

PRODUCTION EN FERMENTEUR DE 2-HEPTANONE
(Arôme du Roquefort)
PAR DES SPORES IMMOBILISÉES DE *Penicillium roqueforti*

Introduction :

Ce protocole été conçu pour être réalisable dans un fermenteur de 2 L, appareillage courant en enseignement, et pour utiliser ce matériel autrement que pour faire de la croissance.

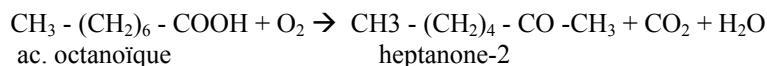
La bioconversion peut être effectuée en 6 heures sans compter la préparation des billes.

Les protocoles de dosage ont été adaptés pour limiter les risques liés à l'emploi des solvants organiques.

1/ But et intérêt de la manipulation

Le travail proposé consiste en la biosynthèse d'une méthyl-céto, l'heptanone-2, à partir d'acide octanoïque par des spores de *Penicillium roqueforti* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium. La réaction sera réalisée en discontinu dans un réacteur agité et aéré.

Le processus de bioconversion obéit à l'équation stœchiométrique globale suivante:)



La moisissure *Penicillium roquefortii* est utilisée pour la confection du Roquefort et d'autres fromages à pâte dite persillée (bleus d'Auvergne, de Bresse, ...).

Contrairement à la majorité des autres moisissures, ce champignon offre la particularité de tolérer une atmosphère appauvrie en oxygène. Il accepte des pH compris entre 3 et 10,5, paraît stimulé par une ambiance riche en alcool, et tolère de fortes concentrations en sel.

L'heptanone-2 est un des principaux constituants de l'arôme des fromages bleus. L'utilisation d'un micro-organisme et d'un substrat qui peut être naturel, l'acide octanoïque, permet de considérer l'arôme produit comme étant naturel (directive européenne du 22 juin 1988). Il peut ainsi être utilisé dans la formulation des biscuits, des soupes, ...

A l'heure actuelle, aucun arôme d'origine microbiologique n'est produit industriellement à partir de micro-organismes malgré les nombreux brevets déposés.

L'utilisation du biocatalyseur sous forme immobilisée permet:

- d'éviter des pertes par adhésion des spores sur les parois du réacteur
- une récupération du milieu réactionnel non contaminé par le catalyseur
- un passage en continu

2/ Réactions apparaissant au cours de la bioconversion

D'un point de vue métabolique, l'obtention de méthyl-cétones implique une activité de la thiolase faible. La réduction des cétones en alcools secondaires est un processus anaérobie qui est défavorisé par les conditions expérimentales utilisées qui mettent en œuvre une aération du milieu de bioconversion.

Matériel et méthodes :

1/ Isolement, culture du champignon et sporulation :

a/ Isolement :

Le *Penicillium roquefortii* est isolé par repiquages successifs sur milieu de Sabouraud + Chloramphénicol à partir d'un fromage persillé commercial (dans ce cas, il s'agit d'un Roquefort Société). L'incubation est réalisée à 30°C ou température ambiante, dans une chambre humide pendant 5 à 7 jours.

Le champignon est ensuite multiplié après inondation de plusieurs boîtes du même milieu, jusqu'à développement d'une coloration verte sur toute la surface de la boîte.

b/ Sporulation :

Pour obtenir une grande quantité de spores, recueillir en milieu liquide les spores de deux boîtes de culture dans environ 10 mL et ensemer le milieu de sporulation. Laisser incuber 10 à 15 jours à température ambiante en position inclinée.

Composition du milieu de sporulation :

Dans un erlen de 2 litres, mettre 500 g d'orge (ou sarrasin, riz, avoine, ...) et stériliser 20 minutes à 120°C.

Ajouter 150 mL du milieu de Czapek stérile, dont la composition est : NaNO₃ 2,0g/L ; KH₂PO₄ 1,0g/L ; MgSO₄ 7H₂O 0,5g/L ; KCl 0,5g/L ; FeSO₄ 7 H₂O 0,01g/L ; Saccharose 30,0g/L ; Eau qsp 1 litre Répartir en flacons de 150 mL et autoclaver 20 min à 120°C.

A cette étape, le milieu contenant les spores peut être conservé directement à -20°C.



Rq : Le milieu peut simplement être composé de pâte à pain, technique traditionnelle encore utilisée dans certaines caves de Roquefort pour produire une grande quantité de spores.

c/ Récolte des spores :

Les spores sont extraites par agitation de milieu de sporulation dans une solution stérile de **Tween 80 à 0,05 %**. Le surnageant obtenu peut être utilisé tel quel ou centrifugé 15 min à 2500 G pour réduire son volume ; il peut également être . La teneur en spores est déterminée par comptage sur cellule de Malassez. Le nombre total de conidies en suspension doit être de l'ordre de 5 à 10.10¹⁰.

2/ Immobilisation en alginate :

a/ Préparation de la solution d'alginate à 2 % (p/v) final :

Ajouter 4,66 g d'alginate de sodium à 200 mL d'eau distillée stérile bouillante et homogénéiser avec une baguette de verre pour supprimer les grumeaux.

Centrifuger 10 min à 2500 rpm pour désaérer la solution.

Pasteuriser 3 h à 60°C.

Ajouter aseptiquement la suspension de spores et ajuster si nécessaire à 235 mL. Homogénéiser lentement en prenant soin de ne pas incorporer d'air au mélange.

b/ Confection des billes :

La suspension précédente est introduite stérilement dans des seringues de 10 mL montées sur des aiguilles de diamètre interne inférieur à 0,6 mm pour permettre un écoulement goutte à goutte.

Faire tomber les gouttes dans 400 mL d'une solution de CaCl₂ 0,05 mol.L⁻¹ stérile et maintenue sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique. Une fois toute la suspension immobilisée, la réticulation de l'alginate est poursuivie environ 30 minutes sous agitation.

Les billes sont ensuite rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile et mises à équilibrer avec 400mL d'une solution stérile 5mmol.L⁻¹ CaCl₂. Les billes sont prêtes pour la bioconversion.

3/ Fermenteur et Bioconversion :

a/ Description de l'appareillage :

- Fermenteur : l'appareil utilisé pour cette bioconversion est un fermenteur de 2L de chez SGI équipé du module d'agitation (300 RPM) et de celui de régulation de température (régulée à 30°C).
- L'aération est effectuée au moyen d'une petite pompe à membrane KNF miniport (Bioblock) qui fonctionne à 5 L/min, le débit est ajusté à 25 L/h sur le débit-mètre placé sur le support du fermenteur. L'aération, de l'ordre de 25 L/h est démarrée 1 heure après le début de la manipulation afin de déterminer le volume mort des billes.
- Le fermenteur est rendu étanche avec du parafilm et la seule sortie d'air est équipée d'un réfrigérant au dessus de la cuve, pour limiter les pertes d'arôme par entraînement.
- La teneur en oxygène est contrôlée avec une électrode Schott OX 1100 couplée à une interface EXAO de chez Nortek.
- Le volume de milieu de bioconversion introduit est d'environ 1,1 L (sans les billes).
- Le pH est maintenu à 6,5 à l'aide d'un régulateur Suntex PC-310 sur le relais de régulation haute avec HCl 0,1 mol.L⁻¹. L'acide est contenu dans une burette de 50 mL placée de façon à ce que le niveau du liquide dans la burette soit à peu près au niveau de la surface du milieu réactionnel (si la pompe péristaltique ne serre pas suffisamment fort le tuyau, elle laisse passer l'acide selon le principe des vases communicants !). Noter les valeurs de la consommation de HCl au cours de l'expérience, au moment des prélèvements. Le régulateur est couplé à une pompe péristaltique LKB2232 microperpex-S ajustée sur 40.

b/ Composition du milieu réactionnel :

Les produits utilisés sont de marque Sigma: Caprylate de sodium (C5038), Alginate de sodium medium viscosity (A2033), CaCl₂ (C5080), Rhodamine 6G (R4127), 2,4-Dinitrophénylhydrazine (D2630), Cyclohexane (C8517), Chloramphénicol (C0378).

- Octanoate de sodium 5 mmol.L⁻¹ (pm 166,2)
- éthanol 100% 0,2 mL/l
- CaCl₂ 5 mmol.L⁻¹ (0,73g/L)
- Eau distillée qsp 1 litre

L'eau distillée et le CaCl₂ sont ajoutés aux billes et l'ensemble est transvasé stérilement dans le fermenteur à l'aide d'un entonnoir stérile et en travaillant à proximité d'une flamme (qui peut être produite par une lampe à souder, pour plus de commodité). L'acide octanoïque (caprylique) et l'éthanol sont ensuite ajoutés dans cet ordre, puis le pH est ajusté à environ 6,5 avec HCl 0,1 mol.L⁻¹. Avec un tel milieu, on n'a pas de problème de mousse. Il est possible de rajouter du chloramphénicol à la concentration de 350 mg/L pour éviter les contaminations bactériennes.

c/ Prélèvements :

Faire un prélèvement à t₀ et un 1 heure après. La mesure de la diminution de la concentration en substrat (acide octanoïque) permet de calculer le volume de liquide retenu dans les billes.

Faire des prélèvements réguliers toutes les heures, les filtrer sur 0,45 µm et les stocker dans la glace.
Faire les gammes et les dosages en même temps, en fin de bioconversion.

4/ dosages :

Dosage de l'acide octanoïque :

*** Dosage colorimétrique par la Rhodamine 6G :**

La concentration résiduelle en acide octanoïque sera déterminée par un dosage spectrophotométrique grâce à la rhodamine 6G.

Extraction : (Attention : les produits utilisés sont toxiques, travailler sous la hotte avec des gants et ne rien jeter à l'évier !)

- 1 mL de prélèvement.
- 250 µL HCl 4 N.
- 1,25 mL de cyclohexane.

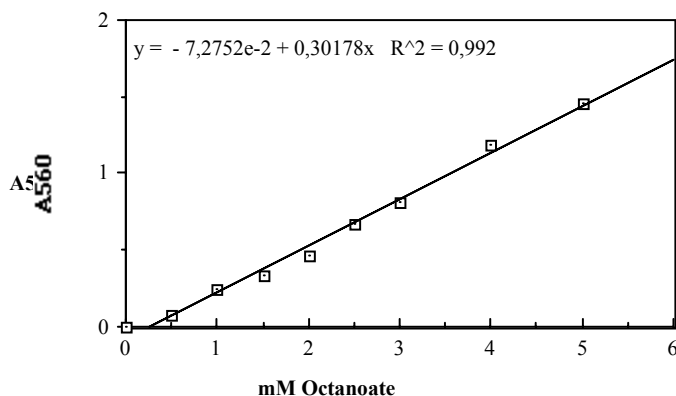
Agiter 10 secondes au vortex et éliminer la phase inférieure.

Dosage :

- 200 µL de phase organique
- 1,5 mL de réactif à la Rhodamine 6G.

Laisser réagir 10-15 min à température ambiante et doser au spectrophotomètre à 560 nm contre un blanc. Tracer également un spectre et noter la valeur maximale d'absorbance du pic.

Réaliser de la même façon en parallèle une gamme d'étalonnage dans les mêmes conditions entre 0 et 5 mM à partir d'une solution étalon d'octanoate de sodium 10 mM dans l'eau à pH 6,5 (gamme linéaire jusqu'à 5 mM).



Réactif à la Rhodamine 6G :

Solution mère : Dissoudre 100 mg de rhodamine dans 100 mL de tampon K₂HPO₄ 0,2 M pH 11. Extraire immédiatement par 100 mL de solvant organique (cyclohexane). Ce réactif peut être stocké deux semaines à température ambiante.

Au moment de l'emploi, diluer au 1/2 dans le même solvant.

*** Dosage par équivalence avec la quantité d'HCl nécessaire à la régulation du pH :**

L'ajout d'un acide (HCl) est nécessaire car la métabolisation de l'acide octanoïque provoque une augmentation du pH qu'il faut réguler. La mesure de la quantité d'HCl consommé pour le maintien du pH à la valeur initiale, ici 6,5, permet de suivre, sans prélèvement, l'avancement de la réaction.

La concentration en acide caprylique est donnée par la formule suivante $S=f(\text{Volume HCl})$:

$$S = S_0 / \alpha - V_x N / (\alpha \cdot V_r)$$

S = concentration en acide caprylique à l'instant t

V_r = Volume réactionnel

S₀ = concentration en acide caprylique à l'instant t₀ (5 mmol.L⁻¹)

N = Normalité de HCl (0,1 mol.L⁻¹)

V = Volume d'HCl consommé par la régulation de pH à l'instant t

α = Proportion de la forme basique (caprylate) du substrat dans le milieu à pH 6,5.

pK_a = 4,85 pH = 6,5 (α = 0,978)

Dosage de la 2-heptanone :

Le dosage de cette molécule va être effectué par deux techniques, dosage colorimétrique et chromatographie en phase gazeuse (CPG).

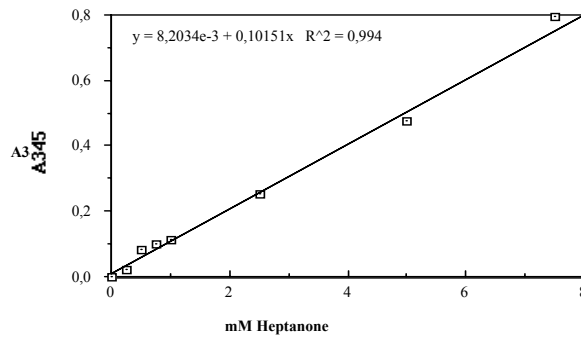
*** Dosage colorimétrique : (méthode de R.C. Lawrence, Nature, March 27, 1965, vol 205):**

Cette méthode est applicable étant donné que l'heptanone-2 est la seule méthyl-cétone présente.

Dosage :

- 100 µL de prélèvement
- 200 µL de 2,4-Dinitro-phényl-hydrazine à 2 g/L en HCl 2 mol.L⁻¹.
- Incuber 30 minutes à température ambiante dans des tubes à hémolyse en verre bouchés.

- Rq :** Incuber en même temps une gamme étalon de 0 à 10 mmol.L-1 de 2-heptanone (linéarité jusqu'à 7,5 mmol.L-1).
- Extraire par 2 mL de cyclohexane.
 - Mesurer l'absorbance de la phase organique supérieure à 345 nm contre un blanc adéquat.



[Heptanone] mmol.L-1	0	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10
A345	0	0.024	0.082	0.099	0.112	0.252	0.478	0.795	1.203

*** Dosage en Chromatographie Phase Gazeuse (CPG) :**

Il est également possible de doser l'arôme par Chromatographie en Phase Gazeuse. Cette méthode est moins précise que le dosage colorimétrique.

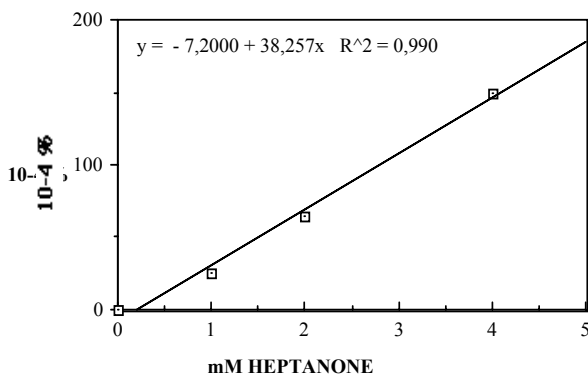
Extraction :

- Extraire volume/volume 1 mL d'échantillon avec 1 mL d'éther éthylique , vortexer quelques secondes et prélever la phase supérieure étherée.

Dosage :

- Injecter 1 µL de cet extrait sur une colonne SE 30, avec une température de four de 120°C, d'injecteur et de détecteur à 150°C et sous une pression d'azote de 1 bar environ. Le détecteur est à ionisation de flamme.

Rq : Le premier pic (autour de 0,35 MIN est celui de l'éther et le pic 1,45 MIN est celui de l'heptanone-2). Comparer à une droite étalon le pourcentage de la surface du pic d'heptanone par rapport à la surface totale (pic d'heptanone + pic d'éther).



[Heptanone] mmol.L-1	0	1	2	4
CPG 10-4 %	0	25	64	150



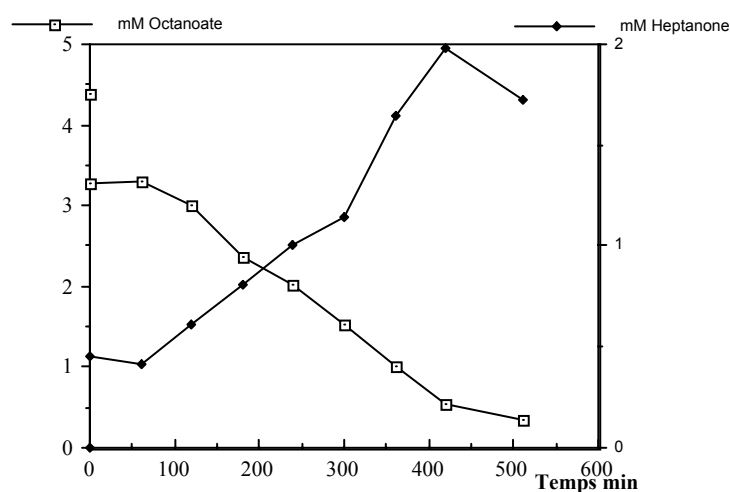
Résultats

Volume réactionnel : 1,1 L de milieu + volume mort des billes (environ 1,5 L au total).
 Volume des billes introduites : environ 400 mL (10.10¹⁰ spores).
 Volume mort calculé : (1,1*4,376/3,273) - 1,1 = 370 mL.
 La teneur en oxygène du milieu est stabilisée à environ 5% avant le début de l'aération puis elle augmente rapidement jusqu'à environ 20% après la mise en route de l'aération.

Tableau de Résultats

Temps	Volume HCl	[Ac. Caprylique]	[Ac. Caprylique] quivalence HCl	[heptanone]
en Min	en mL	en mmol.L-1	en mmol.L-1	en mmol.L-1
0.000	0.000	4.376	#N/A!	0
0.000	0.000	3.273	#N/A!	0.456
60.000	0.500	3.297	1.#10	0.412
120.000	3.400	3.015	-1.#10	0.611
180.000	9.600	2.366	1.#10	0.803
240.000	15.700	2.008	-1.#10	1.142
300.000	24.100	1.525	-1.#10	0.995
360.000	30.100	1.021	#N/A!	1.643
420.000	35.700	0.536	1.#10	1.982
510.000	41.800	0.344	#N/A!	1.728

[Octanoate] mmol.L-1	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	4	5
A560	0	0.073	0.239	0.33	0.464	0.673	0.817	1.182	1.452



Bibliographie

- C. Larroche, Bioconversion par des cellules immobilisées, fascicule du stage de perfectionnement sur les techniques en génie fermentaire.
- C. Larroche, J. B. Gros, Batch and continuous 2-heptanone production by Ca-Alginate/Eudragit RL entrapped spores of *Penicillium roquefortii*, *Biotechnical and bioengineering*, Vol 34, Pp 30-38 (1989).
- C. Creuly, C. Larroche, and J. B. Gros, A fed batch technique for 2-heptanone production by spores of *Penicillium roquefortii*, *Applied Microbiological Biotechnology*, 34, Pp 20-25 (1990).
- R. C. Lawrence, Use of 2,4-dinitrophenylhydrazine for the estimation of micro amounts of carbonyls, *Nature*, March 27 (1965), Pp 1313-1314.
- M. M. Anderson and R. E. McCarty, Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rhodamine 6G, *Analytical Biochemistry*, 45, 260-270, (1972).
- B. K. Dwivedi and J. E. Kinsella, Continuous production of blue-type cheese flavor by submerged fermentation of *penicillium roquefortii*, *Journal of food science*, Vol 39, 620-622 (1974).
- J. Cerning, J. C. Gripon, G. Lambert et J. Lenoir, Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie, *Le Lait*, 67(1), 3-39 (1987).
- D. P. Schwartz, J. Shamey, C. R. Brewington, and O. W. Parks, Methods for the isolation and characterization of constituents of natural products, *Microchemical journal*, 13, 407-417 (1968).
- D. P. Schwartz and O. W. Parks, Quantitative analysis of methyl ketones in blue cheese fat, *Journal of Dairy Science*, 989-990, (1963).
- D. F. Anderson and E. A. Day, Quantitative analysis of the major free fatty acids in blue cheese, *Journal of dairy Science*, 248-249, (196.).
- S. Kudzal-Savoie, Application de la chromatographie sur couche mince à l'étude de la lipolyse dans les fromages, 312-319, ().
- G. Lamberet, B. Auberger, C. Canteri et J. Lenoir, L'aptitude de *Penicillium caseicolum* à la dégradation oxydative des acides gras, *Sciences et techniques*, 13-19, RLF N° 406.
- C. Bonino, rapport de CAPET, session 1996.