



HAL
open science

**Sélection par mutagenèse UV et caractérisation
physiologique de souches mutantes de la levure
Saprochaete suaveolens (anciennement Geotrichum
fragrans) hyperproductrices de composés organiques
volatils.**

Melissa Tan, Yanis Caro, Jean-Marie François, Thomas Petit

► **To cite this version:**

Melissa Tan, Yanis Caro, Jean-Marie François, Thomas Petit. Sélection par mutagenèse UV et caractérisation physiologique de souches mutantes de la levure *Saprochaete suaveolens* (anciennement *Geotrichum fragrans*) hyperproductrices de composés organiques volatils.. CNRIUT 2023 Saint Pierre - La Réunion, IUT de Saint Pierre, Jun 2023, Saint Pierre (La Réunion), La Réunion. hal-04326819

HAL Id: hal-04326819

<https://hal.science/hal-04326819>

Submitted on 6 Dec 2023

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.

Sélection par mutagenèse UV et caractérisation physiologique de souches mutantes de la levure *Saprochaete suaveolens* (anciennement *Geotrichum fragrans*) hyperproductrices de composés organiques volatils.

Mélissa Tan¹, Yanis Caro², Jean-Marie François³ et Thomas Petit⁴
melissa.tan@univ-reunion.fr ; yanis.caro@univ-reunion.fr; fran_jm@insa-toulouse.fr;
thomas.petit@univ-reunion.fr

^{1,2,4} IUT, Université de la Réunion
Laboratoire de Chimie et Biotechnologie des Produits Naturels (ChemBioPro), Réunion, France

³ INSA de Toulouse
Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse, France

Thèmes – Chimie - Microbiologie – Biotechnologies - Agroalimentaires

Résumé – *Saprochaete suaveolens* est une levure non conventionnelle (LNC) appréciable pour sa haute productivité en composés organiques volatils (COVs), tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Cette souche est notamment très intéressante pour sa production d'esters α -insaturés rarement retrouvés dans le bouquet aromatique des souches levuriennes. Le métabolisme de cette souche peut ainsi être considéré comme un modèle très prometteur pour la production de COVs par les levures. Cette étude visait donc à l'optimisation de la production de COVs par la *S. suaveolens* par une méthode de mutagenèse aléatoire. Ainsi, après avoir mis au point une méthode de mutagenèse UV adaptée à la souche de *S. suaveolens*, une méthode rapide de sélection des mutants d'intérêts a été élaborée. Cette méthode a permis de sélectionner 9 souches mutantes parmi plus de 15 000 clones irradiés. Les analyses de COVs produits par ces 9 souches ont mis en exergue un mutant produisant 8 fois plus de COVs que la souche sauvage de *S. suaveolens*. Les analyses biochimiques ont montré que cette surproduction résultait de la perte d'activité de l'Enoyl-CoA hydratase et d'une augmentation de l'activité de l'acyl-CoA hydrolase chez le mutant.

Mots-Clés – Levures ; Composés organiques volatils ; Mutagenèse UV ; *Saprochaete suaveolens*

1 Introduction

Le laboratoire ChemBioPro s'intéresse depuis une dizaine d'années à la production de composés d'arômes (composés organiques volatils, COVs) par les levures non conventionnelles (levures non-*Saccharomyces*). Dans ce cadre, un premier projet de recherche portant sur l'exploration des levures endémiques et indigènes de la Réunion et de Madagascar à produire des COVs a été réalisé¹. En accord avec les résultats d'autres équipes de recherche²⁻⁵, ce travail a mis en exergue la place particulièrement intéressante de la levure *Saprochaete suaveolens* et des espèces qui lui sont apparentées pour la production de COVs à partir des acides aminés^{6,7}.

Plus particulièrement, il a montré que *S. suaveolens* produit de nombreux COVs sous forme d'esters dont des esters α -insaturés qui sont des familles chimiques très appréciés en aromatisation mais peu produit de façon naturelle. De plus, ce type d'esters est rarement retrouvé dans le bouquet aromatique des levures. L'étude du métabolisme aromatique de *S. suaveolens* a montré que la production de ces esters α -insaturés proviennent de la transformation des acides aminés branchés (BCAAs) via deux voies métaboliques : la voie d'Ehrlich (EP) et la voie de la β -oxydation (BOP) des BCAAs⁸. Néanmoins, la seconde voie permet également à *S. suaveolens* de se développer sur des milieux ne comportant que des BCAAs comme source de carbone (phénotype ILV⁺)⁸, diminuant ainsi le rendement de production en esters à partir des acides aminés.

Dans la continuité de ces travaux, nous nous sommes proposés d'optimiser la production de COVs par la souche de *S. suaveolens* par une méthode de mutagenèse aléatoire. Cet article fait état des principaux résultats obtenus.

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériels biologiques

Une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 112-2N⁹ et une souche de *Saprochaete suaveolens* isolée du fruit du pitaya à La Réunion (France)⁶ ont été utilisées dans cette étude.

2.2 Mutagenèse UV et sélection des mutants ILV⁻

La mutagenèse par irradiations aux rayons ultraviolets (UV, 254 nm, 180s) de la souche *S. suaveolens* a été réalisée selon la méthode introduite par Winston en 2008¹⁰. 15 393 clones de *S. suaveolens* ont ainsi été isolés. Une pré-sélection des souches ILV⁻ a été réalisée par la méthode de réplique sur velours stériles des boîtes de Pétri. La confirmation du phénotype ILV⁻ a ensuite été réalisée par un test de croissance en goutte classique. 9 mutants ILV⁻ (mutants M2 à M9) ont ainsi été

isolés.

2.3 Analyses semi-quantitative des COVs produits par *S. suaveolens* et les 9 mutants ILV⁻

Les COVs produits par les différentes souches ont été extraits par micro-extraction en phase solide (SPME) et analysés à l'aide d'un chromatographe gazeux couplé à un spectromètre de masse comme détecteur (CG-SM). L'identification de tous les COVs a été réalisée par comparaison de leur spectre de masse et de leurs indices de rétention linéaire expérimentaux (colonnes DB-5) avec ceux proposés par la base de données « NIST database ».

2.4 Mesures des activités enzymatiques

Les levures ont été cultivées dans 50 mL YNB-Glu ou YNB-Glu-Ile pendant 24 h à 30°C. Ensuite, l'équivalent de 100 UDO₆₀₀ de culture a été utilisé pour la préparation des extraits bruts. Les extraits obtenus ont ensuite été purifiés sur colonne Amicon selon le protocole proposé par le constructeur. Les mesures d'activité des enzymes BCKAD (*branched chain ketoacid dehydrogenase*), ECH (*enoyl-CoA hydratase*), DC (*decarboxylase*), ADH (*alcohol dehydrogenase*), AIDH (*aldehyde dehydrogenase*), ACyD (*acyl-CoA dehydrogenase*), AAT (*alcohol acyltransferase*) et ACyH (*acyl-CoA hydrolase*) ont été réalisés selon des protocoles décrits dans la littérature^{11,12,8}.

3 Résultats et Discussion

3.1 Analyse multivariée de la souche sauvage de *S. suaveolens* et des 9 mutants ILV⁻

Les mutants M9 et M10 présentait respectivement des niveaux de production totale en COVs 1.8 et 8 fois plus grand que la souche sauvage (FIGURE 1). De plus, une analyse par composante principale a permis d'identifier 4 groupes de souches et de distinguer clairement les mutants M9 et M10 entre eux et des autres souches. Ces résultats ont ainsi montré le succès de la mutagenèse UV puisque le profil aromatique de la souche M10 et, dans une moindre proportion de la souche M9, se sont avérés être clairement distincts de la souche sauvage.

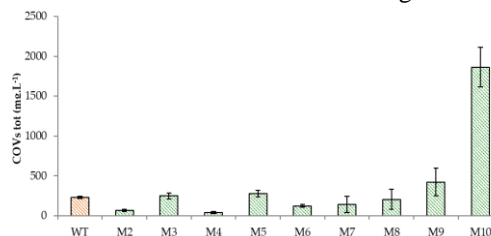


FIGURE 1 – COVs totaux produits par la souche sauvage de *S. suaveolens* (WT) et les 9 mutants ILV⁻

3.2 Comparaison des COVs produits par la souche sauvage et le mutant M10.

Les COVs produits par la souche sauvage et la souche M10 étaient majoritairement des esters pouvant être regroupés en trois catégories selon leur origine métabolique. Le premier groupe comportait les esters issus de la voie classique d'Ehrlich (EP). Le second groupe était constitué d'esters dérivant de l'acyl-CoA de la β -oxydation (BOP). Enfin, le dernier groupe d'esters, propre aux espèces du genre *Saprochaete*, comprenait tous les esters α -insaturés dérivant de l'énoyl-CoA de la BOP.

La **FIGURE 2** illustre la capacité du mutant M10 à produire les esters de ces trois catégories dans des proportions significativement supérieures à la souche sauvage (WT). Plus particulièrement, cette figure montre une production en esters dérivant de l'énoyl-CoA 10 fois supérieure à celle de la souche sauvage pour le mutant M10, ce qui signifie que la mutagenèse UV a permis d'augmenter la production d'esters α -insaturés.

Les activités enzymatiques des enzymes mesurées chez la souche sauvage et le mutant M10 ont montré que l'effet le plus important de la mutagenèse UV était obtenu pour l'ECH et l'ACyH. En effet, l'activité de l'ECH, présente chez la souche sauvage, était indétectable pour le mutant M10 alors que l'activité de l'ACyH, qui catalyse une réaction en amont de l'ECH, était deux fois supérieures à celle observée pour la souche sauvage.

A contrario, les activités de l'ACyD et de la BCKAD ne montraient pas de différence significative entre la souche mutante et la souche sauvage. Enfin, l'activité globale des estérases (AAT) était similaire pour les deux souches.

Ainsi, l'augmentation de la production de COV chez le mutant M10 est probablement due à une perte de l'activité de l'ECH qui conduit à une augmentation de la disponibilité des précurseurs acyl-CoA et énoyl-CoA pour la synthèse d'esters.

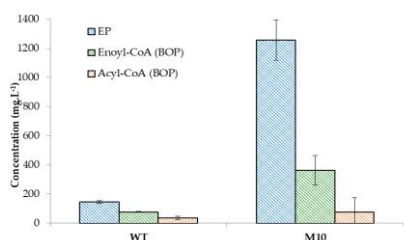


FIGURE 3 – Concentration des esters dérivant de la voie d'Ehrlich (EP), et de l'acyl-CoA et de l'énoyl-CoA de la voie de la β -oxydation (BOP) chez la souche sauvage de *S. suaveolens* (WT) et chez le mutant M10.

4 Conclusion

Cette étude a montré la possibilité d'optimiser la production de COVs, et notamment d'esters α -insaturés par mutagenèse UV chez la souche de *S. suaveolens*. Plus particulièrement cette étude a permis d'identifier les modifications d'activité enzymatiques responsables de cette surproduction. Ainsi, l'exploitation des résultats de cette étude pourront permettre, à terme, de reproduire une

voie métabolique de production d'esters α -insaturés chez une souche de levure mieux maîtrisée (tel que *S. cerevisiae*) afin de produire à l'échelle industrielle des esters α -insaturés par voie fermentaire. Le détail des résultats obtenus a été publié en 2021¹³.

5 Remerciements

Les auteurs expriment leur profonde gratitude à la Région Réunion et l'Union Européenne pour le support financier.

Références

- (1) Grondin, E. Exploration Du Potentiel Biotechnologique Des Levures Endémiques et Indigènes de La Réunion et de Madagascar à Produire Des Molécules d'arômes, Université de la Réunion, 2014.
- (2) İşcan, G.; Demirci, B.; Demirci, F.; Başer, K. H. C. Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) and Analysis of Geotrichum Fragrans Volatiles. *Nature volatiles and essential oils* **2015**, *2* (2), 45–51.
- (3) de Oliveira. Production of 2-Phenylethanol by Geotrichum Fragrans, Saccharomyces Cerevisiae, Kluyveromyces Marxianus in Cassava Wastewater. *Journal of food, agriculture & environment* **2013**, *11* (2), 158–163.
- (4) Zhu, J.; Shi, J.; Lu, Y.; Liu, L.; Liu, Y. Application of Strains of *Geotrichum* Spp. to Decrease Higher Alcohols and to Increase Esters: Application of *Geotrichum* Spp. Strains to Decrease Higher Alcohols and to Increase Esters. *Journal of the Institute of Brewing* **2016**, *122* (1), 147–155.
- (5) Damasceno, S.; Cereda, M. P.; Pastore, G. M.; Oliveira, J. G. Production of Volatile Compounds by *Geotrichum Fragrans* Using Cassava Wastewater as Substrate. *Process Biochemistry* **2003**, *39* (4), 411–414.
- (6) Grondin, E.; Shum Cheong Sing, A.; Caro, Y.; Raherimandimby, M.; Lalaniaina Randrianerana, A.; James, S.; Nueno-Palop, C.; François, J. M.; Petit, T. A Comparative Study on the Potential of Epiphytic Yeasts Isolated from Tropical Fruits to Produce Flavouring Compounds. *International Journal of Food Microbiology* **2015**, *203*, 101–108.
- (7) Grondin, E.; Shum Cheong Sing, A.; James, S.; Nueno-Palop, C.; François, J. M.; Petit, T. Flavour Production by *Saprochaete* and *Geotrichum* Yeasts and Their Close Relatives. *Food Chemistry* **2017**, *237*, 677–684.
- (8) Grondin, E.; Shum Cheong Sing, A.; Caro, Y.; de Billerbeck, G. M.; François, J. M.; Petit, T. Physiological and Biochemical Characteristics of Ethyl Tiglate Production Pathway in the Yeast *Saprochaete Suaveolens*. *Yeast* **2015**, *32*, 57–66.
- (9) van Dijken JP, J.; Bauer, J.; Brambilla, L.; P, null; Francois, null; Gancedo, C.; Giuseppin, M.; Heijnen, J.; Hoare, M.; Lange, H.; Madden, E.; Niederberger, P.; J, null; Parrou, J.; Petit, T.; Porro, D.; Reuss, M.; van Riel, N.; Rizzi, M.; Steensma, H.; Verrips, C.; Vindelov, J.; Pronk, J. An Interlaboratory Comparison of Physiological and Genetic Properties of Four *Saccharomyces Cerevisiae* Strains. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26* (9–10), 706–714.
- (10) Winston, F. EMS and UV Mutagenesis in Yeast. In *Current Protocols in Molecular Biology*; Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008.
- (11) Patston P.A.; Espinal J.; Beggs, M.; Randle P.J. Assay of Total Complex and Activity State of Branched-Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complex and of Activator Protein in Mitochondria, Cells, and Tissues. In *Methods in Enzymology, Branched-Chain Amino Acids*; 1988; Vol. 166, pp 175–189.
- (12) Park, S. J.; Lee, S. Y. Identification and Characterization of a New Enoyl Coenzyme A Hydratase Involved in Biosynthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates in Recombinant *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology* **2003**, *185* (18), 5391–5397.
- (13) Tan, M.; Caro, Y.; Sing, A. S. C.; Reiss, H.; Francois, J.-M.; Petit, T. Selection by UV Mutagenesis and Physiological Characterization of Mutant Strains of the Yeast *Saprochaete Suaveolens* (Former *Geotrichum Fragrans*) with Higher Capacity to Produce Flavor Compounds. *JoF* **2021**, *7* (12), 1031.