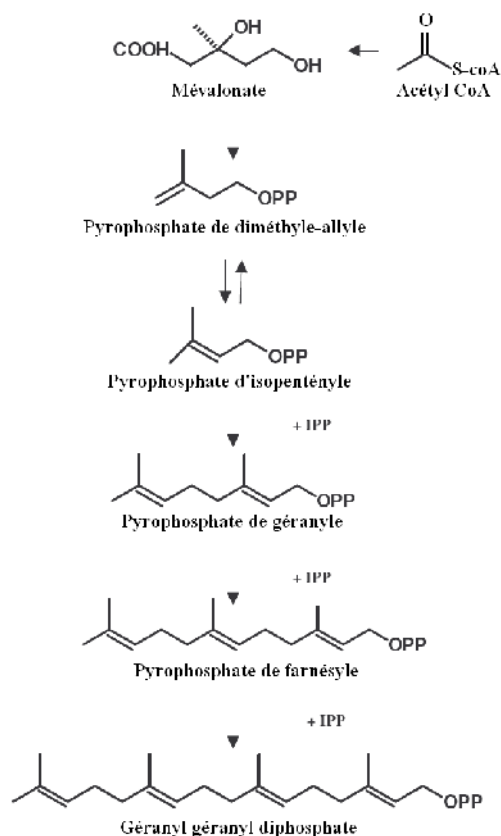


Figure I.8. Premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes (Goldstein et Brown, 1990).

Les caroténoïdes sont issus de la voie des mévalonates. La formation des caroténoïdes par la voie du mévalonate est initiée par la formation de l'acide mévalonique, intermédiaire clé de la biosynthèse, à partir de l'Acétyl-CoA. À partir de l'acide mévalonique, il y a la formation du pyrophosphate d'isopentényle (IPP) qui, par une isomérisation, est transformé en pyrophosphate de diméthyle-allyle qui est la molécule de base pour l'allongement de la chaîne. Par additions successives de molécules de pyrophosphate d'isopentényle, il y a formation du pyrophosphate de géranyl (10 carbone), pyrophosphate de farnésyle (15 carbone) et du géranyl-géranyl diphosphate (20 carbone).

La réaction clé pour la formation du squelette des caroténoïdes est la condensation de deux molécules de géranyl géranyl diphosphate (20 carbone) qui conduit à la formation du

phytoène (incolore) qui est le premier caroténoïde à 40 carbone. La formation de caroténoïdes colorés nécessite un système d'extension de doubles liaisons par une série de réactions de déshydrogénation. La désaturation du phytoène donne successivement du phytofluène, du  $\zeta$ -carotène, du neurosporène et du lycopène (fig. I.9). Ce sont tous des précurseurs de caroténoïdes cyclisés comme par exemple : le  $\beta$ -carotène.

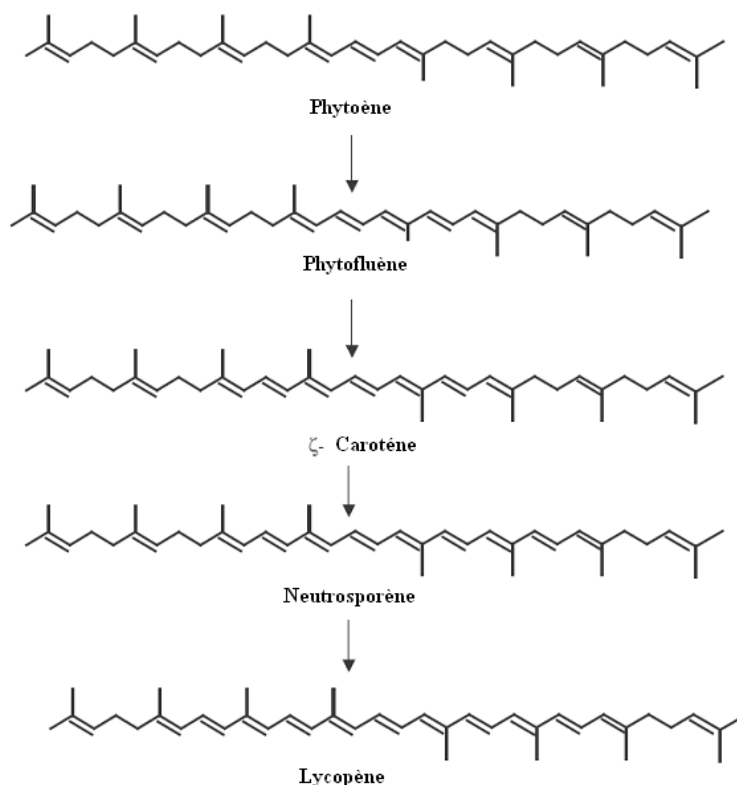


Figure I.9. Schéma de conversion du phytoène en lycopène (Porter et Lincoln, 1950).

La cyclisation peut être considérée simplement comme une isomérisation ou un réarrangement d'un groupe acyclique d'extrémité. Elle peut être formée à partir du neurosporène ou du lycopène (fig. I.9). La cyclisation du neurosporène survient dans un groupe d'extrémité, impliquant la formation du cycle  $\beta$  du  $\beta$ -zeacarotène ou le cycle  $\epsilon$  du  $\alpha$ -zeacarotène (fig. I.10). Ces caroténoïdes seront transformés en  $\gamma$ -carotène et  $\delta$ -carotène, respectivement, par l'introduction d'une double liaison sur la chaîne carbonée. La cyclisation d'un groupe d'extrémité du lycopène donne le  $\gamma$ -carotène ou le  $\delta$ -carotène, respectivement (fig. I.10).

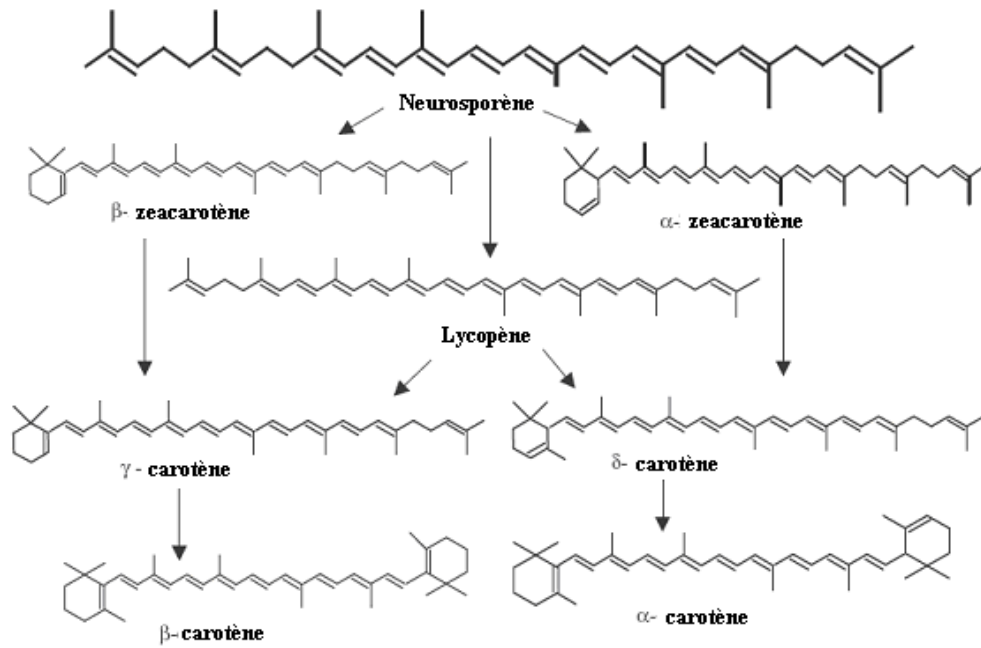
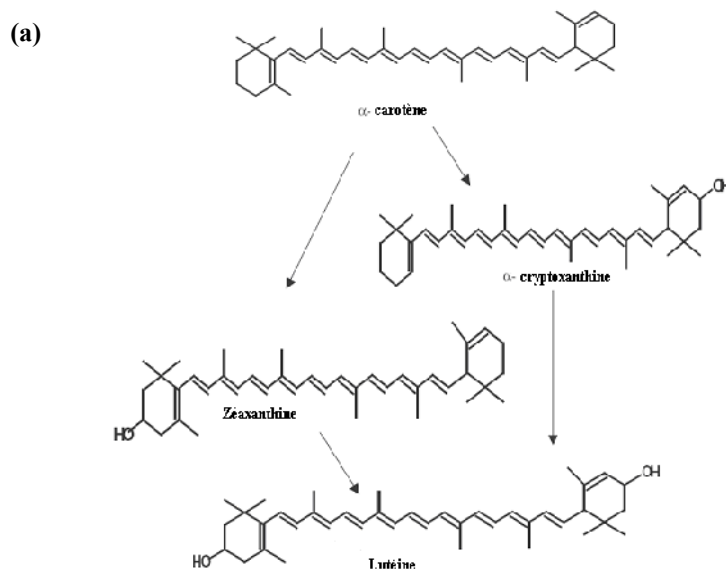


Figure I.10. Formation des caroténoïdes cycliques.

La formation des xanthophylles par l'hydroxylation de l' $\alpha$ -carotène et du  $\beta$ -carotène fait partie des dernières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes colorés (fig. I.11).



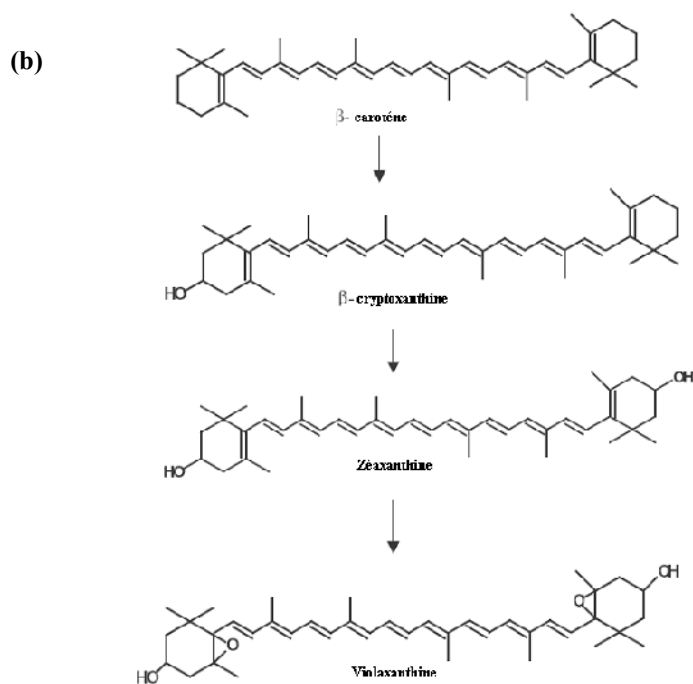


Figure I.11. Formation des xanthophylles à partir du  $\alpha$ -carotène (a) et  $\beta$ -carotène (b).

Les caroténoïdes dont l'un des substituants méthyliques est modifié par oxydation ne sont pas fréquents, mais il y a des exemples bien connus chez les plantes, les algues, les champignons et les bactéries.

La torularhodine qui est un caroténoïde important des levures rouges, est présente en concentrations variables et contient un groupement méthylique terminal, en C (1') du groupe acyclique d'extrémité, substitué par un groupe carboxylique (fig. I.12). Des études réalisées par Kenneth *et al.* (1964) sur l'accumulation de colorants chez *Rhodotorula glutinis* ont montré que la torularhodine est synthétisée à partir d'hydrocarbures, comme le  $\beta,\psi$ -carotène ( $\gamma$ -carotène) et le torulène, par l'intermédiaire des aldéhydes correspondants qui en sont issus (fig. I.12).

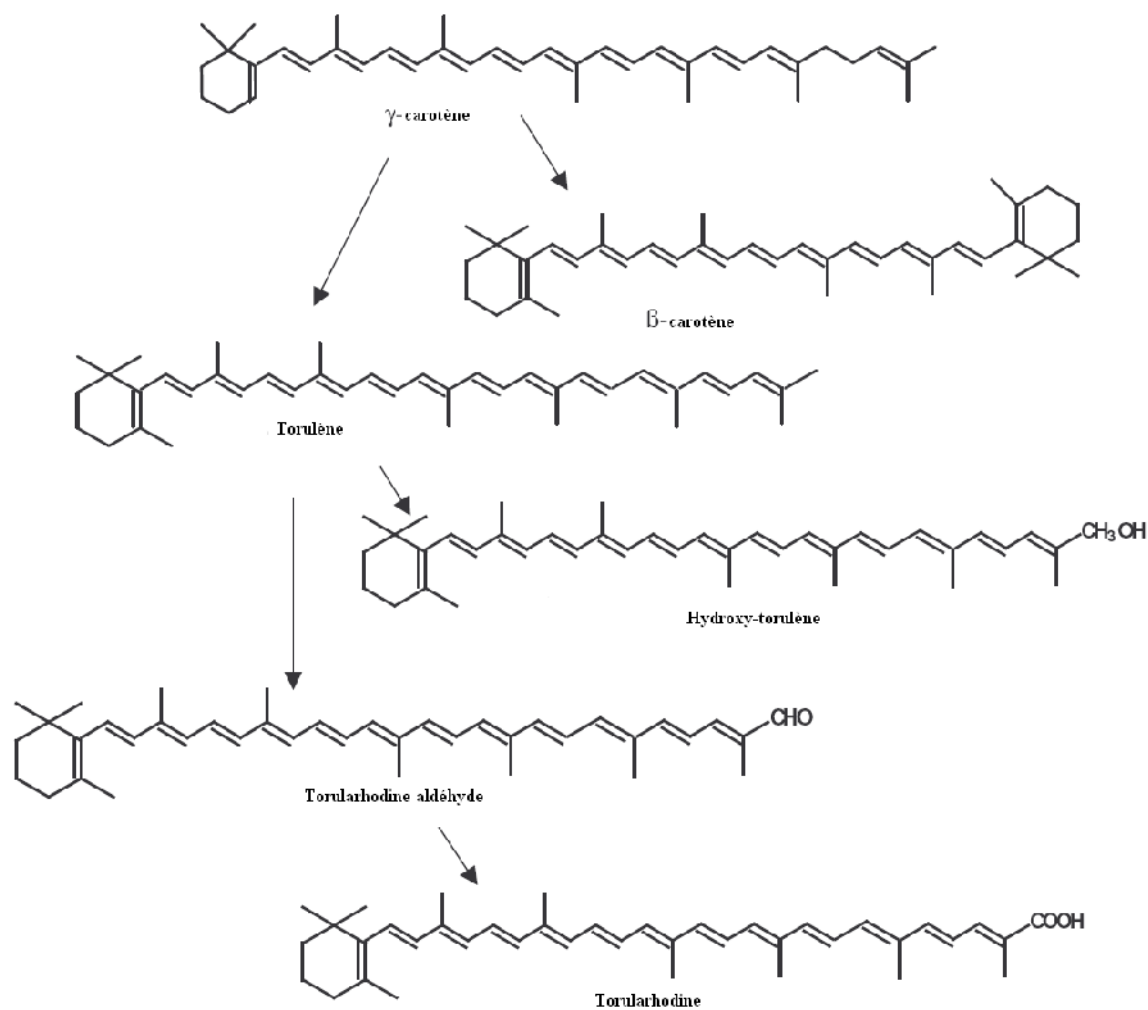


Figure I.12. Voie proposée pour la biosynthèse des caroténoïdes par *Rhodotorula glutinis* (Simpson *et al.*, 1964).

La voie de biosynthèse de la bixine n'est pas encore bien connue, mais il est probable que le caroténoïde  $\text{C}_{40}$ , précurseur de la bixine, soit *a priori* le lycopène (Bouvier *et al.*, 2003). Deux hypothèses sur la voie de synthèse de la bixine sont rencontrées dans la littérature. Jako *et al.* (2002), ont proposé une voie de synthèse de la bixine. D'après cette étude, la norbixine et la bixine sont formées à partir du lycopène (fig. I.13). Tocchini et Meracadante (2001), ont proposé une autre voie de biosynthèse. D'après l'étude, la bixine serait d'abord formée et la norbixine obtenue par saponification.

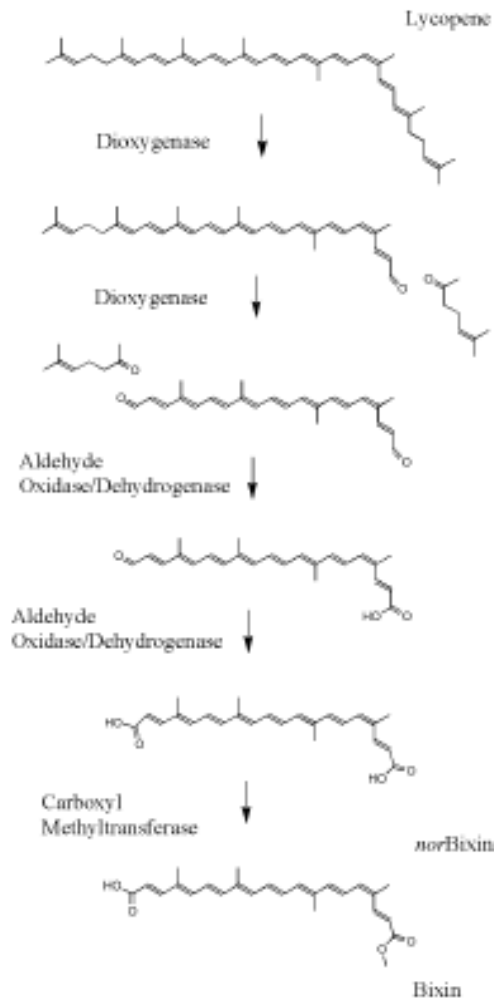


Figure I.13. Voie de synthèse de la bixine et norbixine proposé par Jako *et al.* (2002).

## I.2. Levures à pigment rouges

Les caroténoïdes sont présents dans les végétaux, les algues (Phadwal et Singh, 2003), les microorganismes - bactéries (Sandmann *et al.*, 1999), levures (Kvasnikov *et al.*, 1978) et champignons filamenteux (Herz *et al.*, in press). De nombreuses souches sauvages ou génétiquement modifiées, principalement issues des genres *Rhodotorula* (Aksu et Eren, 2005 ; Park *et al.*, 2007), *Phaffia* (Vázquez *et al.*, 1997 ; Yamane *et al.*, 1997) et *Sporobolomyces* (Razavi *et al.*, 2006) sont connues pour produire des caroténoïdes. La nature et la concentration des caroténoïdes produits sont dépendantes de l'espèce du microorganisme et des conditions de culture. Le genre *Rhodotorula* produit principalement le  $\beta$ -carotène et le torulène (Bhosale et Gadre, 2001) et l'espèce *P. rhodozyma*, l'astaxanthine (Vázquez *et al.*, 1997).

Les caroténoïdes sont également produits par des bactéries et levures naturellement non productrices de caroténoïdes, en utilisant des techniques de recombinaison de l'ADN, pour l'intégration de gènes pour la production de caroténoïdes comme le lycopène, le  $\beta$ -carotène et la zéaxanthine par *Escherichia coli* (Sandmann *et al.*, 1999).

### **I.2.1. *Sporobolomyces ruberrimus***

La nature est très riche en microorganismes, connus ou non, qui n'ont pas encore été très étudiés. Les levures de l'espèce *Sporobolomyces ruberrimus* font partie de ces microorganismes. Connues depuis 1950 (Yamasaki et Fuii, 1950), elles n'ont été officiellement répertoriées qu'en 2000 (Fell *et al.*, 2000), alors que les premières études les concernant sont apparues depuis 1986 (Shiraishi et Fujii, 1986).

La levure a une forme de reproduction asexuée, par bourgeonnement. Lorsqu'une cellule a atteint sa taille maximale, elle forme des bourgeons qui grandissent à leur tour avant de se détacher de la cellule mère. Ainsi, le noyau de la cellule mère se divise pour donner un noyau fils qui migre dans le bourgeon.

Biswas *et al.* (2001) ont montré que, parmi les basidiomycètes, la paroi du genre *Sporobolomyces*, ne comporte pas de xylose. Lopandic *et al.* (1995) ont fait une étude comparative de la paroi des basidiomycètes, qui montre que la paroi cellulaire des levures du genre *Sporobolomyces* contient 22 % de glucose, 77 % de mannose et 1 % de galactose.

La levure *Sporobolomyces ruberrimus* a été utilisée pour cette étude et a été isolée au sein du LSGC (laboratoire des sciences du génie chimique). Cette levure est capable d'utiliser le glycérol technique (glycérol issu de la production de biocarburant) comme source de carbone pour la production des caroténoïdes (Razavi et Marc, 2006).

### **I.2.2. Facteurs influençant la production des caroténoïdes par voie microbienne**

La production des caroténoïdes par voie biotechnologique suscite un grand intérêt ; de nombreuses études sont réalisées avec l'objectif d'optimiser le procédé d'obtention des produits d'origine naturelle à l'échelle industrielle (Dufossé, 2006). De nos jours, la production industrielle des caroténoïdes microbiens est limitée par la faible production des caroténoïdes par les souches sauvages connues et par le manque d'informations du mécanisme pigmentaire des microorganismes (Buzzini, 2000).

Ces difficultés ont conduit à la recherche de nouvelles sources ou l'amélioration génétique des espèces déjà connues. L'utilisation d'un milieu de culture moins coûteux, est aussi essentielle pour l'optimisation du procédé biotechnologique. De nouvelles sources carbonées et azotées, obtenues notamment à partir de co-produits agricoles ou industriels, sont indispensables pour la réduction de ces coûts de production (Aksu et Eren, 2005 ; Buzzini, 2001).

L'optimisation des procédés de production est basée sur trois paramètres majeurs (Gong et Chen, 1998 ; Fontana *et al.*, 1996) :

- 1) les paramètres physico-chimiques comme la température, l'aération, le pH, la lumière et l'agitation,
- 2) les sources carbonées et azotées,
- 3) l'utilisation de microorganismes à haut rendement en caroténoïdes.

#### **I.2.2.1. Influence des paramètres physico-chimiques**

Les paramètres comme le pH, la température et l'aération jouent un rôle primordial sur la croissance et la production de métabolites chez les microorganismes.

La température a une influence directe sur la croissance et le métabolisme des microorganismes. Ainsi, la production de caroténoïdes par les levures est fortement influencée par la température. Simpson *et al.* (1964) ont observé que la quantité de caroténoïdes totaux et la nature des caroténoïdes produits peuvent subir une forte variation, dépendant du microorganisme utilisée. Plusieurs études ont été effectuées avec l'espèce *Rhodotorula* à différentes températures 4 °C à 35 °C, et la température de culture recommandée est 30 °C (Bhosale et Gadre, 2002 ; Hayman *et al.*, 1974). Fregova *et al.* (1994) ont étudié l'effet de la température sur la nature des caroténoïdes produits chez *R. glutinis* et ont montré qu'une température entre 20 °C et 25 °C a une influence favorable pour la synthèse du  $\beta$ -carotène. A 35 °C, la production de la torularhodine correspond à 78 % de caroténoïdes synthétisés avec la diminution du torulène et du  $\beta$ -carotène. A 5 °C, la concentration du  $\beta$ -carotène est égale à 64 % des caroténoïdes totaux.

L'effet de l'oxygène sur la productivité de la torularhodine a été examiné chez *Rhodotorula glutinis* par Sakaki *et al.* (2002). Ils ont montré que, chez *R. glutinis*, la torularhodine est un caroténoïde important avec un rôle protecteur de la cellule contre le « stress » oxydative. Aussi, l'apport d'oxygène au milieu de culture n'a presque aucune



influence sur la biosynthèse du  $\beta$ -carotène ; en contrepartie, il améliore la synthèse de la torularhodine et du torulène.

L'influence du pH sur la croissance cellulaire et la production des caroténoïdes chez *P. rhodozyma* a été étudiée par Meyer et Du Preez (1994). Ils ont rapporté que la gamme de pH 3,8 - 7,5 du milieu n'affectait que légèrement la croissance. À pH 5,8, la vitesse de croissance la plus rapide a été atteinte alors que l'accumulation maximale d'astaxanthine est atteinte à pH 5,0.

#### **I.2.2.2. Composition du milieu de culture**

La disponibilité de carbone et d'azote dans le milieu de culture est importante pour la cinétique de croissance et la caroténogénèse des microorganismes. Les études des dix dernières années ont été focalisées sur la production des caroténoïdes par voie biotechnologique en utilisant des sources carbonées issues de co-produits agricoles ou industriels (Buzzini, 2000 ; Fontana *et al.*, 1996).

Les modifications de la biosynthèse des caroténoïdes provoquées par un changement des conditions de culture chez le *R. glutinis* ont été étudiées par Sakaki *et al.*, (2000). Ils ont observé une amélioration de la production de torularhodine chez les cellules utilisant le lactate, comme source carbonée, en comparaison de celles cultivées avec du glucose. Le changement de source de carbone entraîne un changement de la biosynthèse des caroténoïdes chez *R. glutinis*.

L'influence de la source azotée a été également étudiée. Une grande variété de sources d'azote a été testée pour l'optimisation de la production de caroténoïdes avec diverses espèces de microorganismes. Les sources les plus utilisées sont l'ammonium, la glutamine et l'asparagine. L'azote joue un rôle fondamental en microbiologie industrielle, car il est directement lié à la synthèse des enzymes qui sont responsables du métabolisme primaire et secondaire des microorganismes. Ainsi, la production des caroténoïdes peut être affectée par la source azotée utilisée (Garbayo *et al.*, 2003 ; Sanchez et Demain, 2002).

Borowitzka et Borowitzka (1988), ont observé que la limitation d'azote chez *Dunaliella*, augmente l'accumulation du  $\beta$ -carotène. Leur étude a montré que la limitation en nutriments fait augmenter la biosynthèse des caroténoïdes et change le métabolisme protéique.

### I.2.2.3. Rôle des acides gras dans le comportement des levures

L'acide oléique peut être utilisé comme seule source carbonée disponible dans le milieu de culture, les levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Yarrowia lipolytica* étant capables de croître dans ce type de milieu (Trotter, 2001). L'acide oléique est entièrement dégradé dans les peroxysomes, comme tous les autres acides gras (Trotter, 2001). Le produit final de la  $\beta$ -oxydation des acides gras chez la levure est l'acétyl-CoA (figure I.14).

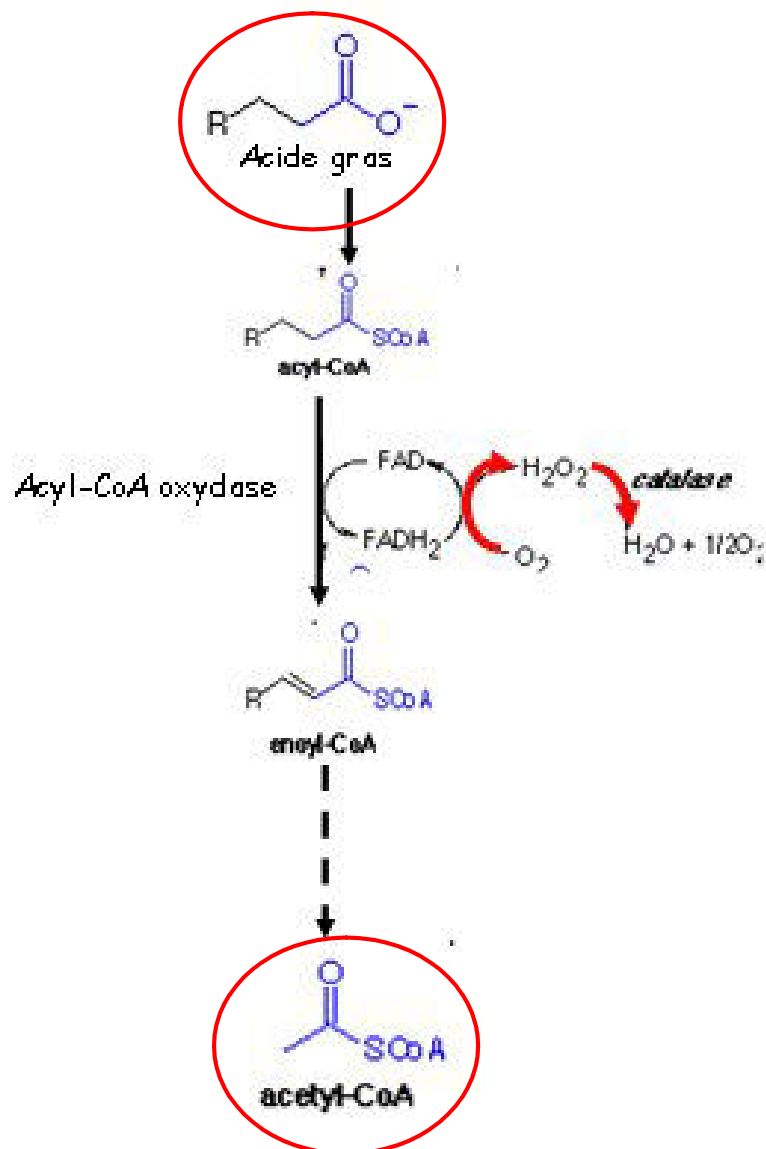


Figure I.14. Schéma de dégradation des acides gras par  $\beta$ -oxydation (Gilber, 2008).

Le rôle exact de l'acide oléique n'a pas encore été précisément établi. Il peut avoir deux effets sur le métabolisme de la levure (Mouret, 2006) :

1) effet « substrat » qui correspond à la dégradation de l'acide oléique en acétyl-CoA = effet d'un flux supplémentaire de carbone au sein du métabolisme,

2) effet « génétique » qui correspond à la stimulation de la transcription de certains gènes par l'oléate.

La disponibilité des acides gras en faveur de la synthèse de caroténoïdes n'a pas été étudiée de manière approfondie. Dans la littérature, peu de travaux concernent l'influence d'acides gras sur la production de caroténoïdes. Dans le schéma de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, montrée dans la figure I.15 et rapportée par Moraes *et al.* (2002), on observe que l'acétyl-CoA est la molécule précurseur de la réaction.

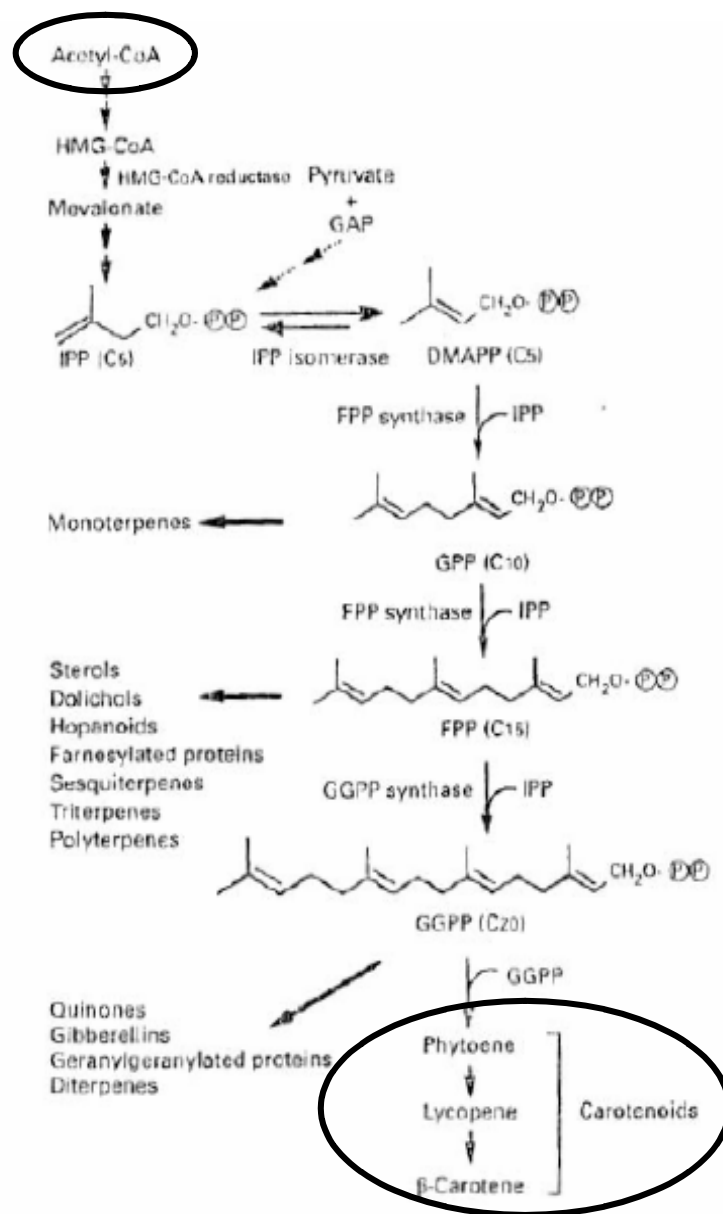


Figure I.15. Voie de biosynthèse des caroténoïdes (Moraes *et al.*, 2002).

Hajjaj *et al.* (1999) ont mis en évidence que l'ajout d'acides gras à courte chaîne (C<sub>8</sub>) dans le milieu de fermentation améliore la croissance cellulaire et la production de pigments chez *Monascus ruber*. Cette étude a aussi montré que les conditions optimales de croissance et de production des pigments sont comprises entre 0 et 1 mM et que des concentrations supérieures à 2 mM semblent être inhibitrices de la croissance cellulaire et de la production de pigment.

D'autres études dans la littérature concernent la production d'anticorps par des cellules animales. D'après Butler et Huzel (1995), l'ajout des acides oléique et linoléique, à une concentration de 25 µM dans le milieu de culture, ont augmenté de manière significative la croissance cellulaire et la production d'anticorps chez des cellules d'hybridomes murins (CC9C10). Ils ont observé que l'ajout optimal d'acide oléique est de 25 µM et d'acide linoléique est de 50 µM, alors qu'un ajout supérieur à 75 µM devient inhibiteur pour la croissance.

### **I.3. Extraction, analyse et purification des caroténoïdes**

#### **I.3.1. Extraction et stabilité des caroténoïdes**

##### **I.3.1.1. Extraction**

Les pigments microbiens sont retrouvés à l'intérieur de la cellule, au niveau de la paroi. Ainsi, pour la récupération des colorants, il est nécessaire de faire une extraction en cassant la paroi de la cellule. Plusieurs techniques, de type chimique, mécanique ou physique, sont proposées dans la littérature (Middelberg, 1995). La plupart des caroténoïdes peuvent être extraits par l'utilisation de solvants, en particulier chez les bactéries. Cependant ce type d'extraction est difficile quand le microorganisme est une levure, car elle possède une paroi très résistante à l'action des solvants. La figure I.16, montre différents types de techniques existant pour la désintégration de la paroi des microorganismes.

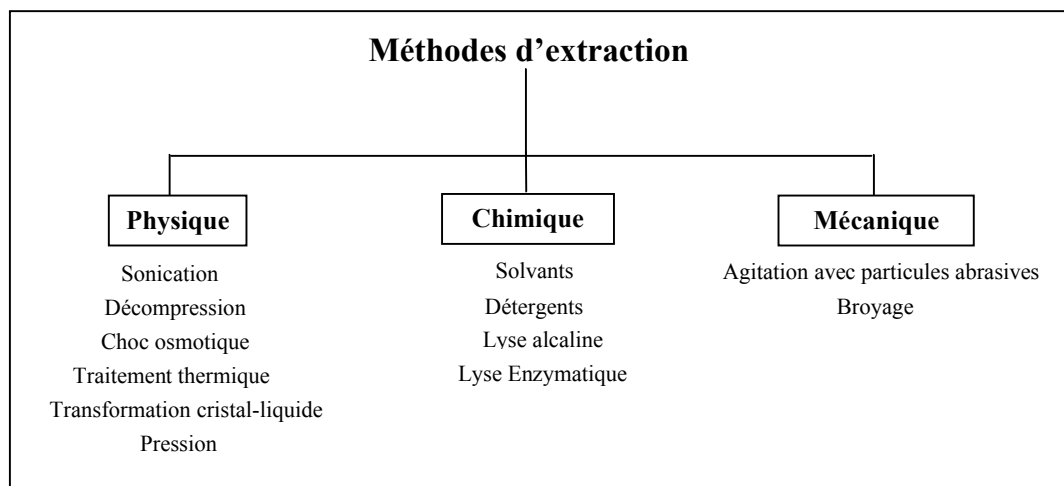


Figure I.16. Techniques de désintégration de la paroi des microorganismes, d'après la proposition modifiée de Edebo et Magnusson (2008).

Le choix de la méthode d'extraction est très important, parce que l'intégrité du produit d'intérêt en dépend.

Johnson *et al.* (1978) ont mis en évidence une méthode pour l'extraction de l'astaxanthine en utilisant l'enzyme extracellulaire de *Bacillus circulans* WL-12, qui peut digérer la paroi cellulaire. Néanmoins, deux étapes sont nécessaires : l'ajout du *Bacillus* dans le milieu de fermentation, suivi d'un traitement thermique pour l'inactivation de la cellule ainsi que le réajustement du pH. Cette méthode est intéressante cependant elle possède un désavantage important : le coût de l'enzyme et la difficulté du procédé d'extraction (Middelberg, 1995).

L'utilisation du diméthyl-sulfoxyde (DMSO), est la méthode chimique la plus utilisée dans la littérature (Sdmak *et al.*, 1990 ; Vazques *et al.*, 1997 ; Park *et al.*, 2007) pour la désintégration des cellules. Cette méthode est efficace, toutefois elle présente des inconvénients comme le coût et la nocivité du solvant. En plus, pour augmenter l'efficacité de la désintégration des cellules, le DMSO doit être préchauffé ( $> 55\text{ °C}$ ) ; cependant, la combinaison d'un solvant organique fort à la chaleur peut induire la dégradation des caroténoïdes (Razavi, 2004).

La presse de French est une méthode physique très efficace pour l'extraction des caroténoïdes. Le système de désintégration consiste en un passage des cellules à l'aide d'un piston par une valve étroite par haute pression ; après ce passage la solution revient à la pression atmosphérique qui induit la désintégration des cellules (Vanderheiden *et al.*, 1970).

Deux passages à  $2 \cdot 10^8$  Pa suffisent pour la désintégration de plus de 95 % des cellules. Ce système possède de nombreux avantages, en opérant à basse température et peut être utilisé pour tout type de cellules. Néanmoins, son coût d'utilisation est assez onéreux et le volume de traitement est limité.

### I.3.1.2. Stabilité

Les caroténoïdes sont des molécules très réactives, dues à leur structure composée par plusieurs doubles liaisons. L'instabilité qui en découle est préjudiciable à leur tenue dans le temps notamment au niveau de l'évolution de leur caractère antioxydant mais aussi de leur couleur. Par ailleurs, une dégradation trop rapide de ces molécules induira une erreur non négligeable sur une quantification analytique ; c'est pourquoi il est essentiel de bien connaître l'effet de la dénaturation sur l'intégrité et, par conséquent, sur les performances des caroténoïdes. Il peut donc être nécessaire de protéger ces caroténoïdes par la présence de molécules agréées d'un point de vue alimentaire.

C'est ainsi que des antioxydants de qualité alimentaire, tels le butylhydroxytoluène (BHT) et le tert-butylhydroquinone (TBHQ), peuvent remplir ce rôle de protection des caroténoïdes, parce que chimiquement très stables, de faible coût et très disponibles (Yang *et al.*, 2002). Ce sont des composés phénoliques de synthèse et capables d'éviter ou de piéger les radicaux libres (Marc *et al.*, 2004). Leurs structures sont présentées dans la figure I.17. Par exemple, pour la protection des caroténoïdes au cours des analyses en CLHP, l'ajout du BHT dans la phase mobile, est souvent préconisé (Olivier et Palou, 2000 ; Nonier *et al.*, 2004). Des concentrations comprises entre 0,04 % et 0,1 % massique, sont les plus souvent rapportées dans la littérature (Kaiser *et al.*, 2007). Concernant le lycopène, Hart et Scott (1995) ont démontré que la dégradation de ce caroténoïde est presque imperceptible, quand 0,1 % de BHT est ajouté dans la solution lycopène + solvant, pendant 20 jours à  $-18$  °C. Cependant, sans ajout d'antioxydant la concentration de lycopène est divisée par deux après un stockage de 45 jours à  $-18$  °C.

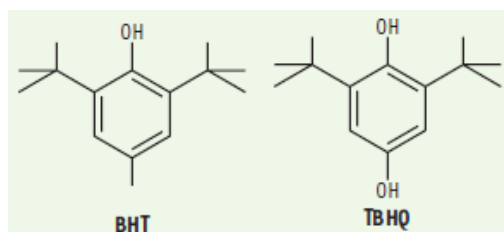


Figure I.17. Structure de deux des principaux antioxydants de synthèse, BHT et TBHQ, de qualité alimentaire utilisés dans diverses applications.

### I.3.2. Techniques d'analyse et de purification des caroténoïdes

La chromatographie est la technique plus couramment utilisée pour la séparation et la purification de molécules présentes dans un mélange complexe. La sélectivité, le rendement, la composition de la phase stationnaire, la phase mobile et le temps d'analyse sont des paramètres chromatographiques très importants. Ces paramètres sont directement liés au coût de l'analyse et à la productivité du procédé de séparation (Snyder *et al.*, 1993).

Les méthodes les plus utilisées pour la séparation et l'analyse des caroténoïdes sont la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP). La barrette de diodes est le détecteur couramment utilisé pour la détection des caroténoïdes, par CLHP. Ce détecteur possède des hautes sensibilité et précision ; de plus, leur gamme de détection est comprise entre 190 à 800 nm (Oliver et Palou, 2000). L'identification et la purification des caroténoïdes par CLHP est une méthode très favorable parce qu'elle protège le pigment de possibles dégradations. La possibilité de faire les analyses à température ambiante évite la dégradation thermique, la dégazéification de la phase mobile protège le caroténoïde de l'oxydation et le système confiné protège les caroténoïdes de la lumière directe (Rouseff, 1988 ; Van Breemen, 1997).

Pour l'identification et l'élucidation de la structure, les techniques de spectrophotométrie visible, résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM), sont les plus utilisées (Hodisan *et al.*, 1997). Les deux détecteurs les plus utilisés pour l'analyse des caroténoïdes en SM sont l'ionisateur par électro-spray (ESI) et l'ionisateur chimique à pression atmosphérique (APCI). Van Breemen (1997) a montré que le couplage CL-SM, avec une source APCI, est la technique la plus appropriée pour l'analyse des caroténoïdes, à cause de leur faible aptitude à l'ionisation.

Plusieurs types de solvants et de colonnes sont décrits dans la littérature, pour la séparation des mélanges des caroténoïdes par CLHP. Les colonnes de type C18 sont généralement utilisées. Weber *et al.* (2007) ont mis au point une méthode d'analyse et de séparation des caroténoïdes très efficace. Pour l'analyse, ils ont utilisé une colonne Lichrospher C18 et un gradient compris entre 70 – 100 % d'acétone/d'eau. Les résultats obtenus ont montré que cette technique analytique est très efficace pour la séparation et l'identification d'un mélange des caroténoïdes.

## I.4. Optimisation et modélisation

### I.4.1. Modélisation

#### I.4.1.1. Introduction

Un modèle représente une relation mathématique qui permet de lier des phénomènes réels à leurs estimations théoriques. Alors, un modèle est construit à partir d'un objectif précis, pour la description mathématique d'un processus réel (Walter et Pronzato, 1994). Cette expression mathématique est conçue pour la détermination de grandeurs non mesurées, pour l'explication des phénomènes complexes, pour la conduite et l'optimisation d'un procédé afin d'améliorer ses performances. Quelle que soit la finalité du modèle, il est impératif que le rôle qu'on attend du modèle soit parfaitement défini au début de l'étude, vu qu'il influencera la démarche de modélisation.

### I.4.2. Généralités

#### I.4.2.1. Notion du système

Le système représente un ensemble d'éléments qui composent l'étude à développer. Sa dimension dépendra des objectifs et des besoins de l'expérimentateur ; le système pourra être une cellule microbienne, un fermenteur complet ou l'ensemble d'un procédé (Muniglia, 2001). Dans tous les cas, il devra être bien caractérisé et pourra toujours être représenté par le schéma de la figure I.18.

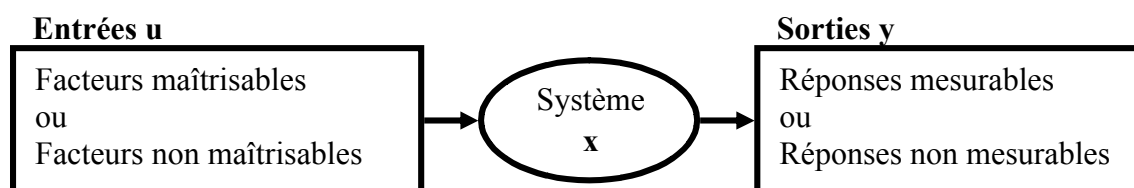


Figure I.18. Schéma simplifié d'un système (Muniglia, 2001), avec  $u$  : vecteur des variables d'entrées,  $y$  : vecteur des sorties mesurées,  $x$  : vecteur des variables d'état.

Le système est analysé par l'ensemble des réponses ( $y$ ), qui permettent l'analyse de l'effet des entrées ( $u$ ), qui lui sont appliquées. Comme observé dans la figure I.18, les entrées comme les sorties, peuvent être très bien maîtrisées, mais aussi peuvent être indépendantes de la volonté de l'expérimentateur.



#### I.4.2.2. Notion du modèle

Le modèle représente une relation mathématique qui permet de lier des phénomènes réels à leurs estimations théoriques. Dans la démarche d'optimisation, les objectifs attendus doivent être parfaitement définis au début de l'étude, car de la structure du modèle dépendront ses propriétés.

Le modèle est une règle qui permet de calculer, à partir de l'entrée  $u$  (maîtrisable) d'un système, une grandeur  $\hat{y}$  qui ressemble le plus possible à la valeur réelle inconnue  $y$  de la sortie (Walter et Pronzato, 1994).

Les modèles sont classés en trois grandes catégories (Viennet, 1997) :

- les modèles phénoménologiques (boîte blanche), connus aussi comme modèles de connaissance, basés sur des bilans d'énergie et de matière et sur des relations cinétiques ou physiques,
- les modèles comportementaux (boîte noire), se limitent à reproduire un comportement sans nécessiter de connaissance *a priori*,
- les modèles de tendance (boîte grise), qui peuvent inclure une connaissance partielle.

Plusieurs types d'approches correspondent à ces trois catégories. Pour la construction d'un modèle, plusieurs étapes sont nécessaires (Walter et Pronzato, 1994) :

- la collecte des données expérimentales,
- le choix d'une structure et d'un critère de qualité pour le modèle,
- l'optimisation de ce dernier.

#### I.4.3. La planification expérimentale

La planification expérimentale est une approche méthodologique qui permet, non seulement, de réduire le coût de l'expérimentation, mais aussi de sélectionner des conditions expérimentales, pour l'obtention maximale d'informations du système à étudier (Sergent *et al.*, 1997).

Pour la réalisation du plan, deux outils complémentaires sont utilisés. Tout d'abord, l'outil algébrique, qui permet de prendre en compte tous les facteurs et leurs effets en même temps. Le deuxième outil est la statistique ; il permet de gérer la reproductibilité des résultats (Schimmerling *et al.*, 1998). Ceci permet d'éviter les « mauvaises » surprises pendant la

réalisation d'un projet. Ainsi, la planification définit, dès le départ, la durée totale de la campagne d'essais et ses coûts.

La planification d'expériences permet une amélioration du rendement des procédés, la réduction de la variabilité et une conformité proches des celles envisagées, la réduction du temps de développement et pour finir, la réduction des coûts (Montgomery, 1997).

#### **I.4.3.1. La démarche expérimentale**

Pour une démarche expérimentale dans des conditions satisfaisantes, plusieurs étapes doivent être respectées et sont incontournables. La démarche à suivre a été décrite par plusieurs auteurs (Montgomery, 1997 ; Lewis *et al.*, 1999), et est composée de plusieurs étapes. La première consiste à formuler clairement le problème. Postérieurement, il est très important d'intégrer les informations connues sur le système pour déterminer le domaine d'expérimentation d'intérêt où l'information manquante devra être recherchée. Dans cette étape, la connaissance préalable est très importante, car le succès d'une étude basée seulement sur des hypothèses est presque nul (Schmuhl *et al.*, 1996). Puis, vient l'étape de définition du plan d'expériences. Après avoir défini les essais à réaliser, en prenant en compte la définition initiale du problème, l'étape de réalisation des expériences est alors initialisée (Ferreira, 1995). Enfin, la dernière étape permet l'étude des réponses, soit directement, soit via un modèle mathématique.

#### **I.4.3.2. Les plans d'expériences optimaux**

Les plans sont utilisés efficacement pour la résolution des problèmes complexes. Cependant, les plans classiques ne sont pas adaptés à la résolution de certains problèmes (Le Garrec, 1998), pour les raisons suivantes :

- les points expérimentaux sont fixés à l'avance (tabulés),
- ils possèdent un nombre d'essais important,
- les conditions expérimentales doivent s'adapter à la structure et pas l'inverse, et,
- les contraintes physiques sont difficiles à intégrer.

Ainsi, l'utilisation des plans optimaux constitue généralement une mise en œuvre alternative. Les conditions expérimentales seront définies afin de maximiser la précision des résultats qui seront obtenus (Stanikov *et al.*, 2005). Ils se révèlent très utiles lorsque le nombre d'essais doit être limité et dans le cas de l'adaptation d'un plan d'expériences, quand c'est

nécessaire (Whitney et Thibault, 2006). Dans ce dernier cas, il s'agit de construire un plan à partir d'essais déjà réalisés, afin de pouvoir exploiter les résultats.

À la différence des plans dits classiques, les plans optimaux ne sont pas tabulés et doivent être établis au cas par cas, limitant ainsi leur utilisation. La construction du plan nécessite le choix d'un critère pour la définition des conditions expérimentales à mettre en œuvre et l'utilisation d'un ordinateur pour l'optimisation du critère. À ce stade, il est important de prendre en compte toutes les contraintes qui pourront empêcher la réalisation de certaines expériences sans sens physique (Walter et Pronzato, 1994).

#### I.4.3.3. Propriétés du modèle

Le choix d'une structure de modèle qui représentera les phénomènes étudiés, est nécessaire pour la définition d'un plan d'expérience optimal. Généralement, une seule structure de modèle est définie et les expériences ont pour objectif l'estimation précise des paramètres (Muniglia, 2001). Si le modèle est considéré comme une structure linéaire, la réponse peut être écrite de la façon suivante :

$$y_i = F^T(x_i) \cdot \Theta + \varepsilon_i$$

où :  $y_i$  est la réponse mesurée de l'expérience  $i$  ;  $F$  est un vecteur de  $p$  fonctions qui modélisent la relation entre la réponse et les  $x_i$  ;  $x_i$  est le vecteur des niveaux des facteurs pour l'expérience  $i$  ;  $\Theta$  est un vecteur des  $p$  paramètres inconnus du modèle et  $\varepsilon_i$  est l'erreur expérimentale de l'expérience  $i$ .

Le modèle permet de construire la matrice d'expériences  $X$ . Selon le critère choisi, différentes propriétés du plan peuvent être optimisées à partir de la matrice d'expériences. La minimisation de la variance de prévision,  $\text{var}(\hat{y}_i)$ , peut être utilisée. Son expression s'écrit :

$$\text{Var}(\hat{y}_i) = \sigma^2 \cdot F^T(x_i) \cdot (X^T X)^{-1} \cdot F(x_i)$$

où :  $\hat{y}_i$  est l'estimation de la réponse vraie  $y_i$  ;  $\sigma^2$  est la variance de répétabilité ;  $F$  est le vecteur de  $p$  fonctions qui modélisent la relation entre la réponse et les  $x_i$  ;  $x_i$  est le vecteur ligne de l'expérience  $i$  et  $X$  est la matrice de l'expériences.

La minimisation de la variance dépend uniquement du plan d'expériences présenté dans la matrice  $(X^T X)^{-1}$  sous la forme de la matrice d'expérience  $X$ . Cette matrice  $X^T X$ , qui permet l'estimation de la qualité des paramètres du modèle (Bernaerts, 2000), est une matrice carrée, symétrique définie positive. Alors, un plan d'expériences optimal est un plan qui minimise cette matrice selon un critère déterminé. Plusieurs critères, décrits dans la section suivante, sont couramment utilisés dans ce but. Cette méthode est mathématiquement commode et constitue une approche efficace (Emery *et al.*, 1998).

#### I.4.3.4. Les critères de qualité d'un plan optimal

Il existe plusieurs types de critères de qualité utilisés pour la construction des plans, et chaque critère permet d'optimiser une propriété spécifique du plan (Walter et Pronzato, 1994). Les critères les plus couramment utilisés (tableau I.1) pour la construction de plans, sont classés en deux groupes distincts :

- ceux qui optimisent la précision sur l'estimation des paramètres du modèle, et,
- ceux qui optimisent la précision sur les prédictions du modèle.

Tableau I.1. Principaux critères de qualité pour la construction de plans optimaux (Muniglia, 2001).

Critère	Représentation mathématique	Signification
<b>Précision sur les paramètres</b>		
<b>D-Optimalité</b>	Minimisation du déterminant de la matrice de dispersion $(X^T X)^{-1}$	Minimisation de la variance généralisée sur l'estimation des paramètres
<b>A-Optimalité</b>	Minimisation de la trace de la matrice $(X^T X)^{-1}$	Minimisation de la moyenne des variances sur l'estimation des paramètres
<b>E-Optimalité</b>	Minimisation de la plus grande valeur propre de la matrice $(X^T X)^{-1}$	Minimisation de la plus grande variance d'estimation des paramètres
<b>Conditionnement</b>	Minimisation du rapport de la plus grande valeur propre de la matrice $(X^T X)^{-1}$ sur la plus petite	Minimisation de la corrélation des paramètres du modèle
<b>Précision sur les prédictions</b>		
<b>G-Optimalité</b>	Minimise la plus grande variance de prédiction sur l'ensemble des essais possibles	Minimisation de la plus grande variance d'erreur sur les prédictions dans le domaine expérimental
<b>I-Optimalité</b>	Minimisation de la somme des variances de prédiction sur l'ensemble du domaine d'étude	Minimisation de l'erreur moyenne sur les prédictions dans le domaine expérimental
<b>L-Optimalité</b>	Minimisation de la somme des variances de prédiction sur un nombre fini d'essai	Minimisation de l'erreur moyenne sur les prédictions sur un nombre fini d'essais sélectionnés
<b>Rotatabilité</b>	Un plan est rotatable si la variance de prédiction est la même pour tous points équidistants du centre du domaine expérimental	Permet de rendre les courbes d'isovariance concentriques par rapport au centre du domaine expérimental

#### **I.4.4. Optimisation multicritère**

##### **I.4.4.1. Introduction**

Généralement, les procédés développés à l'échelle industrielle, sont des problèmes d'optimisation multicritère. Quel que soit le champ d'application, l'industrie cherche toujours au minimum à maximiser sa productivité (quantité de produit/durée de production), à respecter les normes de qualité et à minimiser le coût de production. Alors, une optimisation multicritère est implicite dans le problème, car ce type d'optimisation peut être utilisé pour l'optimisation de plusieurs critères qui sont souvent antagonistes et qui tiennent compte de plusieurs spécifications du système et des contraintes (Tan *et al.*, 2003).

Plusieurs travaux ont été réalisés au cours de ces dix dernières années. L'optimisation multicritère a été utilisée pour diverses applications, dans le cas de procédés mettant en jeu une réaction chimique de polymérisation (Massebeuf, 2000 ; Silva et Biscaia 2003), dans les procédés alimentaires pour le séchage (Kiranoudis et Markatos, 2000) ou des procédés biotechnologiques pour la production d'éthanol (Wang et Sheu, 2000) ou la production d'acide gluconique (Halsall-Whitney *et al.*, 2003).

##### **I.4.4.2. Définitions**

L'optimisation classique monocritère conduit à l'obtention d'une solution unique, alors que, l'optimisation multiobjectif des divers critères conduit généralement à des optimums respectifs différents (jeux de facteurs différents) (Blasco *et al.*, 2008). Alors, il n'existe pas une seule solution respectant tous les objectifs. L'utilisation de multiples critères dans un problème implique l'obtention d'un ensemble de solutions, connues comme les solutions optimales au sens de Pareto (1986). Pour améliorer un élément de solution compris dans le front de Pareto, il faut impérativement abaisser au moins un élément des autres objectifs. Pour la formulation correcte d'un problème d'optimisation, il faut définir le nombre de variables d'action, le nombre d'objectifs et le nombre de contraintes (Makhlouf, 2006).

##### **I.4.4.3. Algorithmes évolutionnaires**

Les algorithmes évolutionnaires sont connus comme de bons outils pour la résolution des problèmes d'optimisation multicritère (Knowles et Corne, 2000). Les algorithmes évolutionnaires permettent l'obtention d'un ensemble de solutions optimales (au sens de Pareto) plus rapidement qu'avec les méthodes classiques (Fonseca et Fleming, 1995). Un

autre avantage, est qu'ils sont moins sensibles à la forme du front de Pareto. Les algorithmes évolutionnaires sont divisés en deux groupes, définis dans les deux sous-paragraphes suivants.

#### I.4.4.3.1. Les approches non basées sur l'optimalité de Pareto

Le VEGA (Vector Evaluated Genetic Algorithm) a été le premier algorithme génétique proposé pour les plans optimaux multicritères. Dans ce type d'approche, l'optimalité de Pareto n'est pas incluse. Malgré la simplicité de mise en œuvre et les bons résultats fournis par cette méthode, seulement des solutions extrêmes sont obtenues au niveau du domaine de Pareto (Richardson *et al.*, 1989).

#### I.4.4.3.2. Les approches basées sur l'optimalité de Pareto

Ces méthodes utilisent explicitement le concept d'optimisation de Pareto. À partir des suggestions de Goldberg (1989) : la dominance de Pareto et le niching, de nombreux types d'algorithmes évolutionnaires ont été développés pour leur adaptation aux problèmes d'optimisation multicritère. La dominance au sens de Pareto est utilisée afin d'exploiter l'espace de recherche en direction du front de Pareto alors que le niching explore l'espace de recherche le long du front, pour préserver la diversité.

## I.5. La réaction d'acylation

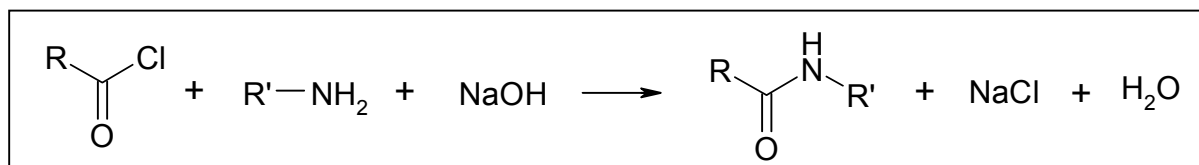
La réaction d'acylation de molécules fonctionnelles telles que les peptides, les flavonoïdes et les caroténoïdes, permet une modification structurale intéressante de ces molécules qui peut leur apporter une meilleure stabilité, une solubilité améliorée dans des milieux hydrophobes, voire leur conférer des propriétés nouvelles. Cette réaction consiste à établir une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile telle qu'une amine ou un alcool. Il existe deux voies d'acylation possibles, soit par catalyse chimique, soit par catalyse enzymatique.

### I.5.1. La catalyse chimique

Dans le cas d'une acylation par voie chimique, des catalyseurs acides ou basiques sont utilisés et les substrats sont nécessairement activés. La « fabrication » des carburants « verts » comme le diester<sup>®</sup> est un exemple de réaction d'estérification à l'échelle industrielle (Ma et Hanna, 1999).

La synthèse chimique d'esters nécessite souvent des conditions réactionnelles contraignantes (pH, température) conduisant à des dégradations importantes des substrats. De

plus, des dérivés toxiques et polluants sont souvent produits dans le milieu réactionnel, impliquant par la suite la nécessité de leur élimination (Enaud, 2004). Par exemple, la condensation entre un acide gras et une molécule possédant une fonction amine, pour permettre la synthèse d'une liaison amide, est généralement issue de la réaction de Schotten-Baumann. L'acylation de l'amine, réalisée en présence d'un chlorure d'acide gras ou d'un anhydride à pH basique (pH 10), se fait suivant la réaction suivante :



L'avantage de cette réaction se situe au niveau du rendement de la réaction qui est proche de 70 à 80 % ; mais la complexité de ces réactions passant par des étapes de protection / déprotection, souvent nécessaires du fait de la faible spécificité des réactifs, entraîne inévitablement des baisses de rendement. Les autres inconvénients de cette méthode de synthèse sont directement liés à la mise en œuvre de la réaction : température élevée, conditions de pH extrêmes, utilisation de solvants toxiques (DMF, DMSO, toluène...), formation de co-produit (sel). Le manque de sélectivité de ces réactions chimiques a favorisé le développement de la catalyse enzymatique.

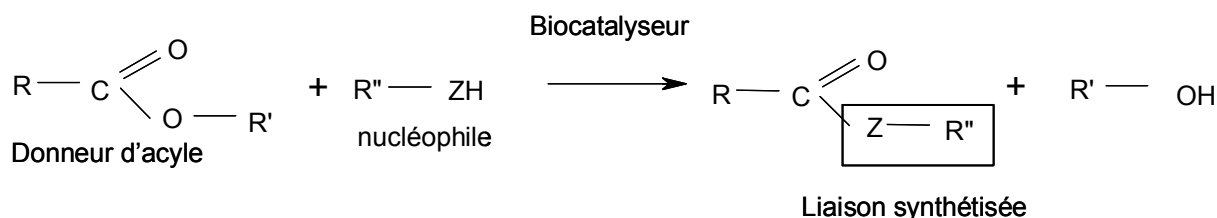
### I.5.2. La catalyse enzymatique

Les récentes campagnes en faveur des produits naturels ont favorisé la recherche de technologies de production plus propres pour l'environnement, et ont diminué l'attrait pour certains produits synthétiques (Gotor-Fernandez et Gotor, 2006). Ainsi, parmi les technologies nouvelles, l'utilisation d'enzymes en milieu organique s'est particulièrement développée puisque ces dernières sont reconnues comme des catalyseurs, non-polluants et biodégradables, pour la synthèse de composés très divers (Vic, 1991).

L'utilisation de la biocatalyse est en forte expansion. Elle est très utilisée par l'industrie pharmaceutique, de chimie fine et alimentaire pour la production de molécules complexes (Jorgejan *et al.*, 1995). De plus, ces molécules d'intérêt sont peu solubles en phase aqueuse. Il est généralement accepté qu'une enzyme placée en milieu organique présente de nouvelles propriétés : augmentation de la thermostabilité, modification de la spécificité, effet

mémoire de la molécule, et, surtout, capacité à catalyser des réactions qui seraient impossibles d'un point de vue cinétique et thermodynamique en milieu aqueux (Yang et Russell, 1996).

La synthèse enzymatique entre un acide/ester et un groupe nucléophile est la suivante :



Outre les avantages liés à l'enzyme, la synthèse en milieu organique permet d'améliorer les procédés réactionnels, pour la mise en œuvre et pour la récupération de l'enzyme et du produit. Le tableau I.2 rassemble les nombreux avantages liés à la synthèse en milieu organique.

Tableau I.2. Avantages à utiliser les enzymes en milieu organique (Sheldon, 1996).

1. Augmentation de la solubilité des substrats apolaires (exemple : acides gras)
2. Augmentation de la thermostabilité
3. Modification de la spécificité pour le(s) substrat(s)
4. Récupération facilitée du produit par simple évaporation du solvant
5. Récupération facilitée de l'enzyme par simple filtration ou centrifugation
6. Suppression des étapes réactionnelles dépendant de l'eau
7. Déplacement de l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse - et au dépend de l'hydrolyse- pour les réactions d'estérification
8. Possibilité de mettre en œuvre des réactions avec d'autres nucléophiles (réaction de transestérification), ce qui ne pourrait être possible en milieu aqueux
9. Intégration aisée d'enzymes dans des étapes de chimie conventionnelles
10. Élimination de la contamination microbienne

### I.5.3. Les enzymes

La synthèse de liaison ester et amide peut être obtenue soit par l'utilisation d'une lipase, soit par l'utilisation d'une protéase avec une activité estérasique (Jamrozik, 2001). Classiquement, les lipases sont différenciées des estérases par le phénomène d'activation interfaciale. Le pouvoir catalytique des lipases est augmenté par leur adsorption à une



interface huile/eau. Dans un milieu à faible teneur en eau, les estérases et les lipases peuvent catalyser la synthèse d'esters notamment par hydrolyse inverse (Facioli et Barra-Arellano, 2001). D'autres enzymes telles les acyl-transférases ou les acylases peuvent catalyser des réactions d'acylation en milieu biphasique aqueux mais les lipases sont les catalyseurs les plus étudiés pour l'acylation de molécules.

#### **I.5.4. Les lipases**

Les lipases sont des catalyseurs enzymatiques très utilisés dans l'industrie (pharmaceutique, alimentaire, etc...) en raison de leur haute énantiosélectivité, de leur stabilité et de leur efficacité catalytique. Elles sont largement répandues dans la nature, présentes dans de nombreux cellules végétales, animales, fongiques et bactériennes (Enaud, 2004). Les lipases d'origine animale (lipase pancréatique de l'homme) ont été les premières lipases étudiées. Cependant, au cours de ces 25 dernières années, l'intérêt des lipases microbiennes n'a pas cessé de croître (Fickers *et al.*, 2008). Elles présentent, en effet, plusieurs avantages avec une fabrication relativement simple comparée aux lipases d'origine animale et démontrent une grande stabilité à l'encontre de l'action de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications industrielles.

##### **I.5.4.1. La structure des lipases**

Dans les années 80, les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées au point de vue biochimique. Les lipases ont une taille moléculaire comprise entre 20-60 kDa. Les premières structures cristallographiques étudiées sont celles de la lipase pancréatique humaine (Winkler *et al.*, 1990) et du champignon *Rhizomucor mihei* (Derewenda *et al.*, 1992). Depuis, plus de 60 structures tridimensionnelles ont été étudiées. Les lipases ont, en général, un pH optimum d'activité qui varie entre 4 et 9 et la température optimale est souvent comprise entre 30 et 40 °C (Alloue *et al.*, 2008).

Les lipases ont une structure de base commune composée de 8 feuillets  $\beta$  hydrophobes reliés entre eux par 6 hélices  $\alpha$  amphiphiles (fig. I.19) formant un repliement dit  $\alpha/\beta$  (Ollis *et al.*, 1992). Elles possèdent un site actif constitué d'une triade d'acides aminés Ser – (Asp ou Glu) – His, appelé aussi triade catalytique.

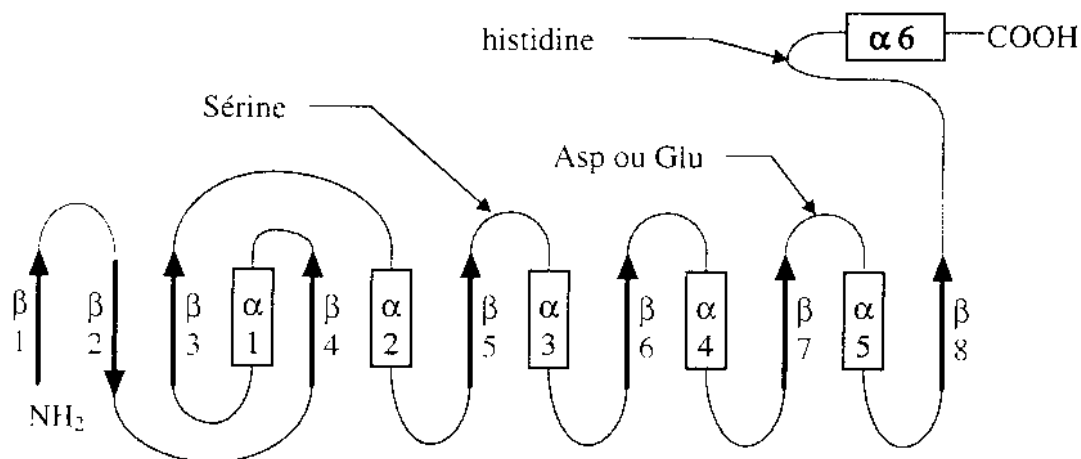


Figure I.19. Schéma du repliement  $\alpha/\beta$ . Les flèches représentent les feuillets  $\beta$  et les rectangles les hélices  $\alpha$  (Uppenberg *et al.*, 1994).

D'une manière générale, les géométries des sites de fixation des groupes acyle diffèrent entre les lipases et les estérases. Ces sites sont volumineux et de nature hydrophobe pour les lipases, mais plus petits pour les estérases. Le site actif des lipases n'est généralement pas accessible au solvant et au substrat. Il est recouvert par un volet amphiphile. On parle de conformation fermée ou de forme inactive de l'enzyme (Egloff *et al.*, 1995). Il servirait à réguler l'exposition du site actif aux substrats en inhibant ainsi l'activité protéolytique de la triade. Des réarrangements conformationnels majeurs sont nécessaires pour que le substrat puisse se lier au site actif des lipases (Verger, 1997).

Dans la forme ouverte, les résidus catalytiques deviennent accessibles au solvant et au substrat. La face hydrophobe de ce volet, orientée vers l'intérieur du site actif, s'expose au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface lipide / eau. On parle de forme active. Le volet varierait selon l'origine de la lipase. Il pourrait être sélectif, voire absent (phospholipase A2 pancréatique). Il est présent chez la lipase B de *Candida antarctica* (Egloff *et al.*, 1995).

#### I.5.4.2. Mécanisme d'action de la lipase B de *Candida antarctica*

Le mécanisme enzymatique à deux substrats, appelé bi ping-pong, est souvent appliqué pour décrire l'activité catalytique des lipases (Malcata *et al.*, 1992), et, en particulier, de la lipase B de *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1995 ; Lopez-Serrano *et al.*, 2001). Le mécanisme catalytique est présenté dans la figure I.20.

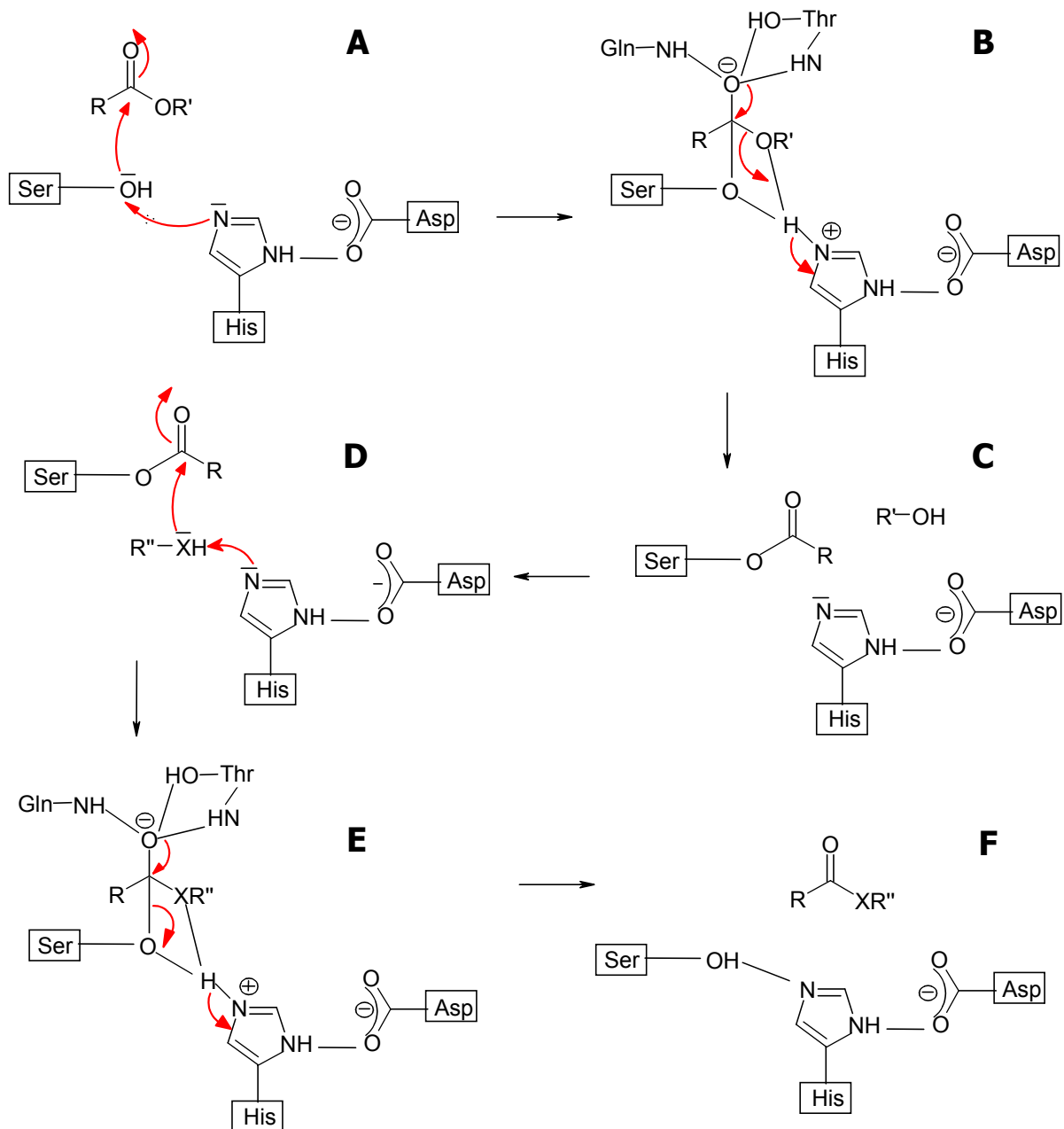


Figure I.20. Mécanisme d'acylation catalysée par la triade catalytique de la lipase B de *Candida antarctica* selon le modèle bi-ping-pong d'après Malcata *et al.*, 1992 et Lopez-Serrano *et al.*, 2001. A) Conformation initiale de l'enzyme et approche du substrat. B) Formation et stabilisation du premier intermédiaire tétraédrique. C) Libération de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme. D) Attaque nucléophile. E) Formation et stabilisation du deuxième intermédiaire tétraédrique. F) Libération du produit acylé et retour à la conformation initiale de l'enzyme.

Dans un premier temps, le groupe hydroxyle de la sérine catalytique attaque le carbone de la fonction carbonyle du substrat. Se forme ainsi un premier intermédiaire tétraédrique dont l'oxy-anion est stabilisé par des liaisons hydrogène créées avec les groupes amines et

hydroxyle des résidus Thr 40 et Gln 106. Au cours de cette catalyse, la liaison ester carboxylique est rompue et le groupe alcool partant ( $R'-OH$ ) emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine. La chaîne acyle de la liaison ester du substrat reste liée de manière covalente à l'enzyme sous forme d'un intermédiaire acyl-enzyme. Cet intermédiaire acyl-enzyme est attaqué, à son tour, par une molécule nucléophile (eau, alcool, amine, par exemple) pour donner un deuxième intermédiaire tétraédrique. Ce dernier se dissocie en libérant le groupe acyle partant ( $R-CO-$ ) désormais lié au nucléophile ( $R-CO-X-R''$ ), restituant ainsi la lipase dans son état initial.

### I.5.4.3. Applications industrielles

Les lipases microbiennes sont la classe d'enzymes les plus importantes et les plus intéressantes pour l'utilisation industrielle. Elles sont très utilisées dans les domaines des détergents (pour l'amélioration de l'efficacité du détergent), de l'oléochimie (permet un meilleur contrôle des produits) et de la chimie fine (pour la synthèse d'énantiomères purs). Leur utilisation est due à leurs propriétés catalytiques atypiques et au fait qu'elles peuvent être facilement obtenues. On peut les utiliser en tant qu'hydrolase ou comme catalyseur en synthèse organique (Fickers *et al.*, 2008). Leurs domaines d'application sont très variés. Le tableau I.3, présente quelques applications industrielles des lipases.

Tableau I.3. Applications industrielles des lipases (Enaud, 2004).

<i>Industries</i>	<i>Activités</i>	<i>Produits ou applications</i>
produits ménagers	hydrolyse des graisses	détergents
produits laitiers	hydrolyse de la matière grasse	développement des agents de flaveur (lait, fromage et beurre)
boulangerie	amélioration de la flaveur	prolongation de la durée de consommation
huiles et graisses	transestérification, hydrolyse	beurre de cacao, margarine, glycérol, savons
pharmaceutique	transestérification, hydrolyse	synthèse de médicaments
cosmétique	synthèse	synthèse d'arômes, émulsifiants

### I.5.4.4. Les types de réactions catalysées par les lipases

Les lipases peuvent catalyser différents types de réactions, comme l'hydrolyse, l'estérification, la transestérification et l'interestérification. Ces types de réaction sont représentés dans la figure I.21.

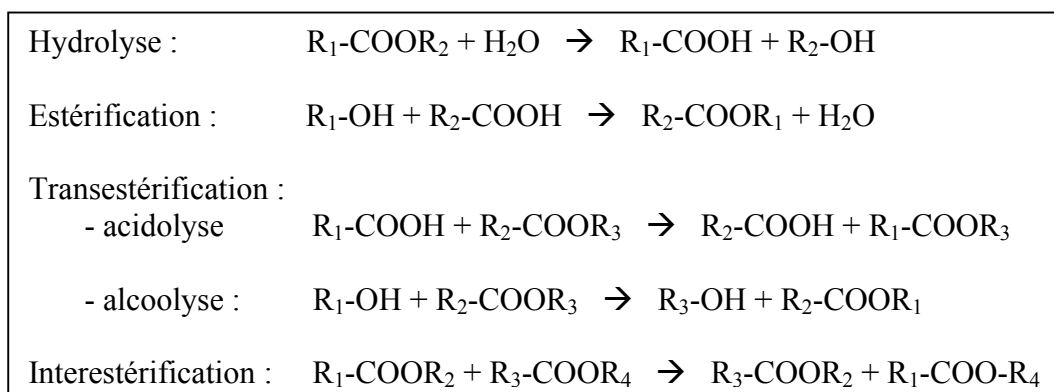


Figure I.21. Ensemble des différentes réactions catalysées par des lipases.

#### I.5.4.5. Paramètres influençant la réaction de synthèse

La réaction de synthèse est régie par différents paramètres, tels le milieu réactionnel, la nature de l'enzyme, l'activité de l'eau et les substrats.

##### I.5.4.5.1. Le milieu réactionnel

Les enzymes sont naturellement présentes dans des systèmes biologiques, donc aqueux. L'utilisation d'enzymes en milieu non aqueux (milieu « non conventionnel »), a été mise en évidence pendant la mise au point des procédés enzymatiques industriels (Alloue *et al.*, 2008).

Pour l'utilisation des hydrolases en milieu « non conventionnel », une teneur faible en eau est très importante. En effet, en milieu aqueux les hydrolases catalysent préférentiellement des réactions d'hydrolyse, alors qu'une teneur en eau faible permet d'orienter l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse. Cependant, l'eau ne peut pas être totalement éliminée du milieu, car pour une bonne activité de la lipase, une faible quantité d'eau est nécessaire (Yoo *et al.*, 2007).

Le choix du solvant organique est crucial, lors de la mise au point d'un procédé biocatalytique. Le solvant doit être non toxique et facilement séparable des autres constituants du milieu. Il doit surtout être compatible avec l'activité enzymatique, le solvant peut affecter l'activité enzymatique en induisant des changements sur le mouvement dynamique et la conformation de la protéine (Enaud, 2004). Enfin, le solvant doit être capable de solubiliser correctement le substrat ; plus la concentration du substrat est importante plus la réaction sera rapide (Yoo *et al.*, 2007). Au cours de ces dernières années, d'autres solvants comme les liquides ioniques ont émergé dans le domaine de la biocatalyse en tant qu'alternative aux

solvants organiques. Les liquides ioniques permettent d'augmenter considérablement l'activité et la stabilité enzymatique, en particulier, dans le cas de l'acylation (Gordon, 2001; Lozano *et al.*, 2001; Sheldon *et al.*, 2002 ; Kaar *et al.*, 2003 ; Van Rantwijk *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2005). De plus, ils induisent le plus souvent une amélioration significative de l'énantio-sélectivité et de la régio-sélectivité des biocatalyseurs. Le CO<sub>2</sub> supercritique est également une alternative à l'utilisation de solvants organiques et présente différents avantages tels que la capacité à solubiliser des composés apolaires de faible masses molaires et à maintenir les enzymes, essentiellement les lipases, sous une conformation structurale leur garantissant une activité synthétique (Hobbs *et al.*, 2007).

#### I.5.4.5.2. Enzyme

La forme libre ou immobilisée sous laquelle l'enzyme va être ajoutée au milieu réactionnel joue un rôle très important sur son activité, sa stabilité et, parfois, sur sa spécificité (Alloue *et al.*, 2008). Une augmentation de la stabilité, des modifications d'activité enzymatique, de pH optimum et d'affinité pour le substrat, ont été observées pour les biocatalyseurs immobilisés (Ivanov et Schneider, 1997). Ces changements dépendent de la source de l'enzyme, du type de support et de la méthode d'immobilisation. Les immobilisations par inclusion, par adsorption et par liaison covalente, sont les principaux types d'immobilisation (Alloue *et al.*, 2008).

#### I.5.4.5.3. La nature des substrats

Une façon d'améliorer le rendement de conversion est d'utiliser des donneurs d'acyles activés ; leur utilisation rend la réaction irréversible. De plus, ils réagissent plus vite que leurs homologues éthyles ou méthyles. Cependant, une inhibition enzymatique causée par les groupes libérés au cours de la réaction a été observée (Wong et Whitesides, 1994). L'utilisation en excès d'un des substrats ou l'élimination d'un des produits formés permet le déplacement de l'équilibre thermodynamique de la réaction, conduisant ainsi à l'amélioration du rendement de conversion des substrats (Humeau *et al.*, 1998).

#### I.5.4.5.4. Effet de l'eau

La quantité d'eau présente dans le milieu peut fortement modifier les performances de la catalyse. Elle exerce une influence considérable sur les positions d'équilibre des réactions d'amidification et d'estérification, dans la mesure où, en tant que produit réactionnel, elle est thermodynamiquement défavorable (Humeau *et al.*, 1998). Le choix d'un milieu non-aqueux

pour ce type de transformation est motivé par la possibilité de déplacer la position d'équilibre des réactions d'hydrolyse, de manière à exploiter l'activité synthétique des hydrolases.

Une hydratation convenable doit être maintenue pour garder l'enzyme active et stable, même quand un solvant organique hydrophobe est utilisé. En effet, l'eau contribue à la polarité du site actif ainsi qu'à la flexibilité de la protéine. Les molécules d'eau sont engagées dans de multiples liaisons hydrogène et apportent la mobilité conformationnelle indispensable à son activité. De trop faibles quantités d'eau peuvent conduire à une rigidification de la structure protéinique, entraînant l'inactivation de l'enzyme (Klibanov, 2001).

Cependant, l'immobilisation permet de fixer l'eau entourant l'enzyme et stabilise les biocatalyseurs grâce aux interactions avec le matériel support, mais aussi en piégeant les molécules d'eau autour de l'enzyme immobilisée.

D'un autre côté, des quantités excessives d'eau ne sont pas non plus favorables à l'activité catalytique. Vazquez Lima *et al.*, (1995) ont mis en évidence la formation d'une couche d'eau autour des particules de Lipozyme<sup>®</sup>. La première conséquence de cette accumulation d'eau est une limitation diffusionnelle des substrats hydrophobes jusqu'aux molécules d'enzymes. La seconde est l'agrégation des particules d'enzymes, provoquant une diminution de la surface de contact entre le catalyseur et le milieu réactionnel et donc une limitation des transferts de masse (Valivety *et al.*, 1992 ; Humeau *et al.*, 1998).

### **I.5.5. Acylation des caroténoïdes**

Les différentes propriétés des caroténoïdes et principalement leur pouvoir antioxydant ont suscité l'intérêt des industries cosmétique, alimentaire et pharmaceutique pour ces molécules. Cependant, leur utilisation reste très limitée, car elles sont très sensibles au changement de température, à l'oxygène et au pH. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour éviter la dégradation des caroténoïdes. Comme la stabilisation des caroténoïdes n'est jamais complète, il est nécessaire d'être vigilant lors de l'emploi de ces molécules pour éviter leur dégradation et assurer une conservation de leurs caractéristiques. Ainsi, il est très important que la conservation des caroténoïdes se fasse à faible température et à l'abri de la lumière.

L'absence d'oxygène pendant la phase de manipulation des caroténoïdes est fortement recommandée, pour éviter la dégradation par oxydation de ces molécules. Quand les caroténoïdes sont utilisés pour la formulation de produits alimentaires ou pharmaceutiques, l'ajout d'antioxydants (comme l'acide ascorbique et le butyl-hydroxytoluène) est souvent nécessaire (Fontana *et al.*, 1997).

L'encapsulation, est une autre méthode pour protéger les caroténoïdes contre la dégradation (Humeau *et al.*, 2000). La surface externe de la capsule est recouverte par des groupes hydroxyles, permettant ainsi à celle-ci d'être soluble dans l'eau. La partie intérieure de la capsule, qui contient le caroténoïde est apolaire. De ce fait, une fois à l'intérieur, la molécule reste protégée de la chaleur, de l'oxygène, de la lumière et, également, de l'interaction avec d'autres molécules.

Plus récemment, l'acylation de caroténoïdes a été mise en évidence par différents auteurs. Cette modification a montré son intérêt notamment pour l'amélioration de l'effet antioxydant (Karagiannidou *et al.*, 2003) et pour l'augmentation de leur stabilité face à la lumière (Arita *et al.*, 2004).

Dans les plantes riches en acides gras, on retrouve naturellement des esters de caroténoïdes de la réaction d'estérification avec des acides gras. Pientea *et al.* (2005), ont mis en évidence une méthode d'analyse de ces molécules retrouvées dans l'espèce *Physalis alkekengi* (amour en cage) et *Hippophae rhamnoides* (argousier). Il a été démontré, que les acides gras saturés sont préférentiellement utilisés pour l'estérification des caroténoïdes, présentes dans ces plantes.

L'étude des esters de lutéine issus des pétales de l'espèce *Tagetes*, a été réalisée par Tyczkowski et Hamilton (1987). Ces esters sont utilisés dans la supplémentation de l'alimentation des poules, pour augmenter la pigmentation du jaune d'œuf. Bone *et al.* (2003), ont démontré que les esters de la lutéine et de la zéaxanthine ont des effets bénéfiques chez l'homme, notamment en réduisant le risque de dégénération musculaire liée à l'âge. Cette étude a montré l'intérêt de l'utilisation de ces esters présentant une activité biologique, comme additifs dans les industries alimentaire et cosmétique.

#### **I.5.5.1. Acylation chimique de caroténoïdes**

L'acylation par voie chimique de caroténoïdes, est la méthode la plus répandue dans la littérature. Nadolski *et al.*, 2006 ont utilisé cette technique pour l'estérification de la lutéine avec le sel de disuccinique (figure I.22 (a)) et le diméthyl phosphoroiodidate (figure I.22 (b)), avec un catalyseur basique, pour l'amélioration de sa solubilité dans les milieux aqueux.



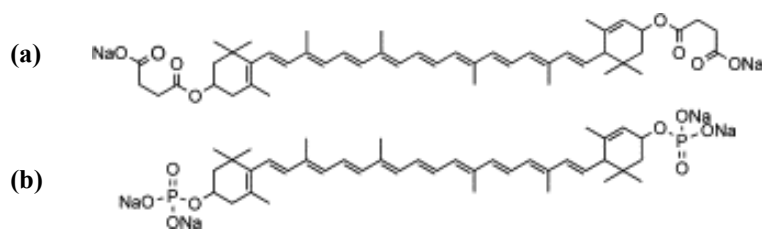


Figure I.22. Structure chimique des diesters formés (a) lutéine disodium disiccinique et (b) lutéine disodium diphosphate (Nadolski *et al.*, 2006).

Ils ont montré une amélioration de la solubilité et de l'activité antioxydante de la lutéine disodium diphosphate par rapport à la lutéine disodium disiccinique. Cette amélioration est probablement due à l'augmentation du potentiel d'ionisation du groupe phosphate en milieu aqueux.

Karagiannidou *et al.* (2003), ont étudié l'acylation du  $\beta$ -Apo-8'-caroténol avec deux antioxydants, le trolox et le hydroxytoluène butylé (BHT) en milieu organique avec un catalyseur basique. Par estérification directe, ils ont obtenu le Caro-Trolox (a) et le Caro-BHT (b) (figure I.23).

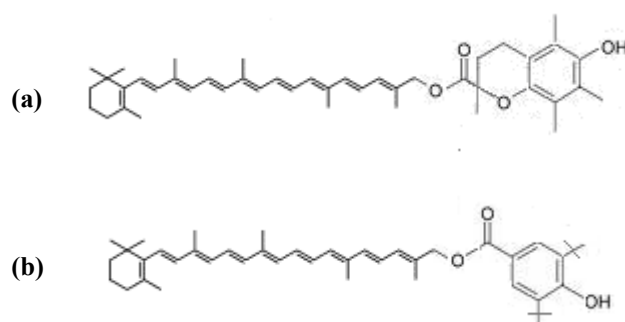


Figure I.23. Structure chimique des monoesters formés (a) Caro-Trolox et (b) Caro-BHT (Karagiannidou *et al.*, 2003).

Ils ont observé, que l'ester formé avec le trolox permet une amélioration du caractère antioxydant par rapport à la molécule initiale et augmente la stabilité du caroténoïde. Le groupe hydroxyle de l'ester Caro-Trolox, possède un effet protecteur de la nouvelle molécule. Un essai a été réalisé pour confirmer cet effet et les résultats ont démontré que la molécule a conservé sa coloration après 16 jours d'exposition à la lumière. Cependant, les mêmes résultats n'ont pas été observés avec l'ester formé avec le BHT.

Des observations analogues ont été démontrées par Arita *et al.* (2003). L'ester formé par estérification de la  $\beta$ -cryptoxanthine avec un acide gras (palmitique) a amélioré la stabilité du caroténoïde à l'exposition à la lumière.

### I.5.5.2. Acylation enzymatique par des caroténoïdes

Une seule étude, sur une réaction enzymatique mettant en jeu un caroténoïde donneur d'acyle en milieu organique (2-méthyl-2-butanol), a été rapportée par Humeau *et al.* (2000). Ces travaux ont mis en évidence l'obtention d'un ester dérivé de l'acylation de l'acide ascorbique par la bixine ou la norbixine.

Ils ont utilisé la lipase B de *Candida antarctica*, comme catalyseur de cette réaction de synthèse. Le taux de conversion de l'ester de bixine à basse pression ( $2 \cdot 10^4$  Pa) de 50 % a été doublé par rapport à celui obtenu à pression atmosphérique (25 %). Ils ont également observé qu'avec la norbixine, le taux de conversion est beaucoup plus faible qu'avec la bixine (8 % au lieu de 50 %). Comme observé, la transestérification de la bixine semble être préférable par rapport à l'estérification directe de la norbixine, la raison peut être liée à la formation d'eau au cours de l'estérification directe qui est défavorable à la réaction d'estérification. La formation d'un diester n'a pas été observée par Humeau *et al.* (2000). La figure I.24, montre la structure chimique de l'ester formée par la transestérification de la bixine ou par l'estérification de la norbixine. Cependant, aucune étude concernant les activités biologiques des dérivés de la bixine, ni de la norbixine n'a été réalisée.

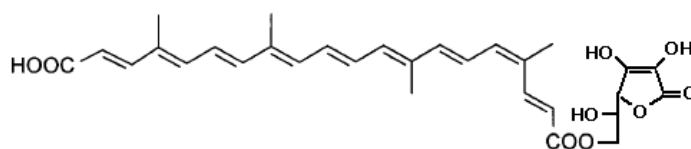


Figure I.24. Structure chimique des monoesters formés par la transestérification de la bixine ou par l'estérification de la norbixine (Humeau *et al.*, 2000).

La concentration maximale de norbixine ou de bixine utilisée a été de 2 g/L et de 10 g/L pour l'acide ascorbique mais un rapport molaire de 1/11 (acide ascorbique/norbixine ou bixine) montrant un net excès d'agent acylant s'est montré optimal. D'autres auteurs ont également montré la nécessité de travailler en léger excès d'agent acylant dans le cadre d'une

réaction d'acylation mettant en jeu un acide gras et de la lysine ou un peptide pour la formation de liaison amide (Maugard *et al.*, 1998 ; Soo *et al.*, 2004 ; Husson *et al.*, 2008).



## Chapitre II

### Matériel et méthodes

---



## CHAPITRE II – MATERIEL ET METHODES

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Souche de levure

La souche *Sporobolomyces ruberrimus* utilisée pour cette étude, est une souche sauvage isolée au L.S.G.C. en 2001 (Razavi et Marc, 2006). Elle est cultivée à 23 °C sur milieu de conservation « YM » et conservée à -20 °C.

#### II.1.2. Réactifs

##### II.1.2.1. Réactifs pour milieu de culture et conservation de la souche

Extrait de levure	Organotechnie	La Courneuve, France
Peptones	Difco laboratories	Paris, France
Sulfate d'ammonium	Sigma - Aldrich	Milwaukee, E.U.
D(+) Glucose monohydraté	Sigma - Aldrich	Milwaukee, E.U.
Extrait de malt	Organotechnie	La Courneuve, France
Glycérol technique	Novance	Compiègne, France
Glycérol pur	VWR	Fontenay sous Bois, France
Antimousse Biospumex 153	Biosoph laboratoires	Nancy, France
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Prolabo	Paris, France
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carlo Erba	Val de Reuil, France
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck	Hohenbrunn, Allemagne
Agar	Merck	Hohenbrunn, Allemagne
Acide palmitique	Fluka	Buchs, Suisse
Acide oléique	Sigma-Aldrich	Milwaukee, E.U.
Acide linoléique	Sigma- Aldrich	Milwaukee, E.U.
Acide stéarique	Fluka	Buchs, Suisse

##### II.1.2.2. Réactifs pour analyses

Méthanol	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Acide sulfurique	Fluka	Buchs, Suisse
Hydroxyde de potassium	Fluka	Buchs, Suisse
TFA (CLHP)	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Hexane	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Chlorure de sodium	Prolabo	Paris, France
Pierre Ponce	Prolabo	Paris, France
Silica gel 60	Fluka	Buchs, Suisse
Silica gel/TLC cards	Fluka	Buchs, Suisse
L-lysine	Sigma-Aldrich	Milwaukee, E.U.
2-méthylbutan-2-ol (M <sub>2</sub> B <sub>2</sub> )	Merck	Hohenbrunn, Allemagne
Phénol phtaléine	Prolabo	Paris, France
Acétone	Carlo Erba	Val de Reuil, France

Benzène	Prolabo	Paris, France
Bixine/norbixine	Commerce artisanal	Brésil
β-carotène	BASF	Burgbernheim, Allemagne
Canthaxanthine	BASF	Burgbernheim, Allemagne
Chlorure d'acétyle	Fluka	Buchs, Suisse
Sodium métallique	Sigma-Aldrich	Milwaukee, E.U.
Ninhydrin	Fluka	Buchs, Suisse
Butanol	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Acide Acétique	Merck	Hohenbrunn, Allemagne
Tamis moléculaire – 4 Å	Sigma-Aldrich	Milwaukee, E.U.
Novozyme <sup>®</sup> 435	Novo industries	Bagsvaerd, Danemark
Eau miliQ	Sartorius – arium 611UV	Goettingen, Allemagne

### II.1.2.3. Effluents gazeux

Azote de qualité U	Messer	Mitry Mory, France
Hydrogène	Messer	Mitry Mory, France
Hélium	Messer	Mitry Mory, France

### II.1.3. Analyseurs

#### II.1.3.1. Chromatographie liquide haute performance

Chromatographe liquide haute performance M.6000A	Waters	Milford, E.U.
- Réfractomètre différentiel R.410	Waters	Milford, E.U.
- Spectrophotomètre Lambda-max 481	Waters	Milford, E.U.
- Injecteur automatique Autosampler series 200LC	Waters	Milford, E.U.
- Four pour colonne CLHP HTR	Waters	Milford, E.U.
- Pompe Spectra Physics P 1000	TSP	Riviera Beach, E.U.
- Colonne Polypore H (PPH – 257)	Brownlee Lab	Foster City, E.U.
- Station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma	Biosystèmes	Dijon, France
Chromatographe liquide haute performance	Perkin Elmer Instruments	Selton E.U.
- Barrette de diodes – series 200	Perkin Elmer Instruments	Selton E.U.
- Injecteur automatique Autosampler series 200LC	Perkin Elmer Instruments	Selton E.U.
- Four pour colonne	Igloo-cil	Hattersheim, Allemagne
- Pompe series 200 LC	Perkin Elmer Instruments	Selton E.U.
- Colonne Lichrospher <sup>®</sup> 100 – C <sub>18</sub> – (5 µm)	Merck	Darmstadt, Allemagne
- Station d'acquisition et de traitement des données - logiciel TotalCrom workstation	Perkin Elmer Instruments	Selton E.U.



**II.1.3.2. Chromatographie en phase gazeuse**

Chromatographie phase gazeuse	Perichrom	Saulx les chartreux, France
- Vanne d'injection gazeuse automatique	Perichrom	Saulx les chartreux, France
- Détecteur à ionisation de flamme	Perichrom	Saulx les chartreux, France
- Colonne capillaire de 30 m en silice fondue, Phase stationnaire : EC – Wax, épaisseur de film 0,25 µm, diamètre intérieur 0,32mm	Alltech	Deerfield, E.U.
- Station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma	Biosystèmes	Dijon, France

**II.1.4. Préparation des cultures et fermenteur**

Étuve à matière sèche	Kendro	Hanau, Allemagne
Hotte à flux laminaire vertical Bio48	Faster	Ferrara, Italie
Autoclave (100 L)	Science Médecine Industrie	Montpellier, France
Table d'agitation Certomat	Descharmes	Heillecourt, France
Fermenteurs de 3 L	Applikon	Schieedam, Pays-Bas
- Boîtier de régulation ADI 1030	Applikon	Schieedam, Pays-Bas
- Système d'agitation ADI 1016	Applikon	Schieedam, Pays-Bas
- Électrodes pH, O <sub>2</sub> stérilisables	Ingold	Zürich, Suisse
- Pompes péristaltiques 7521-35 et 7544-20	Masterflex	Chicago, E.U.
- Bain thermo-circulateur ADI 1018	Applikon	Schieedam, Pays-Bas

**II.1.5. Préparation pour les synthèses**

- Réacteur à barreau aimanté de 50 mL	Wheaton®	Millville, E.U.
- Agitateur magnétique chauffant	Ika Labortechnik	Staufen, Allemagne
- Thermomètre	Ika Labortechnik	Staufen, Allemagne

**II.1.6. Divers**

Spectrophotomètre visible LKB Novaspec	Biochrom	Cambridge, Angleterre
Microscope LABORLUX 12	Leitz	Copenhague, Danemark
Balance de précision AT 200	Mettler	Greifensee, Suisse
Balance Precisa 6000D	PAG Oerlikon	Zürich, Suisse
Pipettes automatiques Proline®	Biohit	Bonnelles, France
Membranes filtrantes en acétate de cellulose (diamètre 25 mm ; seuil de coupure 0,2 µm)		
Millex GS	Millipore	Molsheim, France
Vortex hHeidolph Top-mix	Bioblock Scientific	Strasbourg, France
Centrifugeuse – sigma 302 K	Bioblock Scientific	Strasbourg, France
Rotavapor - R-144	Büchi	Flawil, Suisse

## II.2. Milieux de culture

### II.2.1. Milieu de conservation « YM »

Le milieu Yeast Malt, YM, dont la composition est déterminée ci-dessous, est un milieu riche en sources d'azote et de carbone. Il est utilisé dans cette étude afin de cultiver et conserver la souche. La souche est conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$  et  $-18^{\circ}\text{C}$  et est repiquée tous les trois mois pour le maintien du bon état physiologique.

D(+) Glucose monohydraté	10 g/L
Peptones	5 g/L
Extrait de levure	3 g/L
Extrait de malt	3 g/L
Eau distillée	q.s.p. 1 L
pH	6

La forme solide du milieu YM est obtenue en ajoutant 20 g/L d'agar au milieu YM liquide.

### II.2.2. Milieu de pré-culture et de culture

Le milieu servant à la pré-culture ou de base pour les cultures est préparé dans une fiole d'Erlenmeyer de 300 mL remplie avec 150 mL de milieu. Après la phase de pré-culture, il est totalement transféré de manière stérile dans le fermenteur. Le glycérol technique et les sels sont stérilisés séparément à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes.

Glycérol technique et glycérol pur	33,5 g/L
Extrait de levure	1 g/L
Peptones	0,5 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4 g/L
pH	6
Anti-mousse	1 mL

### II.3. Conduite des cultures

Le schéma ci-dessous représente les différentes étapes de pré-culture avant la fermentation.

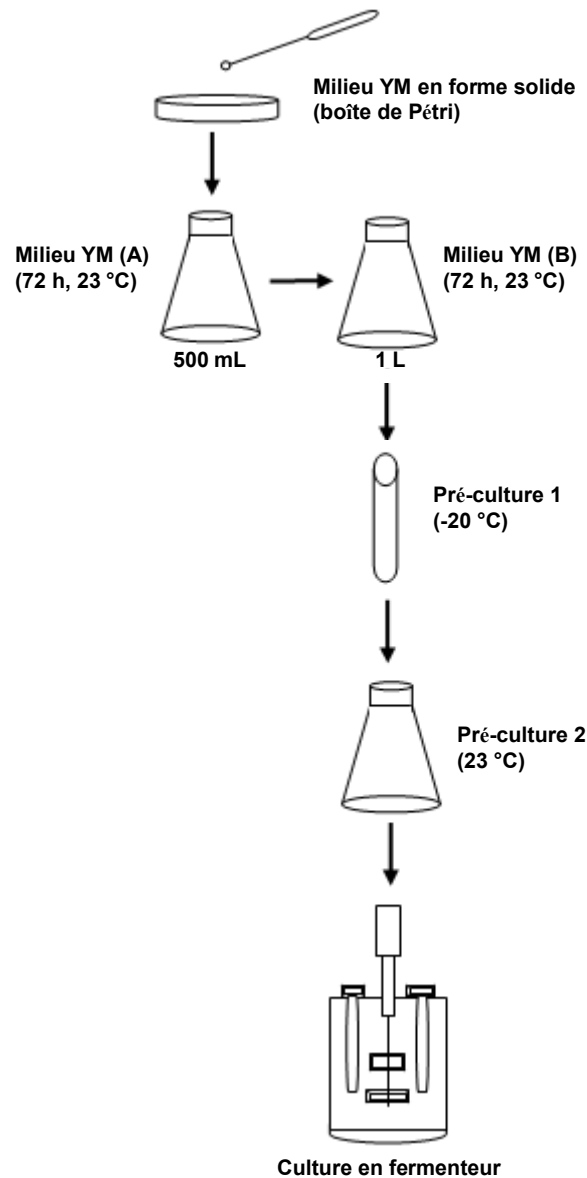


Figure II.1. Schéma global des différentes étapes de pré-culture avant fermentation.

#### II.3.1. Milieu de pré-culture 1

Le milieu de pré-culture 1 est utilisé pour la première étape de pré-culture. Après l'ensemencement à partir d'une boîte de collection, à l'aide d'une anse (fil droit), le milieu

YM (A), placé dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 mL, contenant 100 mL de milieu, est placé sur une table d'agitation pendant 72 heures à 210 oscillations par minute, à la température de 23 °C. Ce milieu servira pour l'ensemencement du milieu d'YM (B), qui sera utilisé pour la préparation du milieu de culture 1. Les étapes de préparation sont identiques à celles utilisées pour le milieu YM (A). Ensuite, 8 mL du milieu de pré-culture 1 sont mis dans des tubes à essais qui seront conservés à -20 °C ; ces tubes seront, par la suite, utilisés pour l'ensemencement de chacun des milieux de pré-culture 2.

### **II.3.2. Milieu de pré-culture 2**

Les fioles d'Erlenmeyer de 300 mL sont remplies avec 150 mL de milieu de culture, les cultures sont préparées en double pour chaque condition de culture. Le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 20 mn à 120 °C. L'ensemencement est réalisé avec le milieu de pré-culture 1, ~ 5 % (8 mL dans 150 mL). Les cultures sont ensuite placées sur table d'agitation pendant 72 h à 210 oscillations par mn, à la température de 23 °C.

### **II.3.3. Conditions de cultures discontinues en fermenteur 3 L**

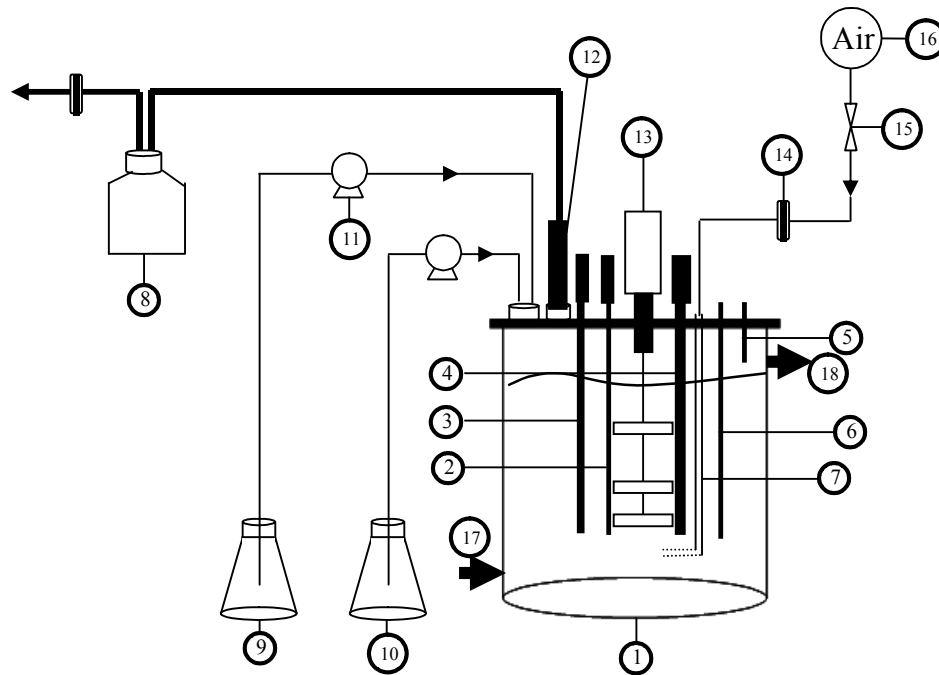
Le volume initial de milieu dans le réacteur est fixé à 1,65 L, après inoculation, pour chacune des fermentations réalisées. Le fermenteur de 3 L est stérilisé à l'autoclave avec tous ses accessoires et le milieu de fermentation. La stérilisation est effectuée à 121 °C pendant 20 mn. Après stérilisation, le réacteur est inoculé avec 150 mL de la pré-culture 2.

L'étalonnage de la sonde de pH a été contrôlé avant l'introduction de tout liquide dans le réacteur à l'aide d'une solution de KOH (2 N) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 N). La température est régulée par circulation d'eau thermostatée au sein d'une double enveloppe entourant le réacteur. Ce système de régulation assure une température constante du milieu de fermentation à 0,2 °C près.

Le système d'agitation comporte trois turbines de type Rushton fixées sur un arbre entraîné par le haut de la cuve et deux contre-pales fixes. La vitesse de rotation du moteur est initialement fixée à 300 tr/mn et peut atteindre une valeur fixée à 900 tr/mn afin d'éviter une production de mousse trop importante. L'aération est régulée en maintenant un taux en oxygène dissous fixé à 10, 50 ou 80 % de la saturation avec une vitesse d'agitation variable comprise entre 300 et 900 tr/mn et un débit variable d'aération limité à 1 L/mn.

Ce procédé conduisant à une importante formation de mousse, 1 mL d’anti-mousse est ajouté au milieu de culture, 7 h après le début de la fermentation pour éviter le dépôt et la perte de cellules sur la paroi du bioréacteur.

Un schéma complet du réacteur et de ses accessoires est présenté dans la figure II.2.



1 – Fermenteur	7 – Canne d’aération	13 – Agitation mécanique
2 – Sonde température	8 – Piège à condensats	14 – Filtre stérile
3 – Sonde pH	9 – NaOH (2N)	15 – Débitmètre
4 – Sonde pO <sub>2</sub>	10 – H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2N)	16 – Alimentation air
5 – Alimentation milieu	11 – Pompe volumétrique	17 – Fluide caloporteur (entrée)
6 – Purge cellulaire	12 – Condenseur	18 – Fluide caloporteur (sortie)

Figure II.2. Schéma général du réacteur 3L utilisé et de ses périphériques.

## II.4. Méthodes analytiques

### II.4.1. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements de milieu sont réalisés pour les mesures hors-ligne. Ils sont effectués stérilement à l’aide d’une seringue à proximité d’une flamme. Le volume prélevé est de 30 mL, 5 mL pour la purge et 25 mL pour la mesure de la biomasse, des substrats et des métabolites. Les 25 mL d’échantillon sont utilisés de la manière suivante :

- dosage du glycérol - 2 mL d'échantillon filtrés à l'aide d'un filtre Sartorius de porosité 0,20  $\mu\text{m}$  et conservés à -18 °C,
- détermination de la concentration en cellules - 3 mL d'échantillon utilisés immédiatement après le prélèvement pour la préparation des dilutions,
- dosage des caroténoïdes - 20 mL d'échantillon placés dans un tube « Falcon » de 50 mL et conservés pendant un maximum de 7 jours à -18 °C.

#### **II.4.2. Séparation cellules – milieu**

Pour l'analyse du principal substrat carboné (glycérol), une séparation des cellules du milieu est nécessaire. Pour cela une filtration sur membrane d'acétate de cellulose Millipore de diamètre 25 mm et de seuil de coupure de 0,2  $\mu\text{m}$ , est réalisée. Les échantillons sont stockés à -20 °C et les analyses sont effectuées ultérieurement.

#### **II.4.3. Détermination de la concentration en levure**

La concentration en biomasse, de la levure *Sp. ruberrimus*, est estimée par une corrélation linéaire entre la concentration cellulaire massique (matière sèche) et la mesure de densité optique (DO). La concentration cellulaire massique est mesurée par la méthode gravimétrique, définie par la masse de cellules sèches issue de solutions de densité optique connues mesurées à 600 nm. L'objectif est de déterminer la corrélation présentée dans la figure II.3. Pour cela, 10 mL de la culture sont filtrés sur une membrane Sartorius en acétate de cellulose de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ . La membrane, préalablement tarée, est alors lavée deux fois avec un même volume d'eau physiologique et séchée à 105 °C pendant 24 h. Après refroidissement au dessiccateur, la membrane est pesée à nouveau afin de connaître la masse de cellules sèches présentes initialement dans l'échantillon. Le procédé est répété trois fois pour une meilleure estimation de la matière sèche.

La concentration cellulaire est estimée par la lecture de l'absorbance (D.O.) à 600 nm. Cette méthode turbidimétrique, rapide et pratique permet de suivre l'évolution de la concentration cellulaire (biomasse) dans le fermenteur au cours du temps. Une dilution se fait nécessaire lorsque la densité optique dépasse la valeur de 0,55. Pour les dilutions, l'eau physiologique (NaCl à 9 %) est utilisée pour éviter tout phénomène d'éclatement des cellules par différence de pression osmotique.

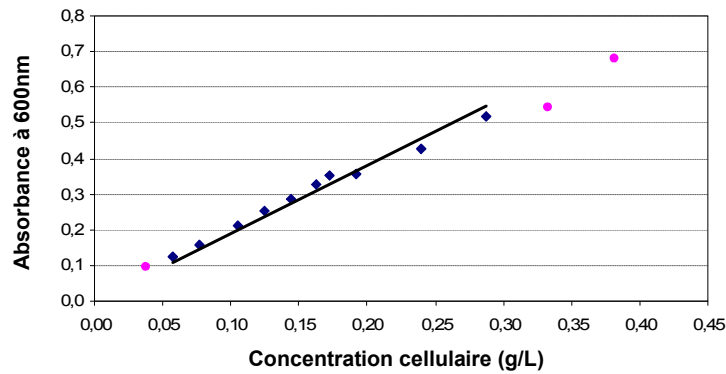


Figure II.3. Corrélation obtenue entre l'absorbance à 600 nm et la concentration cellulaire massique de *Sp. ruberrimus*.

#### II.4.4. Dosage du glycérol

Le dosage du glycérol résiduel est réalisé par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Ce dosage est réalisé hors ligne avec un passeur automatique d'échantillons. Les composés sont séparés avec une colonne polypore H par un mécanisme mixte d'exclusion de taille et d'échange d'ions. En sortie de colonne, les molécules sont identifiées grâce à un détecteur de type réfractomètre différentiel. Les signaux issus du détecteur sont reçus par une station d'acquisition et de traitement des données, équipée du logiciel Chroma (Biosystèmes). Les paramètres utilisés sont les suivants :

- étalonnage externe avec une solution étalon contenant du glycérol à 40 g/L ;
- température de la colonne 65 °C ;
- volume d'injection : 10 µL ;
- éluant : solution d'acide sulfurique à 0,04 N ;
- débit de l'éluant : 0,9 mL/mn.

L'étalonnage est réalisé avec une gamme de solutions aqueuses de glycérol pur. La durée totale de l'analyse est de 15 mn.

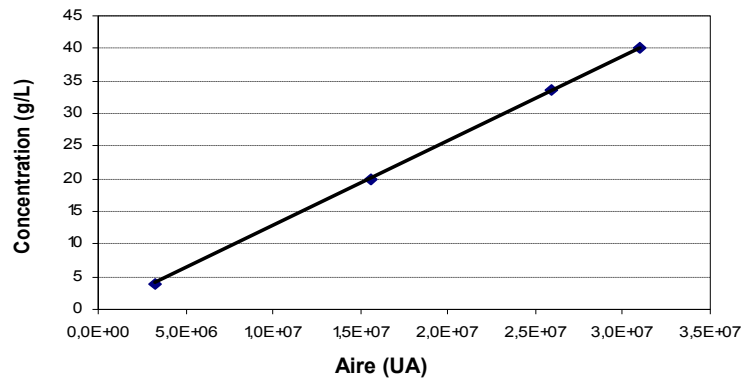


Figure II.4. Corrélation obtenue entre la concentration de glycérol pur et l'aire de pic.

#### II.4.5. Désintégration des cellules, extraction des pigments et caractérisation protéique des extraits

Les caroténoïdes synthétisés par *Sp. ruberrimus*, la torularhodine, le  $\beta$ -carotène, le torulène et le  $\gamma$ -carotène sont des pigments intracellulaires. La paroi de la levure est très dure et l'extraction des pigments directe par solvants n'est pas aisée. Pour réussir une extraction efficace, nous avons adapté et mis au point, au cours de ce travail, une technique utilisant une presse de French, méthode rapide et très efficace pour casser les cellules. Le protocole est le suivant : 20 mL de culture sont centrifugés à 4500 g, à 4 °C pendant 10 mn. Après élimination des surnageants, le culot est remis en suspension dans 20 mL d'eau physiologique ; la suspension est agitée pendant 2 mn avant d'être à nouveau centrifugée dans les mêmes conditions. Après avoir lavé deux fois le culot avec l'eau physiologique, 10 mL d'éthanol sont ajoutés au dernier culot. Le tout est passé deux fois à la presse de French à la pression de  $2 \cdot 10^6$  Pa. Les cellules broyées sont récupérées par centrifugation (4500 tr/mn, 15 mn et 4 °C) et le surnageant est mis dans un ballon, préalablement pesé, pour subir une évaporation de l'éthanol dans le rotavapor ; les caroténoïdes restants sont remis en suspension dans 5 mL d'acétone. Cette solution est filtrée dans un filtre seringue de 0,22  $\mu$ m, pour enlever l'ensemble des débris cellulaires que ne sont pas éliminés par la centrifugation. L'acétone de cette nouvelle solution est à nouveau évaporé au rotavapor et le mélange de caroténoïdes est récupéré dans 1 mL d'acétone pour être analysé par CLHP selon le protocole proposé par Weber *et al.* (2007) dans les conditions opératoires suivantes :



- colonne : Lichrospher C18, 100 Å (150 mm \* 4,6 mm, 5 µm) ;
- éluant : profil d'élution (figure II.5) avec acétone + 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) et eau + 0,1 % TFA ;
- volume d'injection : 10 µL ;
- débit global de l'éluant : 1 mL/mn ;
- détecteur : barrette de diodes.

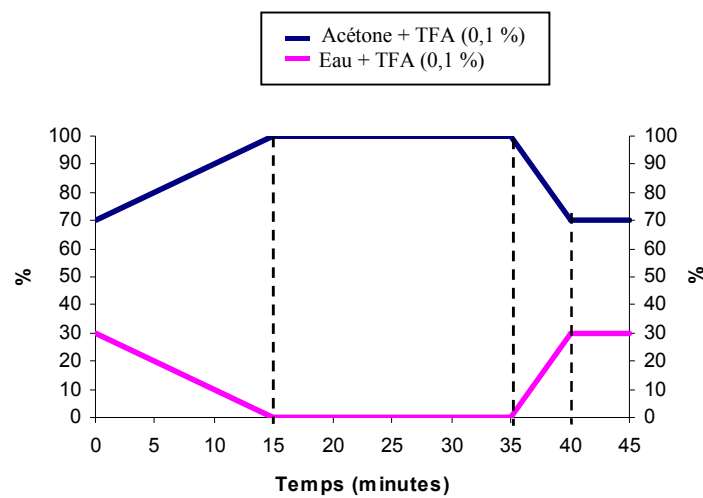


Figure II.5. Profil d'élution utilisé pour la séparation des caroténoïdes (d'après Weber *et al.* (2007)).

Un étalonnage externe avec des solutions étalons, correspondant à des concentrations comprises entre 0,1 g/L et 10 g/L de  $\beta$ -carotène (courbe d'étalonnage en fig. II.6), a été utilisé. Seul le  $\beta$ -carotène a été choisi en tant que standard puisqu'il est l'unique caroténoïde commercialement disponible parmi ceux produits au cours de ce travail. Ainsi, avant chaque série d'analyse en CLHP, un échantillon de 2 g/L de  $\beta$ -carotène est utilisé pour la normalisation de la concentration des autres caroténoïdes, en supposant une réponse proportionnelle de tous les caroténoïdes en UA.

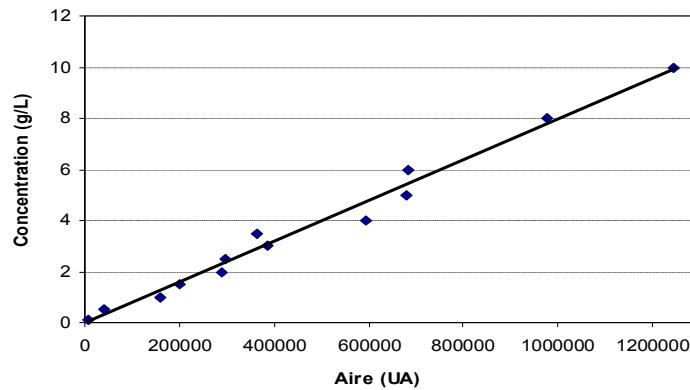


Figure II.6. Corrélation obtenue entre la concentration de  $\beta$ -carotène et l'aire de pic à  $\lambda = 480$  nm.

#### II.4.5.1. Identification par spectrométrie de masse

L'identification des caroténoïdes par spectrométrie de masse, est réalisée avec le « Thermo Scientific series LTQ XL » équipé d'une source d'ionisation du type APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique) en mode négatif. L'analyse avec ce type de source (APCI), est obligatoirement couplée à la CLHP. Alors les échantillons subissent une première étape de séparation (dans la colonne CLHP), avant l'analyse dans le spectromètre de masse. Ainsi, il est possible d'avoir un spectre de masse pour chaque pic obtenu en CLHP, le spectromètre de masse est utilisé pour l'identification de molécules séparées par la CLHP.

Les conditions opératoires sont très importantes pour réaliser l'ionisation des molécules. Nous avons utilisé un mélange méthanol/eau, le TFA (0,1%) a été additionné au mélange pour rendre l'ionisation des molécules plus aisée. La température de vaporisation du gaz vecteur, l'azote U, est de 500 °C. Les masses analysées sont comprises entre 50 et 1200 m/z.

Le logiciel Xcalibur v.2.0 a été utilisé pour l'analyse des résultats obtenus.

#### II.4.5.2. Dosage des protéines dans les extraits de caroténoïdes

La méthode d'extraction des caroténoïdes ne permettant pas de s'assurer d'une parfaite sélectivité, quant à la seule récupération de ces molécules, il s'est avéré nécessaire de vérifier si des protéines n'étaient pas également extraites en même temps. La méthode de Bradford (1976) a été utilisée pour le dosage des protéines cellulaires éventuellement présentes dans le mélange de caroténoïdes, résultat du cassage des cellules par la presse de French. La détermination de la concentration en protéines en solution dans les échantillons de

caroténoïdes, est obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage faite à partir d'un standard de BSA (bovine serum albumin). Cette courbe est réalisée à l'aide de 6 concentrations comprises entre 0 et 0,9 mg/mL. Une solution mère d'une concentration à 1,35 mg/mL a été utilisée.

Le marquage des protéines se fait en ajoutant 20 µL d'échantillon à 980 µL du réactif de Bradford (tableau II.1), pour un volume final de la solution de 1 mL. La solution est agitée à l'aide d'un vortex, pendant 2 mn et est laissée au repos pendant 20 mn. L'absorbance est alors déterminée à 595 nm.

Tableau II.1. Ingrédients pour la préparation du réactif de Bradford.

Coomassie G250	20 mg
Ethanol	10 mL
Acide phosphorique (85 %)	20 mL
Eau milliQ	20 mL

#### II.4.5.3. Étude de la dégradation des caroténoïdes

La dégradation des pigments qui composent le mélange de caroténoïdes après l'extraction, a été étudiée, en présence ou non d'un antioxydant de qualité alimentaire : soit le butylhydroxytoluène (BHT), soit le tert-butylhydroquinone (TBHQ).

Les caroténoïdes sont extraits de la même manière que pour les échantillons classiques et une solution mère contenant 1,24 g de caroténoïdes/L d'acétone, a été divisée en 7 fractions identiques, de 1 mL chacune, qui ont été placées dans des tubes à essais. Les antioxydants BHT et TBHQ ont été ajoutés dans des taux volumiques de 0,04 %, 0,1 % et 0,2 % ; un échantillon témoin (sans ajout) a été préservé.

Les tubes à essais ont été couverts avec du papier aluminium pour éviter toute incidence de la lumière sur les mélanges et placés à 4 °C pour éviter un effet de la chaleur. Les échantillons ont été analysés, en plus des temps initiaux, par CLHP après des durées de stockage : 1, 5, 15, 30 et 45 jours et la dégradation des caroténoïdes au cours du temps a été déterminée.

#### II.4.6. Activité antiradicalaire des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont connus pour leur pouvoir antioxydant. Alors dans le cadre de cette étude nous avons déterminé cette activité anti-radicalaire avec le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). L'activité anti-radicalaire de la canthaxanthine, du  $\beta$ -carotène, de la bixine et du produit de synthèse, ont été analysées, comme décrit par Jiménez-Escrig *et al.* (2000).

Une solution de  $6,31 \cdot 10^{-5}$  mol/L de DPPH, est préparée dans une fiole d'Erlenmeyer enveloppée avec du papier aluminium, pour éviter une dénaturation par la lumière au cours de la réaction. Pour l'analyse, différentes concentrations de caroténoïdes ont été préparées ( $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,52 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,07 \cdot 10^{-4}$  et  $0,76 \cdot 10^{-4}$  mol/L), et un volume de 0,1 mL a été ajouté à 3,9 mL de DPPH. La solution finale de 4 mL est maintenue à température ambiante et est ensuite analysée par spectrophotométrie à 580 nm, après 30 mn.

Le pourcentage de DPPH restant dans la solution, est calculé par :

$$\% DPPH = \frac{[DPPH](t) - [DPPH](0)}{[DPPH](t)} \times 100$$

où,

$[DPPH](t)$  = échantillon témoin sans caroténoïde

$[DPPH](0)$  = échantillon avec DDPH + caroténoïde i

#### II.4.7. Dosage des acides gras dans le glycérol technique

1 mL de glycérol est utilisé pour le dosage des acides gras dans le glycérol technique. Les acides gras ont été estérifiés par la même méthode que celle utilisée par Papanikolaou *et al.* (2001). Cette méthode comporte deux étapes liées à l'utilisation de deux réactifs spécifiques :

- une étape basique - sodium méthylique ;
- une étape acide - méthanol chlorydrique.

Les réactifs sont préparés de la manière suivante :

Méthylate de sodium :

Pour 100 mL de solvant : 70 mL de méthanol,  
30 mL de benzène,  
1 g de sodium métallique.

Les solvants sont ajoutés dans un bécher sous hotte aspirante. Au mélange vivement agité, le sodium métallique est ajouté. L'agitation est poursuivie jusqu'à dissolution complète du sodium. Quelques mg de phénol phtaléine sont ajoutés au mélange, le virage de la couleur rose à l'incolore indiquera le passage du pH basique au pH acide entre les deux étapes de la réaction.

Méthanol chlorhydrique :

Pour 135 mL de solvant : 125 mL de méthanol,  
10 mL de chlorure d'acétyle.

Le méthanol ajouté dans un bécher sous hotte aspirante et sous agitation. Le chlorure d'acétyle est ajouté goutte à goutte par l'intermédiaire d'une burette.

#### II.4.8. Estérification méthylique

Le montage où s'effectuera la réaction, est placé sous la hotte (figure II.7). Il est composé d'un ballon placé dans un chauffe-ballon et surmonté d'une colonne à distiller refroidie par une circulation d'eau.

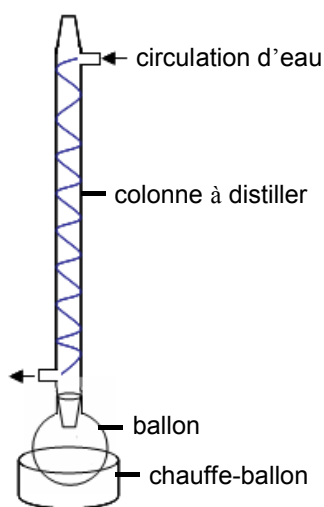


Figure II.7. Schéma du montage pour l'estérification méthylique.

L'échantillon de glycérol technique (1 mL) est placé dans le ballon avec le sodium méthylique et trois pierres ponce. Pour une quantité de matière grasse inférieure ou égale à 0,1 g, 10 mL du solvant sodium méthylique sont nécessaires. Le tout est porté à ébullition pendant 15 mn ; alors le deuxième solvant est ajouté jusqu'au virage de la phénol-phtaléine ; en général, 10 mL suffisent. Ce nouveau mélange réactionnel est porté à ébullition pendant 15 mn, à nouveau. A la fin, la réaction est arrêtée par l'ajout de quelques mL d'eau osmosée.

#### II.4.9. Analyse des esters méthyliques

Le milieu réactionnel est versé dans une ampoule à décanter avec 5 mL d'hexane. L'ensemble est agité 5 fois et laissé à décanter pendant une quinzaine de minutes. La phase organique est récupérée et les esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette analyse est réalisée sur une colonne capillaire de 30 m en silice fondue en phase stationnaire : EC – Wax, épaisseur de film 0,25  $\mu\text{m}$ , diamètre intérieur 0,32mm. Un volume de 0,8  $\mu\text{L}$  est injecté manuellement avec l'aide d'une micro-seringue.

Les caractéristiques de l'analyse sont les suivantes :

- débit du gaz vecteur : 50 mL/mn,
- température d'injection : 220 °C,

Le profil de température utilisé est détaillé dans la figure II.8.

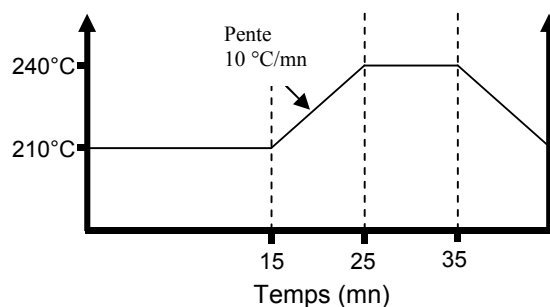


Figure II.8. Profil de température utilisé pour la séparation des acides gras par CPG.

L'identification des acides gras se fait en utilisant une solution standard de composition connue, utilisée au début de chaque série d'analyses. Cette solution étalon est préparée avec les plusieurs standards d'acides gras, dont ceux présents dans le glycérol technique. Chaque ester est caractérisé par un pic à un temps de rétention précis ; celui-ci dépend de la longueur de la chaîne carbonée (tableau II.2).

Tableau II.2. Composition de la solution standard utilisée pour l'identification des esters méthyliques

Composition en acides gras	Ester méthylique	Temps de rétention (mn)
C16 :0	palmitique	3,12
C18 :0	stéarique	4,70
C18 :1	oléique	5,01
C18 :2	linoléique	5,57
C18 :3	linoléinique	6,51
C20 :0	arachidique	7,60
C20 :1	gondoïque	8,07
C22 :0	béhénique	12,89
C22 :1	érucique	13,70
C24 :0	lignocérique	18,58

## II.5. Interprétation des résultats

Pour chaque fermentation, les paramètres cinétiques relatifs à l'évolution de la biomasse, consommation du substrat carbonée et la production des métabolites sont suivis au cours du temps.

### II.5.1. Calcul des vitesses

Dans une culture en mode discontinu, les vitesses de croissance ( $r_X$ ), de consommation de substrat ( $r_S$ ) et de production de métabolites ( $r_P$ ) se déterminent par les valeurs des tangentes respectivement aux courbes de croissance, de consommation des substrats et production des métabolites (exprimées en g/L.h) à chaque instant t. A cet instant t, les vitesses spécifiques sont obtenues selon les expressions suivantes :

$$\text{taux de croissance : } \mu = \frac{r_X}{X}$$

vitesse spécifique de consommation du substrat :  $q_s = \frac{r_s}{X}$

vitesse spécifique de formation du produit :  $q_p = \frac{r_p}{X}$

$\mu$ ,  $q_s$ ,  $q_p$ , s'expriment en g de biomasse (gX), de substrat (gS) ou de produit (gP) par gramme de biomasse et par heure (g/g(X)/h). Les vitesses spécifiques maximales sont déterminées à partir de la courbe des vitesses spécifiques en fonction du temps.

### II.5.2. Rendements

Les rendements globaux  $Y_{x/s}$  et  $Y_{p/s}$  sont définis comme les rapports de masse de cellules sèches (X) ou de métabolites formés (P), par la masse de substrat consommés (S) depuis le début de la fermentation. Ces relations classiques sont :

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \qquad Y_{p/s} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)}$$

$X_0$ ,  $S_0$ ,  $P_0$  sont les concentrations initiales en biomasse, en substrat et en produit définies au départ des cultures.

## II.6. Outils de planification expérimentale, de modélisation et d'optimisation

L'optimisation des performances d'un procédé repose habituellement sur la capacité de le modéliser, c'est-à-dire de prédire l'effet des variables d'actions sur le ou les indicateurs de performances du procédé. L'influence parfois, et même souvent, contradictoire de facteurs opératoires sur les performances métaboliques conduit à chercher l'optimum de plusieurs critères (indicateurs de performance) et requiert la résolution d'un problème d'optimisation multicritère.

La première étape de la méthodologie consiste à établir un modèle pour chaque indicateur de performances. La collecte d'informations expérimentales est une phase critique de la modélisation. Il est souvent pertinent pour les procédés biotechnologiques d'utiliser une



stratégie de planification expérimentale. Cette dernière permet en effet de maximiser la quantité d'informations collectées tout en limitant le nombre d'expériences, c'est-à-dire la durée et le coût de la phase expérimentale.

Dans cette étude, une approche fondée sur les plans d'expériences optimaux est développée. Celle-ci consiste à reformuler le problème de planification expérimentale dans sa forme originale : un problème d'optimisation d'une qualité statistique du plan d'expériences. Cette approche est en effet adaptée à la réalité du problème à traiter (prise en compte des contraintes du procédé et des expériences déjà disponibles). Plusieurs critères de qualité de plans permettent de définir la qualité statistique d'un plan d'expériences. Dans cette étude, une approche de planification optimale multicritère est mise en œuvre. Elle conduit à des plans d'expériences qui traduisent le meilleur compromis des qualités statistiques des plans d'expériences optimaux.

#### **II.6.1. Mise en œuvre de la stratégie expérimentale multicritère**

La stratégie expérimentale multicritère repose sur plusieurs étapes :

- le choix des modèles mathématiques, a priori
- le choix des critères de qualité des plans à considérer,
- l'identification des plans d'expériences compromis, c'est-à-dire de la zone de Pareto des stratégies expérimentales multicritères,
- la sélection du plan d'expériences à réaliser, parmi les plans de la zone de Pareto.

#### **II.6.2. Description du système**

L'objectif étant la détermination des conditions optimales d'un procédé discontinu de production de la torularhodine afin d'obtenir les meilleures performances possibles pour la productivité (biomasse), la production (caroténoïdes totaux) et la concentration (torularhodine). Un modèle mathématique doit donc être attribué à chacun de ces critères de performances du procédé. Le choix du type de modèle à utiliser dépendra de la quantité de connaissance disponible. Pour cette étude, le choix s'est porté sur l'utilisation des modèles polynômiaux du second degré parce qu'ils permettent généralement une représentation convenable des phénomènes non linéaires avec un nombre de paramètres relativement modeste.

### **II.6.2.1. Facteurs d'action**

Les trois facteurs retenus pour l'étude sont :

- la température,
- l'oxygène dissous et,
- la concentration de l'acide oléique ajouté.

### **II.6.2.2. Réponses à modéliser**

Les réponses à modéliser sont directement liées aux objectifs initiaux de l'étude qui consiste en l'optimisation de la production de torularhodine, aussi bien d'un point de vue cinétique que quantitatif. Dans notre cas, les réponses à modéliser sont les suivantes :

- la concentration en torularhodine,
- la vitesse spécifique de croissance de la levure.

### **II.6.2.3. Choix des critères de construction**

Pour la construction du plan d'expériences optimal, la D-optimalité et la rotatabilité ont été choisies comme critères de qualité de plan à optimiser.

La D-optimalité est le critère le plus couramment utilisé pour la construction de plans d'expériences. Il permet la minimisation de la variance généralisée sur l'estimation des paramètres.

La rotatabilité, permet de rendre les courbes d'isovariance des prédictions par le modèle, concentriques par rapport au centre du domaine expérimental.

L'approche expérimentale multicritère consiste ainsi à déterminer le plan d'expériences qui représente le meilleur compromis entre ces deux indicateurs de qualité statistique.

### **II.6.2.4. L'algorithme génético-évolutionnaire**

La recherche de solutions repose sur l'utilisation d'un algorithme dont le principe est basé sur les lois génétiques et l'évolution générationnelle d'une population. L'algorithme gère une population où chaque individu correspond à un jeu de paramètres (ceux à optimiser). Une première génération est générée de manière aléatoire dans le domaine de recherche prédéfini. Ensuite, les performances de chaque individu sont évaluées par l'algorithme. Ils sont alors classés et les moins performants sont éliminés dans une phase de sélection élitiste. De

nouveaux individus sont générés, soit de manière totalement aléatoire (mutant), soit par croisement entre deux individus, *parent*. Les deux *parents* sont sélectionnés aléatoirement parmi les individus conservés lors de la phase de sélection élitiste. Dans cette phase de *naissance*, ne sont conservés que les nouveaux individus dont les performances sont au moins aussi bonnes que celles du dernier individu conservé dans la phase de sélection élitiste. La population tend ainsi à s'améliorer au fil des générations. La répétition de ce processus de sélection élitiste et de croisement va entraîner une amélioration globale de la population, qui doit converger vers l'optimum global.

A l'instar des organismes vivants, les individus sont représentés sous une forme haploïde ou diploïde. Ces deux représentations n'apportent pas les mêmes avantages au niveau de l'efficacité de l'algorithme à trouver la solution globale, ni dans la rapidité de convergence (Perrin *et al.*, 1997). Dans cette étude, l'utilisation d'individus diploïdes a été retenue. La prise en compte dans la phase de naissance d'individus diploïdes hétérozygotes et d'individus diploïdes homozygotes permet d'intégrer simultanément dans l'algorithme génético-évolutionnaire, des caractéristiques de convergence des algorithmes diploïdes et des algorithmes haploïdes.

#### II.6.2.5. Adaptation de l'algorithme pour l'optimisation multicritère

En optimisation monocritère, la comparaison des individus est réalisée par comparaison de leurs performances respectives. En optimisation multicritère, la comparaison des individus sur la base de plusieurs critères à optimiser est plus complexe car la relation d'ordre de comparaison disparaît.

Le concept de domination au sens de Pareto (1896) est utilisé pour rétablir une relation de comparaison. Pour deux individus, A et B, à comparer selon plusieurs critères, si tous les critères de A sont meilleurs (ou équivalents) à ceux de B et si au moins un critère de A est strictement meilleur que celui de B alors on dit que A *domine* B. Les individus non dominés représentent les meilleurs compromis entre les critères.

L'application du critère de domination de Pareto est généralisée à l'ensemble de la population. Dans l'algorithme génético-évolutionnaire, l'optimisation multicritère est reformulée en un problème monocritère : la minimisation du nombre de fois qu'un individu subit une domination par les autres individus de la population. Après convergence, l'algorithme modifié fournit l'ensemble des solutions non dominées. Cet ensemble est appelé Zone de Pareto (espace des variables) Les performances associées à ces solutions forment le

Front de Pareto (espace des critères). C'est dans cet ensemble qu'il faut choisir la solution à mettre en œuvre.

### II.6.2.6. Réglages de l'algorithme et temps de calculs

Les conditions de mise en œuvre et d'utilisation de l'algorithme génético-évolonnaire sont réunies dans les tableaux suivants.

Tableau II.3. Réglages de l'algorithme génético-évolonnaire.

Taille de la population	1000
Taux d'élimination dans la sélection élitiste	1/3
Proportion d'homozygotes dans la population (%)	50
Proportion de mutant (%)	5
Elargissement du domaine des naissances ( $\square$ )	0,2

Tableau II.4. Temps de calculs moyens pour l'optimisation ; configuration informatique : Matlab, version 6.5 (R13) ; PC double Xeon bi-cœur, 1,6 GHz, 3 Go de RAM.

par l'algorithme génético-évolonnaire	
Planification multicritère	25 000 s
Optimisation monocritère des performances de la fermentation	5 s
Optimisation multicritère des performances de la fermentation	150 s

## II.7. Synthèses enzymatiques

### II.7.1. L'enzyme

Les synthèses sont catalysées par le Novozym<sup>®</sup> 435 commercialisé par Novo industries. Il s'agit d'une préparation immobilisée de la lipase B thermostable produite par *Candida antarctica*. La lipase est immobilisée après purification, par l'adsorption sur une résine acrylique qui se présente sous la forme de granules blancs cassés, démontrant une distribution normale de taille variant de 0,3 à 0,9 mm de diamètre.

### II.7.2. La bixine

La bixine est un caroténoïde qui se trouve dans l'enveloppe externe des graines de rocou (*Bixa orellana*) ; elle représente 80 % de la bixine trouvée dans la graine. L'échantillon

standard utilisé dans cette étude, pour les réactions d'acylation, est une poudre commerciale achetée au Brésil. La poudre possède une coloration jaune foncée, est issue de l'écrasement des graines de rocou. Une extraction totale des caroténoïdes a été réalisée pour la quantification de la bixine/norbixine présentes dans la poudre. Les caroténoïdes ont été extraits par lavage de 1 g de poudre avec 60 mL d'éthanol. La solution finale est mise dans un ballon, préalablement pesé, pour subir une évaporation de l'éthanol dans un évaporateur rotatif. Après pesée du ballon, il s'est avéré que la poudre contient 9 % de caroténoïdes. Ce mélange a été analysé par CLHP-SM.

### II.7.3. Réacteur

La synthèse est effectuée dans un réacteur Wheaton<sup>®</sup> de 50 mL (figure II.9 (b)) qui est placé dans un bain d'huile pour l'obtention d'une meilleure régulation de la température. Le tout est chauffé à l'aide d'une plaque chauffante thermostatée (figure II.9 (a)). Le réacteur est enveloppé avec du papier aluminium pour l'obtention d'une obscurité totale afin d'éviter les dégradations potentielles liées à la présence de la lumière pendant les synthèses.

Les paramètres opératoires comme le volume réactionnel, la température et l'agitation sont fixés à 10 mL, 50 °C et 700 tr/mn, respectivement. Les rapports molaires ont été modifiés au cours de l'étude.

Un échantillon de 0,1 mL est prélevé quotidiennement, placé dans un ependorff de 1,5 mL et conservé à 4 °C. L'ensemble des échantillons est alors analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) et/ou par CLHP.

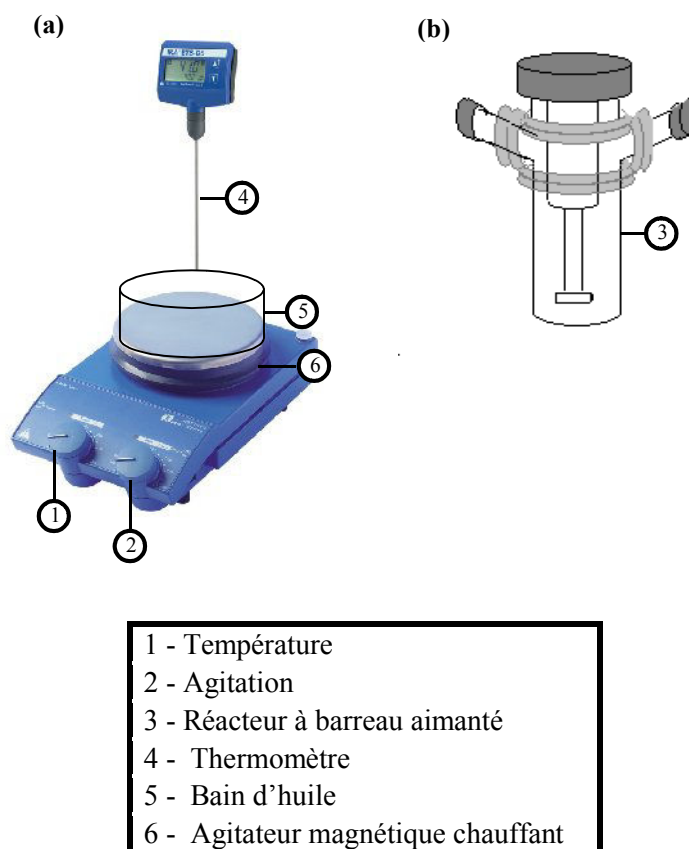


Figure II.9. Schéma du réacteur wheaton<sup>®</sup> et de son environnement.

#### II.7.4. Techniques analytiques

Dans la littérature, il existe plusieurs techniques analytiques pour la quantification et l'identification des caroténoïdes et des peptides. La plupart utilise principalement la CCM et la CLHP.

##### II.7.4.1. Analyse qualitative sur couche mince

Pour l'essentiel, les analyses qualitatives sont réalisées par CCM. Cette méthode s'est révélée suffisamment efficace, pour une première observation du produit résultant de l'acylation de la L-lysine avec la bixine. La phase mobile utilisée est le mélange butanol/acide acétique/eau (60/20/20 – v/v/v) et la chromatographie est réalisée sur des plaques d'aluminium recouvertes d'une phase stationnaire constituée de Silica Gel 60. La durée de migration est d'environ 1 h (pour une plaque de 10 cm de hauteur). Après séchage à température ambiante (10 mn), la bixine est directement détectée par sa coloration orange et la lysine et les dérivés de la bixine sont révélés par vaporisation d'une solution de ninhydrine sur

la plaque. Par cette méthode, les fonctions amines primaires apparaissent sous la forme de taches roses après passage à l'étuve (105 °C, pendant 10 mn).

Les échantillons de 5 µL sont déposés sur la ligne de dépôt, à l'aide d'une pipette automatique. Les dépôts sont effectués espacés de 12 mm les uns des autres, à 15 mm des bords et à 20 mm de haut. Après évaporation du solvant des échantillons, la plaque est placée dans la cuve préalablement saturée en solvant d'élution.

Après migration, les composés apolaires (bixine) se situent au niveau du front du solvant. La lysine, composé polaire, reste pratiquement sur la ligne de dépôt. L'ester présentera un rapport frontal (Rf) proche de 0,4. Le rapport frontal (Rf) est déterminé par la relation :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par la molécule}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

#### **II.7.4.2. Analyse par chromatographie liquide haute performance**

Le dosage de la bixine et du produit résultant de l'acylation de la norbixine est réalisé par CLHP, en respectant les conditions opératoires suivantes :

- colonne : Symmetry C18, (150 mm \* 4,6 mm, 3,5 µm) ;
- éluant : profil d'élution (figure II.9) utilisant du méthanol + 0,1 % de TFA et de l'eau + 0,1 % TFA ;
- volume d'injection : 10 µL ;
- débit d'élution : 1 mL/mn ;
- détecteur : barrette de diodes.

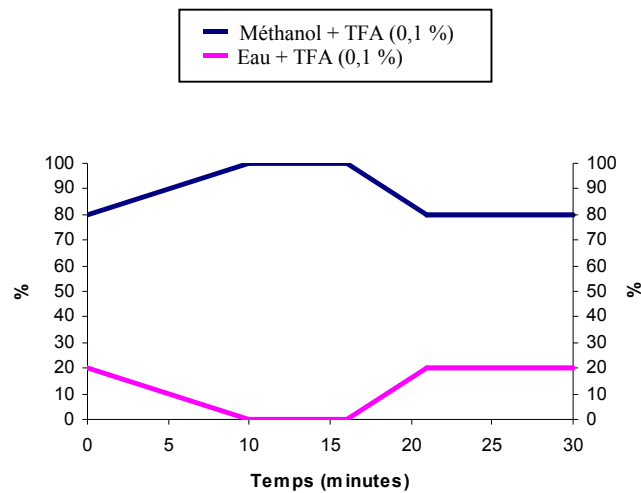


Figure II.10. Profil d'élution utilisé pour le dosage de la bixine et du produit résultant de l'acylation de la bixine.

#### II.7.4.3. Spectrométrie de masse

Cette méthode a été utilisée pour l'identification du produit résultant de l'acylation de la bixine avec la lysine. L'analyse des échantillons a été réalisée en mode couplage CLHP-SM. Les conditions opératoires de la spectrométrie de masse utilisée pour l'analyse de la torularhodine (II.4.5) ont été utilisées pour l'identification et analyse de la bixine, norbixine et des produits de synthèse.

#### II.7.4.4. Séparation des produits réactionnels et de synthèse sur colonne

La séparation du produit de synthèse est effectuée à basse pression, sur une colonne (3x30 cm) de silice (25 cm) en utilisant un éluant constitué par un mélange butanol/acide acétique/eau (60/20/20 – v/v/v). Après la concentration d'un échantillon de fin d'expérience, 1 mL est injecté sur gel de silice et un collecteur de fraction a été utilisé pour la récupération des fractions de 3 mL. Le schéma complet du système utilisé est montré dans la figure II.11.



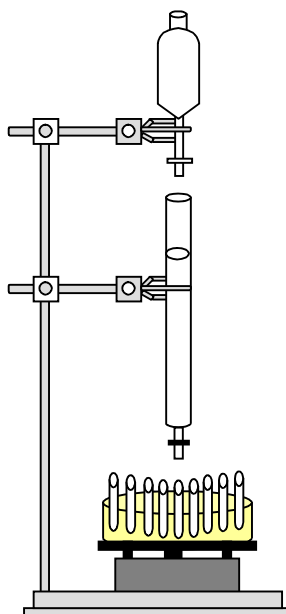


Figure II.11. Schéma du système utilisé pour la collecte des fractions purifiées.

70 fractions de 3 mL sont récupérées et analysées par CCM. Les fractions contenant le produit résultant de la synthèse sont mélangées pour la récupération quasi totale du produit de synthèse. Puis, le solvant est évaporé et le produit est récupéré avant d'être stocké.



## Chapitre III

### Résultats et discussions

---



### **CHAPITRE III – RESULTATS ET DISCUSSION**

Ce travail, qui a pour objectif principal la détermination des conditions optimales de mise en culture d'une levure *Sporobolomyces ruberrimus* pour la production de torularhodine par un procédé discontinu, intègre également une partie dédiée à un essai de fonctionnalisation de ce caroténoïde, connu pour ses propriétés très antioxydantes mais présentant une stabilité incertaine.

Les résultats seront divisés en trois parties. La première présentera quelques essais préliminaires qui sont effectués en fioles d'Erlenmeyer, boîtes de Pétri et en bioréacteur de 3 L. Pour ces essais, le glycérol pur et différents acides gras, seront utilisés. Ces premières expériences ont pour objectif d'identifier et d'étudier l'influence de différentes conditions expérimentales pour un bon déroulement des fermentations, tout comme de mettre au point certaines techniques analytiques pour le dosage des acides gras dans le milieu de culture ainsi que les techniques pour l'extraction, la séparation et l'identification des caroténoïdes.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude de la culture de la levure en bioréacteur afin d'en optimiser les conditions de mise en œuvre. Des séries de cultures en bioréacteur discontinu seront réalisées dans le but de valider les résultats préliminaires obtenus précédemment. Dans un premier temps, des acides gras de différentes natures (oléique, linoléique, palmitique et stéarique) seront utilisés dans le but de connaître l'influence de la nature et de la concentration en acides gras, mais aussi du taux d'oxygénation du milieu de culture, sur la croissance et la production de torularhodine. Dans un deuxième temps, une série d'autres cultures sera effectuée dans des conditions similaires, en utilisant le glycérol technique comme source de carbone et d'énergie. Cette dernière série sera effectuée pour l'optimisation du procédé d'obtention de la torularhodine. Pour cette étude, un plan d'expérience multicritère sera développé.

Enfin, la dernière partie de cette étude sera consacrée à la fonctionnalisation de la torularhodine. Pour cela, un caroténoïde modèle, la bixine, sera utilisé pour la détermination des conditions opératoires (température, agitation et concentration des substrats) adéquates pour acyler la lysine par la bixine et la mise au point des techniques analytiques et de purification des produits de synthèse. Un essai de fonctionnalisation de la torularhodine par une réaction d'acylation de la lysine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* (Novozym<sup>®</sup> 435) sera alors envisagé.

La figure III.1, présente un schéma qui résume l'ensemble de la démarche développée lors de cette étude.

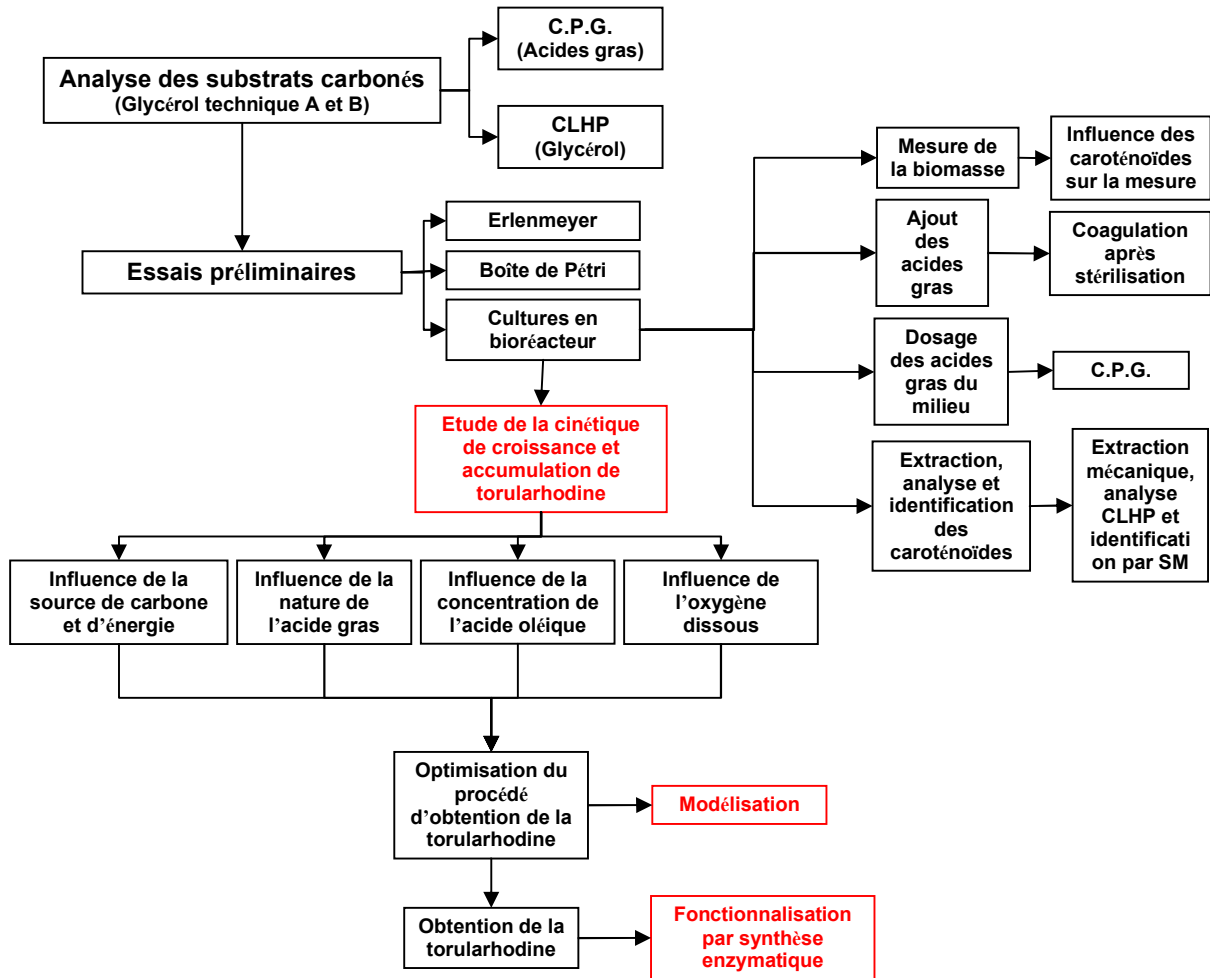


Figure III.1. Schéma général de l'ensemble de la démarche suivie pour cette étude.

### III.1. Analyses des acides gras présents dans le glycérol technique

Cette étude a comme objectif l'utilisation d'un co-produit industriel (glycérol technique) issu de la production des biocarburants à partir d'huile de colza pour la production d'un produit de haute valeur (caroténoïde).

Si l'utilisation d'un co-produit industriel montre un intérêt applicatif, il peut être à l'origine, de par sa composition potentiellement inconstante, de variation de comportement métabolique chez le microorganisme. Ceci contraint à une vigilance et à une analyse répétée de l'ensemble des composants carbonés du substrat (glycérol mais aussi divers acides gras

résiduels issus de l'hydrolyse chimique des tri-acyl-glycérol de l'huile de colza). La complexité de la composition du glycérol technique peut interférer sur la cinétique de croissance et la nature des colorants synthétisés.

Dans cette étude, deux lots de glycérol technique différents (nommés lot A et lot B) seront utilisés. Ainsi, dans un premier temps, l'analyse de la composition de glycérol et des acides gras présents dans les deux lots de glycérol technique a été réalisée (fig. III.2) par chromatographie en phase gazeuse.

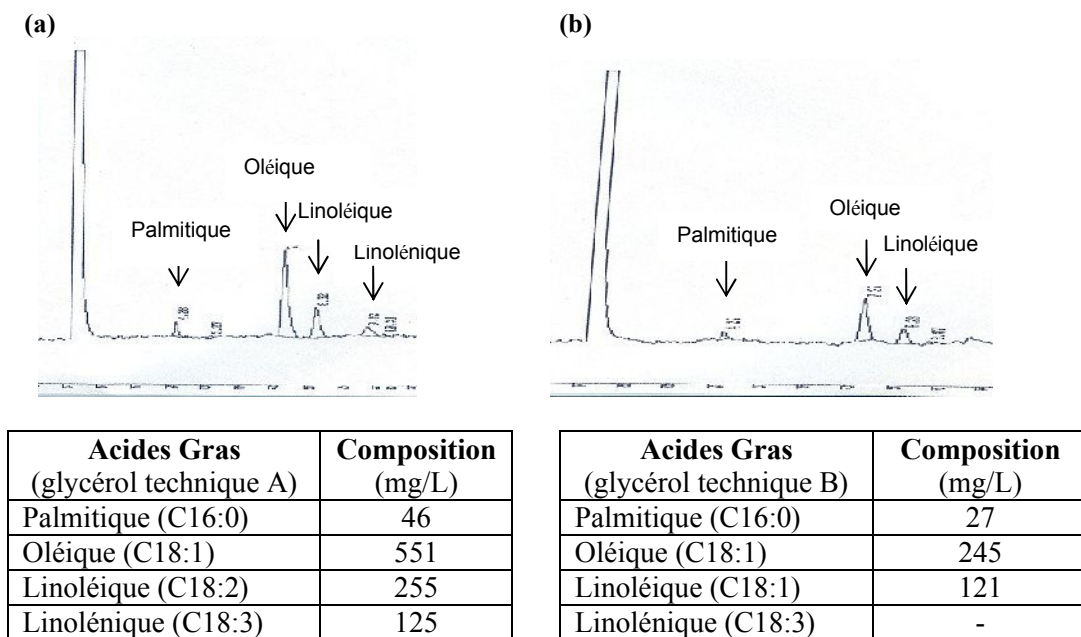


Figure III.2. Analyse des acides gras présents dans le glycérol technique A (a) et B (b) par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Comme observé dans la figure III.2, la concentration des acides gras dans le glycérol technique A est deux fois plus élevée par rapport à celle présente dans le glycérol technique B. Une autre différence mise en évidence concerne la présence de l'acide linoléinique dans le glycérol technique A qui n'a pas été détecté dans le glycérol technique B. Cette différence entre les deux lots s'explique par l'amélioration des procédés d'obtention des biocarburants.

La quantification du glycérol présent dans les deux lots de glycérol technique a également été réalisée. Le taux de glycérol présent dans le glycérol technique A est de 67 g/L et dans le glycérol technique B de 65 g/L. Cette différence n'est pas considérée comme

significative, et aucune correction de la concentration initiale du glycérol n'a donc été effectuée.

Tout d'abord, nous avons réalisé un premier essai pour vérifier l'influence réelle des différentes concentrations en acide gras sur la croissance et la production de caroténoïdes. Pour cela, nous avons préparé des boîtes de Pétri en utilisant le glycérol pur et les deux lots de glycérol technique, comme source de carbone. Les résultats qualitatifs sont présentés dans la figure III.3.

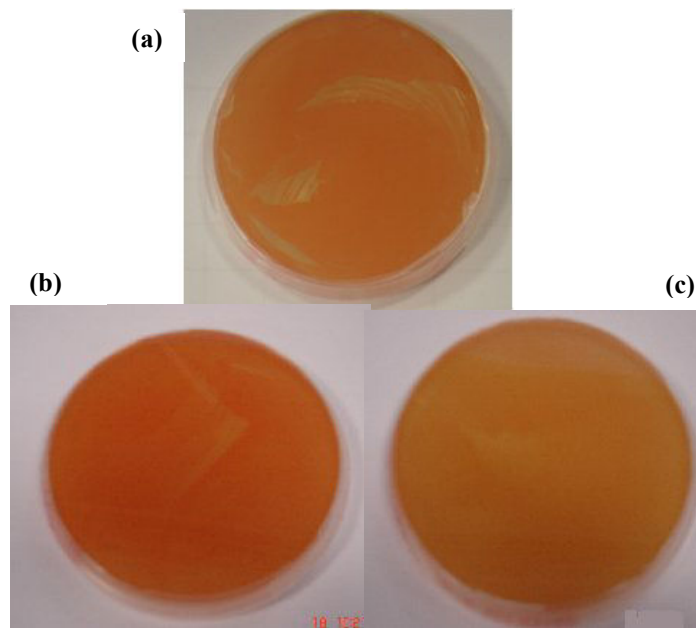


Figure III.3. Culture de *SP. ruberrimus* en boîtes de Pétri avec un milieu contenant du glycérol pur (a) glycérol technique A (b) et glycérol technique B (c).

L'appréciation visuelle de la coloration des surfaces des boîtes de Pétri fait ressortir que les cultures réalisées sur des milieux pauvres en acides gras (glycérol pur et glycérol technique B) sont d'un rouge orangé ; par contre, le milieu riche en acides gras (glycérol A) conduit à une couleur rouge vif. Cette première approche qualitative montre que les acides gras présents dans le glycérol technique ont une influence sur la production de caroténoïdes.

### III.1.1. Conclusion

Ces résultats indiquent qu'il est nécessaire de bien caractériser les co-produits industriels et qu'une variation de leur composition peut modifier le comportement métabolique des microorganismes. Dans le cas présent, il apparaît que les acides gras,



présents dans le glycérol technique à une concentration inférieure à 1g/L, jouent un rôle important dans la production de caroténoïdes

Comme le montre la figure III.3, les différentes concentrations d'acide gras ont changé la production de caroténoïdes chez *Sporobolomyces ruberrimus*.

## **III.2. Influence des acides gras sur la croissance de la levure en conditions non contrôlées**

Des essais préliminaires ont été réalisés en fioles d'Erlenmeyer et en boîtes de Pétri. Ces essais ont pour objectif d'étudier l'effet de l'ajout d'acides gras, présents dans les glycérol techniques, sur la cinétique de croissance et la production de la torularhodine par notre souche de *Sporobolomyces ruberrimus*.

### **III.2.1. Croissance en fioles d'Erlenmeyer**

Au cours de cette première phase, les souches ont été cultivées en milieu liquide (YM). Les cultures sont destinées à évaluer l'influence de la nature et de la concentration d'acides gras dans le milieu de culture sur la cinétique de croissance. Pour cela, nous avons utilisé des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL avec 50 mL de milieu de culture contenant du glycérol pur (99,8 %), comme source de carbone et d'énergie et différents acides gras à diverses concentrations. Le choix initial de l'utilisation du glycérol pur a été fait à partir des travaux montrant la capacité de la souche à utiliser cette source de carbone (Razavi et Marc, 2006) et aussi pour éviter les interférences liées à la présence d'acides gras dans le glycérol technique.

Le choix de la nature des acides gras a été fait à partir des analyses précédentes qui ont montré la présence de certains d'entre eux dans le glycérol technique. Les acides gras choisis sont présents sous la forme insaturée (oléique et linoléique) et sous la forme saturée (stéarique et palmitique). L'acide stéarique n'est pas présent dans la composition des acides gras du glycérol technique, mais cet acide gras a été utilisé dans l'étude car il est très abondant dans les végétaux et la graisse animale.

Deux concentrations (1 g/L et 2 g/L) ont été utilisées pour les ajouts d'acides gras. La concentration de 1 g/L, correspond à la concentration totale approximative d'acide gras présents dans le glycérol technique A. Pour étudier l'influence de concentrations plus élevées, nous avons également choisi de doubler cette concentration. Ainsi, l'effet de ces deux concentrations sur la cinétique de croissance et la production de caroténoïdes est étudié.

Les ajouts suivants ont été réalisés :

- acide oléique (1 g/L (3,5 mM) et 2 g/L (7,0 mM)),
- acide linoléique (1 g/L (3,6 mM) et 2 g/L (7,2 mM)),
- mélange équipondéral des acides palmitique et stéarique (1 g/L (3,71 mM) et 2 g/L (7,42 mM), au total),
- mélange équipondéral des d'acides gras palmitique + stéarique + oléique + linoléique (1 g/L (3,65 mM) et 2 g/L (7,30 mM), au total).

Les fioles d'Erlenmeyer sont alors placées sur une table d'agitation avec une vitesse de rotation de 210 rpm/mn, dans une chambre chaude réglée à 24 °C. Le pH est initialement fixé à 7 et la quantité d'oxygène dissous n'est pas mesurée au cours de l'étude. Un échantillon de 1 mL est prélevé stérilement par jour, pendant 5 jours pour la mesure de biomasse et du pH.

Tableau III.1. Effet de l'ajout de différents acides gras à différentes concentrations, sur la concentration de *Sp. ruberrimus*, après 144 h de culture en température réglée (24 °C) et sous agitation constante. Oxygène dissous et pH non régulés.

Acide gras	Concentration (mM)	X (g/L)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
-	-	23,3	0,035
Palmitique + Stéarique	3,71	21,8	0,039
Oléique	3,50	24,1	0,042
Linoléique	3,60	20,3	0,034
Palmitique + Stéarique	7,42	21,1	0,030
Oléique	7,00	23,3	0,030
Linoléique	7,20	30,1	0,032
Palmitique + stéarique + Oléique + Linoléique	3,65	27,9	0,026
Palmitique + stéarique + Oléique + Linoléique	7,30	22,6	0,027

Comme observé dans le tableau III.1, l'ajout des acides gras a une influence sur la croissance de la levure. L'ajout de 3,5 mM d'acide oléique semble améliorer la croissance des cellules, cependant, cet effet d'ajouts des acides gras doit être validé par des cultures dans des conditions contrôlées. L'évolution du pH et de l'oxygène dissous au cours du temps doit être prise en compte pour conclure sur l'impact des acides gras sur la cinétique de croissance de *Sporobolomyces ruberrimus*.

### III.2.2. Production de caroténoïdes en boîtes de Pétri

Des boîtes de Pétri (milieu YM gélosé) ont été ensemencées puis incubées à 27 °C sur une durée de 20 jours afin d'évaluer, qualitativement, l'influence des acides gras sur la production des caroténoïdes. Cette technique permet de limiter en partie les grandes variations de pH notamment. La couleur observée lors de la culture de cette levure sur milieu gélosé est rouge-rose, caractéristique de la présence de pigments caroténoïdes (fig. III. 4).

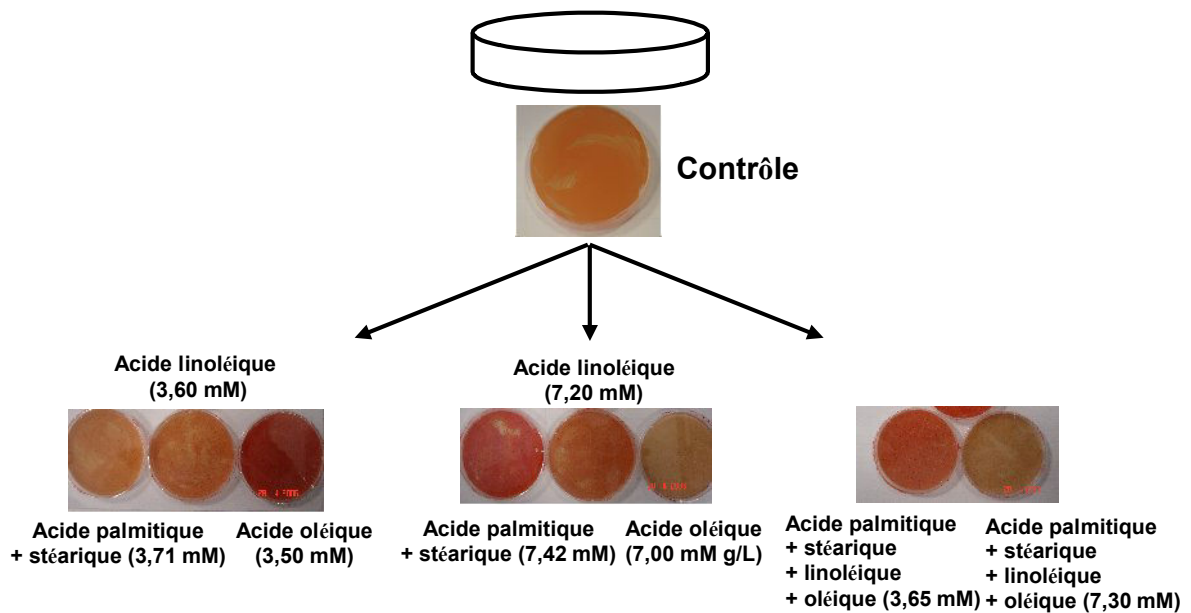


Figure III.4. Culture de *SP. ruberrimus* en boîtes de Pétri avec un milieu contenant du glycérol pur (contrôle) et additionné de différents acides gras à différentes concentrations.

Les inoculations dans les boîtes de Pétri, ont montré que la coloration des cellules en milieu relativement pauvre en acides gras (par exemple acide oléique à 3,5 mM) est plus rouge en comparaison de la coloration des cellules dans un milieu riche en acides gras (oléique 7,0 mM). D'après ces résultats, il semble que les acides gras en concentration élevée peuvent être inhibiteurs de la croissance ou de la production de caroténoïdes.

Une observation visuelle a été réalisée et a montré la présence d'une coloration plus intense pour les cellules cultivées avec l'ajout, d'une part, de 3,5 mM d'acide oléique et, d'autre part, de l'ajout du mélange des acides palmitique + stéarique à 7 mM. Ainsi, les cultures en fioles d'Erlenmeyer et en boîtes de Pétri ont montré que l'ajout des acides gras a une influence sur la croissance cellulaire et plus sûrement sur la production de la torularhodine, à cause de la couleur rouge vif. L'acide oléique semble être l'acide gras qui,

majoritairement, permet d'améliorer la croissance cellulaire et l'accumulation de la torularhodine. Pour valider ces résultats, la deuxième partie de cette étude est consacrée à la culture en bioréacteur de 3 L.

### III.2.3. Hypothèse de l'utilisation des acides gras par la levure

La littérature est assez pauvre en éléments explicatifs de l'influence des acides gras pour la production de pigments et sur la croissance cellulaire des levures. Le rôle de l'acide oléique n'a pas encore été établi. Mouret (2006), a démontré que l'acide oléique peut avoir deux effets sur le métabolisme de la levure, un effet en tant que substrat (par la dégradation des acides gras en acétyl-CoA) et l'effet génétique (stimulation de la transcription de certains gènes).

L'hypothèse émise au cours de cette étude serait que l'effet positif potentiel des acides gras sur la croissance et la production de pigments pourrait être induit, pour la souche utilisée, par la transformation des acides gras ( $\beta$ -oxydation) en acétyl-CoA (fig. I.12). L'acétyl-CoA formé serait alors utilisé pour la synthèse des caroténoïdes (fig. I.13).

### III.2.4. Conclusion

D'après les résultats obtenus, nous avons observé que la nature et la concentration des acides gras ont une influence sur la cinétique de croissance et plus certainement sur la production de caroténoïdes.

L'absence de régulation du pH et de l'oxygène dissous dans les essais en fioles d'Erlenmeyer ne permet pas de conclure sur l'influence réelle des acides gras par rapport aux résultats observés. Cependant, au regard des résultats présentés dans le tableau III.1, il apparaît qu'un ajout de 3,5 mM d'acide oléique améliore assez la croissance des cellules.

Les essais en boîte de Pétri (fig. III.4) ont montré une même tendance des résultats obtenus précédemment. Par une analyse qualitative de la couleur des cultures, nous avons observé un effet favorable, dû à l'acide oléique (3,5 mM), sur la production de caroténoïdes alors qu'une concentration supérieure (7 mM) limitait la croissance ou la production de torularhodine.

### III.3. Réglages pour la mise en œuvre et le suivi des cultures en bioréacteur

Pour une mise en œuvre des cultures en bioréacteur, il est nécessaire de mettre au point les techniques analytiques adaptées et performantes pour identifier les molécules produites par la levure (caroténoïdes par CLHP-SM, spectrophotométrie) et les substrats (hydrate de carbone, acides gras).

#### III.3.1. Influence de la nature et de la concentration des caroténoïdes sur la mesure de la biomasse

La réalisation de la mesure de la biomasse, a été effectuée par une méthode spectrophotométrique. La concentration cellulaire est estimée par la lecture de l'absorbance (densité optique) à 600 nm. Une dilution est nécessaire lorsque la densité optique dépasse la valeur de 0,55 (valeur d'absorbance obtenue à 600 nm). Les dilutions s'effectuent dans de l'eau physiologique (NaCl à 9 ‰) pour éviter tout phénomène d'éclatement des cellules par différence de pression osmotique.

Pour voir si la nature et la concentration du pigment influencent la lecture de la biomasse par spectrophotométrie, nous avons suivi la démarche suivante. Une même quantité de matière cellulaire a été récupérée, avec différentes concentrations de pigment et a été diluée dans la même quantité d'eau. Ensuite, à partir de cet échantillon, une mesure spectrophotométrique a été effectuée pour déterminer les concentrations en biomasse. Une même concentration en cellules aurait dû être obtenue, cependant il n'a pas été possible de baser la détermination de la concentration cellulaire à partir d'une mesure d'absorbance à 600 nm (fig. III.5).

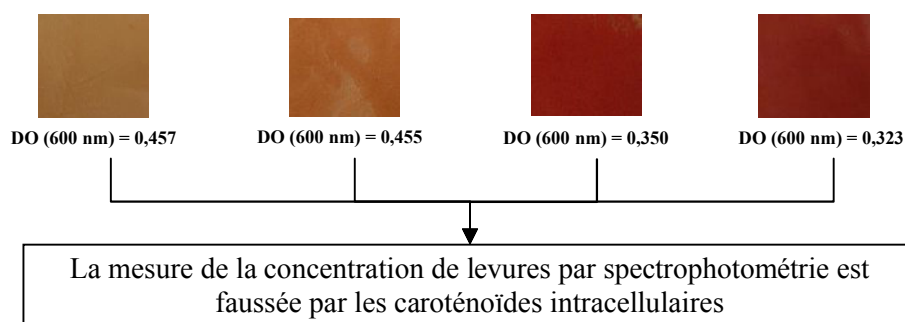


Figure III.5. Mesure de la densité optique, par spectrophotométrie à 600 nm, pour une même concentration en biomasse obtenue selon différentes conditions opératoires.

Pour résoudre ce problème, nous avons suivi la croissance cellulaire pendant la culture en bioréacteur, et toutes les 24 h, une courbe d'étalonnage a été réalisée. Le résultat des étalonnages obtenus au cours de la fermentation sont indiqués dans la figure III.6 (a), (b), (c) et (d). Apparemment deux phases distinctes de croissance peuvent être distinguées :

- une première « peu colorée », entre 0 et 48 h, avec un coefficient  $k_1 = 1,2 \pm 0,005$  ;
- et une deuxième, « intensément colorée », entre 48 h et 96 h, avec  $k_2 = 1,8 \pm 0,004$ .

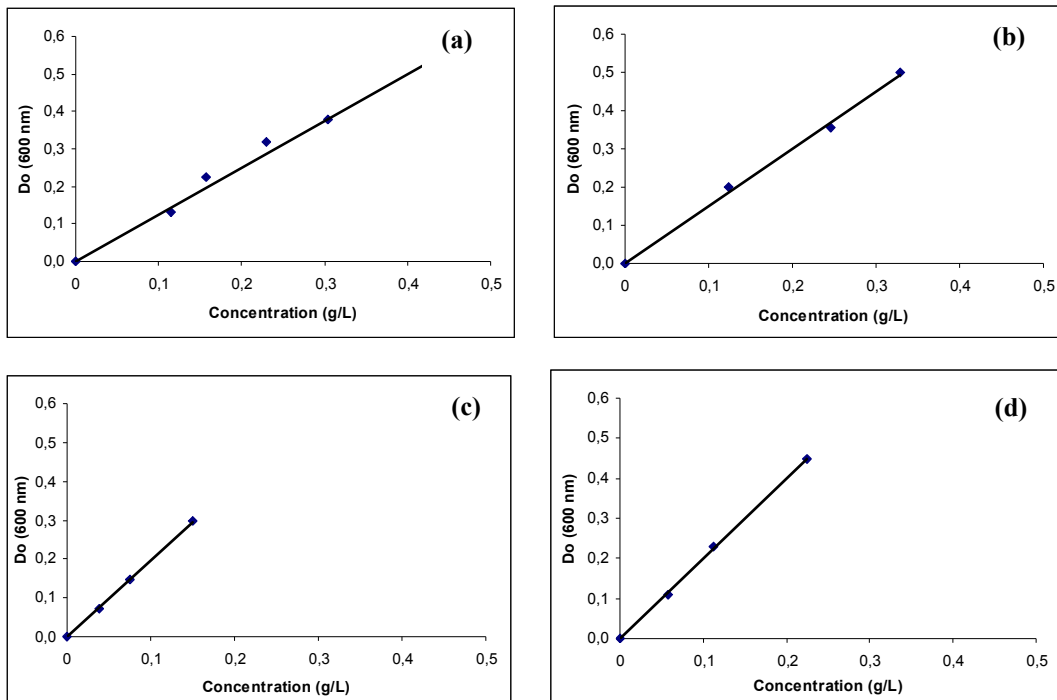


Figure III.6. Corrélation mesurée, entre l'absorbance à 600 nm d'un échantillon de fermentation et la masse sèche des cellules de *SP. ruberrimus* (a) 24 h ; (b) 48 h ; (c) 72 h ; (d) 96 h.

Après avoir identifié deux phases distinctes, une peu colorée (avant 48 h) et une autre très colorée (après 48 h), et déterminé les coefficients de corrélation unité DO/X (g de matière sèche) pour chaque phase (respectivement : 1,2 unité DO/gX et 1,9 unité DO/gX), nous avons utilisé ces coefficients pour le suivi cinétique de croissance. Toutes les courbes de croissance ont été déterminées en tenant compte des deux phases distinctes de croissance.

### III.3.2. Coagulation des acides gras pendant la stérilisation

L'ajout stérile des acides gras dans le milieu de culture, représente également une difficulté, rencontrée pendant la mise en œuvre des cultures en bioréacteur de 3 L.

Dans un premier temps, nous avons ajouté le(s) acide(s) gras dans le milieu de culture avant la stérilisation du milieu. Cependant, nous avons observé, après la stérilisation, que les acides gras saturés (acides palmitique + stéarique) à 3,1 mM, sont restés en partie collés sur la paroi du réacteur et sur les sondes de pH et d'oxygène dissous (fig. III.7), ceci étant dû à un phénomène de coagulation des acides gras saturés après stérilisation, provenant de la très faible solubilité de ces molécules en milieu aqueux.

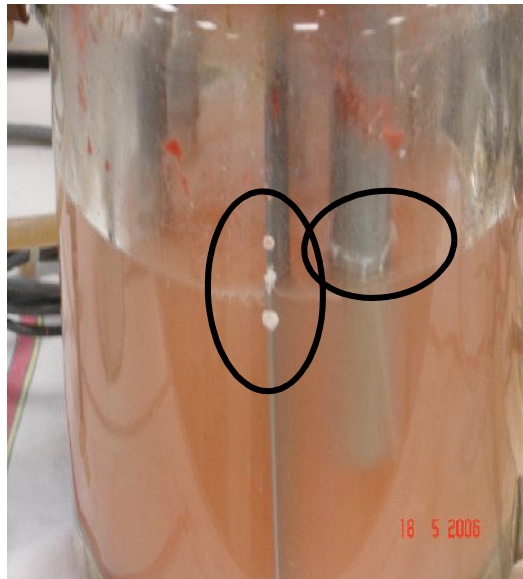


Figure III.7. Insolubilité des acides gras saturés, palmitique et stéarique, créant leur accumulation dans certaines parties du bioréacteur.

Pour résoudre ce problème, il a été envisagé de dissoudre les acides gras saturés dans 10 mL d'éthanol avant de les injecter stérilement, à l'aide d'une seringue et d'une membrane-filtre de 0,22  $\mu\text{m}$ , dans le milieu de culture du bioréacteur. Toutefois, il a fallu vérifier l'impact que pouvait avoir l'éthanol ajouté sur la croissance des levures. Des essais en fioles d'Erlenmeyer ont alors été réalisés : le premier avec de l'acide oléique (insaturé) et ajout d'éthanol (1 mL dans 100 mL de solution) et le deuxième avec le même acide gras insaturé sans éthanol.

Les résultats obtenus au cours des essais en fioles d'Erlenmeyer, ont montré que l'éthanol, qui permet de solubiliser les acides gras saturés, n'a pas d'incidence négative ni positive sur la croissance cellulaire. Ainsi, des ajouts d'acides gras dissous dans 10 mL d'éthanol ont pu être réalisés. Les ajouts ont été réalisés à l'aide d'une seringue et d'une membrane-filtre de 0,22  $\mu\text{m}$  dans la solution de glycérol technique préalablement stérilisé.

Tous les acides gras ont été ajoutés dissous dans l'éthanol, pour que l'étude soit réalisée dans les mêmes conditions opératoires.

### III.3.3. Dosage des acides gras du milieu de culture

Nous avons essayé de mettre au point une méthode analytique pour le suivi de la consommation des acides gras résiduels dans le milieu de culture. Cette méthode permettrait de déterminer la nature des acides gras préférentiellement utilisés par la levure, afin de pouvoir l'ajouter ultérieurement dans le milieu de culture et optimiser la croissance cellulaire et la production des caroténoïdes.

La méthode décrite au § II.4.7 et utilisée pour le dosage des acides gras présents dans le glycérol technique a été expérimentée mais n'a pas conduit à des résultats exploitables. Ceci est très certainement dû à une forte dilution des acides gras dans le milieu de culture ; plusieurs méthodes ont été appliquées pour concentrer les échantillons.

Pour ces essais, nous avons utilisé des échantillons standard avec des concentrations connues. Un mélange d'acides oléique, stéarique, palmitique et linoléique avec une concentration équipondérale comprise entre 2 et 4 g/L, a été dilué dans le milieu de culture. Dans un premier temps, un traitement thermique, à 60 °C, dans un bain marie a été appliqué pour concentrer l'échantillon standard avant l'estérification méthylique. Cependant, les acides gras ne sont plus détectés par analyse en chromatographie en phase gazeuse ; cela est probablement dû à une dénaturation sous l'effet de la chaleur.

Une évaporation sous vide à température modérée a également été réalisée en vue de la concentration des échantillons, toujours avant l'estérification méthylique des acides gras. Cette concentration s'effectue à une température de 45 °C. Après analyse par CPG, seul l'acide stéarique a été détecté, les autres acides gras du mélange ne pouvant être identifiés. Cette méthode bien qu'indiquant la présence d'un des acides gras, ne répond pas, non plus, aux attentes, un effet thermique pouvant être responsable, là encore, d'une dénaturation.

Une dernière méthode de concentration utilisée, a été la lyophilisation pendant 48 h. Les résultats observés après analyse par chromatographie en phase gazeuse, ont permis d'identifier tous les acides gras qui composent le mélange. Afin de valider cette méthode, nous avons utilisé le même mélange d'acide gras à différentes concentrations. Dans ce cas, il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre les signaux de la CPG et les concentrations connues des acides gras. Ceci peut être dû à une extraction incomplète des acides gras présents dans l'échantillon. Pour cette raison, un essai d'amélioration de l'extraction des



acides gras à l'hexane ou à l'éther de pétrole a été réalisé, sans réussir à établir des courbes de calibration adéquates.

L'expérimentation infructueuse de différentes techniques de concentration-détection des acides gras du milieu de culture, en vue du suivi de l'évolution des acides gras dans les milieux de culture ne permettra malheureusement pas de répondre à certaines interrogations lors des études cinétiques suivantes.

### III.3.4. Extraction, analyse et identification des caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes a été effectuée avec un homogénéisateur, type presse de French, comme décrit au § II.4.5. Au cours des analyses des caroténoïdes, nous nous sommes aperçus que dans le mélange de caroténoïdes après l'extraction, les débris cellulaires n'étaient pas totalement éliminés durant l'étape de centrifugation. Nous avons mesuré les protéines cellulaires en mélange avec les caroténoïdes. Comme l'élimination de ces protéines sans la dénaturation des caroténoïdes, n'est pas facile, nous avons quantifié la concentration en protéines des échantillons par la méthode de Bradford (§ II.4.5.1), pour les soustraire de la concentration finale des caroténoïdes totaux. Nous avons retrouvé une moyenne de 40 % de protéines dans chaque échantillon, quelle que soit l'origine de l'échantillon.

Après extraction, les caroténoïdes ont été analysés par CLHP et identifiés par spectrométrie de masse. La méthode d'analyse des caroténoïdes, décrite au § II.4.5, s'avère très efficace pour la séparation du mélange des caroténoïdes (fig. III.8).

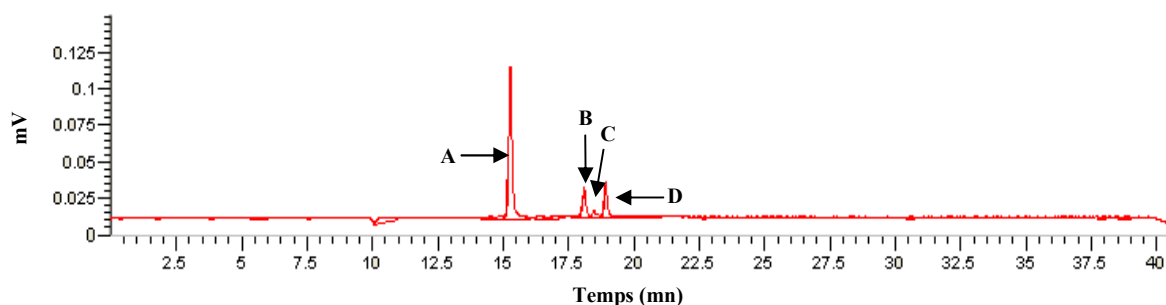


Figure III.8. Chromatogramme ( $\lambda = 580$  nm) obtenu après séparation, par CLHP, du mélange des caroténoïdes produits par *Sporobolomyces ruberrimus* (A = torularhodine ; B = torulène ; C =  $\gamma$ -carotène ; D =  $\beta$ -carotène).

Le  $\beta$ -carotène (fig. III.8 (D)) a été identifié avec l'aide d'un échantillon standard et vérifié par spectrométrie de masse ( $M = 536$ ). La torularhodine (fig. III.9 (A)),  $M = 564$ , et le

torulène (fig. III.9 (B)), M = 534, ont été identifiés par spectrométrie de masse parce qu'il n'existe pas d'échantillons commerciaux standard pour ces molécules.

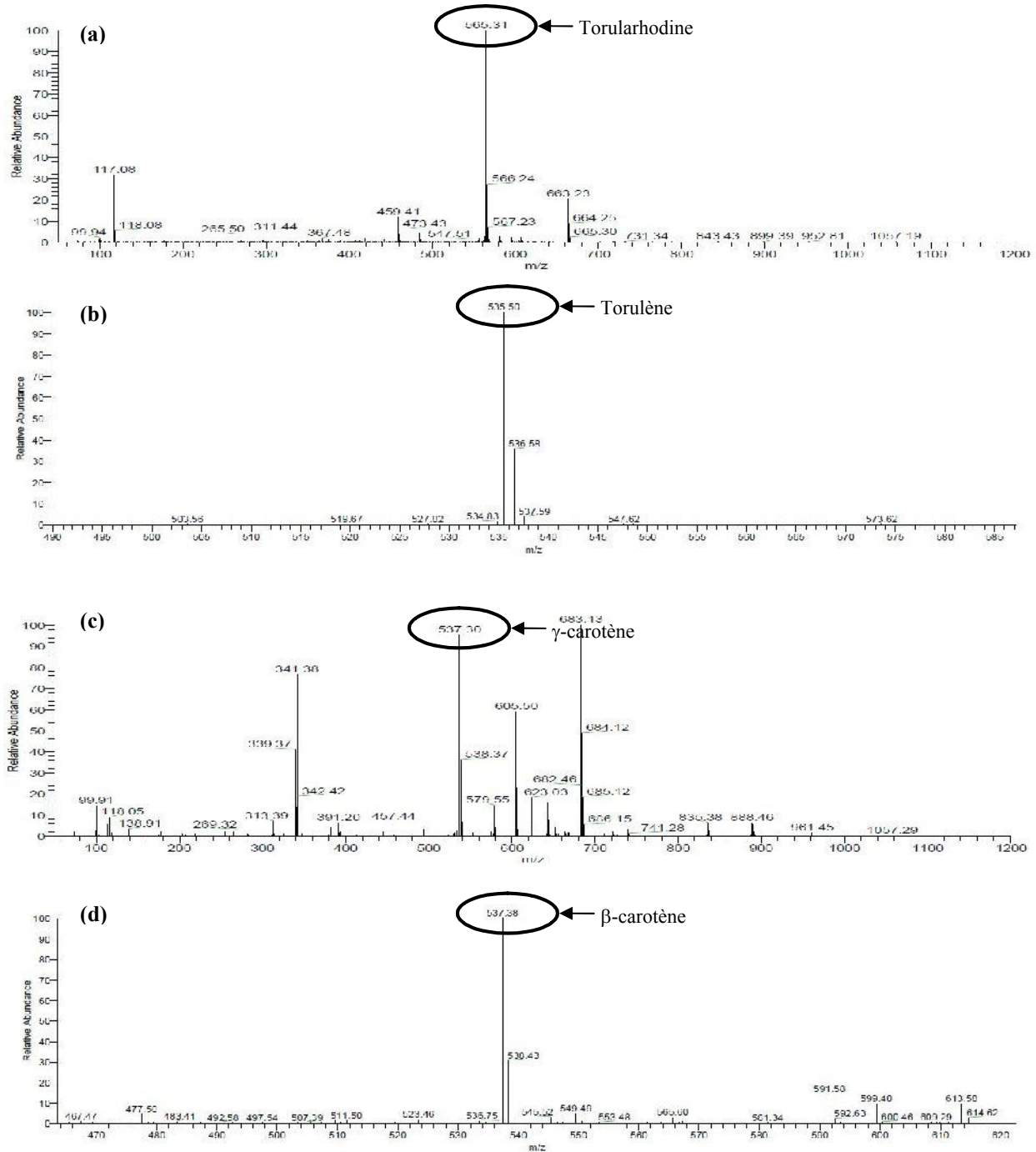


Figure III.9. Spectre de masse APCI-SM en mode positif des caroténoïdes produits par *Sporobolomyces ruberrimus*. Les pics A, B, C et D de la figure III.8 correspondent à (a), torularhodine; (b), torulène; (c),  $\gamma$ -carotène et (d),  $\beta$ -carotène, respectivement.

L'identification par spectrométrie de masse du  $\gamma$ -carotène (fig. III.9 (C)) a été un peu plus difficile puisque ce caroténoïde possède la même masse molaire que le  $\beta$ -carotène (536). Alors pour confirmer la nature de la molécule, nous avons observé le schéma de synthèse des caroténoïdes (fig. III.10).

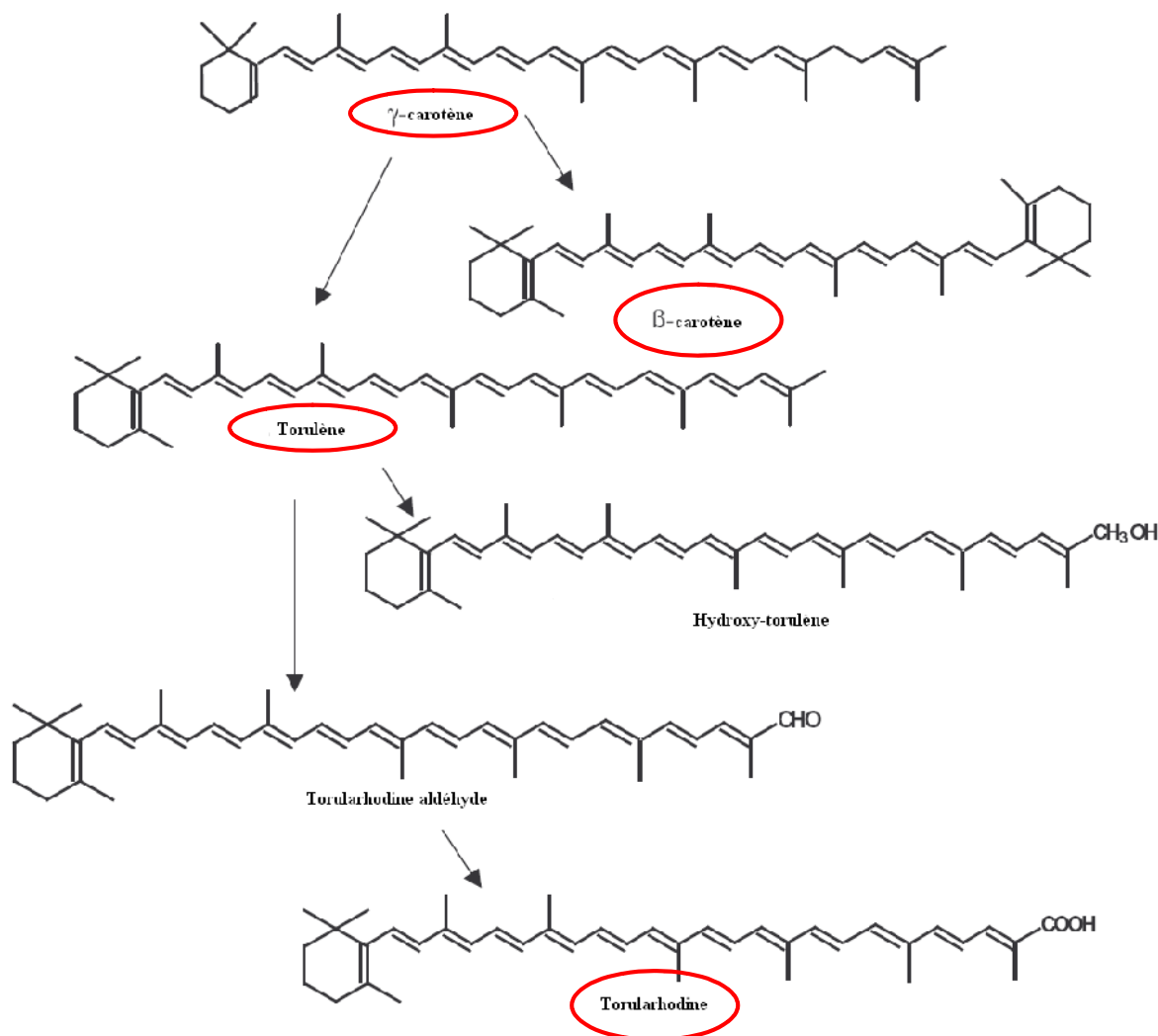


Figure III.10. Voie proposée pour la biosynthèse des caroténoïdes chez *Rhodotorula glutinis* (Simpson *et al.*, 1964).

Nous avons remarqué que dans la voie de synthèse de la torularhodine, les trois autres caroténoïdes présents sont le torulène, le  $\beta$ -carotène et le  $\gamma$ -carotène. Ainsi, il est probable que le  $\gamma$ -carotène soit le caroténoïde observé dans le pic C de la figure III.7. Davolil *et al.* (2004) avaient eux-mêmes observé l'accumulation de ce caroténoïde chez *Sporobolomyces roseus* et *Rhodotorula glutinis*.

Le tableau III.2, présente un résumé des caractéristiques de chaque caroténoïde identifié par la barrette de diodes UV-visible et l'APCI-SM, au cours de cette étude.

Tableau III.2. Temps de rétention en CLHP-phase inverse associés aux caractéristiques d'absorption maximale dans le visible et aux masses correspondantes déterminées par APCI-SM des caroténoïdes produits par *SP. ruberrimus*.

Caroténoïdes	t <sub>R</sub> (mn)	λ <sub>max</sub> (nm)	APCI-SM (m/z)
Torularhodine (A)	15,4	470, 500, 524	565,3 [M+H] <sup>+</sup>
Torulène (B)	18,2	460, 485, 518	535,5 [M+H] <sup>+</sup>
γ-Carotène (C)	18,6	430, 460, 489	537,4 [M+H] <sup>+</sup>
β-Carotène (D)	19,1	425, 452, 480	537,4 [M+H] <sup>+</sup>

#### III.3.4.1. Étude de la stabilité des caroténoïdes au cours du temps

L'un des grands problèmes de stockage des caroténoïdes est leur sensibilité à divers facteurs physico-chimiques et leur réactivité qui peut être très intense. Ceci peut apparaître comme un handicap lorsque l'on souhaite utiliser ces molécules pour leurs propriétés antioxydante/anti-radicalaire et pour leur capacité de coloration caractéristique, sur le long terme. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'étudier la dégradation, au cours du temps, des caroténoïdes présents dans les extraits de *Sporobolomyces ruberrimus*. La torhularhodine étant connue pour son haut pouvoir antioxydant, et par conséquent sa haute réactivité, il est indispensable de comparer la cinétique de dégradation de cette molécule particulière, en présence ou non d'agent antioxydant protecteur.

Des antioxydants de qualité alimentaire ont été choisis pour cette étude : ce sont le butylhydroxytoluène (BHT) et le tert-butylhydroquinone (TBHQ). Ces antioxydants chimiquement très stables, sont, selon les données de la littérature, bien adaptés aux objectifs de l'étude. Des concentrations massiques comprises entre 0,04 % et 0,2 % (m/m), ont été choisies pour la réalisation de cette étude.

Après l'extraction et la récupération des caroténoïdes, une solution mère a été obtenue à une concentration égale à 1,24 g de caroténoïdes/L et a été divisée en 7 fractions de 1 mL chacune, qui ont été placées dans des tubes à essais. Les antioxydants BHT et TBHQ ont été ajoutés aux échantillons de caroténoïdes en mélange, placés dans le solvant de stockage, l'acétone. Ainsi, sept tubes ont servi à caractériser la cinétique de dégradation des quatre caroténoïdes des extraits obtenus à partir de *Sp. ruberrimus* : un témoin sans apport d'antioxydant externe, trois tubes avec différentes concentrations de BHT et trois tubes dans

lesquels ont été introduites des quantités également différentes de TBHQ. Le ciel de ces tubes est rempli d'air.

Par contre, pour éviter l'incidence de la lumière et de la chaleur, les tubes à essais ont été couverts avec du papier aluminium et conservés à 4 °C. Chacun des tubes a servi au prélèvement de six échantillons pour analyse par CLHP ; une mesure initiale au temps  $t_0$  a été suivie de cinq mesures correspondant à différentes durées de stockage entre 1 et 45 jours. Nous avons mesuré la disparition des caroténoïdes au cours du temps, par analyse en CLHP. La méthode CLHP utilisée, ne permet pas de mettre en évidence les antioxydants de synthèse utilisés ni les produits d'oxydation mais elle permet la séparation et l'analyse des différents caroténoïdes (torularhodine, torulène,  $\beta$ -carotène et  $\gamma$ -carotène).

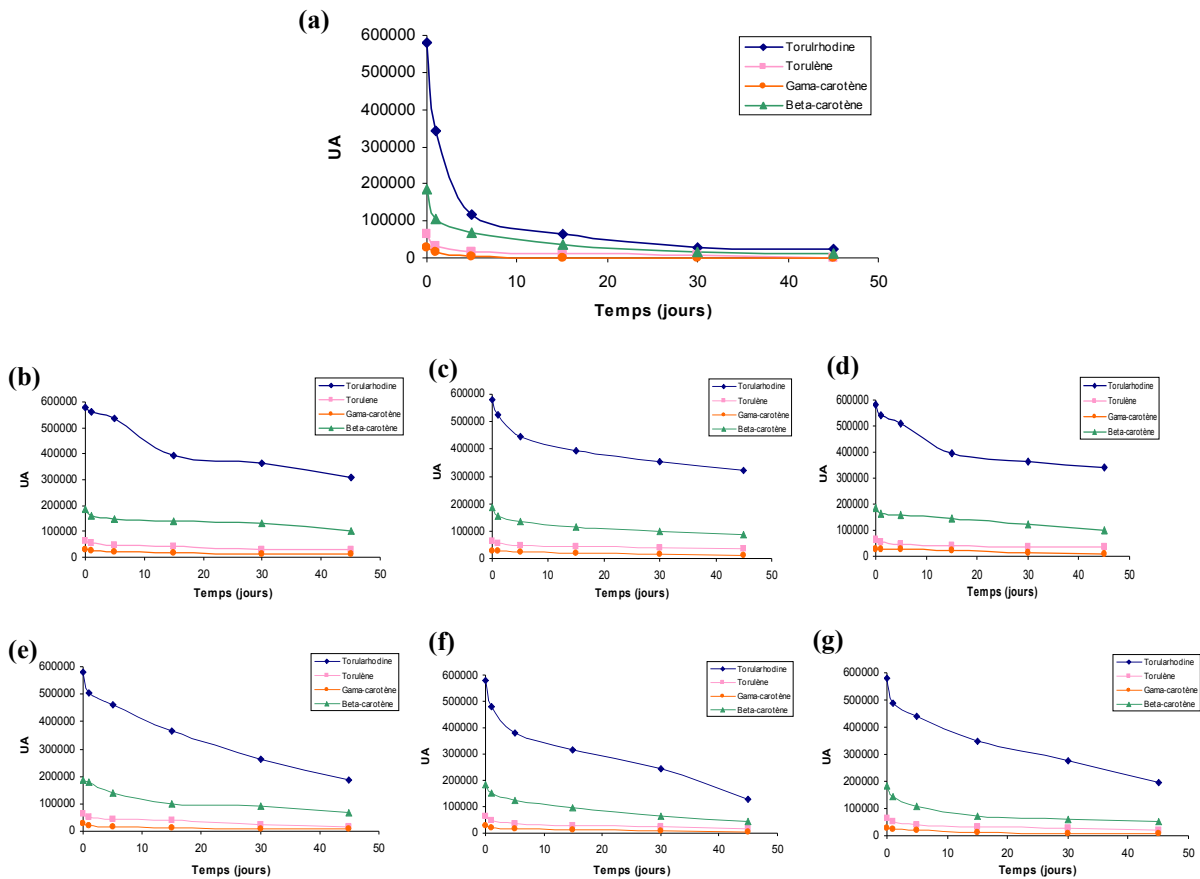
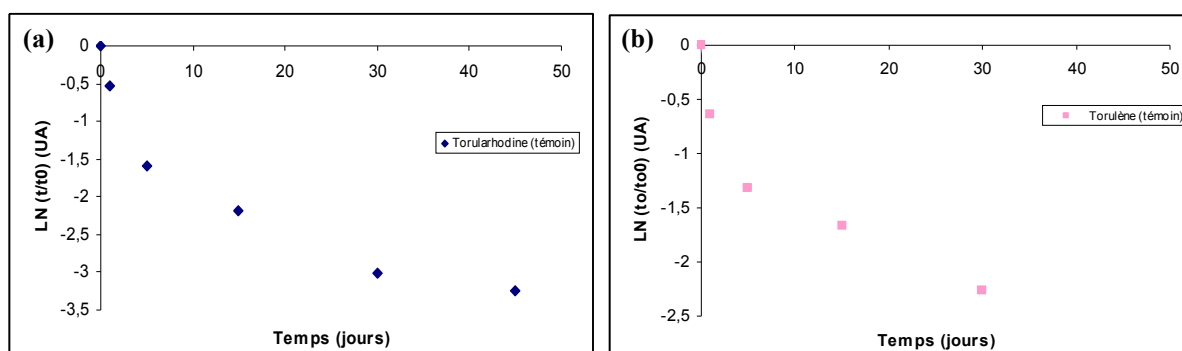


Figure III.11. Étude d'effet de l'ajout des antioxydants sur la dégradation des caroténoïdes. (a) échantillon témoin, (b) BHT à 0,04 %, (c) BHT à 0,1 %, (d) BHT à 0,2 %, (e) TBHQ à 0,04 %, (f) TBHQ à 0,1 % et (g) TBHQ à 0,2 %.

La figure III.11 (a), montre le résultat obtenu pour l'échantillon témoin conservé, au cours du temps, sans ajout d'antioxydant au mélange de caroténoïdes. La torularhodine étant le caroténoïde le plus présent, une diminution très intense de son pic chromatographique se traduit par une chute très importante de sa concentration au cours des 3 à 5 premiers jours. Il est à noter qu'après 24 h, la concentration de torularhodine est divisée par 2 et après 30 jours, elle est presque nulle. Les trois autres caroténoïdes présents dans le mélange, suivent la même tendance que celle observée pour la torularhodine, leur concentration est divisée par 2 après 24 heures. *A priori*, la disparition de la torularhodine semble largement plus importante que celle des trois autres caroténoïdes présents dans le mélange. En fait, si l'on représente l'évolution du logarithme népérien de la concentration des différents caroténoïdes rapportée à leur propre concentration initiale, définies en U.A., au cours du temps (fig. III.12), il ressort que l'on peut représenter l'évolution des données en obtenant des pentes négatives et de valeur élevée, équivalentes pour chacun des caroténoïdes, que ce soit dans une première phase entre 0 et 3 jours ou, nettement plus faibles, dans une seconde phase, à partir de 3 jours jusqu'à la fin du processus réactionnel expérimenté. Ceci est valable pour tous les caroténoïdes, excepté le  $\gamma$ -carotène pour lequel le manque de précision des mesures ne permet pas une analyse pertinente du comportement cinétique de cette molécule. Il n'apparaît donc aucune différence quantitative dans les cinétiques de dégradation des divers caroténoïdes. D'un point de vue cinétique, cette « disparition » de la torularhodine, équivalente à celle des autres caroténoïdes peut être interprétée comme une réponse similaire à l'oxydation par l'oxygène dissous. Une réponse sans équivoque sur l'interprétation de la dégradation de ces caroténoïdes face à leur pouvoir antioxydant pourrait être obtenue en identifiant les molécules formées au cours de la « disparition » et en mesurant leur pouvoir antioxydant à l'aide de différentes techniques.



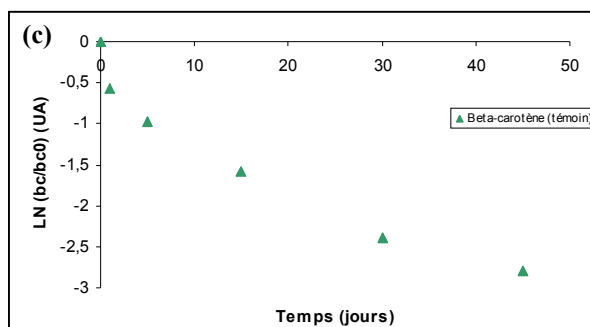


Figure III.12. Représentation semi-logarithmique, en fonction du temps, des courbes cinétiques de dégradation de la torularhodine (a), du toluène (b) et du  $\beta$ -carotène (c), obtenue à l'abri de la lumière, à 4 °C et en présence d'air.

L'effet de l'ajout des antioxydants de synthèse sur la dégradation des caroténoïdes, est montré dans la figure III.11 pour le BHT (b) à 0,04 %, (c) à 0,1 %, (d) à 0,2 %, et pour le TBHQ (e) à 0,04 %, (f) à 0,1 % et (g) à 0,2 %.

A l'ajout de chaque antioxydant de synthèse correspond un effet cinétique équivalent, quelle que soit la concentration ajoutée, le BHT se montrant plus efficace contre la dégradation des différents caroténoïdes que le TBHQ. Avec un ajout de BHT, la concentration de la torularhodine diminue seulement de moitié après 45 jours de conservation, alors qu'elle est proche de zéro dans l'échantillon témoin (sans ajout d'antioxydant de synthèse). En présence de TBHQ, après 45 jours, la concentration de torularhodine est diminuée par 2/3. Comme observé avec l'échantillon témoin, la concentration des autres caroténoïdes présents dans le mélange, est presque nulle après 45 jours. Les différentes concentrations des antioxydants de synthèse, n'ont pas amélioré l'effet protecteur des caroténoïdes, ainsi un ajout de 0,04 % ou de 0,2 % a un effet semblable sur la protection des caroténoïdes.

Une représentation semi-log de l'évolution des concentrations des différents caroténoïdes extraits de *SP. Ruberrimus* (non montrée) dans le cas d'une protection par le BHT ou le TBHQ à différents taux, conduit au même type de conclusion que celle obtenue à partir des résultats issus de la figure III.12. En fait, malgré une dispersion des points liée à une imprécision des mesures due à la méthodologie expérimentale, il apparaît bien deux phases cinétiques linéaires distinctes et ce, quel que soit le caroténoïde envisagé et quel que soit l'agent protecteur ajouté. Par exemple, dans le cas du BHT, sont observées :

- une première période entre 0 et 3 jours, avec une dégradation rapide mais 6 à 7 fois plus lente qu'en absence d'antioxydants de synthèse,
- et une seconde période, après 3 jours de stockage, avec une vitesse de dégradation lente, de cinq fois inférieure aux résultats obtenus lorsque les caroténoïdes ne sont pas protégés.

### III.3.5. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré que la dégradation des caroténoïdes au cours du temps, même à l'abri de la lumière et de la chaleur mais en présence de l'oxygène de l'air, était très importante. Cette dégradation s'effectue en deux phases distinctes : l'une très rapide pendant les trois premiers jours alors que celle qui suit est environ dix fois plus lente, et ce, quelles que soient les conditions de stockage des caroténoïdes. L'ajout d'un antioxydant de synthèse permet de limiter la dégradation des caroténoïdes au cours de leur stockage. Les deux antioxydants utilisés dans cette étude n'ont pas eu le même effet protecteur, le TBHQ étant moins efficace que le BHT.

L'étude préliminaire, proposée ici, n'a pas permis d'élucider l'apparente dichotomie entre les deux phases cinétiques de dégradation des caroténoïdes. Par contre, elle a mis en évidence, même s'il serait nécessaire d'approfondir par l'expérience les observations faites par des méthodologies plus adéquates (expériences sous ciel d'azote ou d'oxygène pur,...), une apparente unicité cinétique de dégradation des différents caroténoïdes présents dans les extraits obtenus.

En tout état de cause, l'instabilité de ces caroténoïdes présente une faiblesse qui peut ou doit être corrigée par une stabilisation de ces molécules, et notamment de la torularhodine par la fonctionnalisation de sa fonction carboxylique.

### III.3.6. Cultures comparées de *SP. ruberrimus* sur différentes sources de glycérol

#### III.3.6.1. Introduction

Après avoir identifié les principales difficultés pour la mise en œuvre des cultures en réacteur de 3 L, pour un suivi objectif des variables d'état et d'intérêt (biomasse, acides gras



et caroténoïdes), la dernière partie de cette section traitera de l'influence de différentes sources carbonées sur la cinétique de croissance et de production des caroténoïdes par *SP. ruberrimus*.

(a)



(b)

Température régulée (°C)	23
pH régulé	6
Oxygène dissous régulé (%)	50
Glycérol pur/technique (g/L)	33,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	20

Figure III.13. Bioréacteur de 3 L (a) et conditions opératoires (b) utilisées pour les cultures comparées sur différentes sources de glycérol.

Les résultats obtenus précédemment ont conduit à penser que l'ajout d'acides gras dans le milieu de culture a une influence non négligeable sur la cinétique de croissance et la production des caroténoïdes. Il s'agit désormais de mettre en œuvre les levures dans des conditions maîtrisées (température, pH et oxygène dissous) afin de vérifier si les observations faites jusqu'à présent étaient vérifiables et correctement quantifiables dans ce nouvel environnement. Pour cela, trois sources de carbone à base de glycérol ont été utilisées. Une culture témoin a été réalisée avec du glycérol pur et deux autres avec les glycérols techniques A et B contenant des concentrations différentes en acides gras (§ III.1).

Le volume initial de milieu dans le réacteur est fixé à 1,5 L, après inoculation, pour l'ensemble des fermentations réalisées. Les fermenteurs de 3 L (fig. III.13 (a)) sont stérilisés à l'autoclave avec tous leurs accessoires et le milieu de fermentation. Les paramètres de fermentation utilisés et contrôlés pendant toute la durée de chaque fermentation ont été fixés et sont présentés dans la figure III.13 (b). Ces paramètres seront utilisés tout au long de l'étude des cultures en bioréacteur de 3 L.

### III.3.6.2. Résultats cinétiques comparés de *SP. ruberrimus* sur trois sources de glycérol différentes : croissance et production de caroténoïdes

L'objectif principal de ces premières mises en œuvre de la levure en bioréacteur est de comparer les performances de croissance et de production de caroténoïdes afin de choisir un type de glycérol technique pouvant servir de source de carbone et d'énergie pour l'espèce *Sp. ruberrimus* pour la suite de l'étude, et en conservant à l'esprit l'aspect valorisation de ce type de substrat. Au cours de ces mises en œuvre, la température, le pH et le taux d'oxygène sont régulés respectivement à 23 °C, 6 et 50 %, valeurs qui avaient été jugées, par l'expérience, comme les meilleures au cours d'un travail précédent (Razavi, 2004). Seule l'aération avait été déterminée *a priori* pour éviter une limitation ou un excès potentiellement préjudiciable au métabolisme général et, par conséquent, au bon déroulement de la « fermentation ». C'est la raison pour laquelle ces facteurs opératoires ont été maintenus constants et ont servi de base de comparaison pour l'ensemble des fermentations réalisées dans cette première étape mais aussi pour l'ensemble des expériences destinées à déterminer si l'apport d'acides gras, de diverses natures, aux milieux de cultures permettait d'accroître les performances de croissance et de production de caroténoïdes et plus particulièrement de torularhodine. De même, la concentration en glycérol, a été fixée à 33,5 g/L, pour l'ensemble des fermentations, afin de pouvoir apprécier les effets cinétiques mais aussi limiter la durée des processus à une semaine.

La figure III.14 présente les résultats cinétiques concernant essentiellement la croissance et obtenus avec les trois sources de glycérol, un pur et deux techniques, le A et le B, ce dernier étant moins riche en acides gras associés. Globalement, on peut observer une grande similarité des courbes de croissance au cours des 40 à 50 premières heures puis un début d'effet létal apparaît dès la disparition du glycérol du milieu. Par contre, il est notoire que les cinétiques d'évolution de la concentration du glycérol suivent des trajectoires différentes à cause d'une consommation différée de ce substrat, probablement due à la présence d'acide gras. Ce phénomène est tout à fait bien illustré avec le glycérol technique A qui contient environ 1 g/L d'acide gras dont 55 % d'acide oléique. Dans ce cas, une très nette accélération de la cinétique suit le « ralentissement » initial, qui conduit à la disparition du glycérol, de type A, presque en même temps que le glycérol issu du glycérol technique B. Il est significatif que la cinétique la plus lente est observée avec le milieu contenant du glycérol pur, c'est-à-dire ne contenant pas d'acides gras.

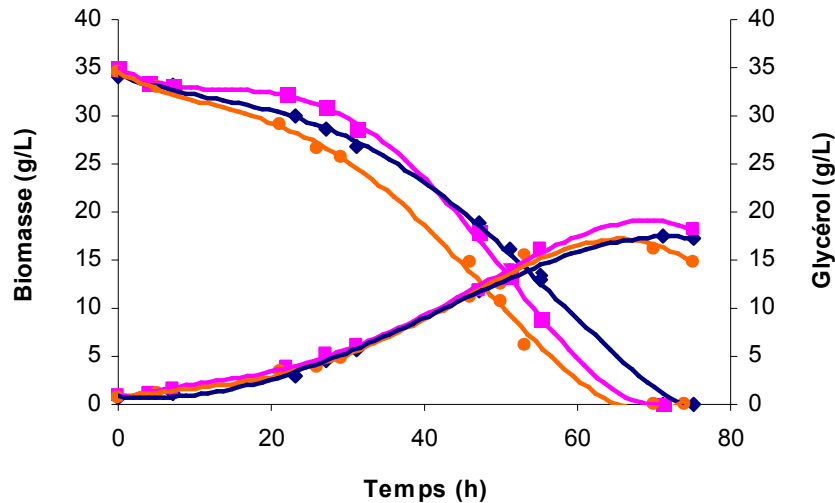


Figure III.14. Cinétique de croissance de *Sporobolomyces ruberrimus* et de consommation du glycérol à 23 °C, pH 6 et taux d'oxygène dissous = 50 %. Symboles : ♦ glycérol pur, ■ glycérol technique A, ● glycérol technique B.

Si l'on regarde les valeurs des paramètres cinétiques, qui correspondent à des indicateurs de performance de la fermentation, il est visible que le glycérol pur et que le glycérol technique B conduisent à des résultats globalement équivalents aussi bien pour ce qui est du rendement global de croissance ( $0,49 \pm 0,05$  g de biomasse produite par g de glycérol consommé) alors que la durée de la fermentation est significativement accrue de l'ordre de 10 h, soit 14 %, en présence de glycérol pur (l'erreur de 10 % sur le rendement correspond à l'erreur additive de la mesure de biomasse, 8 %, et de la mesure du glycérol, bien plus faible). Par contre, le rendement de croissance obtenu avec le glycérol technique A, le plus riche en acides gras, est apparemment amélioré avec une valeur de  $0,52 \pm 0,05$  g/g (tableau III.3). Ainsi, l'effet « retard » sur la consommation de glycérol et « amélioration » du rendement de croissance pourrait être dû à la présence d'acides gras qui pourraient participer à un apport de carbone mais également à un apport énergétique, en direction d'un surplus de production d'acétyl-CoA en faveur de la croissance. Ceci consiste en une hypothèse qui devrait toutefois être vérifiée. Enfin, les taux de croissance maximum sont équivalents, à l'erreur près sur la mesure de biomasse.

La figure III.15 traduit l'évolution générale des caroténoïdes synthétisés, au niveau intracellulaire, par *Sp. ruberrimus*, dans le cas de référence « mise en œuvre avec du glycérol pur ». Pour chaque caroténoïde, ces allures de courbe sont reproduites, avec moins d'incertitude, dans le cas des glycérols technique. Les mesures en UA (équivalent d'une

concentration en signal électrique par L de milieu) montrent, malgré une précision qui parfois peut paraître insuffisante, comme dans cette représentation, des tendances qui doivent être confirmées. D'après cette figure, il apparaît une première période de production et d'accumulation, quasiment proportionnelle, des différents caroténoïdes jusqu'à la disparition du glycérol. Dès que le glycérol a disparu, les concentrations de  $\beta$  et de  $\gamma$ -carotène ne semblent plus évoluer alors que la diminution du torulène semble compensée par l'augmentation de torularhodine.

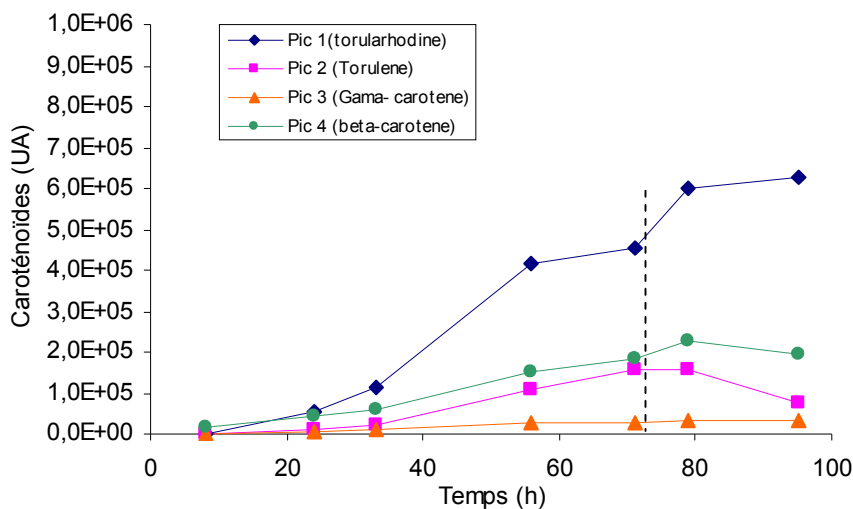


Figure III.15. Cinétique d'accumulation des caroténoïdes produits par *Sp. ruberrimus* à 23 °C, pH 6, OD = 50 % à partir de glycérol pur (33,5 g/L). Symboles : ◆ torularhodine, ■ torulène, ●  $\beta$ -carotène et ▲  $\gamma$ -carotène.

Comme un point de repère, on peut noter que la concentration de torularhodine avec du glycérol pur atteint environ  $4,5 \cdot 10^5$  UA au moment de la disparition du glycérol (fin de la phase de croissance) et qu'elle augmente d'à peu près  $2 \cdot 10^5$  UA au cours des 25 h d'après croissance. A la fin de la phase de croissance, le glycérol technique B conduit à une concentration de torularhodine d'un peu plus de  $4 \cdot 10^5$  UA ( $7 \cdot 10^5$  UA 25 h plus tard) alors que le glycérol A fournit des concentrations plus élevées :  $6,5 \cdot 10^5$  UA et  $10 \cdot 10^5$  UA, 25 h plus tard. Pour chaque type de glycérol, la concentration de torularhodine augmente d'environ 25 % au cours des 25 h suivant la fin de la période de croissance. Il semble que cela soit essentiellement au détriment du torulène dont la concentration diminue au prorata, mais il est évident que le glycérol technique A est un meilleur initiateur de production de torularhodine.

Il existe une autre façon d’appréhender la cinétique de production des caroténoïdes ; elle repose sur l’évolution de la concentration spécifique des caroténoïdes en mg/gX pour le  $\beta$ -carotène et en UA/gX/L pour les autres caroténoïdes. Cette représentation traduit une évolution quantitative des caroténoïdes au sein de la cellule en (fig. III.16) ou en pourcentage si cette donnée est rapportée à la quantité totale des caroténoïdes (fig. III.17).

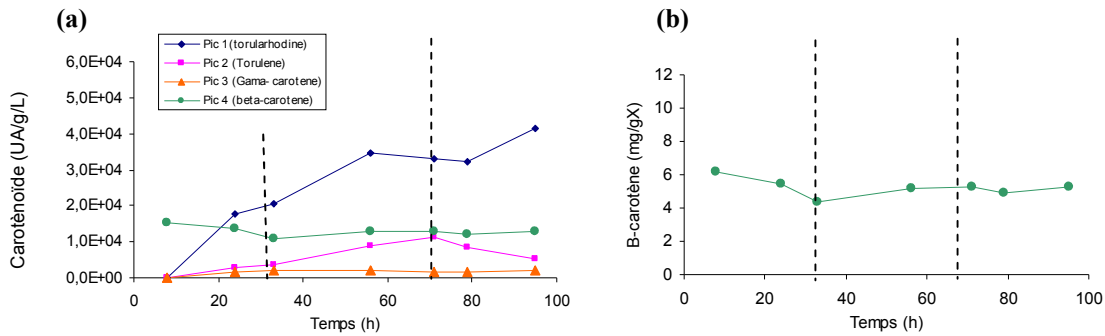


Figure III.16. Cinétique de formation des caroténoïdes en concentration spécifique en UA/gX/L (a) et de formation du  $\beta$ -carotène en mg/gX (b) produits par *SP. ruberrimus* à 23 °C, pH 6, OD = 50 % et glycérol technique B (33,5 g/L). Symboles :  $\blacklozenge$  torularhodine,  $\blacksquare$  torulène,  $\bullet$   $\beta$ -carotène et  $\blacktriangle$   $\gamma$ -carotène.

Ces représentations sont intéressantes mais ne sont pas fiables aux faibles concentrations de biomasse et, par conséquent, aux faibles concentrations en caroténoïdes, à cause de la plus grande incertitude sur les mesures de ces variables d’état. C’est en effet au début de la fermentation, avant 30 h dans le cas présent (période délimitée par des traits pointillés verticaux dans la figure III.16 a et b), que les résultats sont les plus incertains. Par contre, il est possible d’examiner ce qui se déroule après la deuxième barre verticale en traits pointillés, avec une analyse « intracellulaire ». Par exemple, la figure III.16 indique que les concentrations intracellulaires de  $\beta$ -carotène et de  $\gamma$ -carotène ne semblent pas varier pendant et après la croissance, alors que celles du torulène et de la torularhodine paraissent s’accumuler pendant la croissance puis décroître pour le torulène et continuer à augmenter pour la torularhodine pendant la période post-croissance. Ceci montre des comportements différenciés au cours de la synthèse des caroténoïdes.

Le deuxième type de représentation des concentrations spécifiques peut se faire selon une répartition en pourcentage (fig.III.17). Ceci ne correspond pas à une répartition de flux métaboliques mais à un regard comportemental de la levure par rapport au schéma métabolique de synthèse de la torularhodine proposé par Simpson *et al.* (1964) (fig.III.10).

Outre les observations faites à partir des représentations précédentes – concentrations volumiques ou spécifiques au cours du temps – montrant l’effet positif global d’une supplémentation des milieux de culture par des acides gras, ce type de représentation permet de dichotomiser les comportements liés à la présence ou non d’acides gras associés à la source de carbone principale, un peu comme la comparaison des cinétiques de consommation du glycérol.

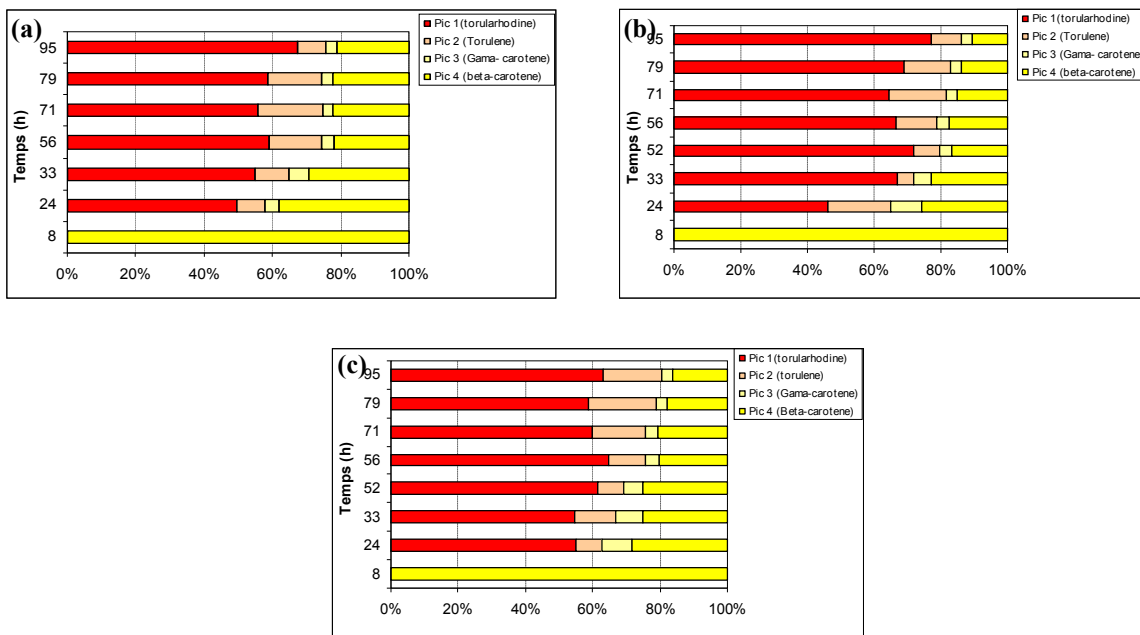


Figure III.17. Influence de différentes sources de glycérol sur le pourcentage de répartition intracellulaire des caroténoïdes (UA/gX/L). (a) glycérol pur ; (b) glycérol technique A ; (c) glycérol technique B.

En effet, l’observation des graphes représentant les taux respectifs des quatre espèces de caroténoïdes fait apparaître trois types de conclusions générales ou plus spécifiques.

- Tout d’abord, une remarque, valable pour les trois types de glycérol, est que le pourcentage de torularhodine semble varier en sens inverse du  $\beta$ -carotène, ce qui correspond au schéma métabolique indiqué.

- Une deuxième remarque globale concerne l’évolution du pourcentage de la torularhodine qui, après la période initiale des cultures soit après 30 h, reste à peu près invariable jusqu’à la fin de la période de croissance, puis augmente au détriment du torulène et du  $\beta$ -carotène.

- Le pourcentage de torularhodine, pendant la croissance, semble correspondre au type de substrat présent dans le milieu de culture. Ainsi, ce pourcentage est :

- (a) légèrement inférieur à 60 % en absence d'acides gras,
- (b) légèrement supérieur à 60 % lorsqu'il y a peu d'acides gras ( $\approx + 5 \%$ ),
- (c) inférieur à 70 % en présence de quantités d'acides gras plus importantes ( $\approx + 5\%$ ).

### **Conclusion**

Cette première partie de l'étude a permis, en premier lieu, d'apprécier la qualité des méthodes et techniques adaptées, au cours de ce travail, pour l'extraction-récupération (utilisation de la presse de French) des caroténoïdes et la quantification de leurs concentrations (Weber *et al.*, 2007).

En deuxième lieu, il s'est avéré que les résultats indicatifs, observés à l'échelle de la boîte de Pétri et des fioles d'Erlenmeyer, étaient, au premier abord, validés avec des concentrations en torularhodine plus importantes en fin de phase de croissance pour les levures ayant été en contact avec le glycérol le plus riche en acides gras.

En troisième lieu, il semble également que la présence d'acides gras contribue à améliorer le rendement de croissance sans modifier le taux de croissance (tableau III.3).

En quatrième lieu, la difficulté de mesurer les concentrations d'acides gras du milieu est à l'origine d'un manque d'information notable qui aurait, peut-être, permis d'expliquer le retard observé à la consommation du glycérol en leur présence notable.

Enfin, deux glycérols ont été retenus pour la poursuite de l'étude :

- le glycérol pur qui servira de base pour étudier le comportement de la levure en milieu supplémenté en différents acides gras,
- et le glycérol technique B, proche du glycérol pur, au niveau des premiers résultats cinétiques, qui représente aussi, un type de substrat valorisable et certainement plus abondant dans le futur, à cause d'une récupération plus affinée des acides gras servant à la production de biocarburants.

Tableau III.3. Caractéristiques quantitatives de *Sp. ruberrimus* en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et OD = 50 % avec différentes sources de carbone (33,5 g/L): glycérol pur, glycérol technique A et glycérol technique B.

Source de carbone	Glycérol pur (g/L)	Glycérol technique A (g/L)	Glycérol technique B (g/L)
X <sub>max</sub> (g/L)	17,5 ± 1,4	18,5 ± 1,5	17,5 ± 1,4
μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,061	0,057	0,058
R x/s (global) (g/g)	0,49 ± 0,05	0,52 ± 0,05	0,49 ± 0,05
Torularhodine (10 <sup>5</sup> UA)	5 ± 0,6	6 ± 0,7	3,5 ± 0,4
Durée croissance (h)	71	63	61

### III.4. Etude de l'influence des différents ajouts d'acide gras

L'étude précédente a montré que la présence en quantités non négligeables de différents acides gras pouvait avoir un effet sur le comportement métabolique de la levure en augmentant directement ou indirectement le rendement de croissance sans altérer le taux de croissance maximum, mais aussi sur l'accumulation de torularhodine aussi bien en concentration qu'en pourcentage. L'objectif est désormais d'essayer, dans un premier temps, de confirmer ces observations et d'identifier le ou les acides gras responsables de ces phénomènes. Aussi, il est indispensable de déterminer la quantité d'acide gras qu'il est nécessaire d'ajouter au milieu pour apprécier ces phénomènes. C'est pourquoi, en tenant compte des résultats préliminaires obtenus en boîtes de Pétri, une concentration supérieure à 1 g/L d'acide gras ayant, alors, semblé inhibitrice de la croissance cellulaire ou de la production de torularhodine, il a été décidé de réaliser un essai comparatif de croissance des levures en réacteur régulé de 3 L, en présence de 1 g/L et de 2 g/L d'acide oléique. Aucun effet de ralentissement de croissance n'ayant été décelé, grâce, très certainement, aux conditions contrôlées de mise en œuvre, il est apparu qu'une concentration de supplémentation de 2 g/L d'acide gras semblait satisfaisante pour repérer les effets recherchés. C'est la raison pour laquelle cette concentration a été choisie pour la quantification de l'influence des acides gras sur la culture de *Sp. ruberrimus*.

Les acides gras choisis et qui seront ajoutés aux milieux de cultures contenant soit du glycérol pur, soit du glycérol technique B, sont ceux entrant dans la composition des deux lots de glycérol technique utilisés précédemment ; il s'agit des acides oléique, palmitique et



linoléique. Un quatrième acide gras a été retenu pour cette étude ; l'acide stéarique qui comporte, comme les acides oléique et linoléique, 18 C, et est très abondant et de faible coût.

#### **III.4.1. Influence de la supplémentation du milieu de culture contenant du glycérol pur en différents acides gras**

La représentation des cinétiques de croissance et de consommation du glycérol de la figure III.18 montre des comportements variés de consommation du glycérol, que l'on peut différencier en trois groupes :

- la référence sans ajout et l'ajout d'acide palmitique qui présentent, correspondant à une durée de croissance de l'ordre de 70 h, la cinétique de disparition de glycérol la plus lente,
- l'ajout d'acide linoléique qui fait apparaître un retard initial important suivi par une accélération de la diminution du glycérol (durée de 70 h),
- et les ajouts oléique et stéarique qui, après une assez longue période de lente consommation, montrent une disparition subséquente rapide (correspondant à une durée de croissance comprise entre 55 et 60 h).

Parallèlement, il est possible d'apprécier les effets des supplémentations sur la cinétique de croissance allant dans le même sens que les catégories définies ci-dessus. Un regard plus précis sur les aspects quantitatifs indique que toutes les supplémentations sont à l'origine d'un meilleur rendement de croissance apparent et d'un meilleur taux de croissance maximum, en particulier les acides gras à 18 C avec une valeur de rendement de 0,58 g/g pour l'acide oléique (tableau III.4).

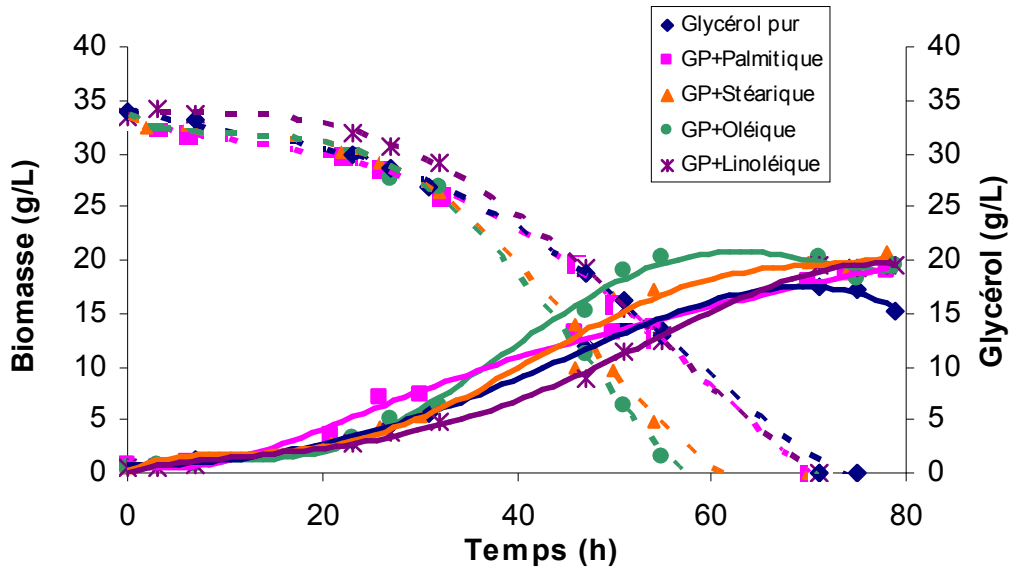


Figure III.18. Cinétiques de croissance et de consommation du glycérol pur de *SP. ruberrimus* à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %. Cultures réalisées avec ajout de différents acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) à une même concentration de 2 g/L.

Concernant la production des caroténoïdes, il ressort que les concentrations de torularhodine obtenues au moment de la disparition du glycérol sont toutes significativement supérieures à celle obtenue avec le glycérol pur non supplémenté, avec des valeurs comprises entre  $5,5 \cdot 10^5$  UA et  $7 \cdot 10^5$  UA, voisines de celle obtenue avec le glycérol technique A, les concentrations continuant à croître par la suite.

La figure II.19 montre les allures de répartition des différents caroténoïdes allant dans le même sens que les observations faites avec le même genre de représentation faite pour les expériences réalisées avec les trois sortes de glycérol. Il est à noter que l'ajout d'acide oléique présente les meilleurs taux de torularhodine avec plus de 60 % pendant la croissance et près de 80 %, une quarantaine d'heures après la fin de la croissance.

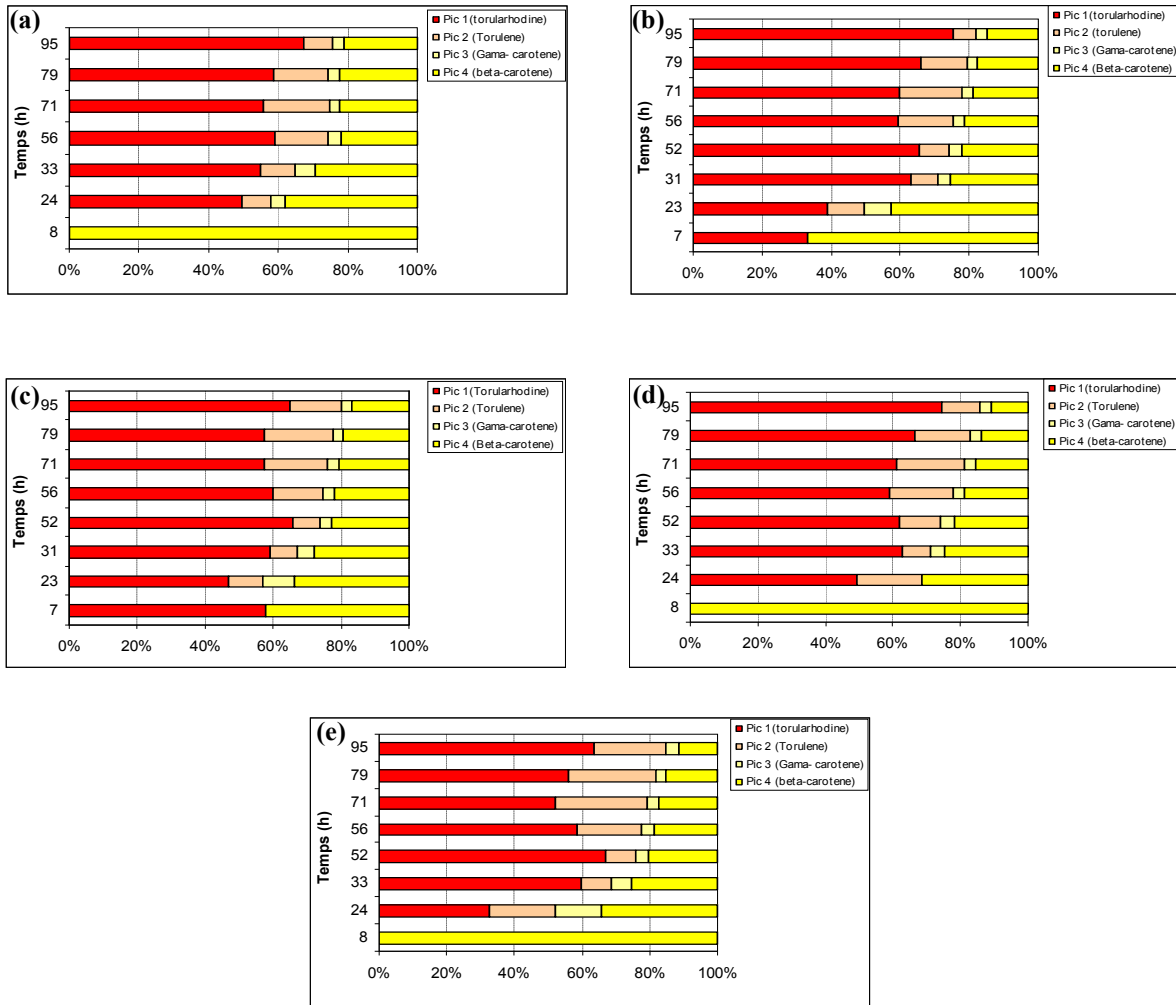


Figure III.19. Influence de différents ajouts d'acide gras dans le glycérol pur (33,5 g/L) sur l'accumulation des caroténoïdes (aire du pic/g de cellules). (a) sans ajout ; (b) acide palmitique ; (c) acide stéarique ; (d) acide oléique ; (e) acide linoléique.

Tableau III.4. Caractéristiques quantitatives de *SP. ruberrimus* en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et OD à 50 %, avec du glycérol pur (33,5 g/L) et supplémentation de différents acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) à une même concentration, 2 g/L. La concentration de torularhodine indiquée correspond au moment où la consommation de glycérol totale.

Acide gras	Sans ajout	Palmitique	Stéarique	Oléique	Linoléique
Glycérol pur (g/L)	33,5	33,5	33,5	33,5	33,5
$X_{max}$ (g/L)	17,5 ± 1,4	19,0 ± 1,5	20,0 ± 1,6	20,5 ± 1,7	20,0 ± 1,6
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,061	0,064	0,066	0,065	0,065
R x/s (global) (g/g)	0,49 ± 0,05	0,54 ± 0,05	0,57 ± 0,06	0,58 ± 0,06	0,57 ± 0,06
Torularhodine (10 <sup>5</sup> UA)	5 ± 0,6	7 ± 0,8	6 ± 0,7	6,5 ± 0,7	5,5 ± 0,7
Durée de la croissance (h)	71	70	60	55	70

Les résultats du tableau III.4, obtenus en réacteur contrôlé, confirment les tendances observées lors des expériences en boîtes de Pétri ; globalement l'acide oléique permet une amélioration de la croissance de la levure et de l'accumulation de torularhodine dans la cellule.

#### III.4.2. Influence de la supplémentation du milieu de culture contenant du glycérol technique B avec différents acides gras

En reprenant le même schéma expérimental que celui proposé au paragraphe précédent avec le glycérol pur, mais en utilisant le glycérol technique B, il est visible que l'on retrouve des similitudes de comportement cinétique. Ceci est vérifié avec la culture supplémentée avec de l'acide linoléique, qui montre la cinétique la plus lente et les milieux supplémentés en acide oléique et en acide stéarique qui induisent des cinétiques assez rapides. Par contre, la cinétique rapide avec un apport d'acide palmitique est moins attendue (fig. III.20).

D'un point de vue quantitatif, les rendements de croissance calculés à partir des données expérimentales fournissent quasiment les mêmes valeurs que celles obtenues avec le glycérol pur supplémenté, excepté pour l'ajout d'acide stéarique qui voit sa valeur passer de 20 à 18 g/g ce qui ne paraît pas obligatoirement valide du fait de l'incertitude sur la détermination des rendements (erreurs cumulées sur la mesure de biomasse et sur le glycérol = 10 %). Toutefois, un relatif faible taux de croissance maximum ( $0,062 \text{ h}^{-1}$ ) est également noté avec l'acide stéarique.

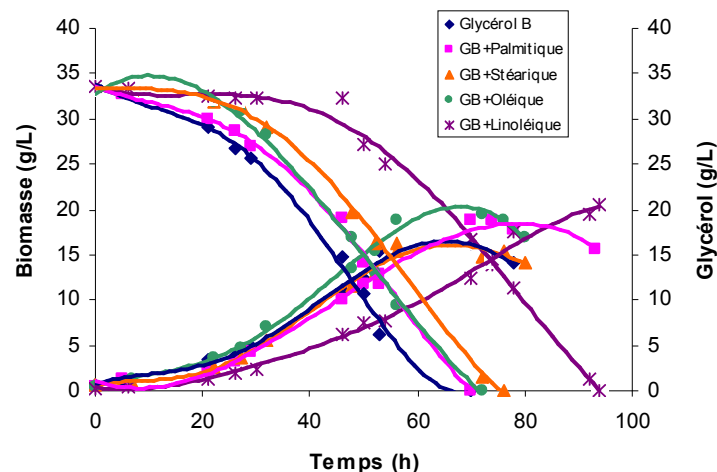


Figure III.20. Cinétiques de croissance et de consommation du glycérol technique B de *Sp. ruberrimus* à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %. Cultures réalisées avec ajout de différents acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) à la même concentration, 2 g/L.

Tableau III.5. Caractéristiques quantitatives de *Sp. ruberrimus* en cultures réalisées à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %, avec du glycérol technique B (33,5 g/L) et supplémentation de différents acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) à une même concentration, 2 g/L. La concentration de torularhodine indiquée correspond au moment où la consommation de glycérol totale.

Acide gras	Sans ajout	Palmitique	Stéarique	Oléique	Linoléique
$X_{\max}$ (g/L)	17,5 ± 1,4	19,0 ± 1,5	18,0 ± 1,4	20,0 ± 1,6	20,0 ± 1,6
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,058	0,067	0,062	0,068	0,065
R x/s (global) (g/g)	0,49 ± 0,05	0,54 ± 0,05	0,51 ± 0,05	0,57 ± 0,06	0,57 ± 0,06
torularhodine (10 <sup>5</sup> UA)	3,5 ± 0,5	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,4	4,0 ± 0,4	4,5 ± 0,4
Durée de la croissance (h)	61	80	74	67	94

L'ensemble des données quantitatives présentées dans le tableau III.5 fait, à nouveau, apparaître l'acide oléique à l'origine des meilleures performances de croissance. Les mesures des concentrations des caroténoïdes paraissent relativement plus faibles que celles attendues, toutefois, les résultats restent satisfaisants.

Ainsi, d'après les différents résultats obtenus au cours des deux dernières séries de cultures en bioréacteur, l'acide oléique a été considéré comme l'acide gras pouvant contribuer à la meilleure croissance et à une production améliorée de la torularhodine et a été choisi pour la suite de l'étude pour déterminer les conditions opératoires permettant d'aboutir à une croissance et une production de torularhodine optimales.

#### III.4.3. Influence de la supplémentation du milieu de culture contenant du glycérol technique B avec différentes concentrations d'acide oléique

Le choix de l'acide oléique établi à partir d'expériences réalisées avec des ajouts de 2 g/L, et après une première comparaison entre des ajouts à 1 et 2 g/L (données non présentées), il est devenu nécessaire de voir si un apport plus important en acide gras permettait d'accroître les performances de croissance et/ou de production de torularhodine. Pour cela, il s'est agi de comparer l'intérêt et l'efficacité d'un apport à 2, 5, 10, 15 et 20 g/L au travers des paramètres cinétiques quantitatifs.

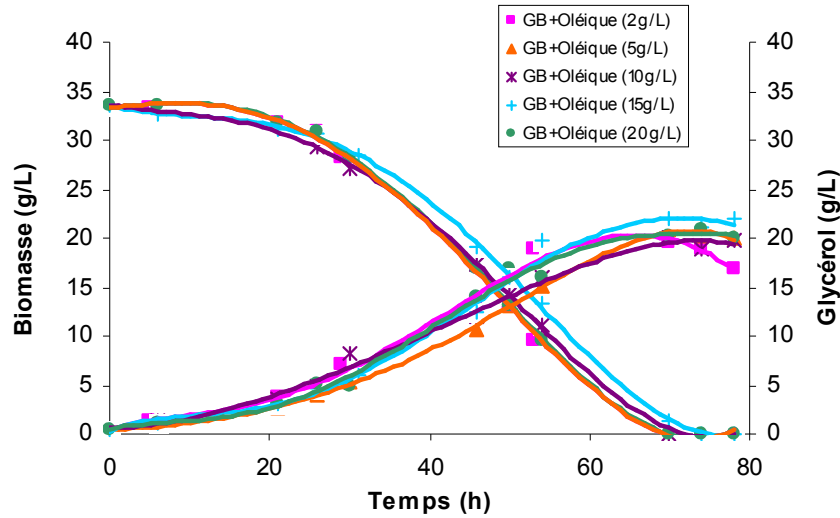


Figure III.21. Cinétiques de croissance et de consommation du glycérol technique B de *SP. ruberrimus* à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %. Cultures réalisées avec ajout d'acide oléique à 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L et 20 g/L.

La figure III.21 ne laisse pas apparaître ou supposer de grandes différences d'un point de vue cinétique entre les cinq cultures, si ce n'est une possible amélioration du rendement de croissance avec une valeur de  $0,63 \pm 0,06$  gX/g de glycérol ( $0,57 \pm 0,06$  g/g) (tableau III.6). Toutes les valeurs de  $\mu_{max}$  sont à peu près équivalentes même si celles obtenues à + 2 g/L et à + 15 g/L sont un peu supérieures avec  $0,068$  h<sup>-1</sup>.

Tableau III.6. Caractéristiques quantitatives de *Sp. ruberrimus* en culture réalisées à 23 °C, pH 6 et OD = 50 %, avec du glycérol technique B (33,5 g/L) et supplémentation d'acide oléique à 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L et 20 g/L. La concentration de torularhodine indiquée correspond au moment où la consommation de glycérol totale.

Acide oléique (g/L)	2	5	10	15	20
$X_{max}$ (g/L)	$20,0 \pm 1,6$	$20,0 \pm 1,6$	$20,0 \pm 1,6$	$22,0 \pm 1,7$	$20,0 \pm 1,7$
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,068	0,064	0,063	0,068	0,063
R x/s (global) (g/g)	$0,57 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,06$	$0,63 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,06$
torularhodine (10 <sup>5</sup> UA)	$4 \pm 0,5$	$4 \pm 0,5$	$7 \pm 0,8$	$6 \pm 0,7$	$5 \pm 0,6$
Durée de la croissance (h)	67	68	68	72	68

La figure III.22 représente les cinétiques de formation des caroténoïdes de trois des cinq concentrations étudiées (a) = 2 g/L, (b) = 10 g/L et (c) = 15 g/L. L'évolution cinétique

des concentrations spécifiques (UA/g/L) présente des allures déjà rencontrées auparavant. Toutefois, cette figure fait bien apparaître, après 30 h lorsque les mesures deviennent plus fiables, une augmentation continue de la concentration spécifique de la torularhodine, pendant et après la phase de croissance, quelle que soit la concentration d'acide oléique ajouté. Toutefois, à titre indicatif, les valeurs atteintes en fin de phase de croissance,  $2,5 \cdot 10^4$  UA/g/L après 67 h pour 2g/L,  $3,5 \cdot 10^4$  UA/g/L après 68 h pour 10 g/L et  $7 \cdot 10^4$  UA/g/L après 72 h pour 15 g/L augmentent significativement mais pas de manière proportionnelle. Par contre, un apport de 20 g/L d'acide oléique ne permet plus d'augmenter la production de torularhodine ; au contraire, avec un abaissement de la concentration spécifique, il semble que la supplémentation, à cette valeur, ait un effet devenant négatif.

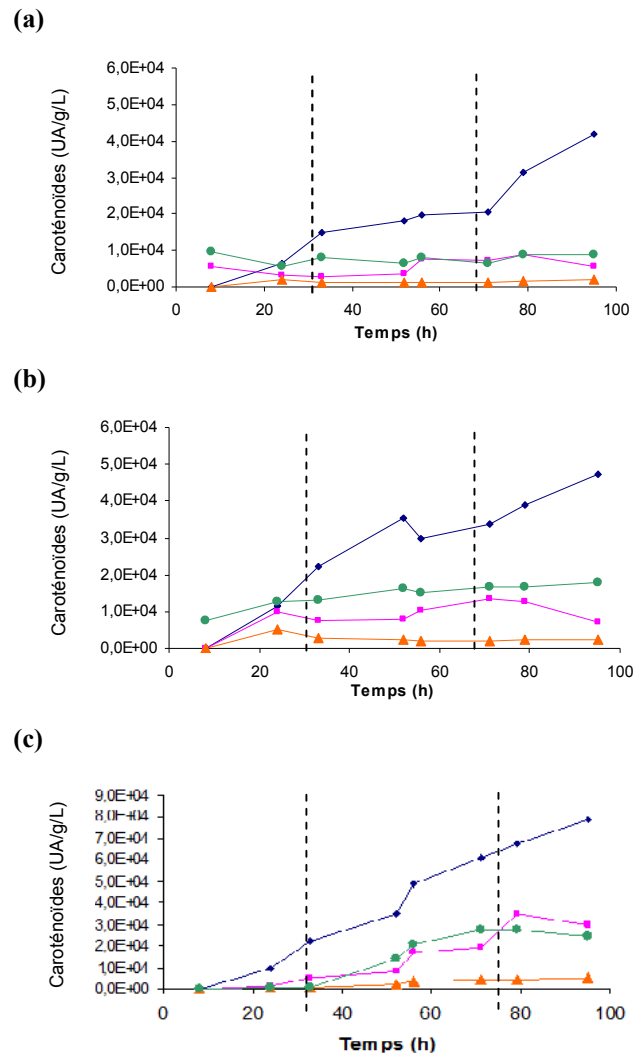


Figure III.22. Cinétique de formation des caroténoïdes (UA/g/L) chez *SP. ruberrimus* avec ajout d'acide oléique à 2 g/L (a), à 10 g/L (b) et à 15 g/L (c) à 23 °C, pH 6, OD = 50 % et glycérol technique B (33,5 g/L). Symboles :  $\blacklozenge$  torularhodine,  $\blacksquare$  torulène,  $\bullet$   $\beta$ -carotène et  $\blacktriangle$   $\gamma$ -carotène.

Pour les autres caroténoïdes, les concentrations spécifiques évoluent dans les mêmes sens que celles qui ont été vues à la figure III.17, lors de l'étude de l'influence de la nature du glycérol. En ce sens, les concentrations du  $\beta$ -carotène et du  $\gamma$ -carotène, rapportées à la biomasse, restent constantes alors que pour le torulène, on observe toujours une diminution après la phase de croissance. Par contre, il est notable que cette diminution est plus que compensée par la production de torularhodine, ce qui signifie qu'il y a toujours production et accumulation importante de ce caroténoïde malgré l'absence supposée de substrat carboné.

Une supplémentation en acide oléique de 15 g/L, permet une légère amélioration de la croissance cellulaire mais, surtout, une augmentation non négligeable de torularhodine.

#### III.4.4. Influence de l'oxygène dissous sur le comportement métabolique de *SP. ruberrimus*

Après avoir apprécié la nature de certains des facteurs d'influence sur la croissance et la production de torularhodine, liés à une supplémentation du milieu de culture, il reste à faire varier la concentration en oxygène dissous, représentée par son taux. Pour cela, trois taux seront comparés : 10, 50 et 80 %. Les cultures sont toujours réalisées en bioréacteur de 3 L avec une régulation adéquate des taux d'oxygène.

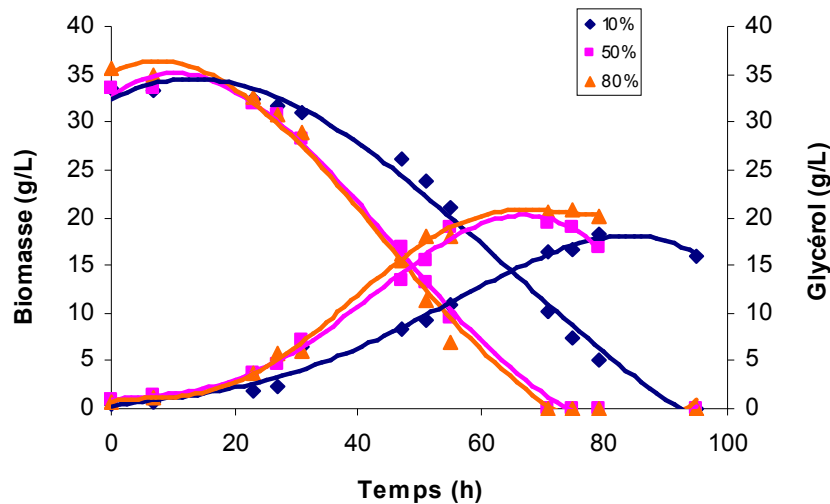


Figure III.23. Cinétiques de croissance et de consommation du glycérol technique B par *SP. ruberrimus* à 23 °C, pH 6 et différents OD. Cultures réalisées avec ajout d'acide oléique à 2 g/L. (a) 10 %, (b) 50 % et (c) 80 % d'oxygène dissous.



Les courbes de la figure III.23 font apparaître une grande similitude de cinétique à 50 et 80 % d'oxygène dissous au niveau de la croissance et de la consommation de glycérol. Elles signalent également qu'un taux d'oxygène dissous de 10 % ralentit assez fortement ces mêmes cinétiques tout en conduisant à une plus faible concentration de biomasse. Pour les OD de 10, 50 et 80 % les rendements de croissance évoluent et valent respectivement 0,55, 0,60 et  $0,63 \pm 0,06$  gX/g de glycérol. Pour ce qui concerne la croissance, le taux de 50 % d'oxygène dissous semble être un bon compromis entre la cinétique de croissance et le coût lié à l'oxygénation.

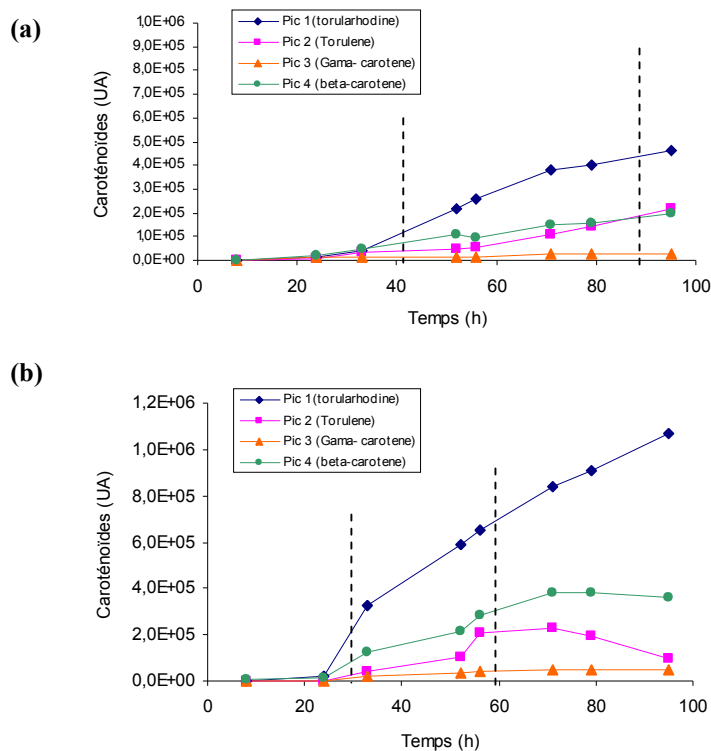


Figure III.24. Cinétique de formation des caroténoïdes produits par *SP. ruberrimus* avec ajout d'acide oléique à 2 g/L et OD à 10 % (a) et à 80 % (b), à 23 °C, pH 6 et glycérol technique B (33,5 g/L).

Symboles : ◆ torularhodine, ■ torulène, ●  $\beta$ -carotène et ▲  $\gamma$ -carotène.

Les cinétiques observées dans la figure III.24, montrent la cinétique de production des caroténoïdes pour les deux taux extrêmes d'oxygène dissous utilisés : (a) = 10 % et (b) = 80 %. L'importante augmentation du taux d'oxygène dissous augmente de manière importante, de  $4.10^5$  UA à  $7.10^5$  UA à la fin de la croissance, la concentration de torularhodine et de  $\beta$ -carotène. Puis, dans le cas d'un OD à 80 %, la concentration évolue de  $7.10^5$  UA à  $11.10^5$  UA de torularhodine, en 35 h après la croissance. Cette production est

importante et peut être expliquée par l'influence de la présence de l'oxygène comme l'ont rapporté Sakaki *et al.* (2002) qui, en augmentant le taux d'oxygène dissous dans le milieu de culture, ont constaté que cela pouvait conduire à doubler la production de torularhodine chez *Rhodotorula glutinis* No. 21. Ils ont suggéré que cela était lié à la capacité antioxydante très puissante de la torularhodine qui s'accumulerait préférentiellement pour protéger la cellule contre l'oxydation.

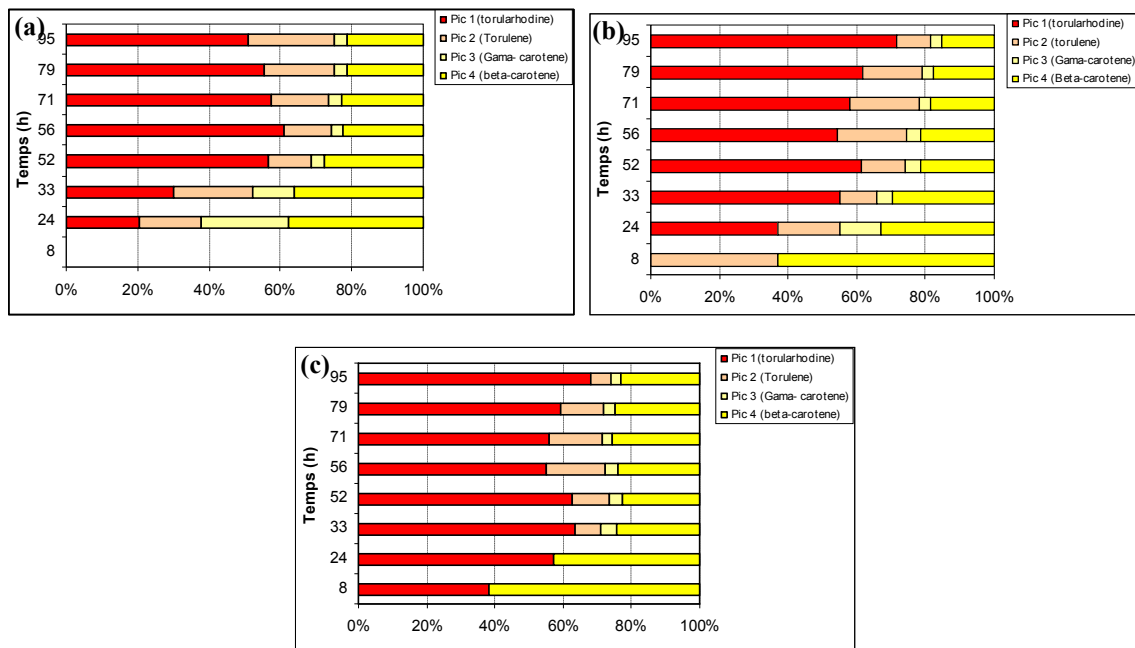


Figure III.25. Influence du taux d'oxygène dissous sur l'accumulation des caroténoïdes (aire du pic/g de cellules). (a) 10 %; (b) 50 % et (c) 80 %.

La figure III.25, montre que la répartition intracellulaire de la torularhodine évolue d'une manière soit semblable à 50 % et à 80 %, soit totalement différente à 10 % d'oxygène dissous. Après la phase de croissance, c'est-à-dire à 90 h, 67 h et 63 h, pour les cultures s'étant déroulées, respectivement, à 10 %, 50 % et 80 % d'oxygène dissous, il est visible que les cultures aux OD 50 et 80 % voient leur taux de torularhodine augmenter à plus de 70 % alors que la culture à OD 10 % présente un taux en chute notable pour atteindre une valeur d'environ 50 %, avec, toutefois, un taux de torulène (25 %) s'accroissant sensiblement. Ce résultat a tendance à justifier les explications proposées par Sakaki *et al.* (2002) sur le rôle joué par l'oxygène dissous dans la synthèse de la torularhodine. En fait, la levure, en présence importante d'oxygène, se défendrait contre l'oxydation et produirait beaucoup de

torularhodine pour ses hautes potentialités antioxydantes. Ce caroténoïde aurait un rôle de protecteur contre les agressions oxydatives.

Le tableau III.7 rassemble l'ensemble des principales données quantitatives concernant la mise en culture de *Sporobolomyces ruberrimus* à différents taux d'oxygène dissous dans un milieu contenant du glycérol technique B, supplémenté par de l'acide oléique à 2 g/L.

Tableau III.7. Caractéristiques quantitatives de *Sp. ruberrimus* en culture réalisées à 23 °C, pH 6 et à différents OD (10 % ; 50 % et 80 %), avec du glycérol technique B et supplémentation d'acide oléique à 2 g/L.

Oxygène dissous (%)	10	50	80
Acide gras (g/L)	2	2	2
Glycérol technique B (g/L)	33,5	33,5	33,5
X <sub>max</sub> (g/L)	18,5 ± 1,5	20,0 ± 1,6	21,0 ± 1,7
μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,058	0,068	0,066
R x/s (global) (g/g)	0,55 ± 0,06	0,57 ± 0,06	0,63 ± 0,06
torularhodine (10 <sup>5</sup> UA)	4 ± 0,5	4,0 ± 0,5	7 ± 0,6
Durée de la croissance (h)	90	67	63

### III.4.5. Conclusion

Les études qui ont été engagées en bioréacteur régulés et contrôlés ont confirmé le rôle potentiel des acides gras, et principalement l'acide oléique, sur la cinétique de croissance et la production de la torularhodine. Les acides gras peuvent donc avoir une influence notable sur le métabolisme de la levure. L'apport d'acide oléique conduit à une augmentation du rendement apparent de croissance alors que le taux de croissance maximum peut également être légèrement affecté par la présence de cet acide gras.

De même, l'accumulation des caroténoïdes, au sein de la levure, a été très nettement modifiée aux quantités élevées d'acide oléique ajoutées.

Enfin, l'augmentation du taux d'oxygène dissous a également permis d'augmenter légèrement le rendement de croissance mais grandement la production de torularhodine.

Il apparaît ainsi que l'ajout d'acide oléique et le taux d'oxygène dissous seraient des facteurs opératoires à optimiser pour optimiser la mise en œuvre de *Sporobolomyces ruberrimus* en bioréacteur.

### III.5. Optimisation des conditions opératoires

La démarche générique employée pour l'optimisation d'un procédé, et en particulier le procédé étudié, repose sur le schéma descriptif résumé dans la figure III.26.

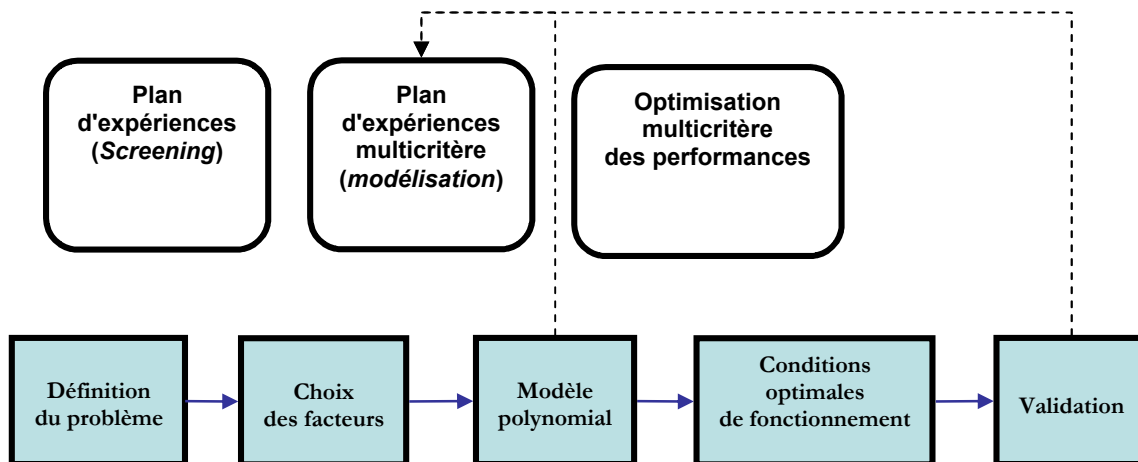


Figure III.26. Méthodologie générique d'optimisation du procédé de fermentation.

Cette méthodologie peut être décomposée en cinq étapes distinctes :

- la définition du problème et de ses contraintes,
- la définition d'un plan d'expériences pour le choix des facteurs opératoires (opérateurs),
- la définition d'un plan d'expériences multicritère pour construire un modèle des indicateurs de performance du procédé,
- l'optimisation multicritère pour l'identification des conditions optimales de fonctionnement,
- la mise en œuvre des conditions opératoires optimales pour la validation.

Dans cette méthodologie, lorsque l'information présente des incohérences ou des insuffisances, il est nécessaire de revenir à une phase de planification expérimentale complémentaire. Les outils de planification multicritère utilisés au L.S.G.C. sont adaptés à cette approche de planification incrémentale. Les résultats de chacune de ces étapes sont développés dans ce chapitre.

### III.5.1. Définition du problème

La définition du problème consiste à fixer le cadre général de l'étude. Cette définition limite, *de facto*, les solutions optimales qui pourraient être identifiées. Elle est toutefois indispensable pour fixer un cahier des charges rigoureux qui ne peut être remis en cause ultérieurement. Dans cette étude, les informations issues de la littérature et de résultats préliminaires ont conduit à sélectionner les facteurs à prendre en compte, pour l'optimisation de la production de torularhodine (la température, le taux d'oxygène dissous et la concentration en acide oléique) et à en délimiter les valeurs minimales et maximales (intervalles dans lesquels seront recherchées les valeurs optimales respectives et relatives aux facteurs) à considérer dans cette méthodologie (Tableau III.8).

Tableau III.8. Facteurs considérés et intervalles d'étude.

	Minimum	Maximum
Température (°C)	19	25
Taux d'oxygène dissous (%)	20	80
Concentration d'acide oléique (g/L)	0	20

Dans cette étude, l'objectif est de proposer des conditions opératoires de fonctionnement qui soient optimales dans un sens multicritère. Deux types d'indicateurs ont été considérés :

- les indicateurs liés à la croissance des micro-organismes
- les indicateurs liés à la production de caroténoïdes (quantité et/ou qualité)

Ces indicateurs sont décrits dans le tableau III.9.

Tableau III.9. Indicateurs de performances du procédé de production de torularhodine.	
Productivité en biomasse	g/L.h
Taux maximum de croissance	h <sup>-1</sup>
Vitesse de production de caroténoïdes	g/h
Concentration spécifique en torularhodine	mg/gX

Un modèle reliant les facteurs opératoires aux performances doit être établi pour chaque indicateur. Dans cette étude, des modèles polynomiaux sont considérés. Ils

permettent, sans nécessairement connaître les phénomènes impliqués, de prédire des comportements non linéaires, au prix d'un investissement expérimental souvent limité, ce qui peut être justifié par le fait de mises en œuvre expérimentales lourdes ou compliquées.

### III.5.2. Pertinence du choix des facteurs

Cette phase consiste à vérifier si les facteurs opératoires, pré-supposés intervenant sur les indicateurs de performance du procédé, permettent effectivement d'agir, et donc de maîtriser le procédé. Cette phase repose généralement sur la mise en œuvre d'un plan d'expérience, dit de *Screening*. Le modèle sous-jacent à ce type de plan est un modèle polynomial d'ordre 1 (sans interaction). Ce type de plan met ainsi en évidence les effets *significatifs* des facteurs sur les indicateurs de performance du procédé. Les facteurs qui doivent être conservés dans les phases suivantes de la méthodologie sont ainsi confirmés.

L'étude préliminaire a permis d'accumuler des résultats dans différentes conditions opératoires, en particulier pour une température de fermentation de 23°C. Les conditions opératoires pour les autres facteurs sont décrites dans le tableau III.10. La température est un des facteurs les plus importants sur la conduite d'une fermentation et son effet sur les indicateurs de performance avait été préalablement validé (Razavi, 2004). Ainsi, elle est considérée, *a priori*, comme essentielle à l'étude. Alors, seules deux variables, le taux d'oxygène dissous et la concentration en acide oléique, doivent être étudiées dans cette phase de vérification des facteurs significatifs.

Tableau III.10. Conditions opératoires retenues pour l'analyse des facteurs :  
taux d'oxygène dissous et concentration d'acide oléique.

Température (°C)	Taux d'oxygène Dissous (%)	Concentration d'acide oléique (g/L)
23	0,5	2
23	0,5	1
23	0,5	5
23	0,5	10
23	0,5	15
23	0,5	20
23	0,1	2
23	0,8	2

Rappelons qu'initialement, des données de la littérature ainsi que des observations qualitatives ont conduit à retenir ces deux facteurs dans l'étude. Pour compléter ces informations, une analyse statistique des résultats expérimentaux a été entreprise et est présentée dans le tableau III.11. Il apparaît, selon l'indicateur retenu, que les facteurs ne sont pas tous significatifs. Le taux d'oxygène dissous aurait un réel effet sur les deux indicateurs de croissance de la biomasse (Productivité et taux maximum). La concentration en acide oléique n'aurait, par contre, pas d'effet sur ces indicateurs. Ces résultats semblent cohérents avec les connaissances quantitatives acquises à propos de ce type de micro-organisme.

Pour les indicateurs de production, les conclusions sont contradictoires. En effet, si la concentration en acide oléique a un effet sur les deux indicateurs retenus, production de caroténoïdes et concentration en torularhodine, il semble que l'effet de l'oxygène soit *perceptible* sur la production de torularhodine mais pas sur la production globale de caroténoïde. Les coefficients de détermination ( $R^2$ ) présentés dans le tableau III.10 sont faibles et ne peuvent conduire à une analyse quantitative des résultats. De plus, les conditions opératoires exploitées ne constituent pas un plan d'expériences de *screening* aux propriétés statistiques optimales.

Les conclusions statistiques viennent confirmer les observations. A la lumière de ces résultats, les deux facteurs étudiés, le taux d'oxygène dissous et la concentration en acide oléique doivent être, avec la température, pris en compte dans l'étude.

Tableau III.11. Analyse des effets des facteurs taux d'oxygène dissous (OD) en % et concentration d'acide oléique (AO) en g/L sur les indicateurs de performances du procédé. En grisé : effets non significatifs.

	$R^2$	OD	AO
Productivité (gX/L.h)	0,68	0,060	0,02
$\mu_{\max}$ ( $h^{-1}$ )	0,56	0,006	0,0008
Production des caroténoïdes (g/h)	0,75	0,11	0,19
Concentration de torularhodine (mg/gX)	0,57	12079	-6290

### **III.5.3. Plan d'expériences multicritère pour la modélisation des performances du procédé**

Après avoir identifié les facteurs d'action, à partir des connaissances antérieures acquises par des données expérimentales et statistiques, et après avoir défini les limites de variations de ces facteurs, un plan d'expériences multicritère peut être déterminé. L'utilisation d'un plan d'expériences multicritère est un outil intéressant pour le génie des procédés biotechnologiques parce qu'il permet de réduire, de manière significative, le nombre d'expériences. En plus, par rapport aux plans classiques, il prend en compte toutes les contraintes qui empêchent la réalisation de certaines expériences (Muniglia, 2001). La construction de plans optimaux, est réalisée à partir des essais déjà effectués afin de pouvoir exploiter les résultats acquis préalablement. Pour répondre aux objectifs fixés, en même temps que les données des nouvelles expériences à réaliser, l'utilisation du plan d'expériences permettra le développement des modèles polynomiaux prédictifs de la croissance et de l'accumulation de la torularhodine en fonction des paramètres opératoires. Pour la construction du plan optimal multicritère, deux critères de qualité du plan ont été choisis. Chaque critère permet d'optimiser une propriété spécifique du plan. Les critères retenus pour la construction du plan sont la D-optimalité et la rotatabilité.

Dans cette étude, le plan d'expériences multicritère a été appliqué à la modélisation des performances d'un procédé de production de caroténoïdes, et notamment de torularhodine, en mode discontinu.

### **III.5.4. Construction du plan d'expériences**

Dans une étude plus ou moins complexe, des contraintes liées au procédé sont à prendre en compte. Si, au moment de la planification, des expériences techniquement non réalisables sont proposées, la démarche expérimentale est compromise. Afin d'éviter cela, pour la construction du plan d'expériences, l'intervalle de chacun des trois facteurs d'action doit être défini ; il est repris de l'étude sur la recherche des facteurs opératoires influents (tableau III.7). Cette zone de variation a été choisie en tenant compte des résultats obtenus dans l'étude préalable.

L'intérêt de recourir à une technique de planification d'expériences multicritère est de déterminer des expériences qui apporteront l'information la plus complète et la plus fiable pour l'identification paramétrique des modèles. L'identification des paramètres nécessite un minimum de dix expériences distinctes.



Le choix des critères de construction est très important pour la définition et l'exploitation des résultats du plan d'expériences. En effet, chaque critère permet d'optimiser une propriété spécifique du plan. Pour la construction du plan d'expériences, le choix s'est limité à deux critères, en considérant la D-optimalité et la rotatabilité. La description des ces critères est montrée dans le tableau III.12.

Tableau III.12. Critères de qualité choisis pour la construction du plan d'expériences.

	Critère	Représentation mathématique	Signification
Précision sur les paramètres	D-Optimalité	Minimisation du déterminant de la matrice de dispersion $(X^T X)^{-1}$	Minimisation de la variance généralisée sur l'estimation des paramètres
Précision sur les prédictions	Rotatabilité	Un plan est rotatable si la variance de prédiction est la même pour tous points équidistants du centre du domaine expérimental	Permet de rendre les courbes d'isovariance concentriques par rapport au centre du domaine expérimental

Les plans sont construits en respectant un compromis entre les deux critères choisis.

### III.5.5. Description de la construction et la représentation de la zone de Pareto obtenue

La recherche de solutions doit nous permettre d'identifier un ensemble de stratégies expérimentales multicritères. Chaque élément de cet ensemble constitue un plan d'expériences *acceptable* au regard des critères de plan considérés. Dans le cas présent, un plan d'expériences contient huit expériences distinctes, qui complètent les huit expériences déjà disponibles. Chaque expérience du plan comporte 3 variables à définir, les 3 facteurs étudiés. Chaque plan d'expériences est ainsi constitué de 8x3 variables à identifier, soit 24 inconnues.

La zone de Pareto recherchée regroupe un ensemble de stratégies expérimentales *acceptables* parmi lesquelles le plan d'expériences à mettre en œuvre doit être sélectionné. La figure III.27, présente la zone de Pareto dans l'espace des critères de plan.

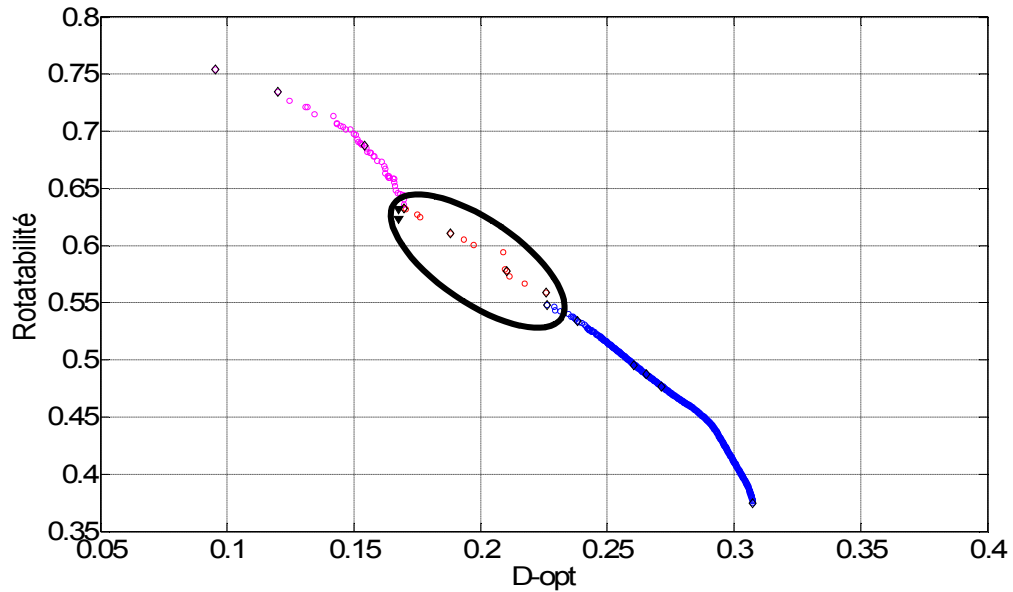


Figure III.27. Représentation des critères de construction, zone de Pareto finale.

Le plan d'expériences a été choisi parmi les plans compris à l'intérieur de l'ellipse. Ces plans sont les plus proches du centre du domaine, où la rotabilité et la D-optimalité sont maximisés. Après avoir choisi trois plans, une légère correction des valeurs des facteurs a été nécessaire pour obtenir les arrondis. Ces nouveaux plans ont été intégrés dans la zone de Pareto, pour la validation de ces corrections. Les nouveaux plans sont représentés par un triangle noir dans la figure III.27 et, comme cela peut être observé, seulement deux d'entre eux sont acceptables.

Alors, nous avons élu un seul plan, parmi les deux disponibles. Ce plan, défini dans le tableau III.13, paraît intégrer toutes les informations nécessaires pour la suite de l'étude, en incluant, par ailleurs, des expériences techniquement réalisables.

Tableau III.13. Caractéristiques des expériences à réaliser.

Référence expérience	Température (°C)	Taux d'oxygène Dissous (%)	Concentration d'acide oléique (g/L)
01	19,0	50	0,0
02	20,5	20	15,5
03	20,5	80	12,0
04	21,0	50	20,0
05	21,0	40	10,5
06	25,0	30	17,0
07	25,0	40	7,0
08	25,0	80	14,0

### III.5.6. Représentation mathématique

Après la réalisation des expériences, un modèle mathématique a été réalisé conçu pour l'optimisation du procédé de production de torularhodine. Nous avons choisi six réponses à modéliser qui, conjuguées pour partie, soient en rapport avec les objectifs d'optimisation fixés:

- la productivité en biomasse (g/L.h),
- la vitesse spécifique de croissance,  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ),
- la production de caroténoïdes totaux (mg/h),
- la concentration spécifique de torularhodine (mg/gX),
- la productivité en  $\beta$ -carotène (mg/L.h) et
- la production spécifique de  $\beta$ -carotène (mg/gX.h).

Dans un premier temps, une relation entre les données expérimentales et les trois facteurs a été établie en utilisant un polynôme du second degré, pour chaque réponse. Les facteurs non significatifs ont été exclus du modèle et seuls les facteurs ayant un sens sont potentiellement conservés. Le tableau III.14, présente un résumé des résultats obtenus ; il est une aide pour un choix pertinent des réponses à prendre en compte dans la phase d'optimisation.

Tableau III.14. Résumé des coefficients des modèles polynomiaux obtenus pour chaque indicateur de performance du procédé. T = température ( $^{\circ}\text{C}$ ) ; OD = taux d'oxygène dissous (%) et AO = concentration d'acide oléique (g/L).

En grisé : valeurs très faiblement significatives indiquant une quasi non-influence.

	$R^2$	Cst	T	OD	AO	$T^2$	$OD^2$	$AO^2$	TxOD	TxAO	ODxAO
Productivité en biomasse (g/L.h)	0,77	0,24	0,06	0,03		-0,05	-0,03	0,04	0,08		
Production caroténoïdes totaux (g/h)	0,62	0,30	0,12			-0,39	-0,12	-0,09		0,27	
Concentration de torularhodine (mg/gX)	0,90	2,90	0,99	0,81	-0,23	0,67	1,73		2,65		
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,89	0,06	0,01	0,003		-0,01	-0,005		0,006		
Productivité de $\beta$ -carotène (mg/L.h)	0,72	62,14		-29,4	9,82	27,30	41,17				23,78
Production spécifique de $\beta$ -carotène (mg/g.h)	0,70	3,47	0,60	-2,11	0,49	2,40	1,65				

A partir d'une estimation des variances sur les coefficients du modèle, les intervalles de confiance de chaque coefficient ont été déterminés. Pour certains coefficients significatifs, l'intervalle de confiance n'est pas nul mais est très proche de cette valeur critique. Ces coefficients sont repérés par des cellules grisées dans le tableau III.14. Ils représentent les coefficients *faiblement* significatifs.

Des coefficients de détermination acceptables ont été obtenus pour les modèles de la concentration en torularhodine (0,90) et le taux de croissance maximum (0,89). On observe par ailleurs que pour ces deux modèles tous les termes sont significatifs. Les modèles des autres indicateurs conduisent à des coefficients de détermination plus faibles ( $R^2 < 0,8$ ) et, par conséquent, à une capacité de prédiction plus limitée. De plus, Le nombre de cellules grisées dans le tableau montre que le caractère significatif de plusieurs facteurs du modèle peut être mis en doute. La prise en compte de ces indicateurs dans la phase d'optimisation ne semble donc pas pertinente.

Ainsi, deux indicateurs de performance de la fermentation ont pu être choisis pour l'optimisation des conditions opératoires : la concentration en torularhodine et le taux de croissance maximum de la levure.

L'optimisation des conditions opératoires a été réalisée, tout d'abord, dans une approche monocritère ce qui permet de connaître les valeurs maximales théoriques pour chacun des indicateurs de performance, puis, dans une approche multicritère afin de déterminer les meilleurs compromis entre ces deux objectifs.

Tableau III.15. Optimisation de la concentration en torularhodine et du taux de croissance maximum en monocritère. ND : non déterminé.

Optimisation monocritère	T (°C)	OD (%)	AO (g/L)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Torularhodine (UA/g)
$\mu_{\max}$	23,4	0,72	ND	<b>0,0652</b>	54658
Torularhodine	25	0,90	0	0,0618	<b>99952</b>

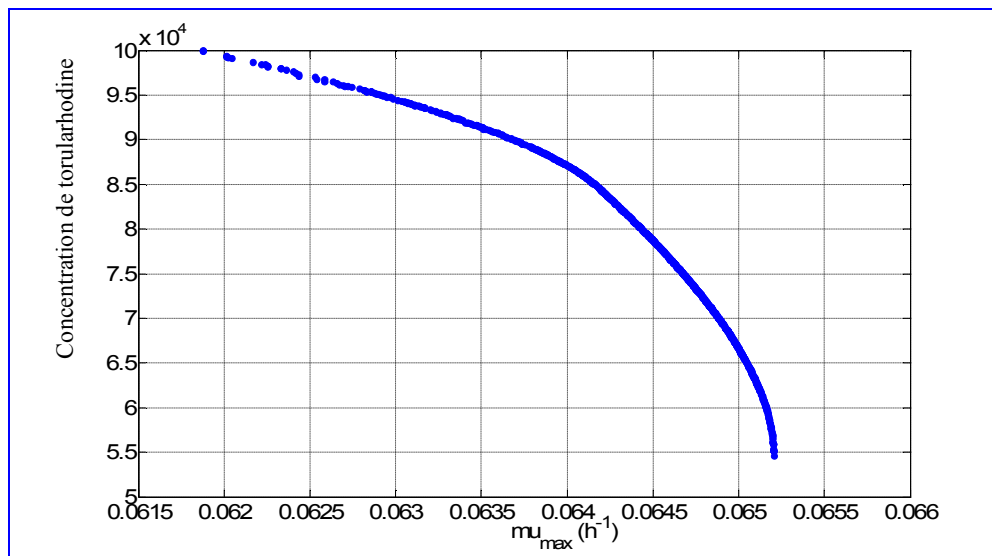
Les valeurs optimales déterminées en monocritère sont indiquées dans le tableau III.15. Les résultats de ce tableau montrent qu'un indicateur de performance est optimisé au détriment de l'autre indicateur. Ainsi, si l'on observe les résultats obtenus, quand la valeur de  $\mu_{\max}$  est égale à 0,065 h<sup>-1</sup>, la production de torularhodine devient faible, avec une valeur chutant de moitié au regard de la valeur maximale potentielle. Inversement, si on optimise la

production de torularhodine (99952), le  $\mu_{\max}$  diminue mais de manière limitée, théoriquement aux alentours de 5 %.

Compte tenu de l'antagonisme apparent entre les deux indicateurs considérés, même s'il peut paraître limité, une optimisation multicritère correspondant à une recherche de compromis entre plusieurs indicateurs de performances, doit être réalisée. Pour obtenir les meilleures conditions opératoires au sens des deux indicateurs de performance. La solution se présente sous la forme d'un ensemble de triplets opératoires (T, OD, AO) pour lesquels l'amélioration d'un indicateur ne peut se faire qu'au détriment de l'autre. Cet ensemble de triplets constitue la zone de Pareto du problème multicritère. La figure III.28 (a) et (b), montre les résultats obtenus pour l'optimisation multicritère de la concentration en torularhodine et du taux de croissance maximum.

Le front de Pareto observé dans la figure III.28 (a), décrit un ensemble de performances qui peuvent être atteintes à partir des conditions opératoires représentées par les triplets de la figure III.28 (b). Chaque couple de performances du Front de Pareto représente un compromis acceptable.

(a)



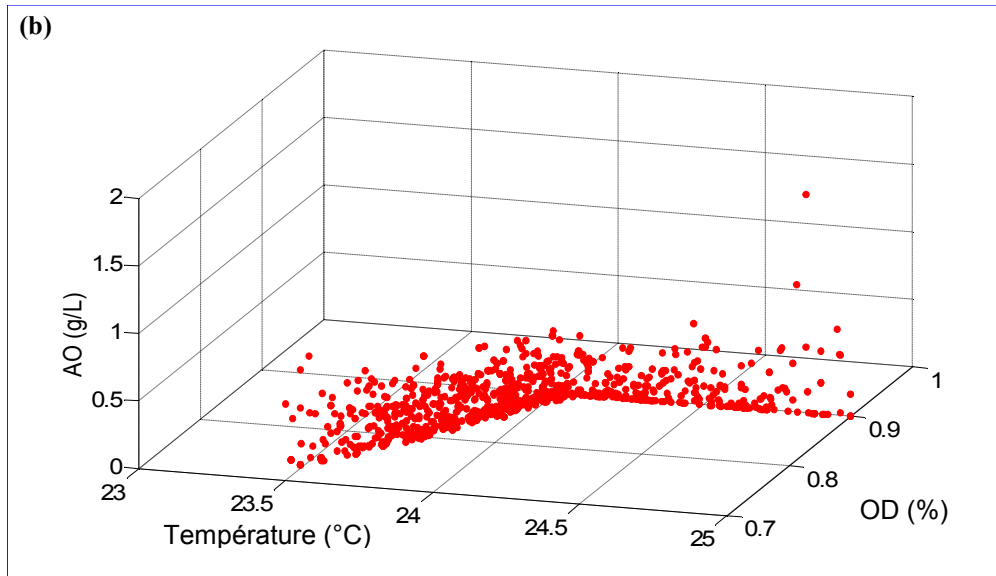


Figure III.28. Optimisation multicritère de la concentration de torularhodine et du taux de croissance maximum de la levure. (a) Front de Pareto et (b) Zone de Pareto. T = température (°C) ; OD = taux d'oxygène dissous (%) et AO = concentration d'acide oléique (g/L).

On constate que les conditions opératoires qui conduisent aux meilleurs compromis entre les deux critères considérés se décrivent en deux familles.

La première famille correspond aux conditions opératoires qui tendent à privilégier la production de torularhodine. Elles sont résumées dans le tableau III.16. Une obtention maximale de torularhodine correspond à une température et un taux d'oxygène dissous élevés et une concentration minimale d'acide oléique. Les résultats de l'optimisation monocritère indiquaient la même tendance.

La deuxième famille de conditions opératoires correspond aux stratégies où la croissance est privilégiée. Les effets de la température et du taux d'oxygène dissous peuvent se compenser partiellement et offrent ainsi un ensemble de conditions opératoires qui semble décrire une droite dans la figure III.28 (b).

Dans tous les cas, l'effet de la concentration en acide oléique négatif sur l'obtention de torularhodine et l'absence d'effet de ce même facteur sur la croissance conduisent à des conditions opératoires qui tendent à limiter la quantité d'acide oléique ajouté. Ce résultat est en contradiction avec les premières observations expérimentales mais reste parfaitement cohérent avec tous les résultats de l'approche de modélisation et d'optimisation.

Le tableau III.16, résume les résultats obtenus pour l'optimisation multicritère du procédé, pour une obtention maximale de torularhodine et pour le taux de croissance. Ces résultats nous montrent qu'avec une température et un taux d'oxygène dissous élevés et une concentration minimale d'acide oléique, l'obtention de torularhodine est optimale.

Tableau III.16. Résultats des conditions optimales pour la maximisation de la concentration de torularhodine et du taux de croissance maximum. T = température (°C) ; OD = taux d'oxygène dissous (%) et AO = concentration d'acide oléique (g/L).

<b>optimisation multicritere {<math>\mu_{\max}</math>,torularhodine} zone de Pareto</b>	<b>T opt</b>	<b>OD opt</b>	<b>AO opt</b>
	élevée	élevée	minimal

### III.5.7. Conclusion

Les stratégies expérimentales multicritères qui ont été mises en place, ont permis la définition des plans d'expériences pour compléter l'étude d'optimisation (initialisée dans les études précédentes) du procédé pour une haute obtention de la torularhodine et du taux de croissance maximum chez *Sporobolomyces ruberrimus*. La construction d'un plan optimal est très avantageuse parce qu'elle permet d'intégrer, dans la démarche expérimentale, les contraintes, observées auparavant, ainsi que les informations expérimentales déjà disponibles. Ce type de plan s'adapte au procédé et non l'inverse. La construction d'un plan optimal multicritère permet, en plus, de construire un plan qui représente le meilleur compromis entre une propriété statistique des coefficients du modèle et une propriété statistique des prédictions par modèle.

Les résultats observés par la modélisation du taux de croissance maximum sont en accord avec ceux obtenus précédemment par l'étude cinétique de la croissance. Cependant, la modélisation de la concentration de torularhodine ne conduit pas à des résultats comparables à ceux supposés et attendus lors de l'étude de l'influence des acides gras, pour laquelle une amélioration de la production de torularhodine semblait observée par l'ajout de différentes concentrations d'acide oléique.

Il semble donc que, malgré les observations expérimentales et la confirmation de l'étude statistique initiale, la supplémentation en acide oléique dans le milieu de culture n'apporte pas de gain en production de torularhodine, dans les conditions expérimentales de

mise en œuvre et d'observation des résultats (mesures faites au moment où le glycérol a disparu du milieu).



### III.6. Fonctionnalisation enzymatique de caroténoïdes porteur d'une fonction carboxylique

Les caroténoïdes sont des molécules présentant des propriétés antioxydantes particulièrement intéressantes ; cependant ce sont des molécules instables, sensibles à la lumière, à l'air et à la chaleur. Comme cela a été montré au § II.3.4.1, la torularhodine présente ces mêmes caractéristiques de dégradation rapide ; c'est la raison pour laquelle la synthèse d'un dérivé de cette molécule a été envisagée. La présence d'une fonction carboxylique permet d'envisager une réaction d'acylation. Une telle fonctionnalisation de la torularhodine pourrait permettre, non seulement, d'augmenter sa stabilité tout en maintenant ses propriétés biologiques, mais également, d'améliorer celles déjà existantes, voire de lui en conférer de nouvelles, en fonction de la molécule qui lui sera associée. La voie enzymatique a été préférée à un procédé chimique, parce qu'elle présente de nombreux avantages comme la sélectivité du biocatalyseur et les conditions réactionnelles plus douces (Humeau *et al.*, 2000). La torularhodine pourrait alors se comporter comme donneur de groupe acyle grâce à sa fonction carboxylique libre. En tant qu'accepteur du groupe acyle, différentes molécules, comme des sucres ou des flavonoïdes, pourraient être utilisées afin de synthétiser une liaison ester comme cela a été rapporté dans la littérature ; par contre, aucune étude officiellement référencée n'a été réalisée sur la condensation, par voie enzymatique, d'un caroténoïde avec un peptide avec création d'une liaison amide. C'est pourquoi, l'acylation d'un acide aminé tel la lysine, a été retenue pour envisager, ultérieurement, la synthèse de molécules multifonctionnelles, associant des acides aminés/peptides à la torularhodine. Cette démarche a, par contre, été suivie avec succès en utilisant de la lysine ou des peptides contenant de la lysine et des acides gras (Soo *et al.*, 2004, Husson *et al.*, 2008) ; dans ce cas, seule la fonction amine en position  $\epsilon$  est acylée, grâce, probablement, grâce à une meilleure réactivité de ce groupe par rapport à la fonction amine en position  $\alpha$ .

La torularhodine n'étant pas disponible commercialement, un caroténoïde modèle a été choisi pour déterminer les conditions réactionnelles d'acylation adéquates. La molécule choisie présente des caractéristiques similaires à la torularhodine tel un groupe fonctionnel carboxylique terminal.

La bixine est un caroténoïde de 25 C, qui possède donc une fonction carboxylique terminale mais également une fonction ester méthylique à l'autre extrémité (fig. III.29). Ce caroténoïde est très utilisé dans l'industrie alimentaire, textile, pharmaceutique et cosmétique,

il représente 70 % des colorants utilisés dans l'industrie mondiale (Parize *et al.*, 2006) et est donc très accessible. Son utilisation dans l'industrie est très répandue, pour sa couleur et pour son activité antioxydante (Humeau *et al.*, 2000).

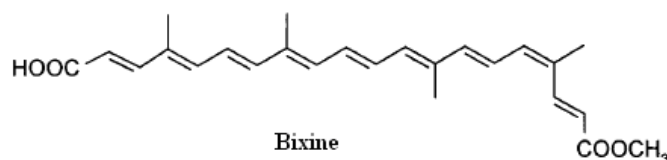


Figure III.29. Structure chimique de la cis-bixine.

Cette étude a pour objectif de déterminer les conditions réactionnelles adéquates pour la synthèse d'une liaison amide entre un caroténoïde et la lysine. Il s'agira :

- de caractériser le substrat après extraction éthanolique d'une poudre commerciale de colorant alimentaire annatto (colorant E 160 b) et d'étudier sa stabilité au cours du temps dans le milieu réactionnel,
- de réaliser des réactions pour déterminer les conditions réactionnelles adéquates pour une acylation enzymatique de la lysine par la bixine et pour mettre au point les techniques analytiques permettant d'identifier les produits de synthèse,
- d'appliquer ces conditions à l'acylation de la lysine par la torularhodine.

### III.6.1. Caractérisation d'un caroténoïde modèle, la bixine extraite d'annatto

#### III.6.1.1. Analyse qualitative par CCM

La bixine utilisée dans le cadre de cette étude est dérivée de la *Bixa orellana*, une plante native d'Amérique tropicale (Tocchini et Mercadante, 2001). Ces graines sont recouvertes par une résine rouge qui contient de la bixine, le caroténoïde principal. Une poudre jaune est obtenue après pressage des graines. L'éthanol a été utilisé pour l'extraction de la bixine présente dans cette poudre ; ce solvant a été choisi parce qu'il est non toxique et qu'il peut être facilement éliminé. Puis, le solvant a été évaporé et la bixine obtenue a été remise en suspension dans le 2-méthyl-2-méthanol (M<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) à deux concentrations molaires différentes de 0,06 M ou 1,2 M.

Plusieurs mélanges de différents solvants ont été utilisés pour les analyses qualitatives par CCM de l'échantillon de bixine. Cependant, le mélange butanol/acide acétique/eau (60/20/20) a été choisi parce qu'il permet une bonne séparation des substrats et des produits de synthèse. Il sera utilisé au cours de cette étude, pour les analyses qualitatives des échantillons obtenus au cours des réactions de synthèse.

Dans un premier temps, une analyse en CCM a été réalisée afin de déterminer le rapport frontal (Rf) de la bixine. Un Rf de 0,9 a été obtenu pour la bixine (fig. III.30).

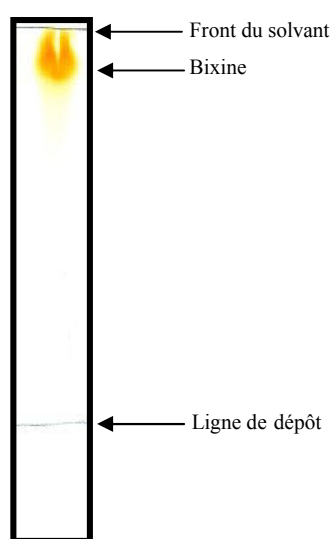


Figure III.30. Analyse en chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait de l'annatto poudre issue de la graine de *Bixa orellana*. Le solvant de migration utilisé est le butanol/acide acétique/eau (60/20/20).

### III.6.1.2. Mise en évidence des produits de dégradation de la bixine par CLHP couplée à la spectrométrie de masse

L'extrait éthanolique a été analysé par CLHP couplée à la spectrométrie de masse afin de caractériser plus finement les molécules présentes. En effet, des produits de dégradation de la bixine peuvent être également retrouvés puisque celle-ci est notamment sensible aux traitements thermiques (Scotter, 1995 ; Scotter *et al.*, 2001). Pour les analyses, nous avons utilisé une colonne C<sub>18</sub> et un gradient méthanol/eau (80/20) + TFA (0,1 %) avec une durée d'analyse de 30 mn. Comme le montre la figure III.31, un pic majoritaire est mis en évidence avec un temps de rétention de 5,61 mn qui pourrait être la bixine. La détection a été réalisée à

une longueur d'onde de 450 nm, couramment décrite dans la littérature, pour la détection de la bixine en CLHP (Kovary *et al.*, 2000).

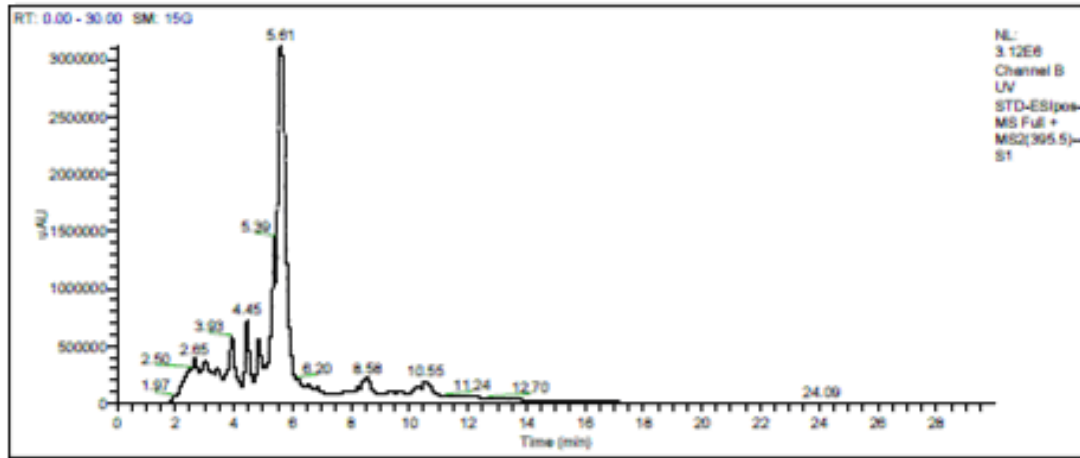


Figure III.31. Chromatogramme UV ( $\lambda = 460$  nm) de la bixine ( $t_r = 5,61$  mn).

Pour confirmer que le pic majoritaire à 5,61 mn, correspond spécifiquement à la bixine, une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) a été réalisée. Le spectre de masse, en mode positif, est montré dans la figure III.32 où un signal majoritaire à  $m/z = 395,3$  (bixine,  $M+H^+$ ) est observé, correspondant à un temps de rétention de 5,3 mn (temps de rétention sur cette chaîne chromatographique couplée à la spectrométrie de masse). La masse observée à 377,4 g/mol, correspond à la masse de la bixine avec perte d'une molécule d'eau qui est due à la déshydratation de la molécule dans la source du spectromètre de masse.

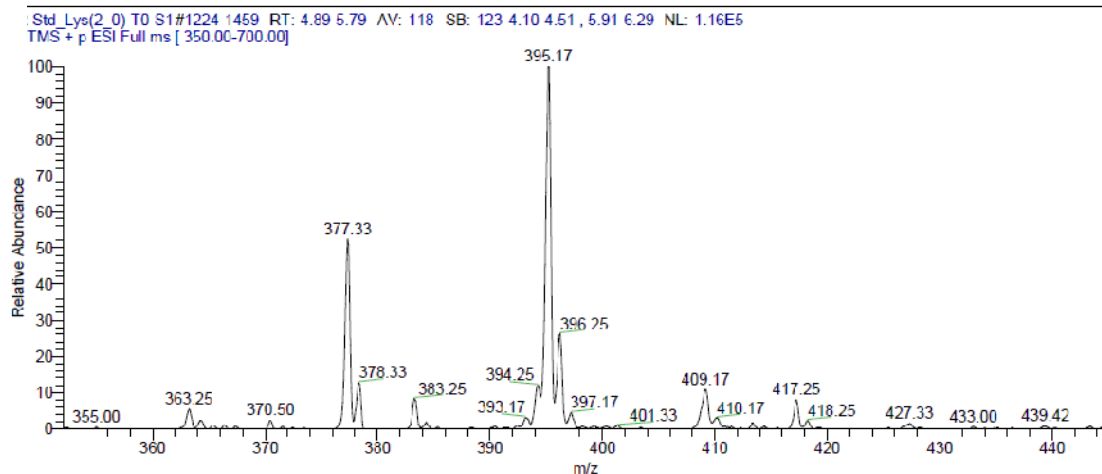


Figure III.32. Spectre de masse - electro-spray en mode positif pour le pic à 5,4 mn de l'extrait éthanolique de la poudre issue de la graine de *Bixa orellana*.

Il est à noter que le pic obtenu à 395,3 (bixine) correspond non pas à un seul pic mais à deux pics qui peuvent être visualisés dans le chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique de l'ion  $m/z$  à 395, indiquant la présence dans l'échantillon des formes cis et trans de la bixine (fig. III.33). En fait, le composé majoritaire de ce colorant alimentaire est la 9'-cis-bixine mais une isomérisation vers la forme trans, thermodynamiquement plus stable, est très souvent observée (Scotter *et al.*, 2001).

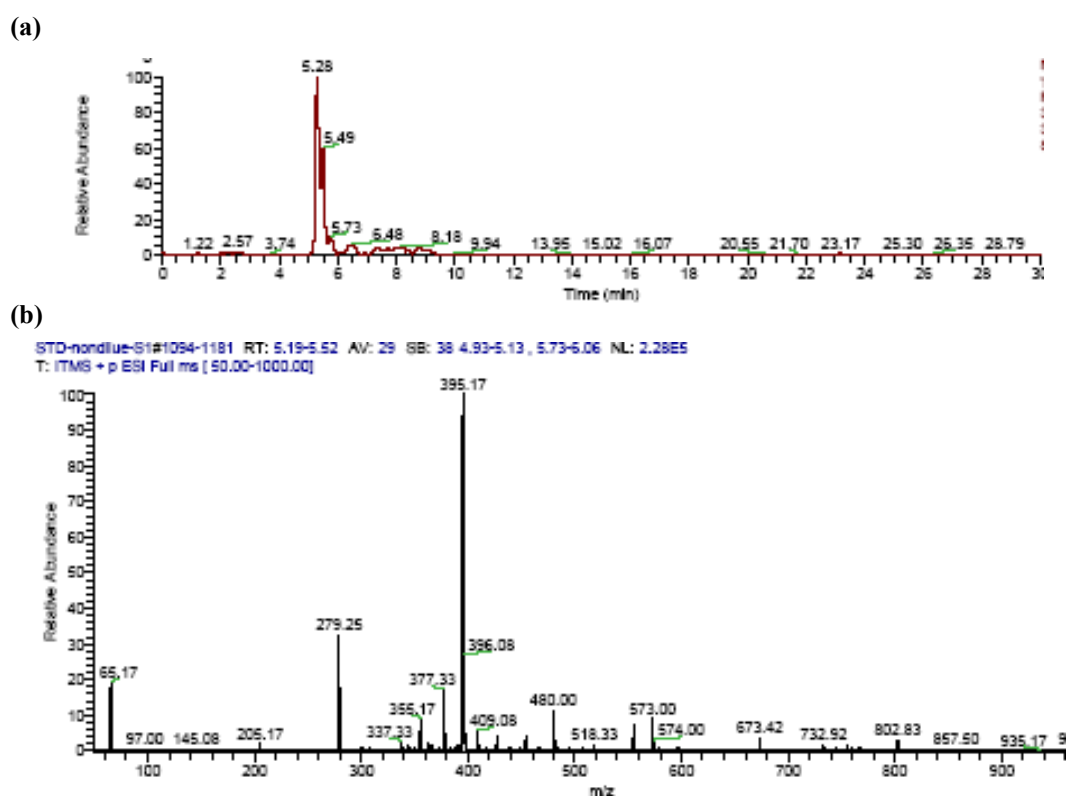
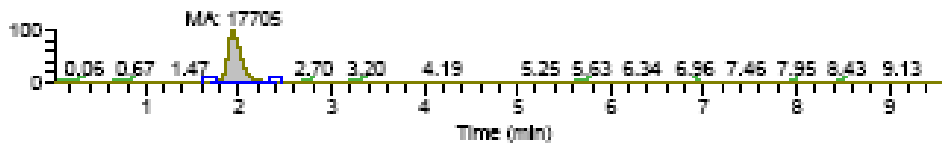


Figure III.33. Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique correspondant à  $m/z$  de 395 (a) montrant les deux pics à des temps de 5,28 et 5,49 mn correspondants aux deux isomères de la bixine pour un  $m/z$  de 395 ; spectre de masse (b).

Par ailleurs, la présence éventuelle de norbixine, qui pourrait être obtenue par hydrolyse de l'ester méthylique de la bixine, a été recherchée. La mise en évidence de la masse de la norbixine ( $M+H^+ = 381$ ), correspondant à un temps de rétention de 2 mn dans le chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique spécifique de  $m/z = 381$  (fig. III.34) démontre la présence effective d'une faible quantité de norbixine dans l'extrait éthanolique.

(a)



(b)

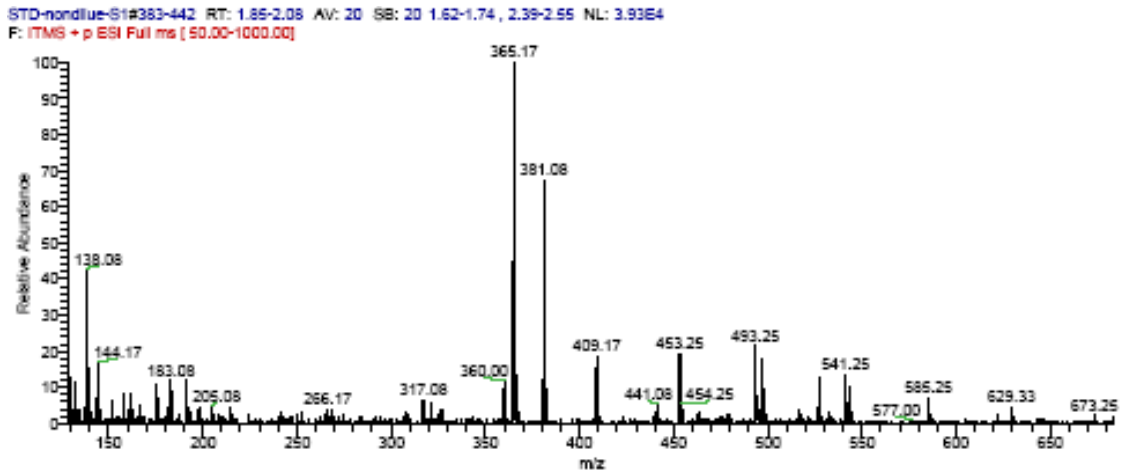


Figure III.34. Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique de l'ion 381 à un temps de rétention de 2 mn (a), correspondant à  $m/z = 381$  (norbixine +  $H^+$ ) (b).

La présence d'ester monométhyle de l'acide 4,8-diméthyl-tétradécahexanoïque (appelé C17) provenant de la libération de xylène (fig. III.35) et qui est un produit de dégradation de la bixine, décrit comme prépondérant lors d'un traitement thermique a été également recherchée. Le chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique total à cette molécule est présenté dans la figure III.36.

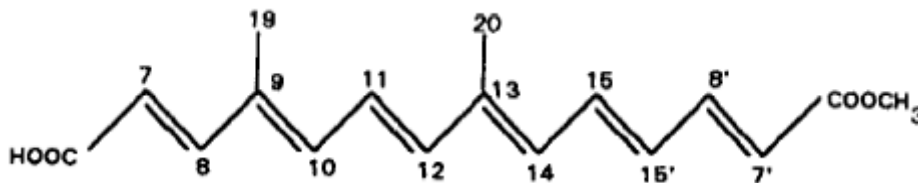


Figure III.35. Produit majoritaire de la dégradation thermique de la bixine : ester monométhyle de l'acide 4,8-diméthyl-tétradécahexanoïque (C17), selon Scotter *et al.* (2001).

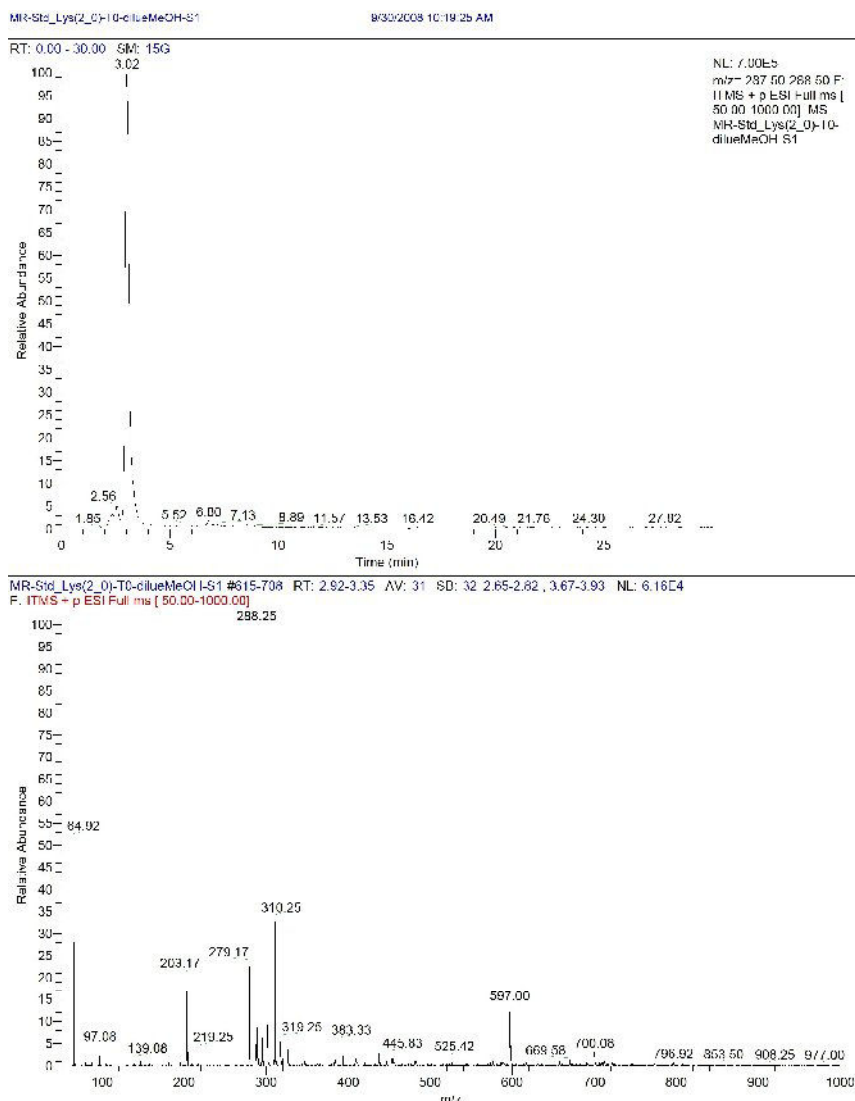


Figure III.36. Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique total à un temps de rétention de 3 mn (a), correspondant à  $m/z = 288$  pour la molécule C17 et  $m/z$  de 310 ( $M+Na^+$ ).

Par ailleurs, un suivi de la stabilité de la bixine au cours du temps, durant 72 h, a été réalisé par spectrométrie de masse, dans les conditions réactionnelles de synthèse envisagées ; à cette fin, la bixine (0,06 M) a été placée dans du 2-méthyl-2-butanol et incubée à la température de 50 °C (fig. III.37). La faible évolution des aires qui correspondent aux deux isomères de la bixine, met en évidence que ce caroténoïde est peu dégradé au cours du temps, dans les conditions de mise en œuvre du système, notamment à 50 °C.

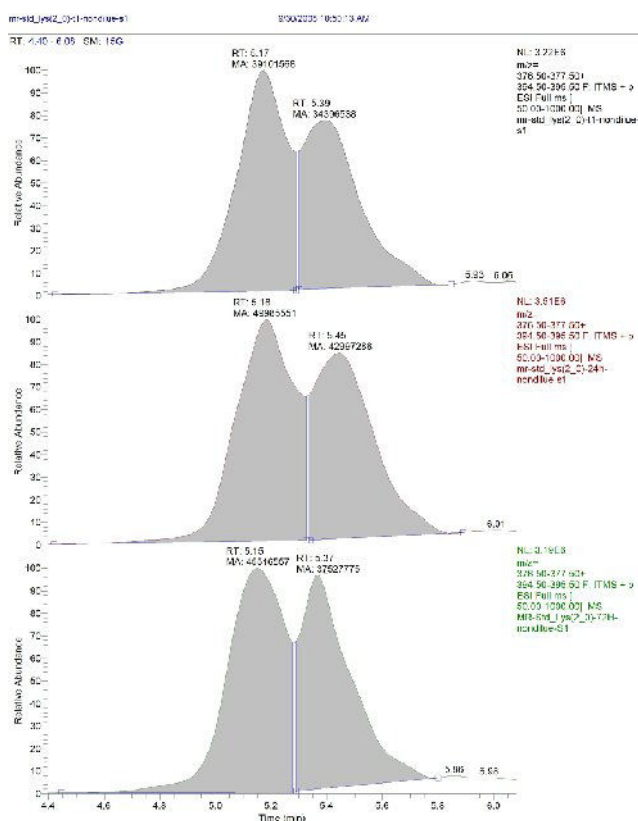


Figure III.37. Suivi, par spectrométrie de masse (courant ionique pour  $m/z = 395$ ), des deux isomères de la bixine placée dans  $M_2B_2$  à  $50\text{ }^\circ\text{C}$  pour les temps  $t_0$ , 24 h et 72 h.

De la même façon, la bonne stabilité de la norbixine et du composé de dégradation C17, présents en faibles quantités dans l'extrait éthanolique, a été vérifiée avec des quantités n'augmentant pas lorsqu'ils sont placés durant 72 h dans du  $M_2B_2$  à  $50\text{ }^\circ\text{C}$  qui sont les conditions réactionnelles attendues pour la réaction d'acylation.

En conclusion, cette partie préliminaire a montré que :

- la bixine était le composé majoritaire de l'extrait éthanolique de la poudre de colorant alimentaire,
- les deux isomères de bixine étaient présents et,
- la norbixine et le composé C17, deux molécules issues de la dégradation de la bixine étaient également retrouvées mais en plus faibles quantités,
- tous ces composés paraissent stables dans les conditions d'acylation enzymatique.



### III.6.2. Mise en œuvre de l'acylation enzymatique de la lysine par la bixine

La bixine possède une fonction carboxylique (-COOH) et une fonction ester méthylique (-COOCH<sub>3</sub>) terminale ; par acylation directe ou par transacylation, plusieurs produits peuvent être obtenus. Par contre, concernant la norbixine, seule l'estérification directe peut se produire comme montré dans la figure III.38.

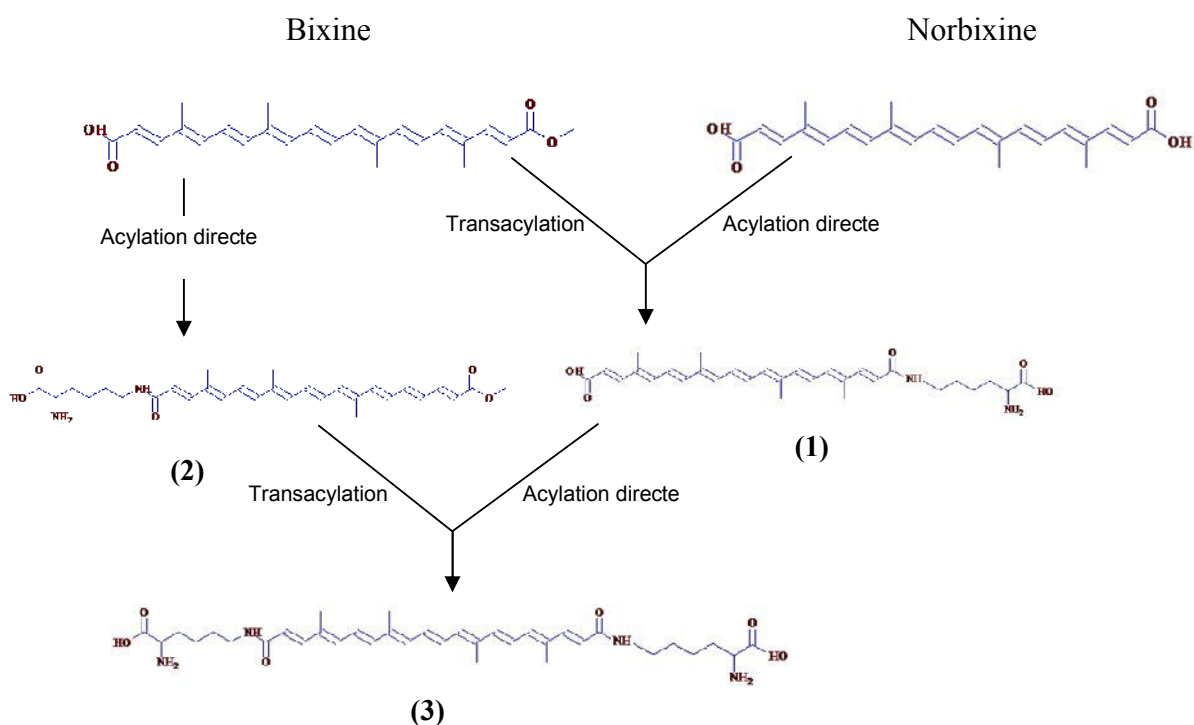


Figure III.38. Schéma réactionnel de formation potentielle de composés mono et/ou diacylés lors de l'acylation de la lysine avec la bixine ou la norbixine.

Ainsi, trois produits de synthèse principaux peuvent être éventuellement obtenus :

- par acylation directe de la norbixine ou transacylation de la bixine, le produit monoacylé (1) avec une masse molaire = 508 g/mol,
- par acylation directe de la bixine, un produit (2) de masse molaire = 522 g/mol,
- un produit diacylé (3) pourrait être également synthétisé. De plus, les produits de dégradation de la bixine, présents dans l'extrait éthanolique peuvent également constituer des agents acylants potentiels.

La synthèse est effectuée dans un réacteur de 50 mL, Wheaton<sup>®</sup>, régulé en température. Le réacteur est recouvert de papier aluminium, pour limiter les dégradations liées à la lumière. Tous les substrats ont été placés avec le solvant dans le réacteur et le milieu a été balayé avec un courant d'azote pour éviter les phénomènes d'oxydation au cours de la réaction. La composition du milieu réactionnel et les conditions opératoires sont présentées dans le tableau III.17.

Tableau III.17. Composition du milieu réactionnel et conditions opératoires de la réaction d'acylation.

		<b>Composition</b>
<b>Solvant</b>	2-méthyl-2-butanol	10 mL
<b>Substrat</b>	Lysine	0,06 M
<b>Substrat</b>	Bixine	0,06 M
<b>Température</b>		50 °C
<b>Agitation</b>		700 rpm
<b>Enzyme</b>	Novozym 435 <sup>®</sup>	20 g/L

### III.6.2.1. Analyse qualitative des produits de synthèse

Des analyses par CCM ont été réalisées, dans un premier temps, pour mettre en évidence l'apparition des produits au cours de la réaction d'acylation. Comme décrit au § III.6.1.1, le butanol/acide acétique/eau (60/20/20), a été utilisé pour la séparation des substrats et des produits de l'acylation. La figure III.39 représente un chromatogramme composé de quatre échantillons prélevés à différents temps réactionnels ( $t_0$ , 24 h, 48 h, et 72 h). La révélation des produits de synthèse est obtenue par pulvérisation avec la ninhydrine, spécifique des fonctions amines primaires.

Dans les conditions de séparation décrites ci-avant, on observe que la bixine, qui n'a pas réagi et est colorée en orange, a migré jusqu'au front de solvant et que la lysine, composé polaire ayant réagi, présente un rapport frontal  $R_f$  de 0,06. Dès 24 h de réaction, l'apparition d'une tache violacée, correspondant à une molécule comprenant une amine primaire, à un  $R_f$  de 0,35 peut être observée. Celle-ci pourrait correspondre à un produit, résultat de l'acylation de la lysine par la bixine. Ce rapport frontal indiquerait la présence d'un seul produit mono-acylé. La solubilité de ce produit de synthèse dans le milieu réactionnel, a été vérifiée. *A priori*, aucun produit diacylé n'est synthétisé.

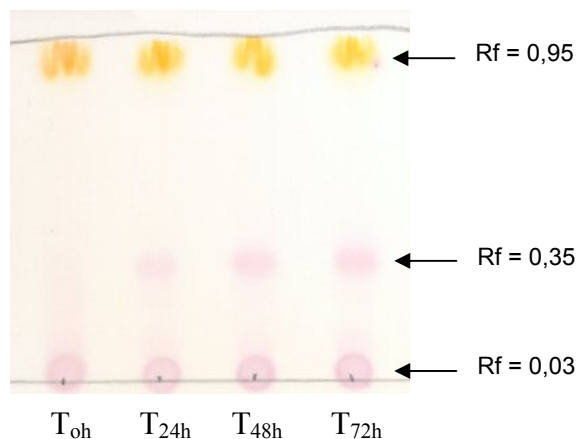


Figure III.39. Suivi d'une réaction préliminaire en chromatographie sur couche mince sur gel de silice comprenant quatre échantillons prélevés au cours de la réaction d'acylation. Solvant de migration : butanol/ acide acétique/ eau (60/ 20/ 20) (v/v/v) et révélation à la ninhydrine.

Le milieu réactionnel a été analysé par spectrométrie de masse afin de mettre en évidence le produit de synthèse (fig. III.40).

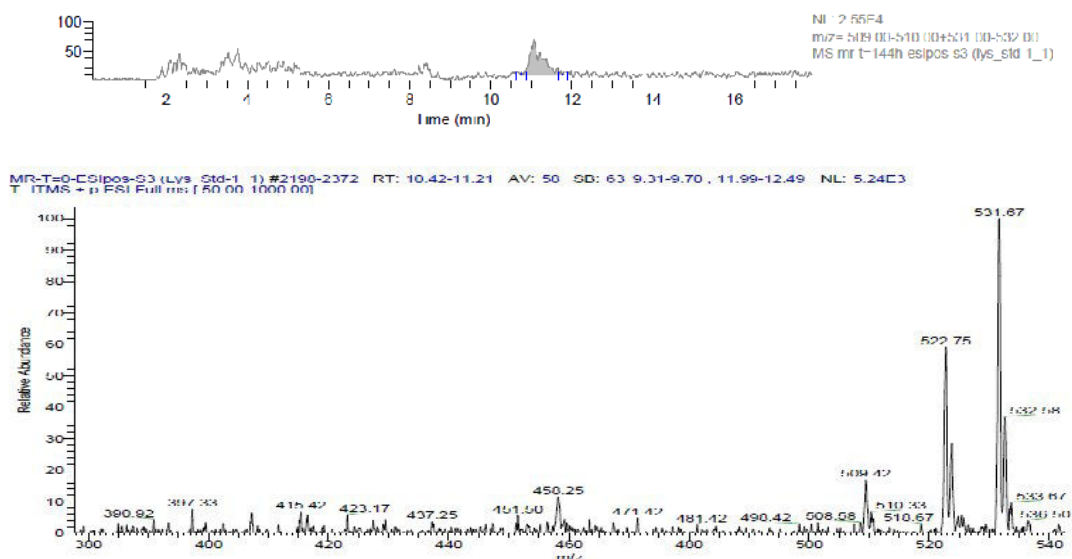


Figure III.40. Spectres de masse, obtenus à l'aide d'une source ESI, en mode positif, avec extraction de l'ion 509 du mélange réactionnel à 72 h.

Les résultats montrent la présence d'une molécule à  $m/z$  de 509,5 g/mol correspondant à la molécule mono-acylée issue de la transacylation de la lysine par la bixine ( $508 + H^+$ ), ou d'une acylation directe par la norbixine (composé 1, fig. III.38). Nous pouvons également observer une masse égale à 531 g/mol, correspondant à un adduit sodium formé pendant

l'ionisation du 509,5 g/mol, qui confirme la présence de cette molécule. Ces observations conduisent à valider la présence d'un produit mono-acylé dans le mélange réactionnel et à supposer l'absence de produit diacylé même en très faible quantité.

### III.6.2.2. Influence de certains paramètres opératoires

Une étude a été réalisée sur l'influence de deux paramètres opératoires essentiels d'un point de vue cinétique : la température et le rapport molaire sur les performances de la réaction.

#### III.6.2.2.1. Choix de la température

La température est un facteur important parmi les paramètres qu'il faut contrôler, parce que les caroténoïdes sont très sensibles à son effet (§ I.1.7) et qu'ils peuvent se dégrader rapidement en cas de température élevée. La température influe également sur l'activité catalytique de l'enzyme. Cependant, la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym<sup>®</sup> 435) est particulièrement thermostable et il est connu que cette enzyme présente une bonne activité à haute température (Sekeroglu *et al.*, 2004 ; Matsuo *et al.*, 2008, Réjasse *et al.*, 2004).

Pour ces essais, une concentration de 0,06 M a été utilisée pour chacun des deux substrats. Les effets de la température à 50 °C et à 80 °C ont été comparés à partir des données issues des prélèvements réalisés au cours du temps, pendant 72 h, et étudiés qualitativement par l'observation, en CCM, des taches des substrats et des produits de la réaction.

A une température de 80 °C, une apparition très élevée de produits secondaires, issus probablement d'une forte dégradation de la bixine et une absence de production du produit mono-acylé ; ce dernier a été, par contre, mis en évidence à 50 °C. Ces résultats confirment ceux mis en évidence dans la littérature (Lyng *et al.*, 2005).

Ainsi, nous avons choisi la température de 50 °C comme condition opératoire, pour la suite de l'étude.

## III.6.2.2.2. Choix du rapport molaire en substrat

Le rapport molaire est un paramètre opératoire directement lié à la cinétique de production du ou des produits de la réaction. Ainsi, plusieurs facteurs peuvent avoir un effet positif ou négatif comme la nature du solvant dans lequel se déroulera la réaction.

Nous avons étudié l'influence du rapport molaire des deux substrats, lysine / bixine, sur la synthèse du produit mono-acylé. Le rapport molaire idéal dépend de la réactivité des sites impliqués dans la réaction ainsi que de la conformation du site réactionnel de l'enzyme. Lors de cette étude, trois rapports molaires ont été fixés : 1/2 (0,06 M/0,12 M), 1/1 (0,06 M/0,06 M) et 2/1 (0,12 M/0,06 M).

La formation du produit de synthèse a été visualisée par chromatographie sur couche mince. Le produit possède une coloration jaune très faible, alors la ninhydrine a été employée pour la révélation de la liaison amine primaire de la molécule. La figure III.41 présente le suivi de la cinétique de formation du produit de synthèse et la disparition de la bixine, correspondant aux trois rapports molaires (RM) différents.

Dans les conditions de séparation décrites auparavant, la bixine, qui n'a pas réagi et est colorée en orange, a migré jusqu'au front de solvant et que la lysine, composé polaire ayant réagi, présente un rapport frontal  $R_f$  de 0,06. Dès 24 heures de réaction, l'apparition d'une tache violacée, correspondant à une molécule comprenant une amine primaire, à un  $R_f$  de 0,35 peut être observée. Celle-ci pourrait correspondre à un produit, résultat de l'acylation de la lysine par la bixine. Ce rapport frontal indiquerait la présence d'un seul produit mono-acylé. La solubilité de ce produit de synthèse dans le milieu réactionnel, a été vérifiée. *A priori*, aucun produit diacylé n'est synthétisé.

Les plaques montrent l'apparition d'une tache possédant un rapport frontal de 0,37 après 24 h de synthèse. L'intensité de cette tache correspondant au produit de synthèse augmente au cours de la réaction d'acylation jusqu'à 72 h. Nous avons vérifié que, quel que soit le rapport molaire des substrats, l'intensité des taches correspondant à un  $R_f$  de 0,37 n'augmentait plus pour des durées supérieures, indiquant que l'équilibre thermodynamique est atteint à 72 h.

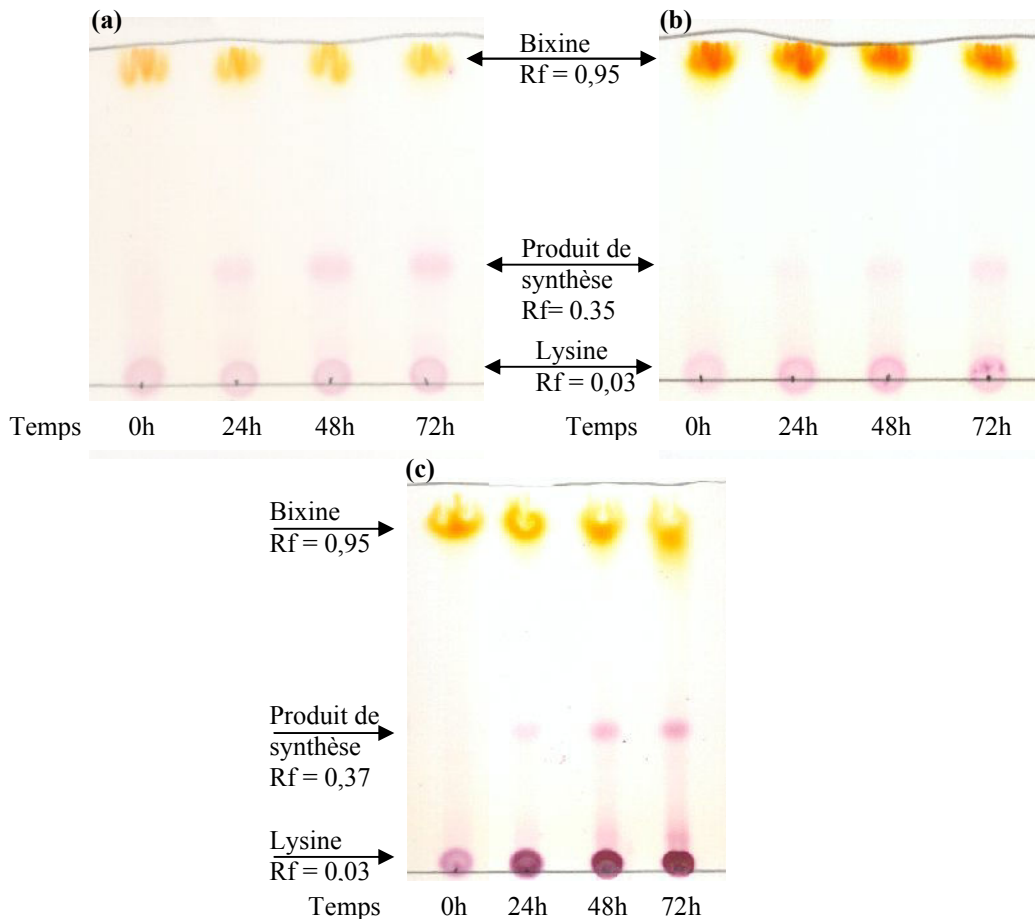


Figure III.41. Suivi de la formation du produit de synthèse par Novozym<sup>®</sup> 435 (20 g/L) sur CCM (gel de silice) en fonction du RM (rapport molaire lysine / bixine) (a) RM = 1/1 ; (b) RM = 2/1 et (c) RM = 1/2. Concentrations molaires des substrats : 1 = 0,06 M et 2 = 0,12 M.

Il apparaît que le rapport molaire de 1/2 favorise une formation plus importante du produit de synthèse que les autres rapports molaires. Il peut être remarqué d'après le chromatogramme (c), qu'après 72 h de réaction, la tache correspondant à la bixine est moins nette (Rf de 0,95), peut-être à cause d'une dégradation de la bixine. A l'opposé, l'intensité de la tache correspondant à la lysine, augmente, indiquant une meilleure solubilisation au cours du temps de cette molécule. Ceci peut être lié aux propriétés tensioactives du produit acylé synthétisé.

Ces résultats sont en accord avec des études déjà rapportées dans la littérature (Maugard *et al.*, 1998), montrant qu'un léger excès d'agent acylant était favorable à la réaction d'acylation et plus particulièrement lors de la formation de liaison amide, cependant un excès trop important d'agent acylant, quand celui-ci est un acide, peut entraîner une modification de l'ionisation de la fonction amine, faisant perdre à celle-ci son caractère nucléophile.

Pour ce qui concerne la fonctionnalisation de caroténoïdes par synthèse enzymatique, il est difficile de comparer les résultats obtenus pour le type de réaction engagée dans ce travail, étant donné qu'une seule référence décrit une réaction d'acylation par un caroténoïde ; il s'agit de l'acylation de l'acide ascorbique par la bixine ou la norbixine, également réalisée dans du M<sub>2</sub>B<sub>2</sub> (Humeau *et al.*, 2000). Il est à noter que ces auteurs ont observé une conversion trois fois plus élevée de la bixine qu'avec la norbixine, indiquant une prépondérance de la transacylation par rapport à l'acylation directe.

### III.6.2.3. Purification du produit de synthèse

La purification du produit de synthèse a été réalisée, pour vérifier son identité et évaluer les activités antiradicalaires de cette molécule. La purification du produit de synthèse, a été réalisée sur silice comme phase stationnaire. L'éluant suivant a été utilisé pour la séparation : butanol/acide acétique/eau (60/20/20 – v/v/v). L'échantillon dissous dans l'acétone (1 mL) a été injecté et un collecteur de fraction a permis de récupérer des fractions de 3 mL. 70 fractions ont été ainsi collectées, analysées par série de 5 échantillons par CCM. Les fractions collectées possédant le produit résultant de la synthèse ont été analysées une par une. Enfin, ces fractions ont été mélangées, le solvant a été évaporé et le produit a été remis en suspension dans le solvant.

Après purification, une analyse par CCM a été réalisée pour vérifier la pureté du produit obtenu (fig. III.42).

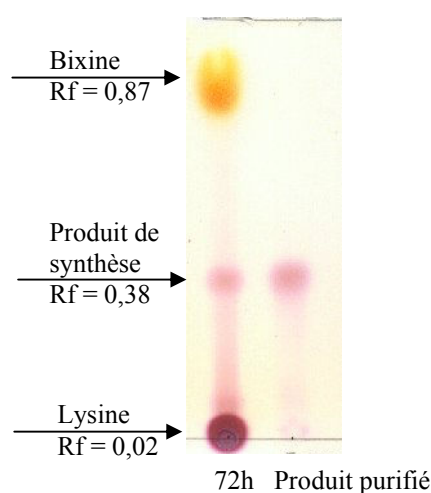


Figure III.42. Analyse d'évaluation, par CCM, de la pureté de l'échantillon purifié à partir d'un milieu réactionnel de fin de réaction (72 h) et le produit purifié sur colonne de silice.

Ces résultats montrent que le produit a été correctement purifié. Ce produit possède un  $R_f = 0,38$ . Il a été analysé par CLHP couplé à la spectrométrie de masse. Une recherche des masses des produits formés à partir de l'acylation ou de la transacylation de la lysine par la bixine, a été effectuée. La figure III.43 montre le spectre de masse du produit purifié correspondant à l'ion extrait 509 ( $M+H^+$ ). L'adduit sodium formé ( $M+Na^+ = 531$ ) permet de confirmer la présence du produit mono-acylé.

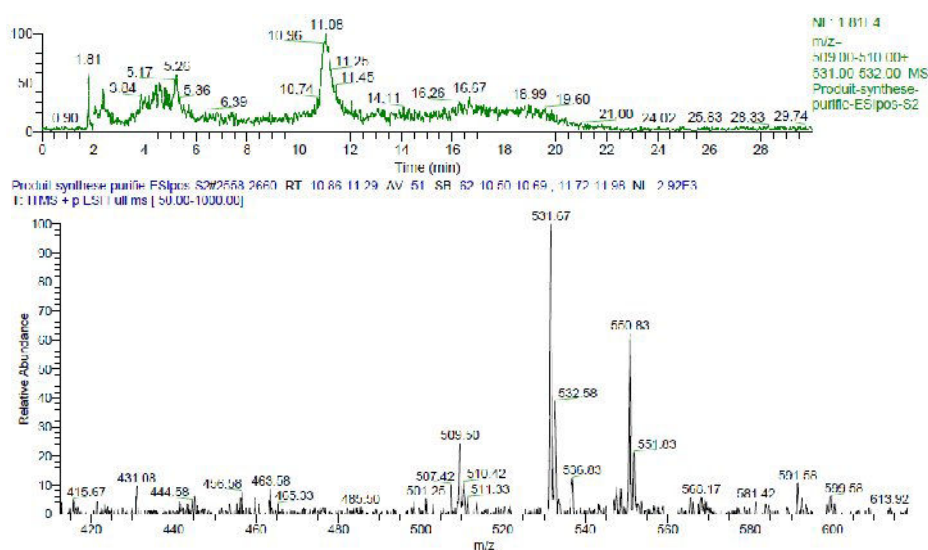


Figure III.43. Chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique de l'ion 509 du produit purifié.

Analyse par spectrométrie de masse-ESI en mode positif.

Aucune formation d'un produit diacylé n'a été observée au cours de cette étude, ce qui confirme la seule existence d'une transacylation, dans les conditions opératoires mises en jeu ; phénomène déjà observé par Humeau *et al.* (2000) dans le cas de la réaction d'acylation de l'acide ascorbique par la bixine, dans des conditions parfaitement similaires.

#### III.6.2.4. Activité antiradicalaire de la bixine et de son dérivé

Après avoir identifié et purifié le produit monoacylé, l'activité antiradicalaire de la bixine et de son dérivé a été évaluée à l'encontre du radical DPPH $\cdot$ . Pour comparer ces activités, deux autres caroténoïdes standard (canthaxanthine et  $\beta$ -carotène) ont été utilisés à des concentrations comprises entre 0,08 mM et 0,2 mM. L'activité antiradicalaire des 4 molécules est présentée dans la figure III.44.



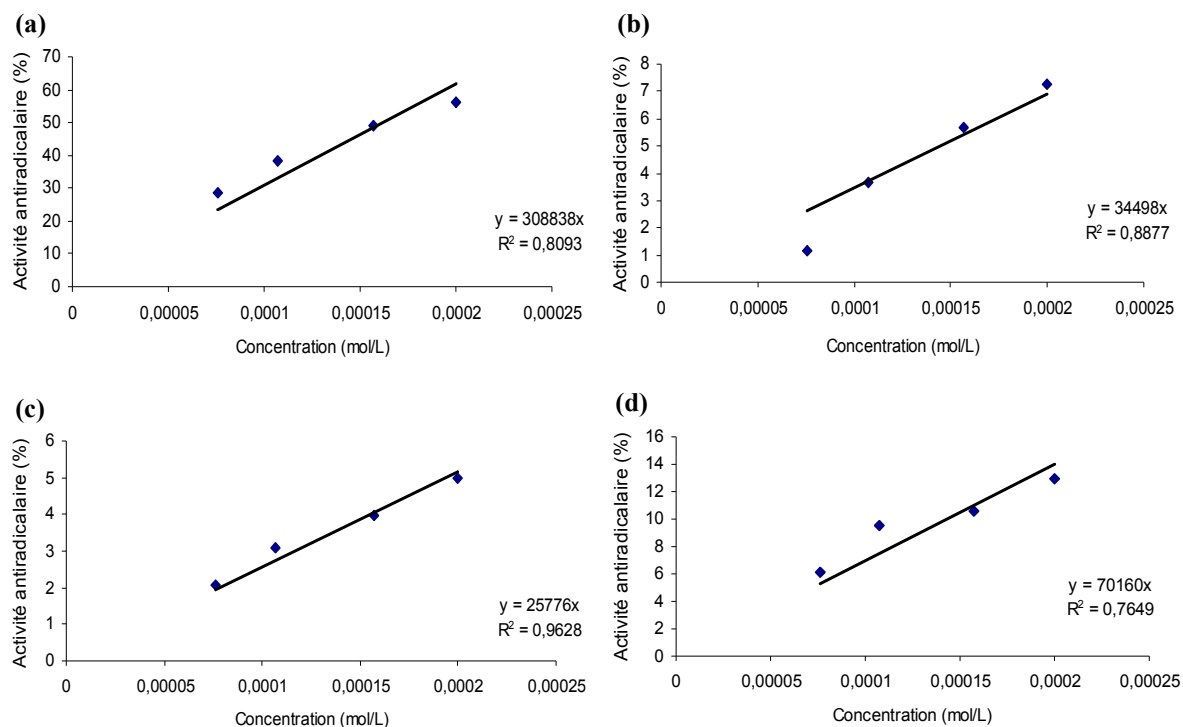


Figure III.44. Mesure de l'activité anti-radicalaire envers le DPPH<sup>•</sup> pour différentes concentrations de caroténoïdes (a) β-carotène, (b) canthaxanthine, (c) bixine et (d) du dérivé de la bixine.

Ces résultats montrent que pour toutes les molécules, l'activité antiradicalaire est une fonction linéaire de la concentration du caroténoïde et que le β-carotène possède une capacité plus grande à piéger les radicaux DPPH<sup>•</sup> que la canthaxanthine, la bixine et le dérivé de la bixine.

La concentration de β-carotène qui permet de piéger 50 % des radicaux DPPH<sup>•</sup> est de l'ordre de 0,16 mM. Ce résultat est en concordance avec celui rapporté par Jimenez-Escrig *et al.* (2000) indiquant une activité antiradicalaire de 54 % pour une concentration de 0,15 mM de β-carotène. A la même concentration de 0,16 mM, l'activité antiradicalaire des différents caroténoïdes est présentée dans le tableau III.18. Il est à noter que la canthaxanthine et la bixine ont une activité antiradicalaire similaire et relativement faible. Par contre, le dérivé de la bixine présente une activité antiradicalaire plus de deux fois supérieure à celle de la bixine, indiquant que la réaction d'acylation n'a pas affecté l'activité antiradicalaire de la bixine, plus de dix fois plus faible que celle du β-carotène.

Tableau III.18. Activité antiradicalaire de différents caroténoïdes pour une concentration de 0,16 mM.

Caroténoïde	Concentration	DPPH
$\beta$ -carotène	0,16 mM	50 %
Canthaxanthine	0,16 mM	5,5 %
Bixine	0,16 mM	4 %
Dérivé acylé de bixine	0,16 mM	10 %

### III.6.3. Fonctionnalisation de la torularhodine

Les conditions réactionnelles ayant permis l'acylation de la lysine par la bixine ont été appliquées à la réaction d'acylation par la torularhodine. Comme la torularhodine n'est pas disponible commercialement, son obtention s'est faite par l'extraction des caroténoïdes issus de la culture de *Sporobolomyces ruberrimus*. L'extraction de l'échantillon s'est déroulée comme cela est décrit au § II.4.5, par désintégration de cellules à l'aide d'un homogénéisateur type presse de French et la récupération d'un mélange de caroténoïdes qui a été utilisé pour la réaction d'acylation enzymatique.

Tableau III.19. Conditions opératoires mises en œuvre pour la réaction d'acylation de la torularhodine.

		Composition
<b>Solvant</b>	2-Méthyl-2-butanol	10 mL
<b>Substrat</b>	Lysine	0,06 M
<b>Substrat</b>	Torularhodine	0,12 M
<b>Température</b>		50 °C
<b>Agitation</b>		700 rpm
<b>Enzyme</b>	Novozym 435 <sup>®</sup>	20 g/L

La purification de la torularhodine n'ayant pu être réalisée dans des conditions suffisamment simples, le mélange de caroténoïdes obtenu, dans lequel on retrouve essentiellement la torularhodine mais aussi, en moindres quantités, le  $\beta$ -carotène, le  $\gamma$ -carotène, le torulène, a servi de substrat acylant ; rappelons toutefois que le seul caroténoïde possédant une fonction carboxylique terminale est la torularhodine. Les conditions opératoires pour la réaction d'acylation de la torularhodine sont indiquées dans le tableau III.19.

L'analyse cinétique de la réaction peut être faite à partir des données de CCM rassemblées dans la figure III.45. Deux tâches ( $R_f = 0,9$  et  $0,25$ ) de coloration violette détectées à la ninhydrine sont observées. Ce résultat montre, qu'outre les caroténoïdes qui ont été identifiés, d'autres molécules sont présentes et porteuses de fonctions amine libre. Cependant aucun éventuel produit de synthèse n'est apparu au cours de la réaction d'acylation. Contrairement aux observations faites lors de l'acylation de la bixine, l'acylation de la torularhodine n'a pas été validée dans les conditions opératoires mises en jeu alors que la concentration de pigments diminue au cours du temps. Cette disparition est probablement liée à la dégradation de la torularhodine par la température. Après 24 h, la dégradation s'intensifie et à 192 h la torularhodine n'est plus visible.

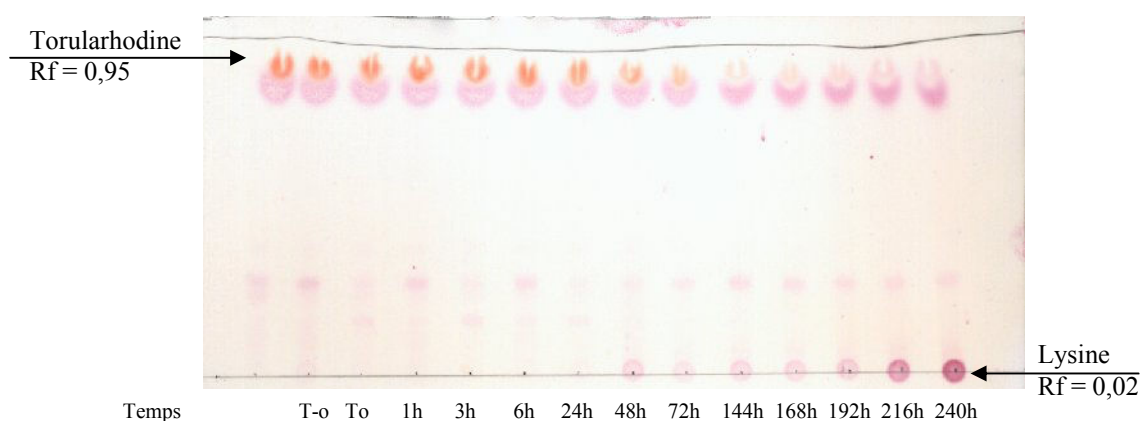


Figure III.45. CCM après révélation à la ninhydrine des échantillons prélevés au cours de la réaction d'acylation de la torularhodine. Rapport 1/2 (Lysine/Torularhodine). T-o correspond au temps juste avant l'ajout de l'enzyme et To le temps du prélèvement 2 mn après l'ajout d'enzyme.

Une réaction d'acylation en présence d'un large excès d'agent acylant, avec une concentration de torularhodine 10 fois plus élevée que la lysine, a été réalisée. A nouveau, ce rapport molaire n'a malheureusement pas conduit à la production d'un produit d'acylation. D'autres conditions réactionnelles devront donc être mises en œuvre pour essayer de limiter la dégradation de la torularhodine et favorisant la réaction d'acylation ; l'ajout d'agent antioxydant tel que BHT ou BHQ pourrait être envisagé puisqu'il a été montré dans ce travail qu'ils limitaient la dégradation de la torularhodine.

#### **III.6.4. Conclusion**

Ce travail représente une contribution originale dans la synthèse d'acyl-lysine à partir d'un caroténoïde pris en tant que donneur de groupe acyle, la bixine. Cependant les conditions ayant permis cette acylation n'ont pas abouti au même résultat avec la torularhodine. Plusieurs voies devraient, à l'avenir, être explorées pour réaliser ce type de synthèse avec la torularhodine. Il pourrait s'agir, notamment, de modifier, dans un premier temps, la fonction carboxylique en l'estérifiant par une réaction de méthylation. De même, il pourrait être envisagé de travailler dans des conditions opératoires modifiées, sous pression réduite afin d'éliminer les molécules d'eau et de déplacer l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse. Il est à noter, par ailleurs, que la réaction d'acylation de la bixine a conduit à améliorer singulièrement l'activité antiradicalaire de la molécule d'origine, permettant en cela d'envisager la synthèse de peptides acylés avec ce type de caroténoïdes afin d'obtenir des architectures moléculaires multifonctionnelles.

## Conclusion et perspectives

---



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### Conclusion générale

Une précédente étude de Razavi (2004), au cours de laquelle une nouvelle souche de *Sporobolomyces ruberrimus* avait été isolée, avait fait apparaître un double intérêt : une capacité élevée à produire la torularhodine, molécule originale (l'un des deux caroténoïdes carbonylés naturels) dotée de propriétés antioxydantes importantes, et l'opportunité d'utiliser du glycérol technique comme substrat carboné et énergétique.

Le présent travail, qui fait suite à l'étude de base engagée par Razavi, a eu un premier objectif essentiel : la détermination des meilleures conditions multicritères compromis pour la mise en œuvre de la souche isolée, dans le but d'atteindre les productions / productivités de synthèse de torularhodine les plus élevées. Un deuxième objectif était de définir les conditions de mise en œuvre de la réaction d'acylation d'un acide aminé, la lysine, avec un caroténoïde donneur d'acyle.

La première étape de l'étude a donc consisté à rassembler des informations, aussi bien qualitatives que quantitatives, pour progresser dans la connaissance globale du comportement métabolique de l'espèce étudiée. Ces informations concernent deux aspects fondamentaux : la croissance cellulaire et la production du caroténoïde d'intérêt, la torularhodine. Un préalable a été d'adapter une technique d'extraction complète des pigments à l'aide d'une presse de French. Cette procédure s'est révélée propre et efficace, tout en conduisant à des échantillons contenant de l'ordre de 40 % de matière protéique. Ensuite, disposant d'échantillons représentatifs des caroténoïdes, une étude comparative du comportement de *Sporobolomyces ruberrimus* en présence de glycérol technique, issu de la filière des biocarburants de type gazole, et d'un milieu de référence obtenu à partir de glycérol pur, a pu être établie. Pour cela, deux glycérols techniques comprenant des quantités d'acides gras allant du simple au double ont été utilisés.

Une première approche qualitative, en absence de régulation du pH et de l'oxygène dissous, réalisée à l'aide de cultures en boîtes de Pétri et en fioles d'Erlenmeyer a contribué, par l'appréciation visuelle de la coloration des cultures en boîte de Pétri, à noter que l'ajout d'acide oléique à 3,5 mM favorisait l'apparition d'une couleur rouge vif caractéristique de la

torularhodine. Par contre, une concentration supérieure de 7 mM semblait inhibitrice soit de la croissance cellulaire, soit de la production de torularhodine.

Toujours dans le cadre de cette étude préliminaire, une étude quantitative, en conditions contrôlées, a été réalisée en bioréacteur de 3 L afin d'apprécier les effets réels des différentes sources de glycérol : un pur et deux techniques. Toutefois, plusieurs « réglages » ont dû être réalisés pour s'assurer de « l'exactitude » de la mesure de la quantité de biomasse produite et, par conséquent, des données sur les caroténoïdes synthétisés au niveau intracellulaire. Cet inconvénient était lié à la mesure densitométrique qu'une évolution de la couleur des cellules perturbait. Le deuxième « réglage » a consisté à dissoudre les acides gras ajoutés au milieu de culture. Ce problème a été solutionné en diluant ces acides gras dans un petit volume d'éthanol avant ajout au milieu de culture, sans effet sur le comportement métabolique de la souche utilisée.

Une étude comparative des cinétiques de croissance et de production des caroténoïdes, en bioréacteur, en présence de glycérol pur et technique, a alors confirmé l'intérêt de la présence d'acides gras en concentration la plus élevée. Le choix du glycérol technique le plus pauvre en acides gras a été retenu pour la suite de ce travail.

La deuxième étape a consisté en une étude cinétique qui avait pour but de définir, par une approche quantitative sur la croissance et la production de la torularhodine, les facteurs opératoires susceptibles d'avoir une influence sur le déroulement de la culture. La base des comparaisons s'est faite sur les données obtenues au moment de la disparition du glycérol-molécule, du milieu. Les effets de ces facteurs ont été étudiés en présence de glycérol pur afin de servir de référence au regard des résultats obtenus avec le glycérol technique choisi. La température et le pH, bien que connus pour leur effet sur la croissance ont été maintenus constants à des valeurs considérées comme les meilleures par Razavi (2004), soit 23 °C et 6, respectivement. L'étude a tout d'abord porté sur l'effet de la nature des acides gras, avec des ajouts différenciés des acides oléique, linoléique, palmitique (présents dans le glycérol technique) et stéarique à une concentration de 2 g/L chacun. Le but a été de choisir le « co-substrat » du glycérol favorisant, de préférence la croissance et la production de torularhodine ; cet acide est l'acide oléique. Ce résultat a été équivalent avec les deux sources de glycérol employées. L'étude s'est poursuivie en mesurant l'effet quantitatif de l'acide oléique avec des ajouts permettant d'accroître sa concentration de 2, 5 10, 15 et 20 g/L de milieu de culture. Globalement, un léger effet positif a été noté sur la croissance pour 15 g/L



alors que, pour ce qui concerne la production de torularhodine, un effet croissant, mais également assez faible a été observé jusqu'à 10 g/L ; au-delà, la production a décliné.

Le dernier effet recherché a été celui du taux d'oxygénation, c'est-à-dire celui de la disponibilité de l'oxygène dissous. Trois valeurs du taux ont été choisies : 10, 50 et 80 %. A 10 % l'effet inducteur de limitation de la croissance a été vérifié induisant la plus faible production de caroténoïdes. A 80 %, la croissance n'a pas été meilleure qu'à 50 % mais la production de torularhodine s'est avérée, de loin, la plus élevée. En fait, cette accumulation serait liée, selon certains auteurs, au rôle de défense de ce caroténoïde contre l'exposition aux effets négatifs de l'oxygène à l'égard de la levure qui développerait, alors, un système de défense.

Ainsi, dans une première approche expérimentale, deux facteurs ont semblé avoir une action sur le comportement métabolique de *Sporobolomyces ruberrimus*, tant du point de vue de la croissance que de celui de la production de torularhodine. Une étude statistique basée sur les données de concentration de la biomasse et de concentration spécifique de la torularhodine, obtenues au moment de la disparition du glycérol (en fin de période de croissance), a conduit à une conclusion de tendance identique ; c'est pourquoi l'étude a été poursuivie en retenant ces deux facteurs, les apports quantitatifs d'acide oléique et d'oxygène dissous, auxquels est ajouté la température capable de jouer un rôle modulé en fonction de la variation des autres facteurs. A partir de ce moment, une stratégie expérimentale multicritère basée sur deux types de plans optimaux considérant la D-optimalité et la rotatabilité, a été élaborée et mise en place pour définir un ensemble d'expériences englobant celles déjà réalisées ; cette démarche représente un avantage certain au regard des autres types de plans classiques.

Dans une troisième étape, ce plan a abouti à une modélisation du taux de croissance maximum en accord avec les valeurs obtenues au cours de l'étude cinétique de la croissance. Cependant, la modélisation de la concentration de torularhodine n'a pas conduit à des résultats comparables à ceux supposés et attendus lors de l'étude de l'influence des acides gras, pour laquelle une amélioration de la production de torularhodine semblait observée par l'ajout de différentes quantités d'acide oléique. Ce résultat pose la question du choix du nombre et de la qualité des observables, ou plus exactement des observés choisis pour représenter un phénomène, qu'il s'agit de retenir pour une bonne appréciation des effets physiquement enregistrés. Il semble donc que, malgré les observations expérimentales et la confirmation de l'étude statistique initiale, les observés (détermination de la concentration

spécifique en torularhodine) utilisés dans les calculs pour la validation des effets, ne conduisent pas à une adéquation entre les données physiquement validées et les données calculées à partir des mesures faites au moment où le glycérol a disparu du milieu.

La définition des conditions de mise en œuvre de la réaction d'acylation enzymatique d'un acide aminé, la lysine, avec un caroténoïde donneur d'acyle a constitué un second objectif de ce travail. Ce type de réaction n'ayant jamais été proposé dans la littérature, a, par conséquent, constitué un défi. Dans ce contexte, la première démarche a été de déterminer des conditions réactionnelles d'acylation adéquates avec une molécule modèle, en l'occurrence la bixine, seul caroténoïde naturel possédant une fonction acide carboxylique, mais également une deuxième fonction carboxylique méthylée. L'utilisation de la lipase B de *Candida antarctica* en milieu organique, constitué de 2-méthyl-2-butanol, a conduit à la synthèse d'un dérivé aminé de la bixine par une réaction de transacylation. Cette démarche représente une contribution originale dans la synthèse d'acyl-lysine à partir d'un caroténoïde pris en tant que donneur d'acyle. Des conditions réactionnelles (50 °C et rapport molaire de 2 lysine pour 1 bixine) ont été déterminées pour une synthèse observable du dérivé aminé de la bixine qui, après purification, a été identifié par spectrométrie de masse. Un signal  $m/z$  de 509 a confirmé qu'il s'agissait d'un produit obtenu par transacylation de la lysine avec la bixine. Cette réaction dite de fonctionnalisation de la bixine a abouti à une molécule dont l'activité antiradicalaire s'est montrée 2,5 fois plus importante que celle du caroténoïde d'origine, la bixine. Ce résultat représente un encouragement pour mettre en place des stratégies de modification structurelles des molécules portant des propriétés ou des bioactivités effectives. Toutefois, les conditions ayant permis cette acylation n'ont pas abouti au même résultat avec la torularhodine, très certainement en raison d'une impossibilité de réaliser une réaction de transacylation.

## Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus ouvre un large champ prospectif pour des études complémentaires tant du point de vue de l'optimisation des conditions de mise en œuvre de la culture de *Sporobolomyces ruberrimus* que de celui de la réaction d'acylation.

Un premier niveau intéresse les études complémentaires nécessaires pour la compréhension du comportement métabolique de la levure utilisée et l'optimisation des

conditions opératoires du procédé de production de torularhodine. Il apparaît fondamental de savoir où se situent les systèmes de régulation du métabolisme placés au(x) carrefour(s) des voies conduisant à la croissance et à la production de la torularhodine, sans oublier pour autant, les autres caroténoïdes également accumulés.

Un deuxième niveau correspond à la réalité analytique. Ici, il s'agit de trouver les moyens permettant d'analyser quantitativement les variables d'état manquantes, en améliorant la mesure des acides gras présents dans le milieu de culture.

Un troisième niveau intéresse le choix des facteurs opératoires en vue d'une optimisation globale multicritère. En effet, d'autres critères de plan peuvent être choisis tout comme d'autres facteurs comme, par exemple, le pH. Cependant, il faut noter l'impact expérimental que cela provoquerait.

Un quatrième niveau serait de faire appel aux méthodes du génie microbiologique en observant la réponse dynamique et en état stationnaire de la levure utilisée, à des pulses ou des modifications temporaires d'environnement chimique, en réacteur continu.

Un cinquième niveau correspondrait à la maîtrise de la stabilité de la torularhodine en analysant le ou les produits obtenus (qualité et cinétique) au cours de la dégradation observée de cette molécule, en présence ou non de puissants antioxydants ; ceci ayant pour but de pouvoir maîtriser cette dégradation et les conditions permettant de limiter ce phénomène.

Enfin, le dernier niveau serait, au regard de la fonctionnalisation de la torularhodine, d'envisager :

- la modification de la fonction carboxylique par une estérification méthylique,
- la réalisation de réactions sous pression réduite afin d'éliminer les molécules d'eau et déplacer l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse,
- l'apport d'antioxydants puissants dans le milieu réactionnel, pour éviter une dégradation trop rapide de la torularhodine.



## Références bibliographiques

---



- Aksu, Z.; Eren, A.T. Carotenoid production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem.*, v. 40, p. 2985-2991, 2005.
- Alloue, W. A. M.; Aguedo, M.; Destain, J.; Ghalfi, H.; Blecker, C.; Wathelet, J-P.; Thonart, P. Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, v. 12, p. 57-68, 2008.
- Arita, S.; Otsuki, K.; Osaki, K. I.; Murata, Y.; Shimoishi, Y.; Tada, M. Reduction in Photostability by the Esterification of  $\beta$ -Cryptoxanthin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 68, p.451-453, 2004.
- Bernaerts, K.; Versyck, K.; Van Impe, J. On the design of optimal dynamic experiments for parameter estimation of a ratkowsky-type growth kinetics at suboptimal temperatures. *International journal of food microbiology*, v. 54, p. 27-38, 2000.
- Bhosale, P. And Gadre, R.V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Letters in applied microbiology*, v. 33, p.12-16, 2001.
- Bhosale, P.; Gadre, R.V. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis*. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 34, p. 349-353, 2002.
- Biswas, S.K.; Yokoyama, K.; Nishimura, K.; Miyaji, M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 51, p. 1191-1199, 2001.
- Blasco, X.; Herrero, J. M.; Sanchis, J.; Martínez, M. A new graphical visualization of n-dimensional Pareto front for decision-making in multiobjective optimization. *Information Sciences*, v. 178, p. 3908-3924, 2008.
- Bone, R.A.; Landrum, J. T.; Guerra, L. H.; Ruiz, C. A. Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. *J. Nutr.*, v. 133, p. 992-998, 2003.
- Born, T. L.; Franklin, M.; Blanchard, J. S. Enzyme-Catalysed Acylation of Homoserine: Mechanistic Characterization of the *Haemophilus influenzae met2*- Encoded Homoserine Transacetylase. *Biochemistry*, v. 39, p. 8556-8564, 2000.
- Borowitzka, M.A.; Borowitzka, L.J. Micro-alga Biotechnology. *FEBS*. v. 238, p. 222-223, 1988.
- Bousquet, M.-P.; Willemont, R.-M.; Monsan, P.; Boures, E. Enzymatic Synthesis of Unsaturated Fatty Acid Glucoside Esters for Dermo-Cosmetic Applications. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63, p. 730-736, 1999.
- Butler M. et Huzel N. The effect of fatty acids on hybridoma cell growth and antibody productivity in serum-free cultures. *J. of Biotechnology*. v. 39, p. 165-173, 1995.
- Buzzini, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 24, p. 41-44, 1999.
- Buzzini, P. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis-Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p. 843-847, 2001.
- Cardarelli, C. R.; Benassi, M. T.; Mercadante, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT*, article in press.

- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.*, v. 61, p. 71-76, 1998.
- Davoli, P.; Mierau, V.; Weber, R.W.S. Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 40, p. 460- 465, 2004.
- Derewenda, Z. S.; Derewenda, U.; Dodson, G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 227, p. 818-839, 1992.
- Downham, A.; Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium. *Journal of Food Science and Technology*, v. 35, p. 5-22, 2000.
- Dufossé, L. Microbial production of food grade pigments. *Food techno. Biotechnol.*, v. 44, p. 313-321, 2006.
- Edebo, L. et Magnusson, K.-E. ; Disintegration of cells and protein recovery [en ligne]. Réf. du 20 juillet 2008. Disponible sur : <http://media.iupac.org/publications/pac/1973/pdf/3603x0325.pdf>
- Egloff, M-P.; Sarda, L.; Verger, R.; Cambillau, C. Van Tilbeurgh, H. Crystallographic study of the structure of colipase and the interaction with pancreatic lipase. *Protein Science*, v. 4, p. 44-57, 1995.
- Emery, A.; Nenarokomov, A. Optimal experiment design. *Meas. Sci. Technol.*, v. 9, p. 864-976, 1998.
- Enaud, E. Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques: synthèses d'esters aromatiques des flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*. Thèse: INPL Nancy, 2004.
- Facioli, N. L. et Barrera-Arellano, D. Optimisation of enzymatic esterification of soybean oil deodoriser distillate. *J. Sci. Food Agric.*, v. 81, p. 1193-1198, 2001.
- Faria, L.J.G.; Rocha, S.C.S. Optimization of annatto (*Bixa orellana* L.) drying in fixed bed. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, p. 4-7, 2000.
- Ferreira, E. M. F. C. Identificação e controlo adaptativo de processos biotecnológicos. Thèse: Universidade do Porto, 1995.
- Fickers, P.; Destain, J.; Thonart, P. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, v. 12, p. 119-130, 2008.
- Fonseca, C.M. et Fleming, P.J. Multi-objective genetic algorithm made easy : selection, sharing and mating restriction. *International conference on genetic algorithm in engineering system: Innovations and application*, 12-14, UK.
- Fontana, J.D.; Czczuga, B.; Bonfim, T.M.B.; Chociai, B.H.; Oliveira, M.F.; Guimarães, M.F.; Baron, M. Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Biores. Technol.* v. 58, p.121-125, 1996.
- Fregova, G.; Simova, E.; Pavlova, K.; Beshkova, D.; Grigorova, D. Formation of caroténoïds by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnol. Bioeng.* v. 44, p. 88-94, 1994.
- Frigaard, N-U. Carotenoid biosynthesis, function, and evolution. *University of Copenhagen – Department of Biology*. (ref. du 21/04/2008), disponible sur: <http://www.bio.ku.dk/nuf/index.htm>



- Garbayo, I.; Vilchez, C.; Nava-Saucedo, J.E.; Barbotin, J.N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gabberella fujikuroi*. *Enz. Microbiol. Technol.* v. 33, p. 629-634, 2003.
- Gilbert, M.; Les Peroxisomes. *Sciencebio.com* [en ligne]. Novembre 2005 [réf. du 30 juillet 2008]. Disponible sur: <http://www.sciencebio.com/FacBio/BioCell/Organites/FBOP.htm>
- Goldberg, D.E. Genetic algorithms in search, optimization and machine learning. Ed. Addison-Wesley publishing company, 1989.
- Gong, X.; Chen, F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Proc. Biochem.* v. 33, p. 385-391, 1998.
- Gordon, C. M. New developments in catalysis using ionic liquids. *Applied Catalysis A: General* v. 222(1-2), p. 101-117, 2001.
- Gotor-Fernandez, V. et Gotor, V. Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis Processes in the Preparation of Chiral Nitrogenated Compounds. *Current Organic ChemistryI*, v. 10, p. 1125-1143, 2006.
- Gu, Z.; Chen, D.; Han, Y.; Chen, Z.; Gu, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT-Food Science Techno*, article in press.
- Hajjaj H., Klaébé A., Goma G., Blanc P. J., Barbier E., et François J. Medium-Chain Fatty Acids Affect Citrinin Production in the Filamentous Fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1120-1125, 2000.
- Halsall-Whitney, H.; Taylor, D.; Thibault, J. Multi-criteria optimization of gluconic acid production using net flow. *Bioproc. Biosys. Eng.*, v. 25, p. 299-307, 2003.
- Hart, D.J.; Scott, K.J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, v. 54, p.101-111, 1995.
- Hayman, E.P.; Yokoyama, H.; Chichester, C.; Simpson, K.L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.* v. 120, p. 1339-1343, 1974.
- Herz, S.; Weber, R.W.S.; Anke, H.; Mucci, A.; Davoli, P. Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhdin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. Capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*, article in press.
- Hobbs, H. R.; Thomas, N. R. Biocatalysis in supercritical fluids, in fluoruous solvents, and under solvent-free conditions. *Chemical Reviews*, v. 107(6), p. 2786-2820, 2007.
- Hodisan, T.; Socaciu, C.; Ropan, I.; Neamtu, G. Carotenoid composition of *Rosa canina* fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.16, p. 521-528, 1997.
- Humeau, C.; Girardin, M.; Rovel, B.; Miclo, A. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *Journal of Biotechnology*, v. 63, p. 1-8, 1998.
- Humeau, C.; Girardin, M.; Rovel, B.; Miclo, A. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B*, v. 5, p. 19-23, 1998.

- Humeau, C.; Rovel, B.; Girardin, M. Enzymatic Esterification of Bixin by L-Ascorbic Acid. *Biotechnology Letters*, v. 22, p.156-168, 2000.
- Husson, E.; Humeau, C.; Blanchard, F.; Framboisier, X.; Marc, I.; Chevalot, I. Chemo-selectivity of the N-O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 55, p. 110-117, 2008.
- Ivanov, A. E. et Schneider, M. P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, v. 3, p. 303-309, 1997.
- Jain, N.; A. Kumar, et al. Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron*, Jako, C.; Coutu, C.; Roewer, I.; Reed, D. W.; Pelcher, L. E.; Covello, P. S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science*, v. 163, p. 141-145, 2002.
- Jamrozik, C. Mise en œuvre d'enzymes hydrolytiques pour l'acylation de la lysine par des acides gras en milieu organique. Thèse: INPL Nancy, 2001.
- Jiménez-Escrig, A.; Jiménez- Jiménez, I. ; Sánchez-Moreno, C.; Saura-Calixto, F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, p. 1686-1690, 2000.
- Jongejan, J. A.; Van Tol, J. B. A.; Duine, J. A. Enzymes in organic media : new solutions for industrial enzymatic catalysis ? *Chimica oggi.*, v. 12, p. 15-24, 1995.
- Kaar, J. L.; A. M. Jesionowski, et al. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125(14), p. 4125-4131, 2003.
- Karagiannidou, E.; Storseth, T. R.; Sliwka, H. R.; Partali, V.; Malterud, K. E.; Tsimidou, M. Synthesis of two modified carotenoids and their behavior during light exposure. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 105, p. 419-426, 2003.
- Kiranoudis, C.T. et Markatos, N.C. Pareto design of conveyor-belt dryers. *J. Food Eng.*, v. 46, p. 145-155, 2000.
- Klibanov, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, v. 409, p. 241-246, 2001.
- Knowles, J.D. et Corne, D.W. Approximating the nondominated front using the Pareto archived evolution strategy. *Evolutionary Computation*, v. 8, p. 149-172, 2000.
- Le Garrec, H.; Giamarchi, P.; Cabon, J.Y.; Le Bihan, A. Electrothermic factors optimization in electrothermal atomic absorption spectrometry via an optimal experimental design matrix. *Analytica Chimica Acta*, v. 368, p. 59-70, 1998.
- Lewis, G.A.; Mathieu, D.; Phan-Tan-Luu, R. Pharmaceutical experimental design. Marcel dekker, New-York, 1999.
- Lopez-Serrano, P.; Jongejan, J.A.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. Enantioselective acylation of  $\alpha$ -aminonitriles catalysed by *Candida antarctica* lipase. An unexpected turnover-related racemisation. *Tetrahedron : asymmetry*, v. 12, p. 219-228, 2001.
- Lozano, P.; T. De Diego, et al. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnology Letters*, v. 23(18), p. 1529-1533, 2001.

- Lyng, S. M. O.; Passos, M.; Fontana, J. D. Bixin and  $\alpha$ -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. *Process biochemistry*, v. 40, p. 865-872, 2005.
- Ma, F.; Hanna, M. A. Biodiesel production : a review. *Bioresource Technology*, v. 79, p. 1-15, 1999.
- Makhlouf, A. Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu alimenté : application à la production bactérienne d'arômes laitiers. Thèse INPL, Nancy, 2006.
- Malcata, F.X.; Reyes, H.R.; Garcia, H.S.; Hill, C.G. Amundson, C.H. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 14, p. 426-446, 1992.
- Marc, F.; Davin, A.; Deglène-Benbrahim, F.; Ferrand, C.; Baccaunaud, M.; Fritsch, P. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine Sciences*, v. 20, p. 458-463, 2004.
- März, U.; The global market for carotenoids. *BCC research* [en ligne]. Juin 2005 [réf. du 29 avril 2008], report ID: FOD025B. Disponible sur: <http://www.bccresearch.com/RepTemplate.cfm?reportID=226&RepDet=HLT&cat=fod&target=repdetail.cfm>
- Massebeuf, S. Optimisation multicritère de procédés discontinus d'homopolymérisation et de copolymérisation en emulsion. Thèse INPL, Nancy, 2000.
- Matsuo, T.; Kobayashi, T.; Kimure, Y.; Hosoda, A.; Taniguchi, H.; Adachi, S. Continuous synthesis of glyceryl ferulate using immobilized *candida antarctica* lipase. *Journal of Oleo Science*, v. 57, p. 375-380, 2008.
- Maugard, T.; M. Remaud-Simeon, et al. Kinetic study of chemoselective acylation of amino-alditol by immobilized lipase in organic solvent: Effect of substrate ionization. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1387(1-2), p. 177-183, 1998.
- Meyer, P.S.; Du Preez, J.C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *World Journal of Microbiol. and Biotechnol.*, v. 40, p. 780-785, 1994.
- Meyer, P.S.; Du Preez, J.C. Effet of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 40, p. 780-785, 1994.
- Middelberg, A. P. J. Process –scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, v. 13, p. 491-551, 1995.
- Montgomery, D.C. Experimental design for product and process design and development. *The statistician*, v. 48, p. 159-177, 1999.
- Morais, H.; Abram, A.; Ferreira, F. Carotenoids Biosynthesis – a review. *Revista Lusófona*, v. 7, p. 22-42, 2002.
- Mouret, J-R. Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oléate: analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes. Thèse: INSA Toulouse, 2006.
- Muniglia, L. Elaboration d'une stratégie expérimentale multicritère appliquée à la conception optimale d'un bioprocédé continu de production d'arômes laitiers. Thèse: INPL Nancy, 2001.
- Nicol, M.; Maudet, M. Caroténoïdes et vitamine A, Actualités. *OCL*, v. 7, p. 266-270, 2000.
- Nonier, M.-F.; De Gaulejac, N. V.; Vivas, N.; Vitry, C. Characterization of carotenoids and their degradation products in oak wood. Incidence on the flavour of wood. *C.R. Chimie*, v. 7, p. 689-698, 2004.
- Oliver, J. et Palou, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p. 543 – 555, 2000.

- Ollis, D.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S.; Harel, M.; Remington, S.; Silman, L.; Shrag, J.; Sussman, J.; Verschueren, K.; Goldman, A. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engeniering*, v. 5, p. 197-211, 1992.
- Papanikolaou, S.; Chevalot, I.; Komaitis, M.; Aggelis, G.; Marc, I. Kinetic profile of cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, p.215-224, 2001.
- Parize, A.L.; De Souza, T.C.R.; Brighente, I.M.C. Obtenção e caracterização de microsferas de quitosana contendo o corante urucum. *Tecnol. And Ciên. Agropec*, v. 2, p. 15-18, 2008.
- Park, P.K.; Kim, E.Y.; Chu K.H. Chemical disruption of yeast cell for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and purification technology*, v. 53, p.148-152, 2007.
- Phadwal, K and Singh, P.K. Effect of nutrient depletion on  $\beta$ -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource technology*, v. 90, p.55-58, 2003.
- Pintea, A.; Varga, A.; Stepnowski, P.; Socaciu, C.; Culea, M; Diehl, H. A. Chromatographic Analysis of Carotenol Fatty Acid Esters in *Physalis alkekengi* and *Hippophae rhamnoides*. *Phytochem. Anal.*, v. 16, p. 188-195, 2005.
- Razavi, S.H. Détermination de conditions de mise en oeuvre d'une souche nouvellement isolée de *Sporobolomyces ruberrimus* pour la production de torularhodine. Thèse: INPL-Nancy, 2004.
- Razavi, S.H.; Marc, I. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. *Iran J. Chem. Chem. Eng.*, v. 25, p. 59-64, 2006.
- Réjasse, B.; Lamare, S.; Legoy, M.-D.; Besson, T. Stability improvement of immobilized *Candida Antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation. *Org. Biomol. Chem.*, v. 2, p. 1086-1089, 2004.
- Richardson, J.T.; Palmer, M.R.; Liepins, G.; Hilliard, M. Some guidelines for genetic algorithms with penalty functions. Ed. Schaffer, Proceeding of third int. cof. On genetic algorithms, 191-197, 1989.
- Rouseff, R.L. High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in turmeric and annatto. *Journal of food science*, v. 53, p. 1823-1826, 1988.
- Sakaki, H.; Nakanishi, T.; Satonaka, K.,T.; Miki, W.; Fujita, T.; Komemushi, S. Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 89, p. 203-205, 2000.
- Sakaki, H.; Nakanishi, T.; Tada, A.; Miki, W.; Komemushi, S. Activation of Torularhodin Production by *Rhodotorula glutinis* Using Weak Light Irradiation. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 92, p. 294-297, 2001.
- Sakaki, H.; Nochide, H.; Komemushi, S.; Miki, W. Effect of Active Oxygen Species on the Productivity of Torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93, p. 338-340, 2002.
- Sanchez, S.; Demain, A.L. Metabolic regulation of fermentation process. *Enz. Microbiol. Technol.* v. 31, p. 895-906, 2002.
- Sandmann, G.; Albrecht, M.; Schnurr, G.; Knörzer, O.; Böger, P. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnol.*, v. 17, p. 233-237, 1999.

Schimmerling, P.; Sisson, J.-C.; Zaïdi, A. Pratique des plans d'expériences. Lavoisier, techniques et documentation, 1998.

Schmuhl, J.; Hartmann, R.; Müller, H.; Hartmann, K. Structural parameter approach and multicriteria optimization techniques for complex chemical engineering design. *Computers and chemical Engineering*, v. 20, p. 327-332, 1996.

Scotter, M. J. Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *Food Chemistry*, v. 53, p. 177-185, 1994.

Scotter, M. J.; Castle, L.; Appleton, G. P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in food. *Food chemistry*, v. 74, p. 365-375, 2001.

Sedmak, J.J.; Weerasinghe, D.K.; Jolly, S.O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Techniq.*, v. 4, p. 107-112, 1990.

Sekeroglu, G.; Fadiloglu, S.; Ibanoglu, E. Production and Characterization of Isopropyl Laurate Using Immobilized Lipase. *Turkish J. Eng. Env. Sci.*, v. 28, p. 241-247, 2004.

Sergent, M.; Phan-Tan-Luu, R.; Mathieu, D. Methodological approach of the experimental research. *RAIRO*, 1997.

Sheldon, R. A.; R. Madeira Lau, et al. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*, v. 4(2), p. 147-151, 2002.

Sheldon, R.A. Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. In *Enzymatic reactions in organic media*, Ed. A.M.P. Koskinen and A.M. Klivanov, Blackie Academic & Professional, p. 267-307, 1996.

Shiraishi, A. and Fujii, H. Inhibition of Cyanide-insensitive Respiration in *Sporobolomyces ruberrimus* by o-Diphenols. *Agric. Biol. Chem.*, v. 50, p. 441-446, 1986.

Shuhama, I.K.; Aguiar, M.L.; Oliveira, W.P.; Freitas, L.A.P. Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. *Journal of Food Engineering*, v. 59, p. 93-97, 2003.

Silva, C.M. et Biscuais Jr, E.C. Genetic algorithm development for multi-objective optimisation of batch free radical polymerization reactors. *Computers and Chemical Engineering*, v. 27, p. 1329-1344, 2003.

Simpson, K.L.; Nakayama, T.O.O.; Chichester, C.O. Biosynthesis of yeast carotenoids. *J. Bacteriol.* v. 52, p. 14-18, 1964.

Snyder, Kirkland, J.J.; Rutan, S.C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. *Journal of Chromatography A*, v. 656, p. 537-547, 1993.

Soo, E. L.; A. B. Salleh, et al. Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry*, v. 39(11), p. 1511-1518, 2004.

Statnikov, R. B.; Bordetsky, A.; Statnikov, A. Multicriteria analysis of real-life engineering optimisation problems: statement and solution. *Nonlinear Analysis*, v. 63, p. 685-696, 2005.

Tan, K.C.; Khor, E.F.; Lee, T.H.; Yang, Y.J. A tabu-based exploratory evolutionary algorithm for multiobjective optimization. *Artificial Intelligence Review*, v. 19, p. 231-260, 2003.

- Tinoi, J.; Rakariyatham, N.; Deming, R.L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochem.*, v. 40, p. 2551-2557, 2005.
- Tocchini, L. and Mercadante, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 21, p. 310-313, 2001.
- Trotter, P.J. The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.* v. 21, p. 97-119, 2001.
- Tyczkowski, J. K. and Hamilton, P. B. Absorption, transport and digestion in chickens of lutein diesters, a carotenoid extracted from marigold (*Tagetes erecta*) petals. *Poult. Sci.*, v. 65, p. 1526-1531, 1986.
- Uppenberg, J.; Ohrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G.J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T.A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, v. 34, p. 16838-16851, 1995.
- Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Macrae, A.R. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1118, p. 218-222, 1992.
- Van Breemen, R.B. Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids. *Pure and Appl. Chem.*, v. 69, p. 2061-2066, 1997.
- Van Rantwijk, F.; R. M. Lau, et al. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology*, v. 21(3), p. 131-138, 2003.
- Vanderheiden, G. J.; Fairchild, A. C.; Jago G. R. Construction of a Laboratory Press for Use with the French Pressure Cell. *Appl Microbiol* , v. 19, p. 875-877, 1970.
- Vázquez Lima, F., Pyle, D.L., Asenjo, J.A. (1995). Factors affecting the esterification of lauric acid using an immobilized biocatalyst : Enzyme characterisation and studies in a well mixed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 69-79.
- Vazquez, M.; Santos, V.; Parajo, J.C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 263-268, 1997.
- Viennet, R. Nouvel outil de planification expérimentale pour l'optimisation multicritère de procédés. Thèse INPL, Nancy, 1997.
- Walter, E. et Pronzato, L. Identification des modèles paramétriques à partir des données expérimentales. Collection M.A.S.C. ed. Masson, Paris.
- Wang, F.S. et Sheu, J.W. Multi-objective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. *Chemical Engineering Science*, v. 55, p. 3685-3695, 2000.
- Weber, R.W.S.; Anke, H.; Davoli, P. Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). *J Chromatogr. A*, v. 1145, p. 118-122, 2007.
- Whitney, H. H. et Thibault, J. Multi-objective optimization for chemical processes and controller design: Approximating and classifying the Pareto domain. *Computers and chemical Engineering.*, v. 30, p. 1155-1168, 2006.

Winkler, F. K.; D'Arcy, A.; Hunziker, W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, v. 343, p. 771-774, 1990.

Yamane, Y.; Higashida, K.; Nakashimada, Y., Kakizono, T.; Nishio, N. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with with glucose nad ethanol feeding. *Biotchnology Letters*, v. 19, p. 1109-1111, 1997.

Yang, M.-H.; Lin, H.-J.; Choong, Y.-M. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Research International*, v. 35, p. 627-633, 2002.

Yang, Z.; Russell, A.J. Fundamentals of non-aqueous enzymology. In *Enzymatic reactions in organic media*, Koshinen, A.M.P. and Klivanov, A.M. Eds. Blackie academic and professional: London, p. 43-69, 1996.

Yoo, I. S. ; Park, S. J.; Yoon, H. H. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. *J. Ind. Eng. Chem.*, v. 13, p. 1-6, 2007.





AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame Fabienne GUERARD, Professeur, Pôle Universitaire P.J. Helias, Quimper**  
**Monsieur Stéphane GUILLOUET, Maître de Conférences, INSA, Toulouse**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame ALVES DA COSTA CARDOSO Ligia**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Identification de facteurs opératoires influents en vue d'une production microbienne optimale de torularhodine et de sa fonctionnalisation enzymatique, à partir d'études cinétiques"**

en vue de l'obtention du titre de :

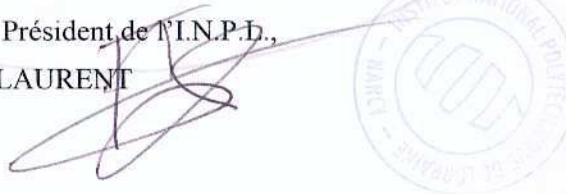
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 03 novembre 2008

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 54501  
VANDŒUVRE CEDEX