

Utilisation de la 13-Hydroperoxyde Lyase recombinante d'olive dans des procédés de production biocatalytiques de composés à note verte

Jacopini S, Mariani M, Vincenti S, Brunini-Bronzini de Caraffa V, Gambotti C, Muselli A, Desjobert JM, Costa J, Maury J, Berti L

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal
UMR-CNRS 6134 Sciences Pour l'Environnement
Université de Corse

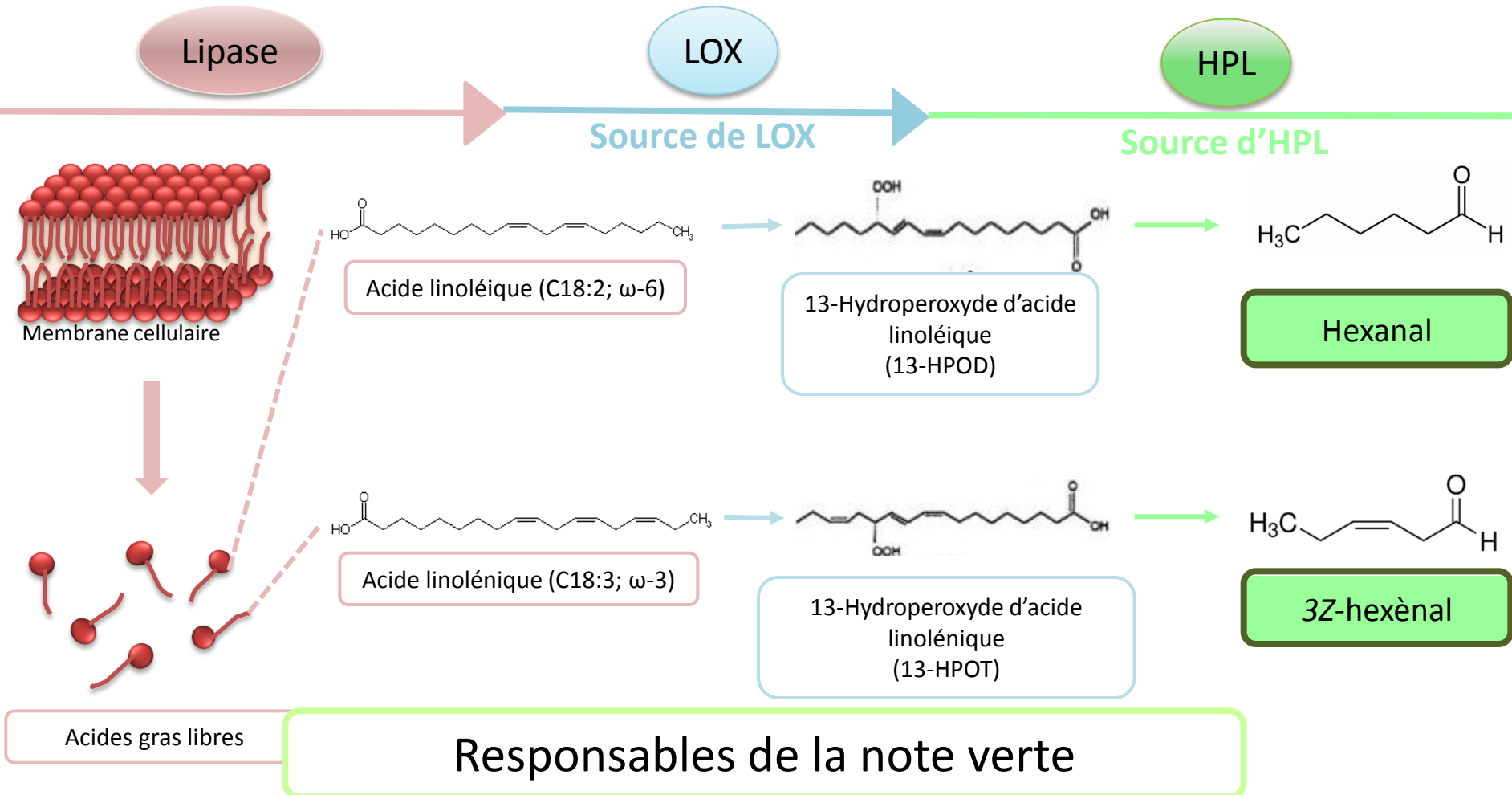
Email: sabrina.jacopini@gmail.com



Voie de la lipoxygénase

Molécules à note verte (aldéhydes; alcools):

→ Produites naturellement chez les végétaux par la voie de la lipoxygénase



Voie de la lipoxygénase

Molécules à note verte (aldéhydes; alcools):

Produites naturellement chez les végétaux par la voie de la lipoxygénase

Lipase commerciale

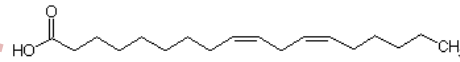
Farine de soja

Pulpes de fruit

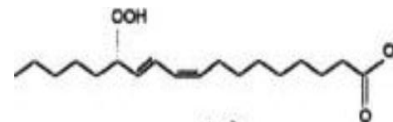
Source de LOX

Source d'HPL

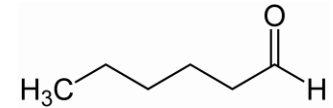
Huile végétale (tournesol/lin)



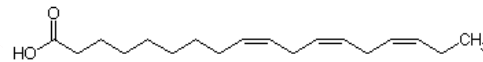
Acide linoléique (C18:2; ω -6)



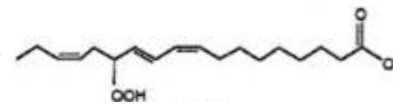
13-Hydroperoxyde d'acide linoléique (13-HPOD)



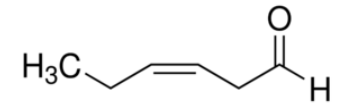
Hexanal



Acide linolénique (C18:3; ω -3)



13-Hydroperoxyde d'acide linolénique (13-HPOT)



3Z-hexènal

Procédés biocatalytiques:

- Attribution du label naturel
- Peu de spécificité
- Engendrent des déchets

Voie de la lipoxygénase

Molécules à note verte (aldéhydes; alcools):

Produites naturellement chez les végétaux par la voie de la lipoxygénase

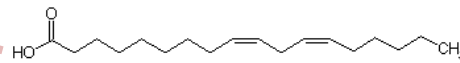
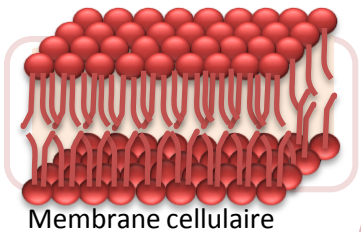
Lipase commerciale

LOX recombinante

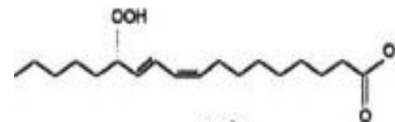
Pur HPL de recombinante

Source de LOX

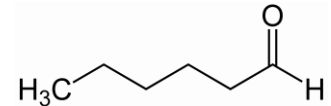
Source d'HPL



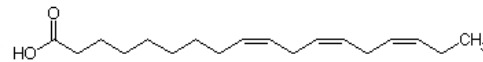
Acide linoléique (C18:2; ω -6)



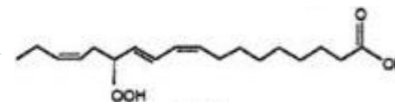
13-Hydroperoxyde d'acide linoléique (13-HPOD)



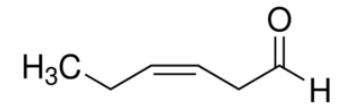
Hexanal



Acide linolénique (C18:3; ω -3)



13-Hydroperoxyde d'acide linoléique



3Z-hexènal

Procédés biocatalytiques:

- Attribution du label naturel
- Peu de spécificité
- Engendrent des déchets

Enzymes recombinantes:

- Attribution du label naturel
- Réaction maîtrisée et spécifique
- Moins de déchets

Stratégie expérimentale

■ Extraction des ARN à partir d'olive

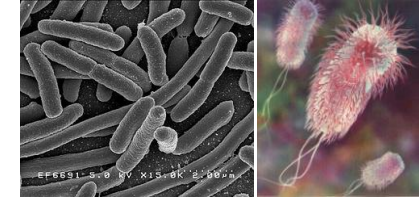
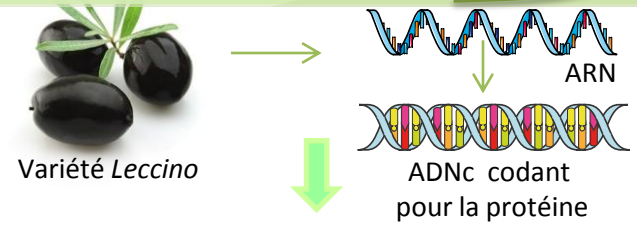


■ Clonage et expression de l'ADNc codant pour l'HPL chez *Escherichia coli*

Etape 1



Etape 2



Escherichia coli

Production de deux 13-HPL recombinantes: **13-HPLwt** et **13-HPLdel**

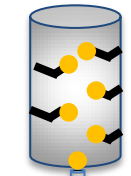
Stratégie expérimentale



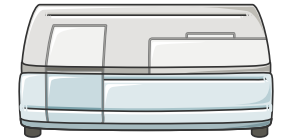
Production de deux 13-HPL recombinantes: **13-HPLwt** et **13-HPLdel**

- Purification par chromatographie d'affinité (FPLC)
- Caractérisation biochimique

Etape 3



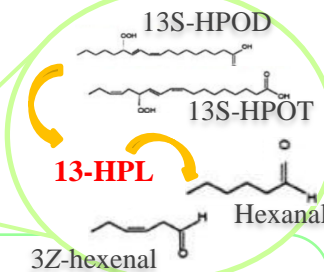
HPL pure



- Mesure du pH et de la température optimum : pH7,5 et 25°C
- Détermination des paramètres cinétiques: Plus efficaces sur 13-HPOT (13-HPOD et 13-HPOT)

- Biosynthèse des composés à note verte.

Etape 4



Optimisation de la réaction

- Différentes concentrations en substrats testés (13-HPOT et 13-HPOT) : 2; 4; 6 μ mol
- Différentes concentrations en enzymes testées (HPLwt et HPLdel) : 0.25; 0.5; 1 U/mL
- Différents temps réactionnels testés : 1; 5; 10; 15; 20 min

- Identification et quantification par GC-MS et GC-FID

Optimisation de la réaction



Production d'Hexanal

	Quantité d'enzyme (U/mL)	13-HPOD (μmol)	Hexanal (μmol)	Temps réactionnel (min)
HPLwt	1	6	5,4624 ± 0,69 91 %	10
HPLdel	0,5	4	2,6820 ± 0,19 67 %	10

Production de 3Z-hexène

	Quantité d'enzyme (U/mL)	13-HPOT (μmol)	3Z-hexène (μmol)	Temps réactionnel (min)
HPLwt	0,25	4	1,6692 ± 0,21 42 %	5
HPLdel	0,5	4	1,0161 ± 0,13 25 %	20

- Faibles taux de conversion obtenus pour la production de 3Z-hexène comparé à la production d'hexanal

↳ Sous estimation de la quantité de 3Z-hexène ? (Améliorer les conditions expérimentales de biosynthèse du produit)

- Diminution de la production d'hexanal et de 3Z-hexène quand l'HPLdel est utilisée comme catalyseur

↳ HPLwt est un meilleur catalyseur que HPLdel.

Optimisation de la réaction



Production d'Hexanal

	Quantité d'enzyme (U/mL)	13-HPOD (μmol)	Hexanal (μmol)	Temps réactionnel (min)
HPLwt	0,25	4	1,6692 ± 0,21 42 %	5
HPLdel	0,5	4	1,0161 ± 0,13 25 %	20

■ Faibles taux de conversion obtenus pour la production de 3Z-hexènal comparé à la production d'hexanal

Perspectives :

- Optimiser les conditions expérimentales de biosynthèse du 3Z-hexènal.
- Inclure la 13-HPL recombinante d'olive dans un processus complet de biocatalyse utilisant la lipase et la LOX.

➡ HPLwt est un meilleur catalyseur que HPLdel.

Merci de votre attention