



**HAL**  
open science

# Optimiser la libération de la réserve aromatique glycosylée des fruits par voie enzymatique pour un procédé adapté à la transformation de la fraise et de l'abricot

Stéphane Gaborieau

► **To cite this version:**

Stéphane Gaborieau. Optimiser la libération de la réserve aromatique glycosylée des fruits par voie enzymatique pour un procédé adapté à la transformation de la fraise et de l'abricot. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2019. Français. NNT : 2019AVIG0711 . tel-03653703

**HAL Id: tel-03653703**

**<https://hal.inrae.fr/tel-03653703v1>**

Submitted on 26 Sep 2024

**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.



# Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue le 19 mars 2019 à Avignon  
pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse**

Mention : Biochimie

---

**Optimiser la libération de la réserve aromatique glycosylée des  
fruits par voie enzymatique pour un procédé adapté à la  
transformation de la fraise et de l'abricot**

---

par

**Stéphane GABORIEAU**

Directeur de thèse : Catherine RENARD

Co-encadrant de thèse : Aurélie CENDRES

Composition du jury :

<b>Président</b>	M.	Christophe NGUYEN-THE	Directeur de recherche, Avignon
<b>Rapporteurs</b>	Mme	Marie-Noëlle MAILLARD	Professeur, AgroParisTech
	Mme	Corinne MIRAL	MCF-HDR, Nantes
<b>Examineurs</b>	Mme	Catherine RENARD	Directeur de recherche, Nantes
	Mme	Aurélie CENDRES	Docteur, directrice projet, Atelier du fruit
	Mme	Cécile PERSILLON	Docteur, responsable scientifique, Protéus

Ecole doctorale Agrosociences et Sciences

Laboratoire INRA, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, UMR 408



---

# Remerciements

---

Ce travail a été réalisé au sein de l'entreprise Atelier du Fruit, dirigée par Monsieur Alain Etiévant. Je te remercie de m'avoir accueilli dans ton entreprise et d'avoir su rester à mon écoute tout au long de la thèse.

Ces travaux ont été réalisés dans les laboratoires à l'UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) du centre de recherche d'Avignon, dirigée au cours de ma thèse par Madame Catherine Renard, puis par Monsieur Frédéric Carlin. Je les remercie tous deux de m'avoir accueilli au sein de leurs locaux.

Je remercie également Madame Catherine Renard pour avoir dirigée ma thèse, avoir su rester à l'écoute tout en faisant part de sa très riche expérience et de ses conseils avisés, ainsi que pour son soutien sans faille malgré la distance.

La co-tutelle de ma thèse a été assurée par Madame Aurélie Cendrès. Je te remercie chaleureusement pour ta bienveillance, ton soutien scientifique et moral, toujours constant même dans les moments les plus difficiles.

Je remercie également Madame Marie-Noëlle Maillard, professeur à AgroParisTech d'avoir accepté d'être rapporteure de ma thèse, ainsi que Madame Corinne Miral, MCF-HDR à l'Université des Sciences et Techniques de Nantes, qui a répondu présent pour rapporter ma thèse et assister à la fin de mon cursus qu'elle a supervisée.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Christophe Nguyen-Thé qui a accepté d'être le président du jury de ma thèse.

Je remercie vivement tous les partenaires du projet Natarôme+ qui m'ont suivi tout au long de ma thèse et tout particulièrement Madame Cécile Persillon qui aura été présente depuis mon entretien jusqu'à mon jury de thèse, en passant par mon comité de thèse.

J'en profite pour remercier Messieurs Pierre Giampaoli et Christian Ginies pour leur implication dans ma thèse. Le premier pour avoir donné de très bon conseil durant mes comités de thèse et le second pour m'avoir épaulé sur l'analytique tout au long de mes travaux et toujours dans la bonne humeur !

Je remercie également toute l'équipe d'Atelier du Fruit et l'équipe SQPOV pour leur convivialité, leur aide et leurs attentions et également pour m'avoir permis de passer ma thèse dans les meilleures conditions. Je remercie aussi mes collègues thésards, en particuliers Carla et

Alexendra toujours avec la joie de vivre ! Petite dédicace à « mon technicien » Thibault Soubrat que je remercie pour avoir régulièrement allégé ma tâche, pour son écoute.

Je remercie toute ma famille, mes parents, mes beaux-parents, mes amis ainsi que tout mon entourage proche pour avoir su me redonner confiance lors des moments de doute et pour toujours m'avoir rendu le sourire. Un grand merci à vous tous.

Et enfin je sais que je ne pourrais jamais assez te remercier pour avoir été constamment à mes côtés dans les bons moments comme les mauvais, de m'avoir supporté malgré mes coups de blues ou/et mes coups de gueule. Je ne serai pas là où j'en suis sans toi et je ne m'imagine plus être sans toi. Tu as à jamais changé ma vie, mon diamant brut et je vais te le dire une fois de plus, car ce ne sera jamais suffisant : je t'aime !



---

# Table des matières

---

Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	17
Introduction générale.....	19
1 Etat de l'art.....	23
1.1 Voies de biosynthèse des arômes et leur possible exploitation.....	23
1.1.1 Arômes de la fraise et de l'abricot.....	23
1.1.1.1 Arôme de la fraise.....	23
1.1.1.2 Arôme de l'abricot.....	27
1.1.2 Arômes issus des acides aminés.....	31
1.1.2.1 Formation d'ester.....	32
1.1.2.2 Formation des molécules aromatiques phénolique et benzylique.....	33
1.1.3 Arômes issus des acides gras.....	34
1.1.3.1 $\beta$ -oxydation.....	34
1.1.3.2 Voie de la lyxoygénase (LOX).....	35
1.1.4 Arômes issus des sucres.....	39
1.1.4.1 Rôle de la glycolyse dans la synthèse d'arômes.....	39
1.1.4.2 Cas particuliers d'arômes issus des sucres.....	39
1.1.4.3 Mise en réserve des arômes.....	40
1.1.5 Arômes issus des terpènes.....	42
1.1.5.1 Voie de biosynthèse des terpènes.....	42
1.1.5.2 Norisoprénoides.....	43
1.1.6 Discussion sur l'exploitation possible des voies de biosynthèse décrites précédemment.....	45
1.1.6.1 Arômes issus des acides aminés.....	45
1.1.6.2 Arômes issus des acides gras.....	46
1.1.6.3 Réserve d'arôme sous forme de glycosides.....	48
1.1.7 Conclusion.....	48
1.2 Glycosidases et glycosides.....	51
1.2.1 Caractéristiques générales des glycosidases.....	51
1.2.1.1 Classification.....	51
1.2.1.2 Structure générale.....	51
1.2.1.3 Fonction des glucosidases dans le vivant.....	52

1.2.2	Substrats des glycosidases.....	55
1.2.2.1	Sucres.....	55
1.2.2.2	Aglycones.....	56
1.2.3	Mécanismes d'action des glucosidases.....	57
1.2.3.1	Acides aminés clés de la réaction enzymatique.....	57
1.2.3.2	Mécanisme avec inversion de conformation.....	57
1.2.3.3	Mécanisme avec rétention de conformation.....	58
1.2.3.4	Synthèse de glycosides et transglycosylation.....	59
1.2.3.5	Libération des aglycones par réaction séquentielle.....	60
1.2.4	Facteurs influençant l'activité des glycosidases.....	61
1.2.4.1	pH et températures optimaux.....	61
1.2.4.2	Inhibitions et co-facteurs.....	62
1.2.4.3	Spécificité des glucosidases.....	62
1.2.5	Ingénierie enzymatique des $\beta$ -glycosidases.....	63
1.2.6	Glycosides de composés volatils de la fraise et de l'abricot.....	65
1.2.6.1	Méthode de mesure des glycosides.....	65
1.2.6.2	Glycosides de la fraise.....	66
1.2.6.3	Glycosides de l'abricot.....	67
1.2.7	Conclusion.....	69
1.3	Produits alimentaires intermédiaires (PAI) à base de fruit et leur fabrication.....	71
1.3.1	Définition des produits alimentaires intermédiaires.....	71
1.3.2	Etapas unitaires de la fabrication des PAI à base de fruits.....	72
1.3.2.1	Blanchiment et pasteurisation.....	72
1.3.2.2	Découpe et broyage.....	74
1.3.2.3	Imprégnation sous-vide.....	74
1.3.2.4	Stockage en froid négatif.....	75
1.3.3	Impact de la décompartmentation cellulaire sur la qualité organoleptique des PAI.....	76
1.3.3.1	Impact sur la couleur du produit.....	76
1.3.3.2	Impact sur la texture du produit.....	79
1.3.3.3	Impact sur l'arôme du produit.....	80
1.3.4	Utilisation des biotechnologies pour améliorer la qualité organoleptique des PAI.....	81
1.3.5	Utilisation des glycosidases en agroalimentaire.....	84
2	Problématique et démarche expérimentale.....	87
2.1	Axe biologique : Caractérisation de la réserve glycosidique dans la fraise et l'abricot.....	87
2.2	Axe biotechnologique : Développement de glycosidases adaptées à une application sur fruits.....	88
2.3	Axe technologique : Intégration des enzymes optimisées dans les procédés de transformations.....	90
3	Matériels et méthodes.....	93
3.1	Réactifs et solvants.....	93

## Table des matières

---

3.2	Matériel végétal.....	94
3.2.1	Fraises .....	94
3.2.2	Abricots.....	94
3.3	Glucosidases .....	94
3.4	Caractérisation des glucosidases.....	95
3.4.1	Activité sur glucoside de <i>p</i> -NP .....	95
3.4.2	Activité sur glucoside de furanéol.....	95
3.4.3	Etude de l'inhibition par les sucres .....	96
3.4.4	Profil de pH.....	96
3.4.5	Profil de température.....	96
3.4.6	Sélectivité sur les aglycones.....	96
3.4.7	Etude de spécificité sur extrait de glycosides de fraise.....	97
3.4.7.1	Extraction des glycosides de fraises .....	97
3.4.7.2	Hydrolyse enzymatique de l'extrait de glycosides de fraise .....	97
3.5	Analyse des composés volatils.....	98
3.5.1	Extraction par ASE (extraction par solvant accélérée) .....	98
3.5.1.1	Description de l'appareil.....	98
3.5.1.2	Mode opératoire.....	98
3.5.2	Extraction liquide-liquide du furanéol.....	99
3.5.3	Analyse par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS) .....	99
3.5.3.1	Méthode instrumentale .....	99
3.5.3.2	Analyse des données .....	100
3.5.4	Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	100
3.5.4.1	Prétraitement des échantillons issus de fraise.....	100
3.5.4.2	Méthode instrumentale .....	101
3.6	Mesures physico-chimiques .....	102
3.6.1	Préparation des échantillons .....	102
3.6.2	Brix.....	102
3.6.3	pH.....	102
3.6.4	Dosage sucres et acides.....	102
3.7	Préparation des échantillons pour l'analyse des composés volatils .....	104
3.7.1	Principe .....	104
3.7.2	Mode opératoire.....	104
3.8	Cinétique enzymatique sur purée de fraises et d'abricots .....	105
3.9	Modélisation de l'activité des glucosidases.....	106
3.9.1	Mise au point et réalisation du plan d'expérience .....	106
3.9.1.1	Plan composite centré.....	106
3.9.1.2	Réalisation du plan d'expérience .....	107

---

3.9.2	Modélisation mathématique et graphique.....	107
3.9.2.1	Résolution du modèle mathématique.....	107
3.9.2.2	Représentation graphique de l'activité des glucosidases.....	107
3.10	Essais à l'échelle pilote de laboratoire.....	109
3.10.1	RoboQbo.....	109
3.10.2	Imprégnation sous vide.....	109
3.10.2.1	Préparation de cubes de pommes.....	109
3.10.2.2	Protocole d'imprégnation.....	109
3.10.2.3	Evaluation de l'homogénéisation et de l'imprégnation.....	110
3.10.3	Traitement enzymatique à l'échelle pilote de laboratoire.....	111
3.10.3.1	Protocole principal.....	111
3.10.3.2	Ajustement du protocole pour l'étude de l'impact des traitements industriels sur les fruits 111	
3.10.4	Analyses sensorielles.....	111
3.10.4.1	Tests triangulaires.....	111
3.10.4.2	Analyse réalisée par la société Jean Niel.....	112
3.10.5	Statistiques.....	113
4	Résultats et discussions.....	115
4.1	Caractérisation de la réserve glycosidique dans la fraise et l'abricot.....	115
4.1.1	Mise au point de la méthode d'analyse des composés volatils et de la réserve.....	115
4.1.1.1	Choix du protocole de préparation des échantillons.....	115
4.1.1.2	Choix du solvant d'extraction des composés volatils.....	116
4.1.1.3	Tests de divers paramètres pour le protocole de préparation.....	118
4.1.1.4	Répétabilité de l'analyse des composés volatils.....	120
4.1.1.5	Ajout d'une étape de centrifugation avant l'extraction des composés volatils.....	121
4.1.1.6	Mise en place d'un contrôle HPLC pour suivre le glycoside de furanéol.....	123
4.1.2	Caractérisation des composés volatils de fraises industrielles et de fraise de bouche et de sa réserve.....	124
4.1.2.1	Abstract.....	125
4.1.2.2	Introduction.....	126
4.1.2.3	Materials & methods.....	128
4.1.2.4	Results.....	130
4.1.2.5	Discussion.....	141
4.1.2.6	Conclusion.....	143
4.1.3	Caractérisation des composés volatils d'abricots industriels et de leur réserve.....	143
4.1.4	Synthèse de chapitre.....	149
4.2	Développement de glycosidases adaptées à une application sur fruits.....	151

4.2.1	Abstract.....	152
4.2.2	Introduction.....	152
4.2.3	Material & method.....	154
4.2.3.1	Plant material.....	154
4.2.3.2	Reagents and solvents.....	154
4.2.3.3	Preparation of strawberry glycosides.....	154
4.2.3.4	Glycosidases engineering.....	155
4.2.3.5	Screening of mutant bank.....	156
4.2.3.6	Inhibition by sugars.....	157
4.2.3.7	Activity modelling.....	157
4.2.3.8	Hydrolysis of furaneol glucoside.....	158
4.2.3.9	Hydrolysis of glucoside standards.....	158
4.2.3.10	Hydrolysis of strawberry glycoside extract.....	159
4.2.3.11	Hydrolysis of strawberry puree.....	159
4.2.3.12	Furaneol quantification by HPLC.....	159
4.2.3.13	Volatile compounds quantification by GC-MS.....	160
4.2.4	Results.....	160
4.2.4.1	Parental enzyme selection.....	160
4.2.4.2	Directed evolution of glycosidases.....	167
4.2.4.3	Selection of best mutants for strawberry application.....	168
4.2.5	Discussion.....	172
4.2.5.1	Activity on furaneol glucoside.....	172
4.2.5.2	Inhibition by sugars.....	172
4.2.5.3	Optima of pH and temperature.....	173
4.2.5.4	Aglycon selectivity of glycosidases.....	174
4.2.5.5	Application of enzymes on strawberry puree.....	174
4.2.6	Conclusion.....	174
4.2.7	Synthèse de chapitre.....	174
4.3	Intégration des enzymes optimisées dans les procédés de transformation.....	177
4.3.1	Choix du fruit.....	177
4.3.1.1	Démarche.....	177
4.3.1.2	Choix de la fraise.....	177
4.3.1.3	Validation de la variété d'abricot pour l'optimisation du procédé de traitement enzymatique 186	
4.3.2	Etude du traitement du fruit avant incubation.....	187
4.3.2.1	Mise en place des limites et conditions de validation des procédés.....	187
4.3.2.2	Impact des prétraitements sur la libération de la réserve.....	188
4.3.2.3	Impact des traitements sur le profil initial.....	188

---

4.3.2.4	Analyses sensorielles des essais .....	195
4.3.3	Cinétiques .....	199
4.3.3.1	Evolution des composés volatils de la fraise par traitement enzymatique .....	199
4.3.3.2	Etude de paramètres pouvant influencer l'incomplétude de la libération de la réserve de furanéol	201
4.3.3.3	Etude de paramètres pouvant influencer le retard de la libération de la réserve de composés volatils	202
4.3.3.4	Evolution des composés volatils de l'abricot par traitement enzymatique .....	203
4.3.4	Imprégnation sous vide .....	205
4.3.4.1	Les contraintes du traitement enzymatique sur cubes de fruits.....	205
4.3.4.2	Choix du colorant pour l'optimisation visuelles de l'imprégnation .....	206
4.3.4.3	Imprégnation sous-vide de cubes de fruits avec du colorant alimentaire.....	207
4.3.4.4	Imprégnation sous-vide de cubes de fruits avec des protéines colorées.....	209
4.3.5	Synthèse de chapitre.....	209
	Conclusion générale et perspectives .....	211
	Références Bibliographiques.....	217
	Annexes et compléments.....	238

---

# Liste des figures

---

Figure 1: Schéma structurel d'une drupe typique .....	27
Figure 2 : Voie de biosynthèse de formation des esters à partir des acides aminés .....	32
Figure 3 : Voie de biosynthèse d'arômes issus de l'acide coumarique.....	33
Figure 4 : Schéma d'un cycle de la $\beta$ -oxydation.....	34
Figure 5 : Schéma des possible transformation d'un acyl-CoA .....	35
Figure 6 : Schéma de la biosynthèse de la gamma-décalactone .....	35
Figure 7 : Réaction enzymatique d'une 13-LOX et d'une 13-HPL sur l'acide linoléinique .....	36
Figure 8 : Schéma des arômes obtenues grâce à l'acide linoléinique par la voie de la LOX.....	37
Figure 9 : Schéma de la biosynthèse de la jasmone et du jasmonate de méthyl.....	38
Figure 10: Schéma de la synthèse du 6Z-nonénal et du 6Z-nonénol.....	38
Figure 11 : Schéma de la biosynthèse d'arômes issus de la glycolyse.....	39
Figure 12: Voie de biosynthèse du furanéol (HDMF) et du mésifurane (DMMF).....	40
Figure 13 : Réaction de biosynthèse du mésifurane (DMMF) à partir du furanéol (HDMF).....	40
Figure 14 : Schéma du type de réserve glycosidique en fonction de l'arôme initial .....	41
Figure 15 : Schéma de la réaction d'une glycosyltransférase .....	41
Figure 16 : Voie de biosynthèse des terpènes .....	42
Figure 17 : Schéma de la biosynthèse du géraniol et de ses dérivés .....	43
Figure 18 : Schéma de la biosynthèse des arômes issus des caroténoïdes.....	44
Figure 19 : Schéma de la biosynthèse des différents carotènes .....	45
Figure 20 : Schéma de la preuve de concept sur l'utilisation simultanée d'une ADH, d'une KDH et d'une AAT .....	46
Figure 21 : Schéma des enzymes pour l'optimisation de la voie de la LOX et leur rôle .....	47
Figure 22 : Schéma de la réaction d'une glucosidase sur un glucoside d'arôme.....	48
Figure 23 : Structure en ruban de glucosidases appartenant aux différentes familles de GH* (Ketudat Cairns & Esen, 2010) .....	52
Figure 24 : Schéma de la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'amygdaline en benzaldéhyde (Vassão et al., 2018) .....	54
Figure 25 : Exemple de saccharides possibles pour la partie sucre d'un glycoside (Sarry & Günata, 2004).....	56
Figure 26 : Exemple de substrats de glycosidases (Ketudat Cairns & Esen, 2010).....	57
Figure 27 : Schéma de la réaction d'une glycosidase avec un mécanisme d'inversion de conformation (CAZpedia) .....	58
Figure 28 : Schéma de la réaction d'une glycosidase avec un mécanisme de rétention de conformation (CAZpedia).....	59
Figure 29 : Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosidases (Grokore, 2016) .....	59
Figure 30 : Schéma global de la compétition entre la transglycosylation (1) et l'hydrolyse (2) (Grokore, 2016) .....	60
Figure 31 : Hydrolyse de la rutine en quercetine par des exo-glycosidases.....	61
Figure 32 : Effets de la température (A) et du pH (B) sur l'activité (●) et sur la stabilité (○) d'une glucosidase d' <i>Aspergillus oryzae</i> (Riou et al., 1998) .....	61
Figure 33 : Configurations des sites actifs de ZmGlu1 avec du DIMBOA (A) et de SbDhr1 avec de la dhurrine (B), (Czjzek et al., 2000) .....	63
Figure 34 : Schéma du principe du L-Shuffling™ (Fourage et al., 2013).....	65
Figure 35 : Réaction enzymatique de brunissement par la PPO.....	77
Figure 36 : Réaction catalysée par la chlorophyllase.....	78
Figure 37 : Action de la PG, PME, PAL et PL sur l'homogalacturonane de la pectine .....	79

Figure 38 : Organigramme de la méthode de sélection des meilleures enzymes mutantes.....	89
Figure 39 : Organigramme de l'étude de l'imprégnation sous-vide des enzymes dans des cubes de fruits .....	91
Figure 40 : Gamme étalon de <i>p</i> -NP à 420 nm .....	95
Figure 41: Photographie de l'appareil ASE 200 system de Dionex .....	98
Figure 42: Photographie du système GC-MS Trace 1300-ISQ LT de Thermo Scientific.....	99
Figure 43 : Gradient de température pour l'injection en GC-MS .....	100
Figure 44 : chromatogramme d'un jus de fraise injecté par HPLC avant traitement au PVPP (à gauche) et après traitement au PVPP (à droite).....	101
Figure 45: Gradient de la concentration en solvant B en fonction du temps d'analyse.....	102
Figure 46: Chromatogramme HPLC avec le standard de furanéol et de glucoside de furanéol .....	102
Figure 47 : Schéma du protocole de préparation des échantillons de purée de fruits pour l'analyse du profil et de la réserve aromatique .....	105
Figure 48 : Schéma du plan composite centré avec le numéro d'expérience pour chaque point .....	106
Figure 49 : Photographie du pilote de laboratoire roboQbo Qb8-3.....	109
Figure 50 : Dispositif de capture d'image .....	110
Figure 51: Schéma du protocole initial de la préparation des échantillons pour analyse .....	116
Figure 52: Ratio de furanéol entre la phase organique et la phase aqueuse .....	117
Figure 53: composés volatils extraits d'une purée de fraise avec 3 solvants différents (bleu : pentane/DCM (2:1) ; rouge : DCM ; vert : acétate d'éthyle/pentane (2:1)) .....	118
Figure 54: Augmentation ou diminution des composés volatils par ajout de NaCl dépassant les 20%.....	119
Figure 55: Schéma du protocole de préparation des échantillons à analyser avec la compensation de l'effet exhausteur du NaCl .....	119
Figure 56: Comparaison des profils aromatique de purée salée de Senga sangana (Bulgarie) pour une extraction directement après le broyage (bleu) et après 24h à 4°C (rouge) .....	120
Figure 57: Coefficient de variation de la quantification des composés volatils de Senga sangana (Bulgarie) .....	121
Figure 58: Variation du furanéol par rapport aux composés volatiles initiaux sans centrifugation (A) et avec centrifugation (B) avant extraction .....	122
Figure 59: Schéma du protocole modifié de préparation des échantillons pour l'analyse des composés volatils .....	123
Figure 60: Chromatogramme HPLC avec le standard de furanéol et de glucoside de furanéol .....	123
Figure 61 : Scheme of strawberries preparation for assisted-solvent extraction (ASE) of volatiles and sampling point for analysis of free- and bound-volatiles.....	129
Figure 62: Concentration of volatiles after extraction by ASE method with: dichloromethane/pentane (1:2) (blue), dichloromethane (red), ethyl acetate/pentane (2:1) (green) .....	132
Figure 63: Principal component analysis of free-volatiles in strawberries. A. Sample map; B. Variable correlation map ...	136
Figure 64: Principal component analysis of glycoconjugates in strawberries. A. Sample map ; B. Variable correlation map .....	139
Figure 65: Composés volatils quantifiables des abricots <i>Canino</i> et <i>Bebeco</i> .....	146
Figure 66: Composés volatils quantifiables après hydrolyse de la réserve des abricots <i>Canino</i> et <i>Bebeco</i> .....	147
Figure 67 : Principle of L-Shuffling™ method .....	155
Figure 68 : pH (A) and temperature (B) profile of AR2000 (round), E1487 (diamond), E3973 (cross), E4078 (triangle) and E4079 (square).....	161
Figure 69 : Graphical modelling of activity (nkat/mg of protein) of AR2000 (A), P5 (B), P6 (C), P7 (D), F1 (E) and F2 (F) from experimental design on temperature, pH and Brix.....	165
Figure 70 : Graphical modelling of activity (nkat/mg of protein) of AR2000 (A), P5 (B), P6 (C), F1 (D) and F2 (E) from experimental design on concentration of glucose, fructose and sucrose.....	166
Figure 71 : Sequence alignment of improved variants resulting from L-Shuffling™ experiment. Each color represents fragment from a parent gene among the seven selected .....	168
Figure 72 : pH (A) and temperature (B) profile of AR2000 (full diamond), E4103 (empty diamond), E4177 (full square), E4179 (empty square), E4180 (empty round), E4181 (full round), E4192 (triangle).....	169

## Liste des figures

---

Figure 73: Kinetic of release of 1-dodecanol (round), phenol (triangle), 1-hexanol (square), 4-penten-1-ol (cross) and furaneol (diamond) by E4177 .....	170
Figure 74: Chromatogramme HPLC avec le pic de glycoside de furanéol avant (noir) et après (rose) pasteurisation 3 minutes à 75°C .....	185
Figure 75 : Cinétique du coumarone pour un traitement à 1 g/kg d'AR2000 ou à 10 mL/kg E4177 d'une purée de fraise (n=1) .....	200
Figure 76 : Cinétique du furanéol pour un enzymage à 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177 d'une purée de fraise (n=1) .....	200
Figure 77 : Cinétique du furanéol pour un enzymage à 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177+pectinases d'une purée de fraise (n=2) .....	201
Figure 78 : Schéma de l'action de l'AR2000 et de la E4177 sur un di- ou un mono-glycoside.....	202
Figure 79 : Cinétique du coumarone pour un enzymage à 10 g/kg d'AR2000 ou 100 mL/kg de E4177 d'une purée de fraise (n=2) .....	202
Figure 80 : Cinétique du furanéol pour un traitement par 10 g/kg d'AR2000 ou 100 mL/kg de E4177 d'une purée de fraise (n=2) .....	203
Figure 81 : Cinétique de libération du benzaldéhyde pour un traitement par 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177 d'une purée d'abricots (n=2) .....	204
Figure 82 : Cinétique du $\beta$ -myrcène pour un enzymage à 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177 d'une purée d'abricots (n=2) .....	204
Figure 83 : Coupe de frites de pommes après mise en contact avec de la safranine à pression atmosphérique (A) et sous-vide (B) .....	206
Figure 84 : Coupes de cubes de pommes décongelé (A) et imprégnés sous-vide avec de l'hémoglobine (B) .....	206
Figure 85 : apparence du lot de cube de pommes après imprégnation sous vide, précédée d'une homogénéisation à pression atmosphérique (A) ou sous-vide (B) .....	207
Figure 86 : Cubes prélevé du lot ayant subi le procédé 1 (A) ou le procédé 2 (B) .....	207
Figure 87 : Image sous différents objectifs de coupes de cubes de pomme frais ou ayant subi un procédé .....	208
Figure 88 : Lot d'1 kg de cubes de fraise ayant subi le procédé 2 avec 1 ml de phycocyanine .....	209

---

# Liste des tableaux

---

Tableau I : Composés volatils présent dans la fraise .....	25
Tableau II : Composés volatils présents dans l'abricot .....	29
Tableau III: Composés volatils présents dans la fraise sous forme glycosylée .....	66
Tableau IV : Composés volatils présents dans l'abricot sous forme glycosylée .....	68
Tableau V: Description des différentes gammes de produits alimentaires à base de fruits et légumes .....	72
Tableau VI : Utilisations de l'imprégnation sous-vide sur la fraise.....	75
Tableau VII: Spécification des glucosidases utilisées durant la thèse .....	94
Tableau VIII: Paramètres utilisés pour la réalisation des plans d'expérience pour les interactions fructose/glucose/saccharose (à gauche) et pour les interactions pH/Brix/température (à droite).....	107
Tableau IX : Table de significativité de test triangulaire suivant un loi de distribution binomiale.....	112
Tableau X : Physico-chemical characteristics and origin of strawberries material.....	131
<b>Tableau XI: Identified<sup>9</sup> volatile compound in GC-MS analyses of strawberries samples .....</b>	<b>133</b>
Tableau XII: Number of molecules and quantitative repartition for chemical classes in strawberries free-volatiles.....	137
Tableau XIII: Number of molecules and quantitative repartition of chemical classes in strawberries glycoconjugates .....	140
Tableau XIV : Liste des composés volatils identifiés dans les abricots <i>Bebeco</i> et <i>Canino</i> .....	144
Tableau XV: Tableau des molécules augmentées et diminuées durant l'hydrolyse de purées d'abricots .....	148
Table XVI: Specifications of studied enzymes .....	156
Tableau XVII: Activity test with conversion of glucoside of furaneol by AR2000 and potential parental enzymes at 30°C and pH 3.6 .....	160
Tableau XVIII: Activity loss by inhibition from sugars for AR2000 and potential parental enzymes at 37°C and pH 3.6 with 18 g/kg of fructose, 16 g/kg of glucose and 11 g/kg of sucrose.....	161
Tableau XIX: Parameters and results of centre composite design to study interaction between temperature, pH and Brix on glucosidase activity.....	163
Tableau XX: Parameters and results of centre composite design to study interaction between concentrations of fructose, glucose and sucrose on glucosidase activity .....	164
Tableau XXI: Activity test with conversion of glucoside of furaneol by AR2000, E4103 and mutants at 30°C and pH 3.6..	168
Tableau XXII: Activity loss by inhibition from sugars for AR2000, E4103 and mutants at 37°C and pH 3.6 with 18 g/kg of fructose, 16 g/kg of glucose and 11 g/kg of sucrose.....	169
Tableau XXIII: Volatile compounds released from glycoside extract at 30°C and pH 3.6 by AR2000, E4177, E4179, E4180, E4181 and E4192 (µg/kg in equivalent 4-nonanol) .....	171
Tableau XXIV: Increase of volatile compounds in strawberry puree by deglycosylation .....	171
Tableau XXV : Quantité de furanéol libre et lié dans les différentes fraises possibles pour l'optimisation de la libération de la réserve d'arôme (n=3) .....	178
Tableau XXVI : Augmentation de composés volatils par action de l'AR2000 dans les différentes « variétés » de fraises mises à disposition par les partenaire du projet Natarôme+ (n=3) .....	179
Tableau XXVII : Augmentation de composés volatils par action de la E4177 sur les fraises de la société Agro'Novae (n=3) .....	182
Tableau XXVIII : Dosage des trois sucres majeur dans les fraises d'Agro'Novae, de Senagral et la Mibao (n=3).....	183
Tableau XXIX : Dosage du furanéol et du glycoside de furanéol par HPLC après traitement .....	184

## Liste des tableaux

---

Tableau XXX: Dosage du furanéol et du glycoside de furanéol par HPLC après traitement par de la E4177 stérilisée par microfiltration ou de la E4177 sur de la fraise lavée à l'hypochlorite de sodium .....	185
Tableau XXXI : Augmentation de composés volatils par action de l'AR2000 dans le lot d'abricots de la société Senagral (n=3) .....	187
Tableau XXXII : Concentration des composées volatils de purée de fraises ayant subi divers traitements,sans ajout de glucosidases (en µg/kg en équivalent 4-nonanol) (n=3).....	189
Tableau XXXIII : Augmentations et diminutions des composés volatils après traitement avec de l'AR2000 ou de la E4177 de fraises lavées avec de l'hypochlorite de sodium (n=2) .....	191
Tableau XXXIV : Augmentation et diminution des composés volatils après traitement avec de l'AR2000 ou de la E4177 de fraises lavées à l'hypochlorite de sodium et blanchies (n=2) .....	192
Tableau XXXV : Augmentation et diminution des composés volatils après traitement avec de l'AR2000, de la E4177 ou de la E4179 sur de la fraise lavée à l'hypochlorite de sodium et réajustée à ph 5,5 (n=2) .....	194
Tableau XXXVI : Augmentation et diminution des composés volatils après tritement avec de l'AR2000 ou de la E4177 + pectinases sur de fraises lavées à l'hypochlorite de sodium (n=2).....	195
Tableau XXXVII : Résultats du test sensoriel en interne sur les lots de fraises enzymé avec E4103 et E4177 en comparaison avec un témoin sans enzyme (n=1) .....	196
Tableau XXXVIII : Résultats de l'analyse sensoriel des fraises de la société Agro'Novae traitées avec E4177 .....	197
Tableau XXXIX : Résultats de l'analyse sensoriel des abricots de la société Sénagral traités avec E4177 .....	197
Tableau XL : Résultats de l'analyse sensoriel des fraises de la société Agro'Novae traités dans un bain d'hypochlorite de sodium et avec l'AR2000 ou la E4177 .....	198
Tableau XLI : Résultats de l'analyse sensoriel des fraises de la société Agro'Novae traités dans un bain d'hypochlorite de sodium, blanchies et avec l'AR2000 ou la E4177 .....	198
Tableau XLII : Rendements de l'imprégnation sous-vide par comptage de cubes de pommes (n=2) .....	207

---

# Liste des abréviations

---

---

## Composés chimiques

---

CoA	Co-enzyme A
DCM	Dichlorométhane
DMAPP	Diméthylallyl-diphosphate
DMMF	2,5-diméthyl-4-méthoxy-3(2H)-furanone
FPP	Farnésyl-diphosphate
GalA	Acide galacturonique
GPP	Géranyl-diphosphate
HCN	Acide cyanhydrique
HDMF	4-Hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone
HMMF	4-hydroxy-5-méthyl-2-méthylène-3(2H)-furanone
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O <sub>2</sub>	Dioxygène

---

## Enzymes

---

AAT	Alcool-acyltransférase
ADH	Alcool déshydrogénase
AER	Alkènal oxydoréductase
CCD	<i>Carotenoid cleavage dioxygenase</i>
CHS	Chalcone synthase
EGS	Eugénol synthase
GH	Glycoside hydrolase
HPL	Hydroperoxyde lyase
IGS	Isoeugénol synthase
KDH	Kétoacide déshydrogénase
KL	Klotho'
KLPH	Klotho lactase phloridzine
LOX	Lypoxygénase
LPH	Lactase phloridzine
PAL	Pectate lyase
PG	Polygalacturonase
PL	Pectin Lyase
PME	Pectine méthylestérase
POD	Peroxydase
PPO	Polyphénol oxydase

### Unités

---

h	Heure	3600 s
min	Minute	60 s
s	Seconde	
h-	Hecto-	10 <sup>5</sup>
k-	Kilo-	10 <sup>3</sup>
m-	Milli-	10 <sup>-3</sup>
μ-	Micro-	10 <sup>-6</sup>
n-	Nano-	10 <sup>-9</sup>
°C	Degrés Celsius	
Da	Dalton	
g	Gramme	
kat	Katal	mol/s
L	Litre	
M	Molaire	mol/L
Pa	Pascal	
ppb	Partie par millions	μg/kg

### Divers

---

ACP	Analyse par composant principal
AIC	Coefficient d'information d'Akaike
ASE	Extraction par solvant accélérée
EC	<i>Enzyme commission number</i>
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IQF	<i>Individually quick frozen</i>
MS	Spectrométrie de masse
PCR	Réaction en chaîne polynucléaire
RI	Indice de rétention
SPE	Extraction en phase solide

---

---

# Introduction générale

---

Les fruits, achetés et utilisés par les acteurs de la 1<sup>ère</sup> transformation, ne sont pas mûrs puisque cueillis avant la maturation pour des raisons de logistique. Or, la teneur en arôme d'un fruit est directement liée à sa maturité (Golding, Shearer, McGlasson, & Wyllie, 1999; Perez, Rios, Sanz, & Olias, 1992). Les consommateurs rejettent de plus en plus massivement les additifs dans les produits dans l'objectif d'avoir une alimentation plus saine, naturelle et éco-responsable (Agro Media, 2018c; Daily, 2018; SNIAA, 2018). Ce comportement est une réponse aux nombreuses polémiques autour de l'industrie agroalimentaire. Les pouvoirs publics tentent de satisfaire les consommateurs avec de nouvelles réglementations sur les additifs et arômes en modifiant la liste des molécules autorisées (Agro Media, 2012). Ces réglementations sont alors de plus en plus drastiques et les industries agroalimentaires doivent innover de façon régulière en mettant au point de nouveaux moyens de satisfaire les consommateurs en conservant les propriétés organoleptiques de leur produit, notamment les propriétés gustatives, tout en respectant les contraintes de qualité exigées par la législation.

C'est dans ce contexte qu'Atelier du Fruit a mené des essais, à partir des ressources scientifiques de l'INRA, jusqu'à la création d'une preuve de concept à l'échelle industrielle pour améliorer l'arôme de purées de fraises avec l'ajout d'une glycosidase commerciale, l'AR2000. Cependant si ce procédé a permis d'exclure les colorants et stabilisants des fraises, et si le rendu de couleur était très positif, le goût et la texture (liquéfaction des fraises) restaient à être améliorés, ainsi que l'opérabilité chez l'industriel. Natarôme+, projet collaboratif à Fond Unique Interministeriel est né de ces constats. Si la preuve de concept a été validée, il reste des travaux de recherches et développements à mener pour développer une gamme d'auxiliaires technologiques dédiés aux arômes ciblés et aux fruits travaillés et industrialiser les procédés.

Le but est de proposer des jus aromatiques et des produits alimentaires intermédiaires (PAI) à base de fruit (base fruits pour yaourt, confiture, glace, pâtisserie, etc...) améliorés aromatiquement sans arôme ajouté pour pouvoir lancer une gamme « Clean Label » pour suivre la tendance de l'étiquetage transparent (Agro Media, 2017, 2018a). Le « Clean Label » n'a pas de définition législative, il est néanmoins considéré dans le projet comme un label certifiant qu'un produit est sans ingrédient ajouté comme les arômes, colorants de synthèse, les agents texturants et les stabilisants. Les enzymes ne sont pas incluses dans les ingrédients car elles sont éliminées durant le procédé de fabrication du produit, ce sont des auxiliaires technologiques. Afin d'apporter des solutions innovantes commercialisables à moyen terme, le consortium NATAROME+ s'est structuré avec :

- **Protéus**, filiale du groupe SEQUENS, est une entreprise de développement et de production de solutions enzymatiques pour un usage en industrie. Elle fournit les enzymes nécessaires au projet, réalise l'évolution dirigée des enzymes pour le projet et joue le rôle d'expert en enzymologie dans le projet.
- **L'équipe Qualité et Procédé de l'UMR 408 – SQPOV** (INRA), institut de recherche public est spécialisée dans l'étude de l'évolution des propriétés nutritionnelles des fruits et légumes durant les procédés de transformation. C'est dans ce laboratoire que la thèse a été menée.
- **L'équipe GREEN de l'UMR 408 – SQPOV** (Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse), est spécialisée dans les techniques d'éco-extraction. Elle élabore pour le projet des moyens d'extraire les arômes améliorés par voies biotechnologiques en respectant le « Clean Label ».
- **Senagral** est une entreprise de fabrication de produits laitiers basée à Jouy. Elle a rejoint le projet pour travailler sur la base de fruits qu'elle utilise pour ses yaourts aromatisés et aux fruits afin d'avoir une gamme améliorée en arôme et « Clean Label ».
- **Agro'Novae**, fabricant des confitures et dérivés de la marque « Les Comtes de Provence » a rejoint le projet pour ajouter une gamme améliorée en arôme de façon « Clean Label ».
- **Jean Niel**, est une entreprise spécialisée dans la création d'arômes alimentaires pour les produits sucrés. Elle a rejoint le projet dans l'espoir d'ajouter une gamme d'arômes obtenue de façon « Clean Label » basée sur l'appellation « Arôme naturel de fruits ».

C'est au sein de ce projet que s'inscrivent ces travaux de thèse. Il s'agit d'une thèse CIFRE engagé par l'entreprise Atelier du Fruit et soutenu par l'équipe Qualité et Procédé de l'UMR 408 – SQPOV (INRA), le laboratoire d'accueil. L'Atelier du Fruit est une société créée en 2012 par Alain ETIEVANT. L'entreprise est spécialisée dans le développement d'applications de biotechnologie comme les enzymes ou la fermentation sur matrice végétale pour répondre aux besoins de l'industrie agroalimentaire.

Les travaux de la thèse consistent à « **Optimiser la libération de la réserve aromatique glycosylée des fruits par voie enzymatique pour un procédé adapté à la transformation de la fraise et de l'abricot** ».

Bien que plusieurs types d'enzymes et de fruits soient étudiés dans ce projet, il a été décidé que ces travaux de thèse se concentreront sur deux fruits et sur les enzymes glycosidases, en raison du fait que la preuve de concept ait été réalisée avec ces enzymes. Ces deux fruits ont été choisis pour avoir un représentant pour les fruits rouges et un autre pour les fruits jaunes qui sont fortement présents dans les produits à base de fruits. La fraise est le fruit préféré des consommateurs français et 92% d'entre eux l'apprécient pour son arôme spécifique ce qui en fait un excellent fruit modèle pour l'amélioration de son arôme (Bhat, Geppert, Funken, & Stamminger, 2015). L'abricot, avec 160 000 tonnes de fruits récoltés en 2015 (Agreste, 2015), est le troisième fruit le plus produit en France après la pomme et les pêches/nectarines. Il s'agit d'un fruit régional avec 3 principaux bassins de production (Languedoc-Roussillon, Vallée du Rhône et PACA) très

apprécié des français avec plus de 60% des ménages qui en consomment chaque année (Kantar Worldpanel, 2016). La fraise et l'abricot ont donc été les fruits étudiés durant la thèse.

Les glycosidases ont la capacité d'hydrolyser des glycoconjugués. Dans notre cas il s'agit d'un arôme lié à un sucre, le composé perd ses propriétés volatiles à cause de la liaison avec le sucre perdant également de ce fait ses propriétés gustatives et olfactives. L'hydrolyse permet de libérer l'aglycone du sucre et donc de recouvrer ses propriétés de volatilité. De plus ces glycoconjugués (ou glycosides) sont abondants dans les fruits. Ils peuvent ainsi avoir un réel impact sur leur arôme une fois libérés ce qui fait des glycosidases les candidates idéales pour améliorer l'arôme général des fruits. Il existe des enzymes commerciales de type glycosidase déjà couramment utilisées dans la fabrication du vin en tant qu'auxiliaire technologique exhausteur d'arôme. Cependant elles ne sont pas utilisées industriellement avec d'autres fruits à cause d'une activité pectinase qui liquéfie le fruit et d'une forte inhibition des sucres (principalement le glucose) des fruits.

Différents verrous ont été identifiés pour réussir ce challenge. Le premier est biologique et comporte deux aspects. Tout d'abord il faut être sûr de la présence d'une réserve à libérer dans les différents fruits utilisés par les industriels. Puis, il faut s'assurer que les différentes variétés d'un même fruit possèdent une réserve aromatique, car les industriels utilisent des mélanges de variétés dont les proportions pouvant changer d'une année sur l'autre. Le second est biotechnologique. Bien que l'activité enzymatique soit déjà ciblée (hydrolyse de glycosides), il faut également identifier une enzyme adaptée au milieu fruit avec son pH acide, son taux de sucre élevé, les possibles inhibiteurs du fruit, etc... et qui n'hydrolyse pas ou peu les anthocyanes des fraises dont la couleur est stabilisée par le glycoside (da Silva, Escribano-Bailón, Pérez Alonso, Rivas-Gonzalo, & Santos-Buelga, 2007). La levée de ce verrou sera aidée par l'utilisation de l'évolution dirigée. C'est une méthode consistant à changer les propriétés d'une enzyme en modifiant son gène codant. Enfin le dernier verrou est technologique. Il faut trouver la technique optimale pour mettre en contact l'enzyme et son substrat tout en prenant en compte les contraintes industrielles : la température de traitement, le temps d'occupation d'une cuve pour l'incubation, mais également le produit fini désiré. En effet entre un fruit qui reste entier et un fruit en purée l'accessibilité du substrat ne sera pas la même et l'incorporation des enzymes devra être adaptée.

L'objectif de la thèse est de lever ces divers verrous et ces travaux seront présentés dans ce mémoire organisé en 6 parties principales :

## **Introduction générale**

### **Etat de l'art : synthèse bibliographique autour de trois parties :**

- Les arômes des fruits et leurs voies de biosynthèse, décrite par type de précurseurs (acides aminés, acides gras et sucres).

- Les glycosidases avec la description de leur mode de fonctionnement, leurs rôles dans le vivant et les limites de leur utilisation.
- Les paramètres organoleptiques, notamment l'arôme, dans les PAI à bases de fruit, avec une définition de ces paramètres ainsi que leur importance pour le choix des consommateurs. Puis une description de leur évolution sera abordée par le biais des étapes unitaires de transformation et par celui des biotechnologies utilisées en industrie.

### Problématique et démarche scientifique

### Matériel et méthodes

### Résultats et discussions :

- **Partie 1** : Caractérisation du profil aromatique et de la réserve de plusieurs variétés de fraise et d'abricot
- **Partie 2** : Elaboration d'une ou plusieurs glucosidases par évolution dirigée pour une application adaptée aux conditions des fruits
- **Partie 3** : Insertion et optimisation de la réaction enzymatique durant un procédé de transformation

### Conclusion générale et perspectives

La thèse a donné lieu à plusieurs productions scientifiques :

- Une publication soumise et acceptée dans le journal « LWT - Food Science and Technology » :  
Gaborieau, S., Cendrès, A., Page, D., Ginies, C., & Renard, C. M. G. C. (2018). **Variability of free and glycosylated volatiles from strawberries destined for the fresh market and for processing, assessed using direct enzymatic hydrolysis.** LWT, 98, 187–196.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.026>
- Une publication prête à soumission dans le journal « Biochemistry process » :  
L'article s'intitule « **Development of new glucosidases adapted for the release of fruit volatile compounds in industrial processes** ». Les auteurs sont Stéphane Gaborieau, Catherine M.G.C. Renard, Cécile Persillon, Stéphanie Pallas et Aurélie Cendrès.
- Un brevet, en cours de dépôt, pour la protection de deux des nouvelles glucosidases produites durant les travaux de thèse.
- Une communication orale dans un congrès international :  
« **Optimisation Of Glycosidases For Release Of Aromas From Strawberry Glycosides** »  
Gaborieau S, Cendres A, Persillon C, Pallas S, Renard M G C durant le « 3rd Food Structure Design congress » à l'université de Debrecen (Hongrie). Du 20 au 22 Septembre 2018, dirigé par le professeur Zoltán Györi

# Chapitre 1

---

## Etat de l'art

---

### 1.1 Voies de biosynthèse des arômes et leur possible exploitation

#### 1.1.1 Arômes de la fraise et de l'abricot

L'arôme est un élément complexe des produits alimentaires. Il s'agit d'une composition de plusieurs dizaines de molécules volatiles différentes présentes dans des proportions données. De nombreuses molécules volatiles responsables de la création des arômes dans les fruits ont été isolées et identifiées dans la littérature. Elles sont généralement présentées par classement dans de grandes familles chimiques (ester, alcools, aldéhydes, cétones, lactones et terpènes). Les arômes de la fraise et de l'abricot ne font pas exception. De plus, l'arôme d'un même fruit est nuancé en fonction de sa variété, complexifiant encore plus l'étude de l'arôme de la fraise et de l'abricot.

Pour estimer l'impact d'une molécule sur l'arôme sa quantification est nécessaire mais à elle seule, elle ne peut dire si une molécule a un impact fort ou non sur l'arôme global du fruit. Pour cette raison la concentration d'un composé volatil est relativisée par le seuil de détection (ou threshold) qui est la concentration minimale pour laquelle la molécule est perçue. Pour estimer l'impact potentiel d'une molécule sur un arôme la concentration du composé divisé par le seuil de détection permet d'obtenir une valeur appelée LogOdor (Reboredo-Rodríguez, González-Barreiro, Cancho-Grande, & Simal-Gándara, 2013). Cette valeur représente la puissance aromatique d'un composé dans une matrice donnée. Il est admis qu'une molécule commence à avoir un impact sur l'arôme à partir d'un LogOdor supérieur à 1 (concentration supérieure au seuil de détection) (Reboredo-Rodríguez et al., 2013).

##### 1.1.1.1 Arôme de la fraise

La fraise vient du fraisier, de la famille des Rosacées (Potter et al., 2007). Cette plante de l'espèce des *Fragaria* comporte 21 espèces, incluant les espèces diploïdes au espèces octoploïdes.

Parmi ces espèces, 11 sont diploïdes et font figure de parents pour toutes les autres espèces. *Fragaria vesca* (fraisier des bois), *Fragaria veridis* (fraisier vert), *Fragaria moschata* (fraisier musqué), *Fragaria virginiana* (fraisier de Virginie) et *Fragaria chiloensis* (fraisier du Chili) sont les espèces historiques de fraises les plus connues. Cependant la fraise majoritairement cultivée est l'espèce octoploïde *Fragaria x ananassa* issu de l'hybridation entre *Fragaria virginiana* et *Fragaria chiloensis* (Rousseau-Gueutin et al., 2008). Ce fruit, apprécié pour son arôme, est cultivé pour être consommé frais, en jus, en purée, en confiture ou encore pour être transformé et ajouté comme ingrédients à divers produits alimentaires.

Darbellay, Luisier, Villettaz, Amadö, & Azodanlou (2004), Lambert, Demazeau, Largeteau, & Bouvier (1999), Larsen, Poll, & Olsen (1992), Ménager, Jost, & Aubert (2004), Schwieterman et al. (2014) et Ubeda, Callejón, Troncoso, Morales, & Garcia-Parrilla (2014) ont mis en évidence 18 composés volatils odorants présent dans la majorité des fraises, dont plus d'un tiers sont des esters (Tableau I). Ces composés sont : Le furanéol (note caramel), le mésifurane (note caramel), le  $\beta$ -linalool (note florale), l'acétate d'hexyl (note fruitée), le (2E)-Hexénol (note verte), le 1-hexanol (note verte), l'hexanal (note verte), le (2E)-hexénal (note verte), l'acide 2-méthylbutanoïque (note fermentée), la  $\gamma$ -décactone (note fruitée), le butanoate d'éthyle et de méthyle (note fruitée), l'hexanoate d'éthyle et de méthyle (note fruitée), l'acétate de butyle et de 3-méthylbutyle (note fruitée), le linalool oxyde (note florale) et le *trans*-nérolidol (note florale).

L'arôme des fraises est très riche en esters, en mésifurane et en furanéol qui ont un impact fort sur l'arôme grâce à leur seuil de détection bas. Les composés en C6 sont également très présents (Nuzzi, Lo Scalzo, Testoni, & Rizzolo, 2008). Ainsi, toutes ces molécules donnent principalement des notes caramel, vertes, fruitées et florales. Le *trans*-nérolidol et le  $\beta$ -linalool sont également des marqueurs importants pour l'arôme des fraises cultivées (*Fragaria x ananassa*). Selon Aharoni (2004), les fraises sauvages (*Fragaria x vesca*) sont plus riches en terpénoïdes comme le  $\beta$ -myrcène ou l'acétate de myrtényle. Le furanéol et le mésifurane ayant tous les deux un seuil de détection très bas (0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dans l'eau) et jouent un rôle majeur dans l'arôme de la fraise.

Tableau I : Composés volatils présent dans la fraise

	Seuil de detection dans l'eau (µg/L) <sup>a</sup>	Descripteurs <sup>b</sup>	Réf <sup>c</sup>
<b>Acides</b>			
Acide 2-méthylbutanoïque	180	Acide, fruité	1;2;3;5;6
Acide butanoïque	240	Fromage, aigre	1;2;5
Acide acétique	150	Acide, âcre	1;5
Acide hexanoïque	3000	Gras, fromage	1;2;5
Acide 2-méthylpropanoïque	8100	Acide, aigre	1;2;5
Acide nonanoïque	3000	Gras, cireux	5
Acide octanoïque	3000	Cireux, savon	2;5
Acide propanoïque	20000	Acide, lacté	1
<b>Alcools</b>			
1-Butanol	500	Fermenté, fruité	4
2-Méthylbutan-1-ol	140	Rôti, vineux	3
3-Méthylbutan-1-ol	250	Fermenté, alcoolique	4
1-Pentanol	-	Fermenté, âcre	3;4
(2Z)-Pentèn-1-ol	-	Vert, moutarde	3
1-Pentèn-3-ol	-	Vert, âcre	3
2-Méthylpropan-1-ol	360	Alcoolique, moisi	4
1-Hexanol	800	Herbeux, vert	1;2;3;4;5
2-Ethyl-1-hexanol	-	Frais, citrus	3
4-Vinylguaïacol	3	Fumé, boisé	4
Alcool benzylique	10000	Floral, fruité	2;4;5
(3Z)-Hexèn-1-ol	70	Vert, frais	2;4
(2E)-Hexèn-1-ol	-	Vert, fruité	1;2;3;4;5;6
1-Octanol	42	Cireux, citrus	6
2-Phényléthanol	4	Floral, rose	4
3-Phényl-1-propanol	-	Epicé, balsamique	6
<b>Aldéhydes</b>			
Pentanal	12	Vineux, fermenté	3
2-Pentènal	1,5	Vert, âcre	3
Hexanal	4,1	Vert, frais	1;2;3;5;6
(2E)-Hexènal	30	Vert, herbeux	1;2;3;5;6
(3Z)-Hexènal	0,25	Vert, herbeux	2;5
Heptanal	3	Vert, frais	3
Octanal	1,4	Cireux, citrus	3
(2E)-Octènal	3	Gras, concombre	3
Nonanal	1	Cireux, melon	3;5
(2E)-Décènal	1	Cireux, gras	3
<b>Esters</b>			
Acétate de méthyle	1,5	Vert, éthéré	4
Acétate d'éthyle	5	Ethéré, fruité	1
Acétate de propyle	2700	Fruité, âcre	3;4
Acétate de butyle	66	Fruité, éthéré	1;2;3;5;6
Acétate de 2-méthylbutyle	5	Fruité, banane	3
Acétate de 3-méthylbutyle	2	Fruité, banane	2;3;4;6
Acétate de 3-méthyl-2-butényle	-	Fruité, banane	3
Acétate de pentyle	-	Fruité poire	3

Acétate d'hexyle	2	Fruité, vert	1;2;3;4;5;6
Acétate de (2E)-hexènyle	-	Fruité, vert	2;3;5
Acétate de (3Z)-hexènyle	-	Vert, frais	6
Acétate de 2-éthylhexyle	-	Terreux, herbeux	3
Acétate d'octyle	23	Floral, cireux	3
Acétate de benzyle	2	Fruité, floral	3
Acétate de 2-Phényléthyle	3000	Floral, miel	4
Acétate de <i>p</i> -menth-1,8-diènyle	-	Fruité, mentholé	3
Propanoate d'éthyle	9	Fruité, éthéré	3;4
Butanoate d'éthyle	1	Fruité, sucré	1;3;4;5;6
Butanoate de méthyle	1	Fruité, âcre	1;2;3;4;6
Butanoate de propyle	-	Fruité, sucré	3;6
Butanoate de 2-propyle	43	Fruité, éthéré	3;6
Butanoate de 2-méthylpropyle	-	Fruité, banane	6
Butanoate de butyle	87	Fruité, tropical	3;6
Butanoate de 2-méthylbutyle	-	Fruité, abricot	6
Butanoate de 3-méthylbutyle	-	Fruité, cireux	6
Butanoate de pentyle	2110	Fruité, banane	3
Butanoate d'hexyle	250	Fruité, vert	3;6
Butanoate de 2-hexyle	-	Fruité banane	3
Butanoate de (2E)-hexènyle	-	Vert, fruité	3
Butanoate d'octyle	8200	Cireux, fruité	3
2-Méthylbutanoate de méthyle	0,92	Fruité, éthéré	2;6
2-Méthylbutanoate d'éthyle	0,01	Fruité, fruits rouges	3;4;6
2-Méthyl-2-buténoate d'éthyle	65	-	3
3-Méthylbutanoate de méthyle	4,4	Fruité	3
3-Méthylbutanoate de butyle	-	Fruité, ananas	3
3-Hydroxybutanoate d'éthyle	-	Fruité, vert	4
3-Hydroxybutanoate de méthyle	-	Fruité, pomme	4
Pentanoate de méthyle	20	Fruité, mûr	3
Pentanoate d'éthyle	1,5	Fruité, fraise	3
Hexanoate d'éthyle	1	Fruité, ananas	1;3;4;5;6
Hexanoate de méthyle	10	Fruité, ananas	1;2;3;5;6
Hexanoate de 2-propyle	-	Fruité, fruits rouges	3;6
Hexanoate d'hexyle	6400	Fruité, vert	6
Octanoate d'éthyle	5	Cireux, fruité	3
(E)-Cinnamate d'éthyle	17	Balsamique, fruité	4

#### Furanes

Furanéol	0.03	Caramel, brûlé	1;2;3;4;5;6
Mésifurane	0.03	Moisi, caramel	1;2;3;4;5;6
Furfural	280	Roussi, boisé	5

#### Cétones

2-Hexanone	NA	Fruité, champignon	3;5
3-Hexanone	41	Fruité, cireux	3
1-Pentèn-3-one	1.5	Epicé, aigre	3
2-Pentanone	70	Fruité, éthéré	1;2;4
3-Pentanone	-	Ethéré, acétone	3
4-Méthyl-2-pentanone	240	Ethéré, vert	3
2-Heptanone	1	Fromage, fruité	1;2;3
6-Méthyl-5-heptèn-2-one	50	Vert, citrus	3
2-Nonanone	5	Fromage, fruité	3

Acétoïne	800	Crémeux, beurré	4
<b>Lactones</b>			
Butyrolactone	20	Crémeux, lacté	4
$\gamma$ -Caprolactone	1600	Tonka, crémeux	2;4;5
$\gamma$ -Octalactone	7	Crémeux, noix de coco	2
$\gamma$ -Décalactone	11	Fruité, pêche	1;2;3;4;5
$\gamma$ -Dodécalactone	7	Fruité, beurré	2;3;4
Pantolactone	-	Caramel, barbe à papa	4
<b>Terpènes</b>			
$\beta$ -Linalool	6	Floral, citrus	1;2;3;4;5;6
<i>trans</i> -Linalool oxide (pyranoside)	320	Floral, vert	1;2;3;5
$\alpha$ -Terpinéol	300	Citrus, boisé	4
<i>trans</i> -Nérolidol	300	Floral, vert	1;2;3;5
Myrténal	7	Epicé, mentholé	3

<sup>a</sup> : Burdock & Fenaroli, 2010

<sup>b</sup> : "The Good Scents Company - Flavor, Fragrance, Food and Cosmetics Ingredients information"

<sup>c</sup> : 1 : Larsen, Poll, & Olsen (1992) ; 2 : Ménager, Jost, & Aubert (2004) ; 3 : Schwieterman et al. (2014) ; 4 : Ubeda, Callejón, Troncoso, Morales, & Garcia-Parrilla (2014) ; 5 : Lambert, Demazeau, Largeteau, & Bouvier (1999) ; 6 : Darbellay, Luisier, Villettaz, Amadó, & Azodanlou (2004)

### 1.1.1.2 Arôme de l'abricot

L'abricot est originaire de Chine, venant de l'abricotier, de la famille des Rosacées (Guillaume, 2014). Cet arbre du genre *Prunus* de la section *Armeniaca* contient 5 espèces : *Prunus armeniaca*, *Prunus birgantina*, *Prunus mandshurica*, *Prunus mume* et *Prunus sibirica* (Bortiri et al., 2001). L'espèce cultivée pour ses fruits est *Prunus armeniaca*. L'abricot est une drupe, un fruit indéhiscent et charnu à noyau (Figure 1). Ce fruit, apprécié pour son arôme, est cultivé pour être consommé frais, en jus, en purée, en confiture ou pour être transformé et ajouté comme ingrédients à divers produits alimentaires.

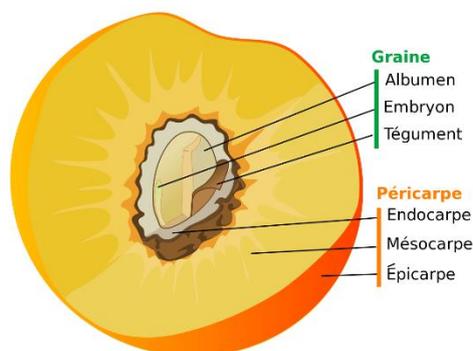


Figure 1: Schéma structurel d'une drupe typique

L'arôme de l'abricot est complexe. Aubert, Bony, Chalot, & Hero (2010), Feng et al. (2015), Gomez, Ledbetter, & Hartsell (1993), Imrak et al. (2016), Karabulut et al. (2018) et Riu-Aumatell, López-Tamames, & Buxaderas (2005) ont mis en évidence 13 composés aromatique présent dans la majorité des abricots (Tableau II). Ces composés sont : l'acétate d'hexyl (note fruitée), l'hexanal (note verte), l'acétate de butyle (note fruitée), le  $\beta$ -linalool (note florale), le  $\alpha$ -limonène (note citrus), l' $\alpha$ -terpinéol (note citrus), l'acide acétique (note acide), le (2E)-hexénol (note verte), le 1-hexanol (note verte), le (2E)-hexénal (note verte), l'acétate de (2E)-hexényle (note verte), la  $\gamma$ -décylactone (note fruitée) et le 6-méthyl-5-heptèn-2-one (note verte).

En plus de ces composés récurrents, au moins deux terpénoïdes supplémentaires, dont la nature varie en fonction des variétés sont retrouvés. En effet, en plus des terpènes précédemment cités la variété *Guoxiyulvke* contient du  $\beta$ -myrcène (note épicée) et du  $\beta$ -ocimène (note florale) alors que la variété *Dayoujia* contient du  $\beta$ -myrcène et de l' $\alpha$ -terpinène (note boisée) (J. Feng et al., 2015) ou encore le  $\beta$ -pinène (note boisée) sera présent dans la variété K113-40 et absent dans la variété K33-81 et à l'inverse le farnésol (note florale) est absent de K113-40 et présent dans K33-81 (Gomez et al., 1993).

Ainsi les familles de molécules les plus présentes dans les abricots sont les terpénoïdes, les lactones et des composés en C6 (dérivé du (3Z)-hexénal) (Takeoka, Flath, Mon, Teranishi, & Guentert, 1990). Les abricots sont donc des fruits avec des notes principalement vertes, citrus, fruitées et crème/beurre.

Le projet Natarôme+ vise à augmenter la teneur des molécules clés des arômes des fruits. Il est donc nécessaire de connaître l'origine métabolique de ces molécules et leur devenir pour choisir et utiliser de manière optimale les biotechnologies requises pour améliorer l'arôme des fruits.

Différentes voies naturelles de biosynthèse aboutissent à la création de ces métabolites secondaires. Ces voies de biosynthèse peuvent être étudiée en fonction des grands groupes de précurseurs : les acides aminés, les acides gras et les sucres. L'étude de ces voies de biosynthèse avait pour objectif initial d'identifier les étapes limitantes qui pourraient être optimisées par l'apport d'enzymes exogènes, principale voie biotechnologique d'amélioration envisagée dans le projet Natarôme.

Tableau II : Composés volatils présents dans l'abricot

	Seuil de detection dans l'eau ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>	Descripteurs <sup>b</sup>	Réf <sup>c</sup>
<b>Acides</b>			
Acide 2-méthylbutanoïque	180	Acide, fruité	4
Acide butanoïque	240	Fromage, aigre	4
Acide propanoïque	20000	Acide, lacté	4
Acide acétique	150	Acide, âcre	2;3;4;6
Acide pentanoïque	940	Acide, fromage	4
Acide hexanoïque	3000	Gras, fromage	3;4
Acide décanoïque	2200	Gras, savon	3
<b>Alcools</b>			
1-Butanol	500	Fermenté, fruité	4;6
Ethanol	8	Alcoolique, éthéré	1;3;4
2-Propanol	40000	Alcoolique, moisi	1;4
2-Méthylpropan-1-ol	360	Alcoolique, moisi	3
1-Pentanol	-	Fermenté, âcre	3;4
1-Hexanol	800	Herbeux, vert	1;3;4;6
2-Ethyl-1-hexanol	-	Frais, citrus	1;4;5
1-Heptanol	3	Vert, moisi	1
2-Heptanol	41	Fruité, citrus	4
3-Heptène-1-ol	-	Vert, terreux	4
(3Z)-Hexèn-1-ol	70	Vert, frais	1;3
(2E)-Hexèn-1-ol	-	Vert, fruité	1;4;5;6
1-Octanol	42	Cireux, citrus	3
1-Nonanol	50	Cireux, floral	4
2-Phényléthanol	4	Floral, rose	3
2,5-Diméthylphénol	400	Moisi, phénolique	5
<b>Aldéhydes</b>			
Pentanal	12	Vineux, fermenté	2;3
Acétaldéhyde	0,7	Ethéré, âcre	1;3;4
Butanal	17	Cacao, âcre	1
2-Méthylbutanal	-	Chocolat, moisi	1
3-Méthylbutanal	-	Fruité, chocolat	1
Hexanal	4,1	Vert, frais	1;2;3;4;5;6
(2E)-Hexènal	30	Vert, herbeux	1;3;4;6
(3Z)-Hexènal	0,25	Vert, herbeux	1
2,4-Hexadiènal	60	Vert, frais	1
Heptanal	3	Vert, frais	5
2,4-Heptadiènal	-	Gras, vert	1;5
(2E)-Octènal	3	Gras, concombre	4
Nonanal	1	Cireux, melon	4;5
(2E)-Nonènal	0,1	Gras, vert	3
Décanal	0,1	Cireux, citrus	2
2,4-Décadiènal	0,07	Gras, frit	5
Benzaldéhyde	100	Fruité, amande	3;4;6
Phénylacétaldéhyde	4	Vert, miel	5
Cinnamaldéhyde	50	Epicé, cannelle	3

<b>Esters</b>			
Acétate de méthyle	1,5	Vert, éthéré	1;3
Acétate d'éthyle	5	Ethéré, fruité	1;3
Acétate de propyle	2700	Fruité, âcre	1;2
Acétate de butyle	66	Fruité, éthéré	1;2;4;5;6
Acétate de 3-méthylbutyle	2	Fruité, banane	2
Acétate de pentyle	-	Fruité poire	6
Acétate d'hexyle	2	Fruité, vert	1;2;3;4;5;6
Acétate de (2E)-hexènyle	-	Fruité, vert	5
Acétate de (3Z)-hexènyle	-	Vert, frais	1;2;4;6
2-Méthylpropanoate de méthyle	-	Fruité, éthéré	1
Butanoate d'éthyle	1	Fruité, sucré	2;3
Butanoate de méthyle	1	Fruité, âcre	1
Butanoate de 2-propyle	43	Fruité, éthéré	1
Butanoate de butyle	87	Fruité, tropical	1
Butanoate de (2E)-hexènyle	-	Vert, fruité	5
2-Méthylbutanoate de méthyle	0,92	Fruité, éthéré	1
Hexanoate d'éthyle	1	Fruité, ananas	3
Octanoate d'éthyle	5	Cireux, fruité	3
Nonanoate d'éthyle	12000	Cireux, fruité	3
Décanoate d'éthyle	8	Cireux, fruité	3
Benzoate d'éthyle	100	Mentholé, médicament	3
Benzoate d'hexyle	250	Balsamique, vert	4
(E)-Cinnamate d'éthyle	17	Balsamique, fruité	3
<b>Furanes</b>			
Furfural	280	Roussi, boisé	3;4
5-Méthylfurfural	6000	Caramel, roussi	3
<b>Cétones</b>			
2-Hexanone	NA	Fruité, champignon	5
2-Butanone	-	Fruité, chimique	3
Acétoïne	800	Crémeux, beurré	3;4
3-Hexanone	41	Fruité, cireux	5
Acétone	40000	Ethéré, pomme	1
1-Hydroxy-2-propanone	-	Caramel, doux	4
6-Méthyl-5-heptèn-2-one	50	Vert, citrus	1;3;5;6
2,2,6-Triméthylcyclohexan-1-one	100	Absinthe, âcre	5
<b>Lactones</b>			
$\gamma$ -Caprolactone	1600	Tonka, crémeux	3;6
$\delta$ -Octalactone	-	Crémeux, noix de coco	6
$\gamma$ -Octalactone	7	Crémeux, noix de coco	5;6
$\gamma$ -Nonalactone	7	Crémeux, noix de coco	3;5;6
$\delta$ -Décalactone	100	Crémeux, noix de coco	5
$\gamma$ -Décalactone	11	Fruité, pêche	3;4;5;6
$\gamma$ -Undécalactone	60	Crémeux, fruité	5
$\gamma$ -Dodécalactone	7	Fruité, beurré	3;5;6
$\gamma$ -Jasmolactone	-	Gras, beurré	6
Jasmine lactone	-	Floral, jasmin	6
Dihydroactinidiolide	-	Fruité, abricot	5;6

Terpènes			
$\beta$ -Linalool	6	Floral, citrus	1;2;3;5;6
$\alpha$ -Limonène	4	Citrus, doux	1;2;3;4;5
$\alpha$ -Ionone	0,6	Floral, violette	5
$\beta$ -Ionone	0,007	Floral, boisé	1;3;5
(E,E)-Pseudoionone	-	Balsamique, floral	5
Dihydro- $\beta$ -ionone	-	Boisé, fruits rouges	1;3;5
Dihydro- $\beta$ -ionol	-	Boisé, floral	3
$\beta$ -Myrcène	-	Epicé, floral	2;4
$\alpha$ -Terpinène	-	Boisé, terpénique	2
$\beta$ -Ocimène	-	Floral, vert	2;3
$\beta$ -Pinène	140	Boisé, herbeux	5
$p$ -Cymène	-	Terpénique, boisé	3;5
Eucalyptol	1	Herbeux, mentholé	3
Nérol	680	Floral, rose	3;5
$\beta$ -Cyclocitral	-	Tropical, safran	3
$\alpha$ -Isophorone	200	Boisé, vert	3;5
Menthol	950	Mentholé, frais	3
Géraniol	4	Floral, citronnelle	3;5
Citral	-	Citrus, frais	5
Isocinéole	-	Herbeux, frais	3
Géranyle acétone	60	Floral, fruité	3;5
Acétate de géranyle	9	Floral, vert	5
Camphène	-	Boisé, camphre	4
4-Carvomenthénol	-	Epicé, frais	5
Farnésol	1000	Floral, frais	5
Farnésyle acétone	-	Fruité, vineux	5
Hexahydrofarnésyle acétone	-	Floral, vert	5
$\alpha$ -Terpinéol	300	Citrus, boisé	2;3;4;5;6

<sup>a</sup> : Burdock & Fenaroli, 2010

<sup>b</sup> : "The Good Scents Company - Flavor, Fragrance, Food and Cosmetics Ingredients information"

<sup>c</sup> : 1 : Karabulut et al. (2018) ; 2 : Feng et al. (2015) ; 3 : Riu-Aumatell, López-Tamames, & Buxaderas (2005) ; 4 : Imrak et al. (2016) ; 5 : Gomez, Ledbetter, & Hartsell (1993) ; 6 : Aubert, Bony, Chalot, & Hero (2010)

### 1.1.2 Arômes issus des acides aminés

Les acides aminés sont connus pour être les briques fondamentales des protéines et de ce fait, sont principalement utilisés par les organismes vivants pour les synthétiser. Cependant le métabolisme secondaire peut utiliser les acides aminés libres pour la synthèse de molécules volatiles responsables d'une partie des arômes dans les fruits. A partir de ces précurseurs, des alcools, des acides carboxyliques et des esters avec un pouvoir olfactif et gustatif peuvent être créés. Les acides aminés représentent donc des éléments essentiels pour la synthèse d'arômes en particuliers pour les esters ramifiés et les arômes benzyliques.

### 1.1.2.1 Formation d'ester

Les esters ramifiés tels que les esters de 2-méthylbutyle, les esters de 2-méthylpropyle ou encore les esters de 3-méthylbutanoates qui sont retrouvés dans la fraise et l'abricot, proviennent de la conversion des acides aminés libres. De manière générale la formation de ces esters se déroule comme suit. Premièrement, une transaminase agit pour désaminer l'acide aminé, puis la molécule est traitée soit par une décarboxylase puis une alcool déshydrogénase (ADH) pour obtenir la partie alcool de l'ester, soit par une kétoacide déshydrogénase pour obtenir la partie carboxyle de l'ester (Beaulieu & Baldwin, 2002). Ainsi la L-isoleucine donne les esters de 2-méthylbutyle et de 2-méthylbutanoate (Hansen & Poll, 1993) et la L-valine donne les esters de 2-méthylpropyle et de 2-méthylpropanoate (Yabumoto, Yamaguchi, & Jennings, 1977). La L-isoleucine subit tout d'abord l'action d'une  $\alpha$ -aminotransférase pour donner l' $\alpha$ -kéto- $\beta$ -methylvalérate. L' $\alpha$ -kétoacide déshydrogénase transforme ensuite cette molécule en 2-méthylbutanoyl-CoA qui constituera la partie carboxyle des esters. Quant à l' $\alpha$ -kétoacide décarboxylase et l'ADH, leur action successive permet d'obtenir le 2-méthylbutan-1-ol qui composera la partie alcool des esters (Sugimoto, Forsline, & Beaudry, 2015) (Figure 2). Le 2-méthylbutanoyl-CoA sera ensuite transformé en ester comme le 2-méthylbutanoate d'éthyle ou le 2-méthylbutanoate de méthyle, grâce à l'éthanol et au méthanol naturellement présents dans le fruit. Ces arômes, importants dans la fraise (Ménager et al., 2004), sont à l'origine du goût fruité et frais dans le fruit.

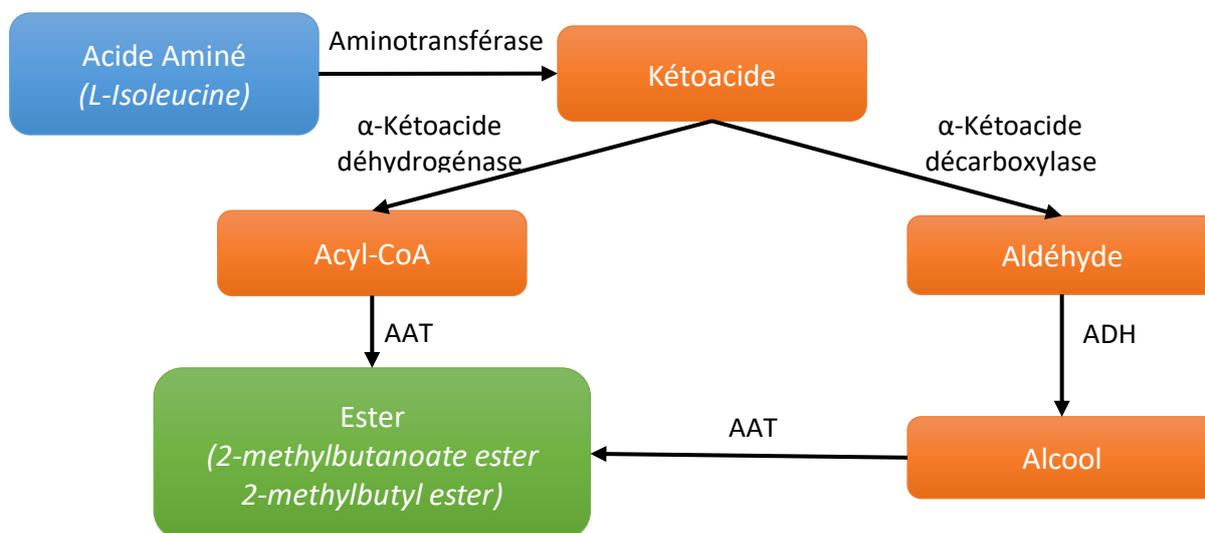


Figure 2 : Voie de biosynthèse de formation des esters à partir des acides aminés

Une fois chaque partie de l'ester obtenue, une dernière étape est nécessaire pour obtenir les esters odorants : l'action d'une alcool acyl-CoA transférase (AAT). Cette enzyme a besoin pour substrats d'un acyl-CoA et d'un alcool, tel que l'éthanol ou le méthanol. Ainsi la L-valine donne le 2-méthylpropanoyl-CoA qui est converti par l'AAT avec le méthanol en isobutyrate de méthyle qui donne un goût « sucré et fruité » (Gonda et al., 2010). González-Agüero et al. (2009) ont montré une corrélation entre l'augmentation de l'expression de l'AAT de l'abricot *Modesto* (*Pa-aa1*), la

maturation du fruit et l'accumulation d'esters. De même, Cumplido-Laso et al. (2012) ont également mis en évidence dans la fraise cette corrélation entre l'augmentation de l'expression de FaAAT2 (*Fragaria x ananassa* AAT 2), la maturation du fruit et l'accumulation d'ester acétate aromatique et à courte chaîne (C1 à C8 pour le partie alcool). De plus, cette expression de l'enzyme qui stimule la voie de biosynthèse des esters, va de pair avec une diminution des acides aminés libres durant la maturation de la fraise selon Zhang et al. (2011). L'utilisation des acides aminés est donc la voie de prédilection pour la biosynthèse des esters ramifiés.

### 1.1.2.2 Formation des molécules aromatiques phénolique et benzylique

Bien que peu représentée dans la fraise et l'abricot, il existe une autre voie de biosynthèse de composés volatils à partir d'acides aminés aromatiques tels la tyrosine et la phénylalanine. En plus de la formation d'ester, la phénylalanine peut emprunter la voie de l'acide *p*-coumarique. La phénylalanine est convertie en acide cinnamique par une phénylalanine amino lyase. Ce dernier est ensuite transformé en acide *p*-coumarique par l'action d'une cinnamate hydrolase contenu dans la membrane des cytochromes P<sub>450</sub> (Czichi & Kindl, 1975). L'acide *p*-coumarique est à l'origine de plusieurs composés volatils phénoliques, notamment l'anol, le chavicol, l'eugénol et l'isoeugénol. Ainsi le *p*-coumaroyl-CoA et son dérivé le féruloyl-CoA sont, respectivement, convertis en anol et chavicol et en eugénol et isoeugénol, après traitement par une AAT puis par l'eugénol ou l'isoeugénol synthase (Hoffmann et al., 2011). Bien que ces molécules jouent un rôle anti-microbien chez les végétaux (Ghosh, Mukherjee, & Chandrasekaran, 2014), il s'agit également de molécules volatiles qui donnent, généralement, un goût épicé.

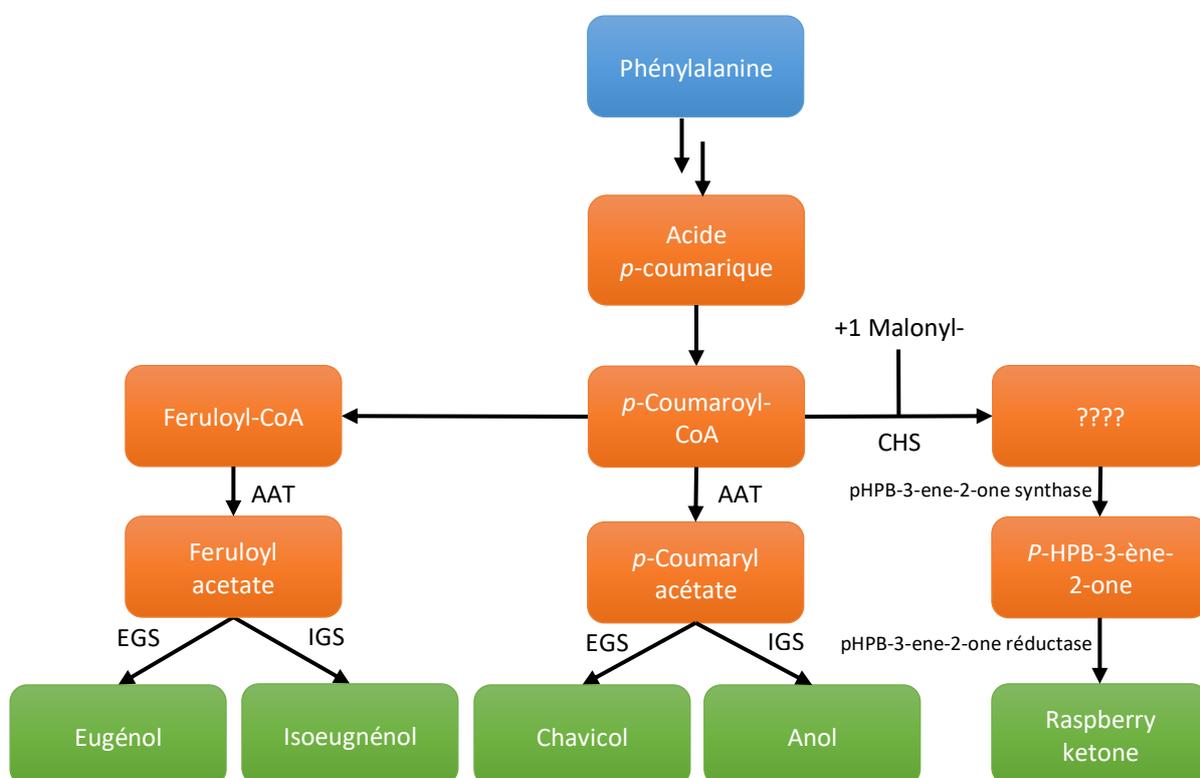


Figure 3 : Voie de biosynthèse d'arômes issus de l'acide coumarique

Dans certains fruits, dont la framboise, il existe un cas particulier où le *p*-coumaroyl-CoA peut également donner la « *raspberry ketone* » constituant l'arôme principal de ce fruit. Elle est produite par la condensation du *p*-coumaroyl-CoA avec un malonyl-CoA grâce à la chalcone synthase (CHS), puis, avec les deux réactions enzymatiques successives de la *p*HPB-3-ène-2-one synthase et de la *p*HPB-3-ène-2-one réductase (Borejsza-Wysocki & Hrazdina, 1994) (Figure 3).

### 1.1.3 Arômes issus des acides gras

Les acides gras sont en priorité utilisés par l'organisme pour créer de l'énergie grâce à la  $\beta$ -oxydation. Cependant ils interviennent également dans le métabolisme secondaire, notamment dans la formation d'arôme. Les composés en C6, les lactones et les composés volatils à chaîne longue (esters, aldéhydes, cétones et alcools), qui sont retrouvés dans la fraise et l'abricot comme l'hexanal, la  $\gamma$ -décylactone, le 1-heptanol ou le décanoate d'éthyle, font parties de ces molécules issues des acides gras.

#### 1.1.3.1 $\beta$ -oxydation

La  $\beta$ -oxydation ou hélice de Lypen est la voie métabolique des acides gras la plus connue. Elle consiste en une dégradation progressive des acides gras par pertes successives d'unités de 2 carbones (acétyl-CoA) (Figure 4).

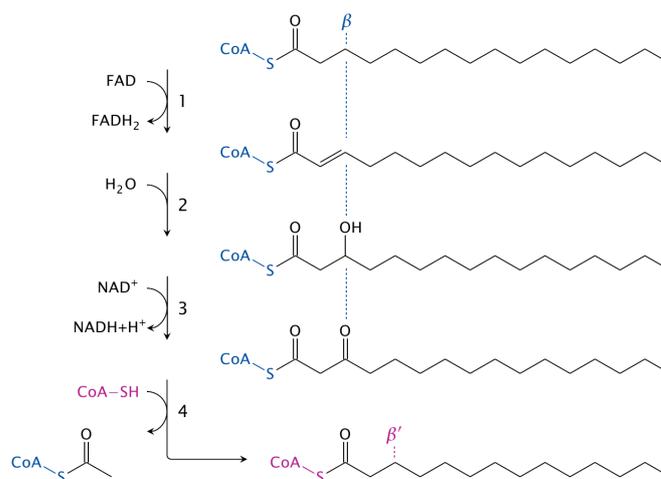


Figure 4 : Schéma d'un cycle de la  $\beta$ -oxydation

L'oxydation peut ne pas être totale, il en résulte alors des acyl-CoA allant de 5 à 10 carbones qui peuvent ensuite être utilisés dans la synthèse de divers arômes de type ester, lactone, acide, alcool ou aldéhyde (Schwab, Davidovich-Rikanati, & Lewinsohn, 2008), comme le pentanal, retrouvé dans les fraises *Festival* et *Camarosa* (Schwieterman et al., 2014) ou encore l'heptanal retrouvé dans l'abricot *Hacihaliloğlu* (Karabulut et al., 2018) (Figure 5).

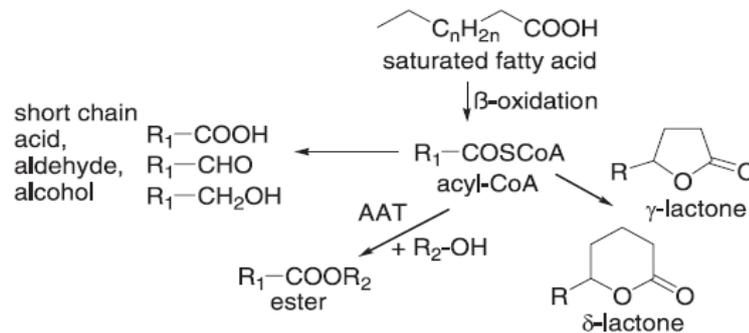


Figure 5 : Schéma des possible transformation d'un acyl-CoA

L'hydrolyse de l'acyl-CoA produit un acide qui peut être réduit en aldéhyde puis en alcool. Quant à elle, l'action de l'AAT sur l'acyl-CoA permettra de former les esters à chaîne linéaire tels que l'octanoate de méthyle aux notes vertes et fruitées ou encore le pentanoate d'éthyle aux notes de pomme et de fraise. Si l'acide gras porte un groupement hydroxyle, la  $\beta$ -oxydation peut engendrer la synthèse de lactones (esters cycliques), comme avec l'acide ricinoléique. Il se lactonise spontanément en  $\gamma$ -décylactone aux notes fruitées de pêche après 3 cycles d'oxydation et l'action d'une acide gras désaturase pour éliminer l'insaturation de l'acide ricinoléique (Waché, Aguedo, LeDall, Nicaud, & Belin, 2002) (Figure 6). Sánchez-Sevilla, Cruz-Rus, Valpuesta, Botella, & Amaya (2014) ont mis en évidence une corrélation entre l'expression de l'acide gras désaturase *FaFAD1* dans la fraise et l'accumulation de  $\gamma$ -décylactone dans le fruit.

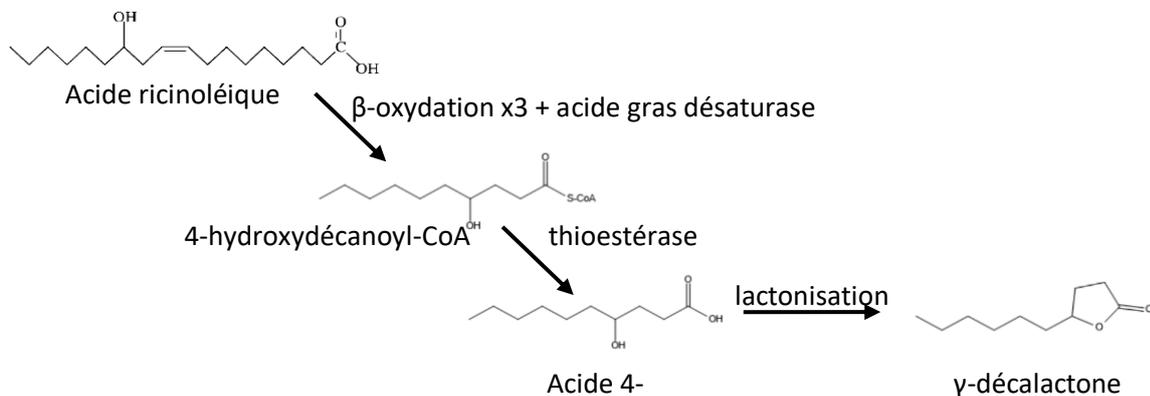
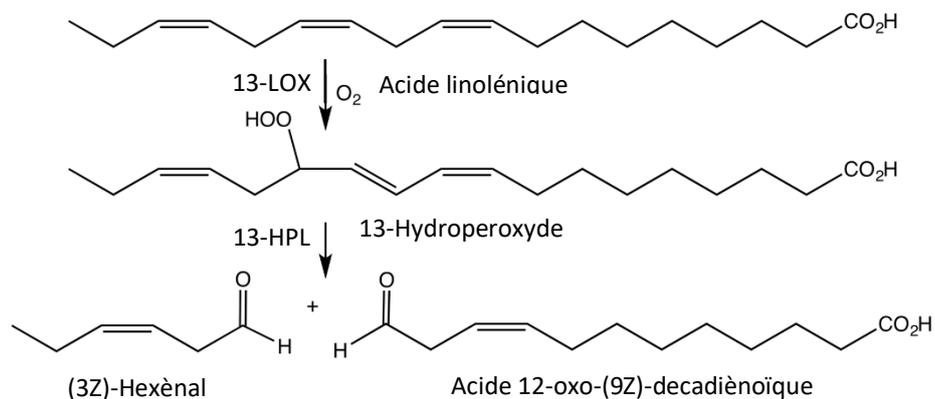


Figure 6 : Schéma de la biosynthèse de la gamma-décylactone

### 1.1.3.2 Voie de la lipoxygénase (LOX)

Les composés en C6 sont parmi les plus importants composés volatils de la fraise et de l'abricot issus des acides gras. Ces molécules viennent de la voie de la lipoxygénase (LOX). Cette voie est responsable de la formation d'alcools et d'aldéhydes notamment en C<sub>6</sub> et C<sub>9</sub>, réputés pour leurs notes vertes et fraîches. Dans les plantes ces derniers viennent de l'acide linoléique et

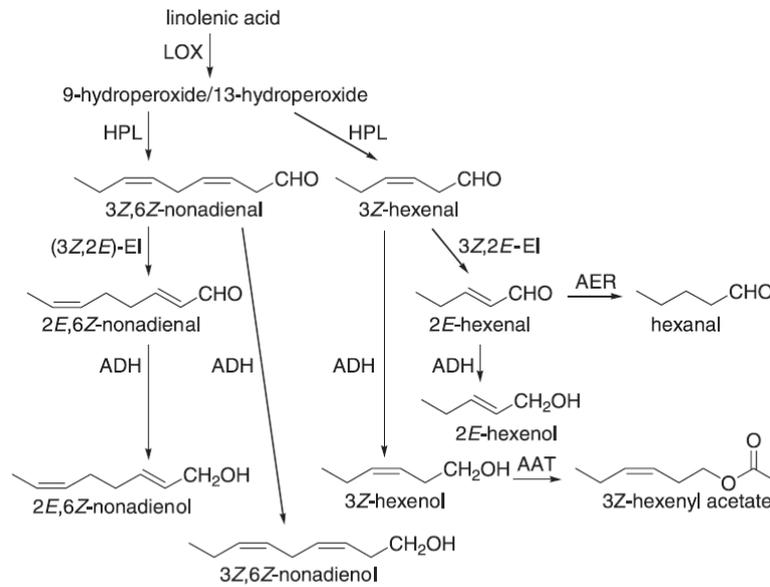
linoléique pour donner de l'hexanal, du (2E)-hexèn-1-ol ou encore du (3Z)-hexènal qui sont retrouvés dans la majorité des fraises et abricots.



**Figure 7 : Réaction enzymatique d'une 13-LOX et d'une 13-HPL sur l'acide linoléique**

La voie de la LOX est centrée sur l'action de deux enzymes principales : la LOX et l'hydroperoxyde lyase (HPL). La LOX prend en charge des acides gras en C18 insaturés, principalement l'acide linoléique et l'acide linolénique et leur ajoute un oxygène en C9 ou C13 en fonction du type de LOX, puis l'HPL scinde la molécule en deux en formant deux groupements carbonyles (Matsui, 2006) (Figure 7). Il existe 3 types de LOX en fonction du produit qu'elles synthétisent : les 9-LOX qui produisent exclusivement des 9-hydroperoxydes ; les 13-LOX qui produisent exclusivement des 13-hydroperoxydes ; les LOX non-spécifiques qui produisent un mélange de 9- et 13-hydroperoxydes. Ces hydroperoxydes sont ensuite pris en charge par des HPL qui sont également divisées en trois groupes en fonction du substrat pris en charge : les 9-HPL qui utilisent exclusivement des 9-hydroperoxydes ; les 13-HPL qui utilisent exclusivement des 13-hydroperoxydes ; les HPL non-spécifiques qui utilisent indifféremment les 9- et 13-hydroperoxydes. Les 9-hydroperoxydes vont former les composés en C9 alors que les 13-hydroperoxydes donnent les composés en C6.

A partir de l'acide linoléique, les 13-LOX et 13-HPL vont produire le (3Z)-hexènal et les 9-LOX et 9-HPL le (3Z,6Z)-nonadiènal. Le (3Z)-hexènal peut devenir, par action d'une ADH, du (3Z)-hexèn-1-ol qui pourra former de l'acétate de (3Z)-hexényle via une AAT. Le (3Z)-hexènal peut également donner du (2E)-hexènal par action d'une (3Z,2E)-énal isomérase, pouvant devenir aussi un alcool via une ADH. Par action d'une alcènal oxydiréductase (AER), le (2E)-hexènal peut être transformé en hexanal, lui-même sujet à l'action d'une ADH puis d'une AAT. Le (3Z,6Z)-nonadiènal peut également subir l'action d'une ADH, ou d'une (3Z,2E)-énal isomérase donnant respectivement le (3Z,6Z)-nonadièn-1-ol et le (2E,6Z)-nonadiènal (Schwab, Davidovich-Rikanati, & Lewinsohn, 2008) (Figure 8). Si le substrat de départ est l'acide linoléique, l'action des LOX et HPL donne du (3Z)-nonènal et de l'hexanal, pouvant aboutir à du (2E)-nonènal, du (3Z)-nonèn-1-ol, du (2E)-nonèn-1-ol et du 1-hexanol par action de (3Z,2E)-énal isomérase et d'ADH.



AAT, alcohol acyl CoA transferase; ADH, alcohol dehydrogenase; AER, alkenal oxidoreductase; LOX, lipoxygenase; 3Z,2E-EI, 3Z,2E-enal isomerase; HPL, hydroperoxide lyase;

**Figure 8 : Schéma des arômes obtenus grâce à l'acide linoléique par la voie de la LOX**

Pérez, Sanz, Olías, & Olías (1999) ont montré que la fraise *Camarosa* possède une activité LOX non-spécifique avec une préférence pour l'acide linoléique comme substrat. Elle synthétise 70% de 13-hydroperoxyde et 30% de 9-hydroperoxyde. Cependant cette fraise possède uniquement une activité 13-HPL, avec également une préférence pour le substrat issu de l'acide linoléique, ce qui exclut la prise en charge des 9-hydroperoxydes. Ainsi, seuls des composés en C6 peuvent être formés dans cette fraise. Si cette caractéristique s'étend aux autres variétés de fraises, cela pourrait expliquer la prédominance des composés en C6 dans l'arôme des fraises.

Cependant, les enzymes de cette voie et leur substrat ne sont naturellement pas en contact car ils sont dans des compartiments cellulaires différents ce qui ne rend possible la formations des composés en C6 que lors de la décompartmentation cellulaire. Celle-ci peut avoir lieu durant la maturation du fruit lors de la perte de fermeté ou lors d'une blessure (morsure, découpe, etc...) (B. Zhang et al., 2009).

Parmi toutes les molécules aromatiques, certaines sont plus recherchées par l'industrie. Elles sont appelées molécules rares. Elles sont très intéressantes pour les industriels mais elles sont difficilement isolables à partir des végétaux, car produites en petite quantité. La difficulté de sourcer ces arômes les empêche d'être utilisé pour l'appellation « extrait d'arôme naturel ». Quelques exemples de molécules rares issus de la voie de la LOX sont exposés ci-après.

La jasmone est une molécule très utilisée en aromatique et parfumerie pour sa note florale de jasmin. Cependant cette jasmone est obtenue par synthèse organique et il est très difficile d'en obtenir en quantité à partir de végétaux pour un extrait naturel. Elle est issue de l'acide linoléique

(Schwab et al., 2008). L'action successive de la 13-LOX, de l'*allene oxide synthase* (AOS) et de l'*allene oxide cyclase* (AOC) donnera l'acide cis-12-oxo-phytydiénique (cis-OPDA). L'OPDA est ensuite réduit dans le peroxysome du végétal par la cis-OPDA réductase 3 (OPR3), l'acide 8-((1S,2S)-3-oxo-2((Z)-pent-2-en-1-yl)cyclopentyl)octanoïque (OPC-8:0) est alors obtenu. Cet acide subit trois cycles de  $\beta$ -oxydation pour donner le jasmonoyl-CoA. Il serait ensuite hydrolysé par une acyl-CoA estérase du peroxysome pour donner l'acide jasmonique. Celui ci peut ensuite former deux arômes d'intérêt : le méthyl jasmonate, par l'action de la jasmonate méthyl transférase (JMT), et la cis-jasmone, par dégradation oxydative (Jimenez-Aleman et al., 2015 et Schaller, Schaller, & Stintzi, 2004) (Figure 9).

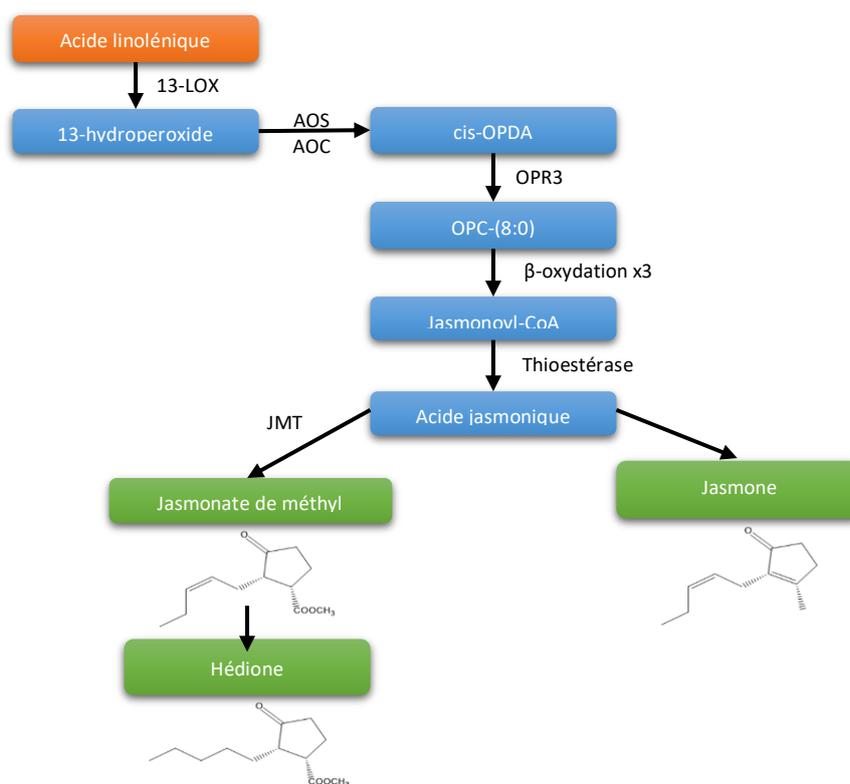


Figure 9 : Schéma de la biosynthèse de la jasmone et du jasmonate de méthyl

Le 6(Z)-nonénal et nonénol sont recherchés pour leurs notes vertes et fraîches assimilables au melon. Tout comme la jasmone, ces deux molécules sont issues de l'acide linoléique. Par action de la 9-LOX puis d'une HPL, le 3Z,6Z-nonadiénal est synthétisé. La (3Z,2E)-ène isomérase le convertit en 2E,6Z-nonadiénal. Ensuite, l'action d'une alkénal oxydoréductase (AER) sur ce composé pourrait conduire au 6Z-nonénal. L'action d'une ADH permettrait alors d'obtenir l'alcool à partir de l'aldéhyde (Schwab et al., 2008) (Figure 10).



Figure 10: Schéma de la synthèse du 6Z-nonénal et du 6Z-nonénol

## 1.1.4 Arômes issus des sucres

### 1.1.4.1 Rôle de la glycolyse dans la synthèse d'arômes

La glycolyse est la voie de biosynthèse qui permet la création de l'énergie dans un organisme à partir du glucose. Cette voie ubiquitaire a un impact certain sur les arômes de fruits en produisant à partir de son produit final, le pyruvate, l'éthanol des éthyl-esters et l'acetyl-CoA des acétates-esters (Yabumoto, Yamaguchi, & Jennings, 1978) (Figure 11). La glycolyse est également le début de la voie du méthylérythritol, une voie de biosynthèse des terpènes spécifiques aux plantes et microorganismes, les terpènes étant connus pour leurs arômes, tel le limonène ou le linalool. Ils seront développés ultérieurement.

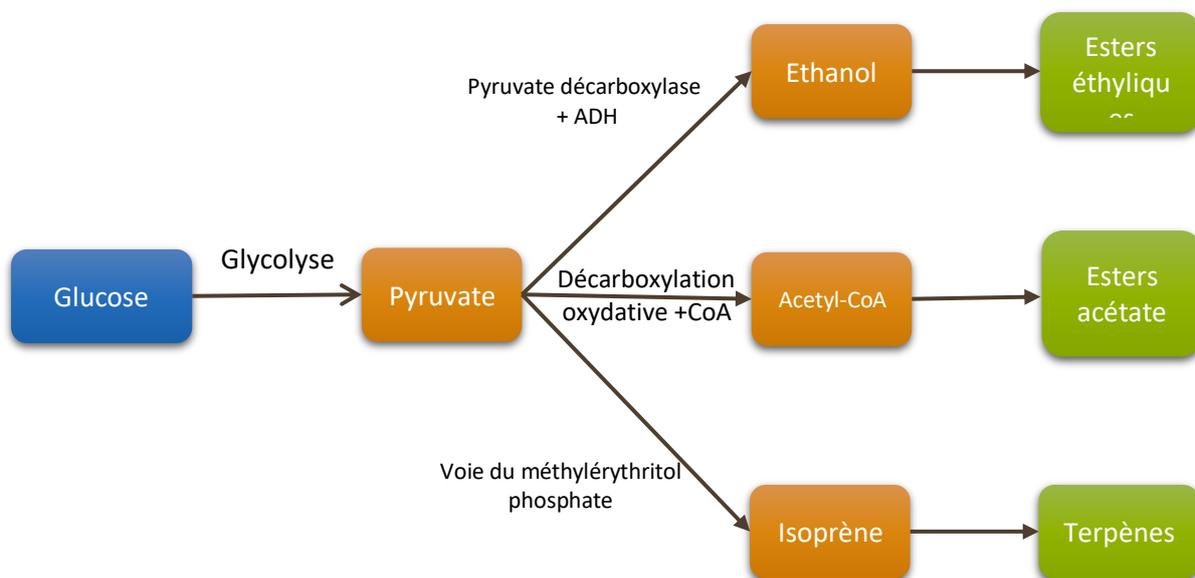


Figure 11 : Schéma de la biosynthèse d'arômes issus de la glycolyse

### 1.1.4.2 Cas particuliers d'arômes issus des sucres

Dans de rares cas les sucres sont les précurseurs directs d'arômes. C'est le cas pour les furanones tel que le furanéol (et ses dérivés) qui est l'arôme signature de la fraise caractérisée par sa saveur sucrée et caramélisée. Son précurseur est le fructose-1,6-diphosphate (F1,6DP), un des intermédiaires de la glycolyse (Schwab, 1998). Les premières étapes à partir du F1,6DP n'ont pas encore été déterminées mais le sucre subirait l'effet de phosphatases ainsi que des oxydations pour former la 4-hydroxy-5-méthyl-2-méthylène-3(2H)-furanone (HMMF). Ce dernier est réduit par la FaQR (*Fragaria ananassa* quinone reductase) pour former la 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone (HDMF), ou furanéol (Raab, 2006) (Figure 12).

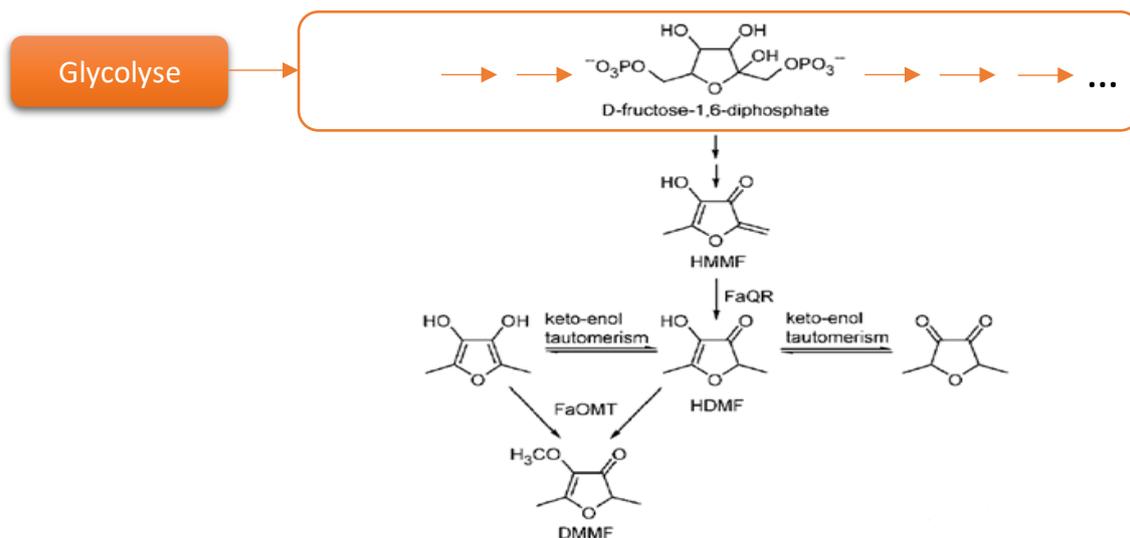


Figure 12 : Voie de biosynthèse du furanéol (HDMF) et du mésifurane (DMMF)

Durant la maturation des fraises *Fragaria x ananassa*, le furanéol peut être utilisé comme substrat par la *FaOMT* (*Fragaria x ananassa* O-méthyltransférase) pour donner le mésifurane (2,5-diméthyl-4-méthoxy-3(2H)-furanone ou DMMF), une molécule clé de l'arôme de fraise, avec la S-adénosyl-L-méthyonine comme cofacteur (Figure 13). La forte synthèse de ce composé volatil est une particularité des fraises cultivées. En effet Zorrilla-Fontanesi et al. (2012) ont montré que dans *Fragaria vesca* la *FvOMT* (*Fragaria vesca* O-méthyltransférase) a un niveau d'expression très faible dans tous les tissus de la plante, fraise mûre comprise contrairement aux fraises cultivées (*Fragaria x ananassa*). Cette étude montre une concentration en mésifurane 100 fois supérieure dans les fraises *Camarosa* (*Fragaria x ananassa*) que dans *Fragaria vesca*.

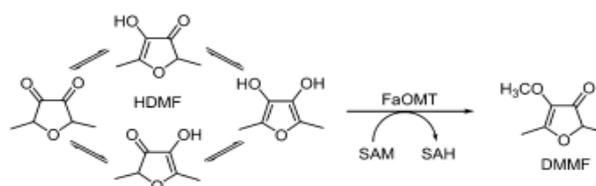


Figure 13 : Réaction de biosynthèse du mésifurane (DMMF) à partir du furanéol (HDMF)

### 1.1.4.3 Mise en réserve des arômes

Les sucres peuvent aussi intervenir après la biosynthèse des arômes, contrairement aux autres précurseurs. Cela vient du système de mise en réserve pratiqué dans les fruits. En effet, certaines molécules peuvent être dangereuses pour le végétal à des concentrations relativement élevées. Une partie des arômes est donc mise en réserve dans les vacuoles des cellules sous forme de glycosides et perdent alors leur pouvoir aromatique (Baek & Cadwallader, 1999a). Plusieurs études ont démontré que la quantité de composés volatils sous forme de glycosides est plus élevée que la quantité de composés volatils libres dans divers fruits tel que la fraise (R. Roscher, Koch, Herderich, Schreier, & Schwab, 1997), la framboise (Pabst, Barron, Etievant, & Schreier, 1991),

l'abricot (Krammer, Winterhalter, Schwab, & Schreier, 1991) ou encore la banane (Pérez, Cert, Ríos, & Olías, 1997a). Pourtant, parmi toute la diversité des composés volatils, seuls trois types de fonction moléculaire peuvent être glycosylés : les alcools, les acides carboxyliques et les esters (Figure 14).

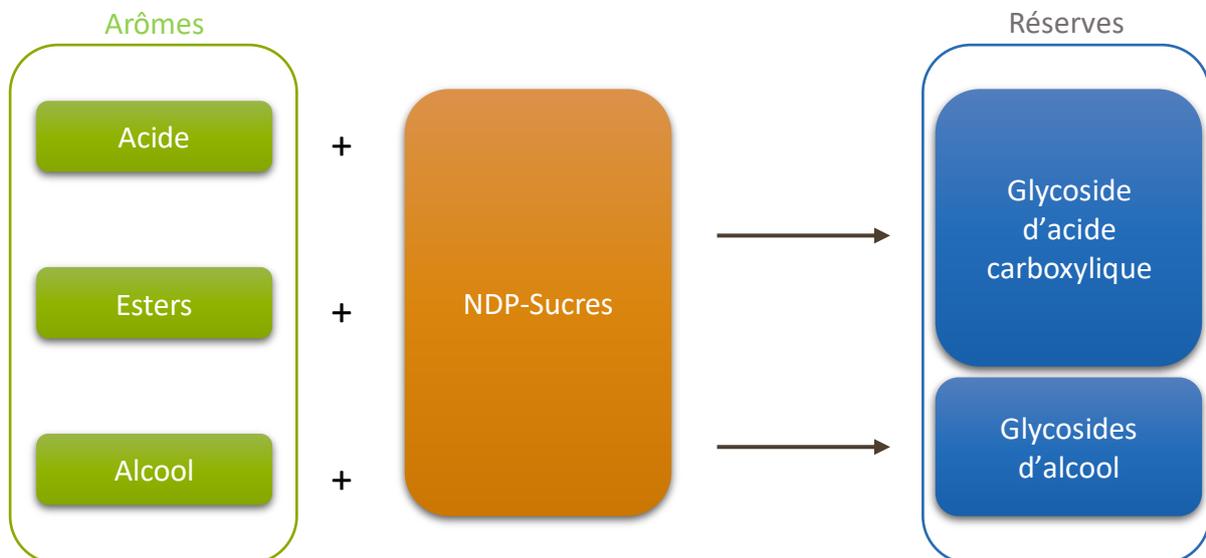


Figure 14 : Schéma du type de réserve glycosidique en fonction de l'arôme initial

La nature des sucres associés aux arômes est variable mais des tendances sont tout de même observables. Les aglycones sont généralement associés à des mono- et disaccharides. Dans de plus rare cas des trisaccharides ont été observés (Winterhalter & Skouroumounis, 1997). La partie aglycone est toujours fixée à un  $\beta$ -D-glucose. Dans le cadre d'un disaccharide le deuxième sucre est variable, l' $\alpha$ -L-rhamnose, l' $\alpha$ -L-arabinose et le  $\beta$ -D-glucose font parties des sucres identifiés (Sarry & Günata, 2004).

La glycosylation se fait grâce à des glycosyltransférases (Lunkenbein et al., 2006). Ces enzymes ont besoin de NDP-sucres (principalement UDP et GDP) pour réaliser le transfert de l'ose sur l'aglycone. Si le substrat est un alcool ou un acide carboxylique, il y a libération du nucléotide diphosphate et d'un proton (Figure 15). Le produit ainsi obtenu est alors plus soluble dans le milieu aqueux et serait ensuite envoyé dans la vacuole. Cette mise en réserve et sa libération seront abordées plus en détails dans la seconde partie de l'état de l'art.

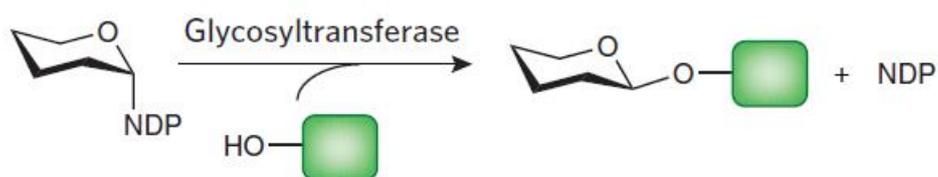


Figure 15 : Schéma de la réaction d'une glycosyltransférase

## 1.1.5 Arômes issus des terpènes

Les terpènes sont une famille regroupant énormément de molécules aux rôles très variés au sein de la plante. Ils peuvent intervenir dans des fonctions structurales, comme les stérols, dans la photosynthèse, comme les caroténoïdes, ou encore dans les réactions rédox dans l'organisme, comme les quinones (Croteau, Kutchan, & Lewis, 2000). Une partie de ces terpènes peut également être volatile et donc avoir des propriétés aromatiques.

### 1.1.5.1 Voie de biosynthèse des terpènes

Malgré leurs diversités, les terpènes ont la particularité de provenir de la même molécule : l'isopentényl diphosphate (IPP). Cette molécule en C5 est la brique de base de tous les terpènes, ce qui implique que leur composition en carbone est toujours un multiple de 5. L'IPP est converti en diméthylallyldiphosphate (DMAPP) par l'isopentényl diphosphate isomérase. Ces deux molécules sont associées par la géranyldiphosphate (GPP) synthase pour former le GPP, responsable de la formation des monoterpènes (C<sub>10</sub>) grâce aux terpènes synthases. Parmi ces molécules, on retrouve des arômes tels que le (-)-menthol, D-limonène, et le S-linalool. L'ajout d'une unité d'IPP supplémentaire par la farnésyldiphosphate (FPP) synthase permet d'obtenir le FPP qui sert à la synthèse des sesquiterpènes (C<sub>15</sub>), qui regroupent des arômes comme le valencène ou encore  $\alpha$ -sinensal aux notes de citrus et des triterpènes (C<sub>30</sub>) par condensation de deux FPP (Daviet & Schalk, 2010) (Figure 16).

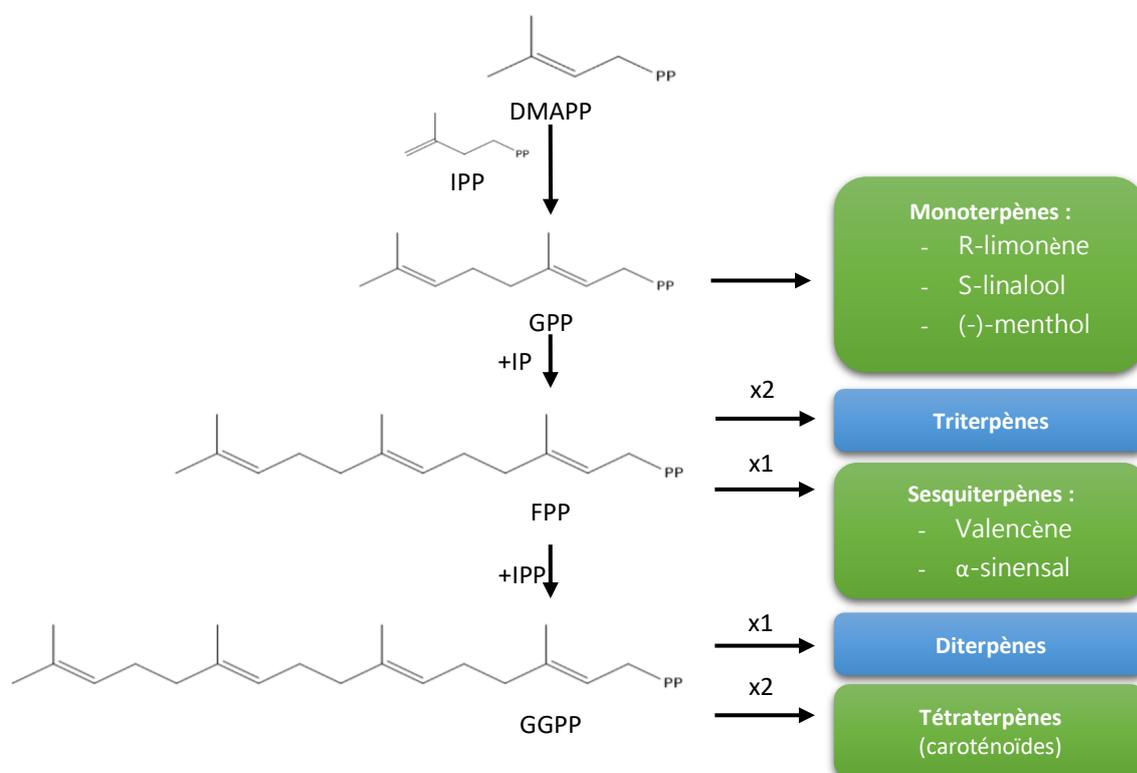


Figure 16 : Voie de biosynthèse des terpènes

Comme tous les terpènes sont issus du même substrat, la différenciation sera réalisée par des enzymes spécifiques associées. Les terpènes synthases sont en effet très spécifiques et ne permettent de synthétiser qu'un nombre restreint de terpènes, comme c'est le cas pour le géraniol synthase qui formera le géraniol. Celui-ci donnera, par l'action de diverses enzymes, ses dérivés tels que le citronellol ou le rose oxide (Davidovich-Rikanati et al., 2007) (Figure 17). Il en va de même pour la 4S-limonène synthase, d'où vient le 4S-limonène, le précurseur du (-)-menthol et de la (-)-carvone (Turner, Gershenzon, Nielson, Froehlich, & Croteau, 1999), deux arômes mentholés.

L'abricot est un fruit dont l'arôme dépend en partie des terpènes. Dans la variété *Jintaiyang*, le gène de la *PaLis* (*Prunus armeniaca* Linalool synthase) a été identifié et élucidé, montrant l'implication de cette enzyme dans la formation du linalool étant l'une des molécules présentes dans la grande majorité des abricots (Wang & Fan, 2009). De plus, une autre étude a mis en évidence le lien entre la maturation des abricots *Hacıhaliloğlu* et *Kabaası* et l'accumulation de limonène et de linalool (Karabulut et al., 2018).

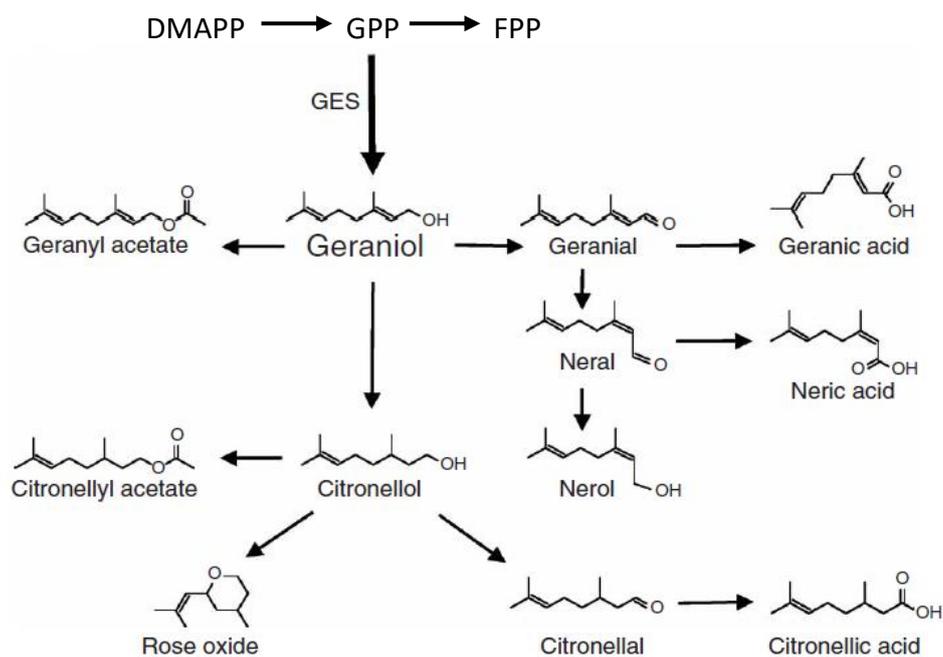


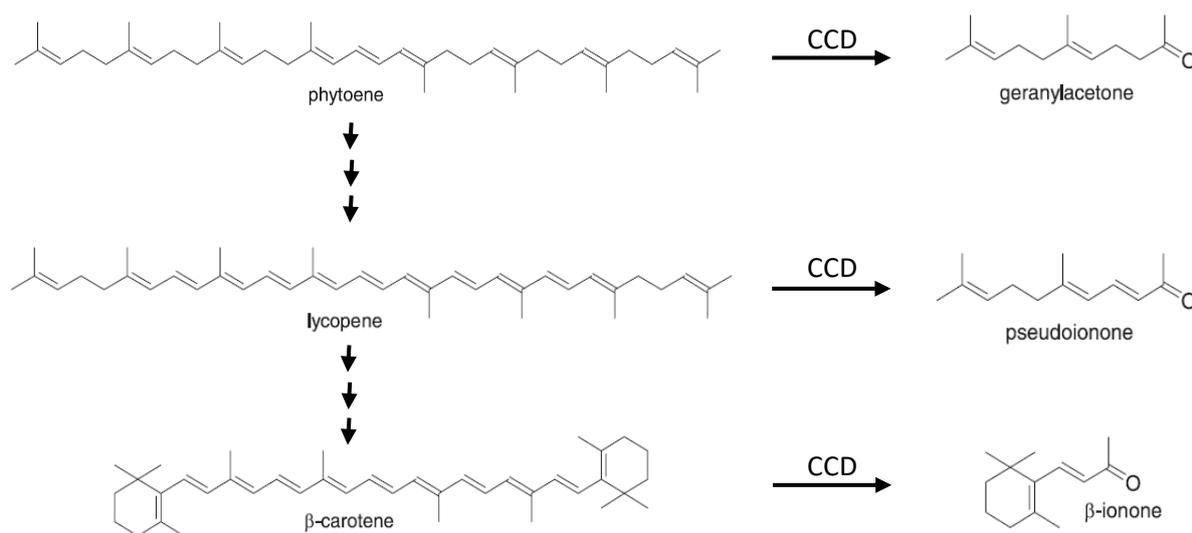
Figure 17 : Schéma de la biosynthèse du géraniol et de ses dérivés

### 1.1.5.2 Norisoprénoïdes

Par ajout d'une unité d'IPP sur un FPP, on obtient du géranyl géranyl diphosphate (GGPP) qui est à l'origine des caroténoïdes (Figure 16). Le phytoène est synthétisé par condensation de deux GGPP pour donner par la suite le lycopène et enfin le  $\beta$ -carotène (Yoon et al., 2009) (Figure 16). Ces molécules sont connues pour leur pigmentation allant du jaune au rouge orangé et sont

responsables de la coloration de l'abricot. Elles ne sont pas volatiles sous cette forme mais leurs dégradations par les *carotenoid cleavage dioxygenase* (CCD) donnent des molécules volatiles : les norisoprénoïdes. Cette enzyme réalise une oxydation à partir de O<sub>2</sub> pour scinder le caroténoïde en deux molécules avec ajout d'un groupement carbonyle. Ainsi, le phytoène permet de synthétiser la géranylacétone, le lycopène, la pseudoionone et le β-carotène, la β-ionone (Ibdah et al., 2006a) (Figure 18). Il est à noter que cette dégradation serait peu fréquente naturellement dans le fruit et que l'apparition de ces arômes serait principalement due à la décompartmentation résultant de la découpe des fruits (Beaulieu & Baldwin, 2002).

Ces norisoprénoïdes sont des composés volatils importants de l'abricot notamment la β-ionone, le β-ionol, la pseudoionone ou encore la géranylacétone. Tout comme la majorité des composés volatils, ils augmentent au cours de la maturité du fruit, qui a été démontré avec la β-ionone et la dihydro-β-ionone (Karabulut et al., 2018). Comme pour la LOX, cette production de norisoprénoïdes est probablement due à la perte de fermeté du fruit lors de la maturation qui facilite la décompartmentation cellulaire.



**Figure 18 : Schéma de la biosynthèse des arômes issus des caroténoïdes**

Un des norisoprénoïdes, l'α-ionone, est une molécule rare responsable de la note violette. Elle est surtout assimilée à l'arôme de la framboise où il est toutefois possible d'en retrouver également dans l'abricot. Elle fait partie des norisoprénoïdes et s'obtient par dégradation de l'α-, du δ- de l'ε-carotène. Comme vu précédemment, le β-carotène est obtenu à partir du lycopène et cela grâce à une double action de la lycopène β-cyclase (CrtL-b) (Figure X) qui donne par la suite, la β-ionone après action d'une *carotenoid cleavage dioxygenase* (CCD).

Cependant une autre cyclase existe : la lycopène ε-cyclase (CrtL-e). Contrairement à la CrtL-b, qui catalyse la formation d'un cycle-β, cette cyclase forme un cycle-ε. Si la CCD agit à partir de ce cycle-ε, l'α-ionone est alors obtenue à la place de la β-ionone (Bramley, 2002) (Figure 19).

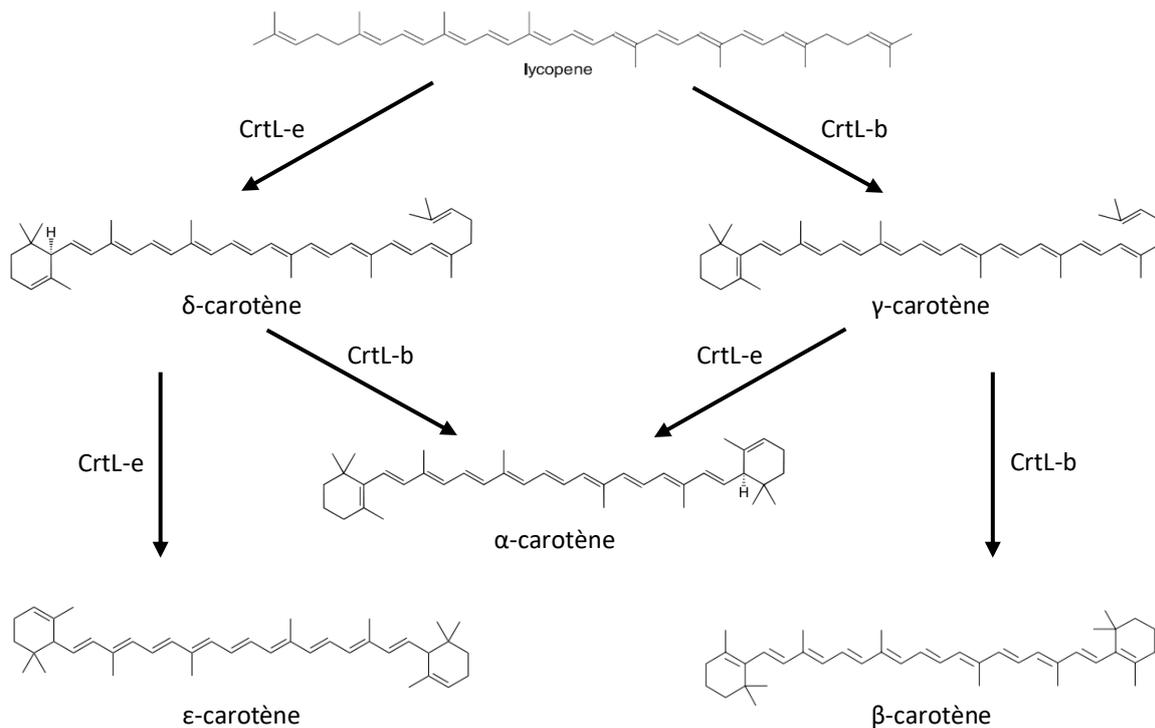


Figure 19 : Schéma de la biosynthèse des différents carotènes

### 1.1.6 Discussion sur l'exploitation possible des voies de biosynthèse décrites précédemment

Compte-tenu de la faible durée de traitement de fruit en industrie (de l'ordre de quelques heures), des actions biotechnologiques sur les parties en amont des voies de biosynthèse risquent de ne pas avoir le temps d'avoir de l'effet sur les dernières étapes de biosynthèse. De même se focaliser sur des voies spécifiques est intéressant pour la synthèse d'un arôme particulier et donc intéressant pour les aromaticiens, mais n'est pas pertinent dans le cadre du projet Natarôme+ avec l'objectif d'une amélioration globale de l'arôme d'un fruit.

#### 1.1.6.1 Arômes issus des acides aminés

L'option la plus viable serait d'intervenir sur les dernières étapes de la voie de biosynthèse générale de production d'arôme à partir des acides aminés. Pour cela, deux types d'enzymes seraient préférées : les déshydrogénases et les AAT.

Les AAT sont les dernières enzymes des voies de biosynthèse des esters, comme vu précédemment avec la voie des ester ramifiés, toutes origines confondues. Leur réaction permet de libérer l'ester et un coenzyme-A.

Les déshydrogénases sont des enzymes à fort potentiel pour l'optimisation de la formation des esters d'arômes. Cependant, elles sont généralement dépendantes de cofacteurs, où pour les kétoacide déshydrogénases (KDH), il s'agit du coenzyme-A et du  $\text{NAD}^+$  et pour les alcools

déshydrogénases (ADH) du NAD(P)H. Bien que naturellement recyclés dans les cellules, les cofacteurs deviennent limitants dès que la compartimentation cellulaire est affectée, comme c'est le cas durant les procédés de transformation.

Pour pallier cette limitation sans ajout de cofacteur, nos enzymes d'intérêts pourraient être utilisées en synergie afin de combler leur possible souci d'apport en cofacteur. Comme le montre la Figure 20, il serait possible d'utiliser les KDH, ADH et AAT ensemble, de façon à recycler le coenzyme-A et le NADH. Cette synergie aurait également l'intérêt d'avoir l'enzyme créant les alcools, celle créant les acyl-CoA et celle qui assemble ces deux parties pour former des esters. Dans le cadre du projet Natarôme+, cette voie serait très intéressante à exploiter pour les fruits riches en esters ramifiés comme la pomme, la fraise, la figue, l'abricot ou encore l'ananas.

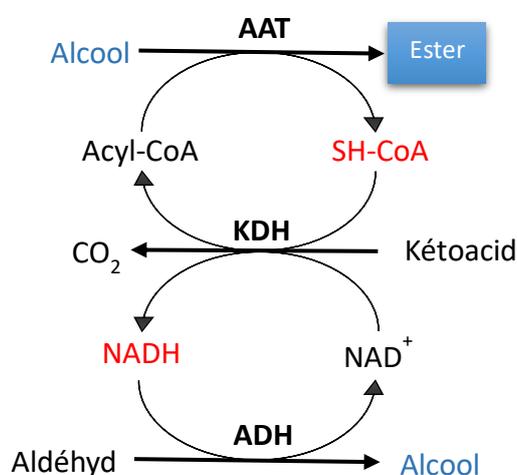


Figure 20 : Schéma de la preuve de concept sur l'utilisation simultanée d'une ADH, d'une KDH et d'une AAT

Dans le cadre d'un traitement avec une étape de fermentation, pour les produits laitiers par exemple, le temps de traitement des fruits est plus long. L'ajout du substrat en amont de la voie de biosynthèse pourrait être envisagé, comme dans les travaux de A.G. Pérez (2002), où la mise en contact de cellules de fraise avec de la L-isoleucine a permis de multiplier au delà d'un facteur 7 la quantité d'esters de 2-méthylbutanoate produite. Dans un souci de proposer un produit « Clean Label » aux consommateurs, il n'est pas possible d'ajouter directement ces substrats. Cependant, l'utilisation de fruits naturellement riches en ces acides aminés pourrait apporter suffisamment de précurseurs pour augmenter la production d'esters (Kisumi, 1971).

## 1.1.6.2 Arômes issus des acides gras

### 1.1.6.2.1 Voie de la LOX

Comme pour les arômes issus des acides aminés, l'utilisation d'AAT et d'ADH semble favorable à la formation d'esters issus d'acides gras. Mais la  $\beta$ -oxydation ne pourra être davantage exploitée à cause de son temps de cycle long. Une autre voie d'optimisation est cependant

envisageable avec l'optimisation de la voie de la LOX, permettant la formation des arômes en C<sub>6</sub> et C<sub>9</sub>, qui sont très importants pour développer les notes « fraîches » des fruits. Pour cela, l'utilisation de LOX et de HPL serait une piste envisageable.

Il existe trois familles de HPL associées à la formation des arômes en C<sub>6</sub> et C<sub>9</sub> : les 13-HPL qui ne prennent comme substrat que les 13-hydroperoxyde, les 9-HPL qui sont spécifiques des 9-hydroperoxyde et les 9/13-HPL qui peuvent utiliser l'un ou l'autre des substrats sans distinction (Padilla, 2010). De même, les LOX seront spécifiques de la formation de 9- ou 13-hydroperoxyde (Figure 21). Il est ainsi possible de favoriser de manière spécifique l'apparition des composés en C<sub>6</sub> ou en C<sub>9</sub>, voire les deux.

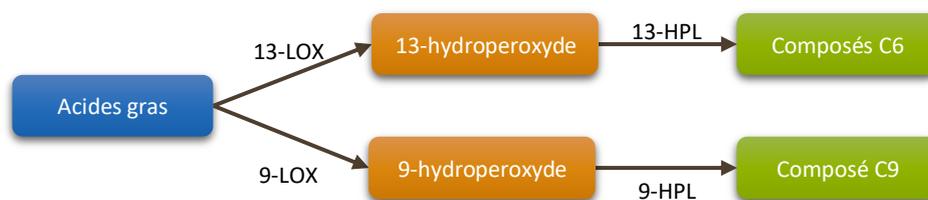


Figure 21 : Schéma des enzymes pour l'optimisation de la voie de la LOX et leur rôle

L'optimisation des notes fraîches des composés en C<sub>6</sub> sera importante pour des fruits comme la pomme, l'abricot et les agrumes tels que le citron ou l'orange. Les composés en C<sub>9</sub> seront quant à eux davantage exploitables dans des fruits comme le melon ou le kiwi qui contiennent naturellement ces arômes.

#### 1.1.6.2.2 Voie des terpènes

A cause de la spécificité des enzymes impliquées à la fin des voies de biosynthèse des terpènes, il n'est envisageable de les exploiter que pour un arôme ou un petit groupe d'arômes spécifiques et non pour la totalité des terpènes. Cela peut donc être intéressant pour la création d'un jus aromatique basé sur une note particulière.

Cependant, l'utilisation de *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCD) pourrait être une bonne stratégie pour augmenter la teneur en norisoprénoïdes. En effet, Ibdah, (2006) a montré que la coupure entre la position 9 et 10 se faisait indépendamment des extrémités du caroténoïde. Ainsi le  $\delta$ -carotène, possédant deux extrémités de formes différentes, donne de l' $\alpha$ -ionone et de la pseudoionone par action d'une CCD. Il faut cependant garder à l'esprit que la dégradation des caroténoïdes en arôme pourrait avoir un impact sur la couleur du produit. Cela serait particulièrement visible sur les pêches ou les abricots qui perdront progressivement leur couleur orange au fur et à mesure que les caroténoïdes seraient clivés (Adami et al., 2013; Ma et al., 2014). Cependant, des stratégies d'assemblages (produits traités pour améliorer leur teneur en arômes et produits non traité pour garder la couleur) pourraient pallier ce problème.

### 1.1.6.3 Réserve d'arôme sous forme de glycosides

Pour la partie sucre, la meilleure option est de se focaliser sur les réserves de glycosides des fruits. En effet, leur hydrolyse permet de libérer l'aglycone ainsi que son pouvoir aromatique. Dans plusieurs études utilisant une prépurification des glycosides par SPE (extraction en phase solide) la concentration en glycosides est estimée à 2 à 8 fois celle de leurs homologues libres, comme dans le raisin (Günata et al., 1985), la banane (Pérez, Cert, Ríos, & Olías, 1997b), l'abricot (Krammer et al., 1991; Salles, Jallageas, Fournier, Tabet, & Crouzet, 1991), la pêche (Krammer et al., 1991), la prune jaune (Krammer et al. 1991), la framboise (Pabst et al., 1991), la fraise (Roscher et al. 1997), ou la tomate (Marlatt, Ho, & Chien, 1992). Ces réserves étant en plus grande quantité que les arômes libres dont elles sont issues, les libérer permettrait une augmentation sensible de l'arôme du fruit. Un tel processus serait rendu possible par le recours à un type d'enzyme encore non évoquée : les glycosidases.

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons osidiques qui relient les sucres entre eux ou aux aglycones (Figure 22). Elles sont spécifiques du type de liaison osidique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) et du sucre en amont de la liaison à couper. Comme tous les aglycones sont directement reliés à un D-glucose par une liaison de type  $\beta$ , il faut alors utiliser des  $\beta$ -glucosidases pour libérer les réserves aromatiques du fruit.

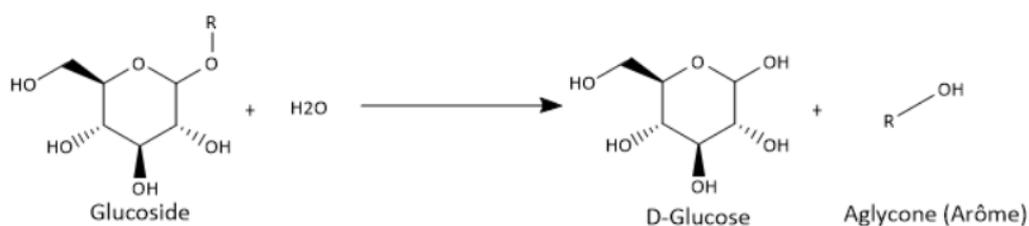


Figure 22 : Schéma de la réaction d'une glucosidase sur un glucoside d'arôme

### 1.1.7 Conclusion

A partir des voies de biosynthèse présentées, le plus intéressant pour améliorer l'arôme de la fraise, de l'abricot et autres fruits du projet reste la synthèse d'esters, d'aldéhydes/cétones et de composés en C<sub>6</sub>. Ces composés ont le plus impact sur les notes fruitées, florales et fraîches, caractéristiques des arômes de fruits frais.

L'utilisation des ADH, AAT, des HPL et des  $\beta$ -glucosidases a donc été retenue par le projet Natarôme+. Ces enzymes peuvent être exploitées pour augmenter le teneur en arôme dans les fruits transformés. Cependant l'objectif principale du projet Natarôme+, consistant à augmenter la saveur globale du fruit, l'option privilégiée sera la libération de la réserve en utilisant des  $\beta$ -glucosidases.

Dans le cadre de la thèse, il s'agit du seul type d'enzyme qui sera étudié en profondeur. En effet, la recherche bibliographique ainsi que les résultats de l'étude de la variabilité des réserves et des composés volatils chez la fraise (partie 4.1.2) confirment les résultats bibliographiques.



## 1.2 Glycosidases et glycosides

La partie précédente a montré l'intérêt d'utiliser les  $\beta$ -glucosidases dans les fruits afin d'améliorer leur teneur en composés volatils. Il est donc nécessaire d'avoir une bonne compréhension de cette famille d'enzymes pour choisir les plus adaptées pour libérer la réserve glycosidique et les utiliser de manière optimale.

### 1.2.1 Caractéristiques générales des glycosidases

#### 1.2.1.1 Classification

Les  $\beta$ -glycosidases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques de molécules composées d'un ou plusieurs sucres liés à une partie aglycone (pouvant également être un autre sucre). Elles sont classifiées EC 3.2.1.X par l'*Enzyme Commission number*, c'est-à-dire que ce sont des hydrolases (EC 3.X.X.X) agissant sur des composés glycosylés (EC 3.2.X.X) au niveau de liaison O-osidique (EC 3.2.1.X). Parmi ces glycosidases on retrouve par exemple les lysozymes (EC 3.2.1.17), les lactases (EC 3.2.1.108) ou encore les  $\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.21). Les glycosidases sont ensuite classées en fonction de leur séquence d'acides aminés dans différentes familles de glycoside hydrolase (GH). La classification CAZy a été inventé par B. Henrissat (Bourne & Henrissat, 2001) et regroupe maintenant 156 familles différentes de GH ("CAZy - GH," <http://www.cazy.org/>). Les  $\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) peuvent appartenir à 8 de ces familles de GH (GH1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 9 ; 30 ; 39 et 116). Les glycosidases sont les plus étudiées et les plus connues font partie des familles GH1, GH3, GH5, GH9 et GH30 (Ketudat Cairns & Esen, 2010).

#### 1.2.1.2 Structure générale

Les  $\beta$ -glucosidases ont des structures différentes mais toutes les GH ont un site catalytique similaire composée de deux résidus carboxylates qui assurent la réaction catalysée par ces enzymes. Ce site catalytique est le résultat de la structure quaternaire d'un ou plusieurs domaines. Plusieurs structures différentes de domaine ont été observées en fonction de la famille GH étudiée.

Les GH1, GH5 et GH30 ont toutes un domaine similaire avec un tonneau  $(\beta/\alpha)_8$  contenant le site actif. Les deux résidus carboxylate sont situés sur les brins 4 et 7 du feuillet- $\beta$  (Jenkins, Lo Leggio, Harris, & Pickersgill, 1995). Les GH3 ont, quant à elles, 2 domaines qui participent au site catalytique : un tonneau  $(\beta/\alpha)_8$  comme les familles précédentes couplé à un sandwich  $(\alpha/\beta)_6$ . Chacun des deux domaines contient un des deux résidus nécessaires à la réaction d'hydrolyse (Harvey, Hrmova, De Gori, Varghese, & Fincher, 2000). Par exemple, pour l'ExoI de l'orge appartenant aux glucosidases, les deux acides aminés de la catalyse sont l'aspartate D285 et le glutamate E491. Le premier est situé sur le brin 7 du feuillet- $\beta$  du domaine  $(\beta/\alpha)_8$  et le second sur une boucle du domaine sandwich  $(\alpha/\beta)_6$  (Hrmova et al., 2001). Pour les GH9, le domaine avec le site actif est un tonneau  $(\alpha/\alpha)_6$ , structure différente des autres familles qui pourrait expliquer la

prévalence du mécanisme réactionnel avec inversion de la conformation du sucre dans les enzymes de cette famille, ce qui est inhabituel car le mécanisme avec rétention de conformation du sucre est prédominant dans les glucosidases (Qi, Jun, & Forsberg, 2008) (Figure 23).

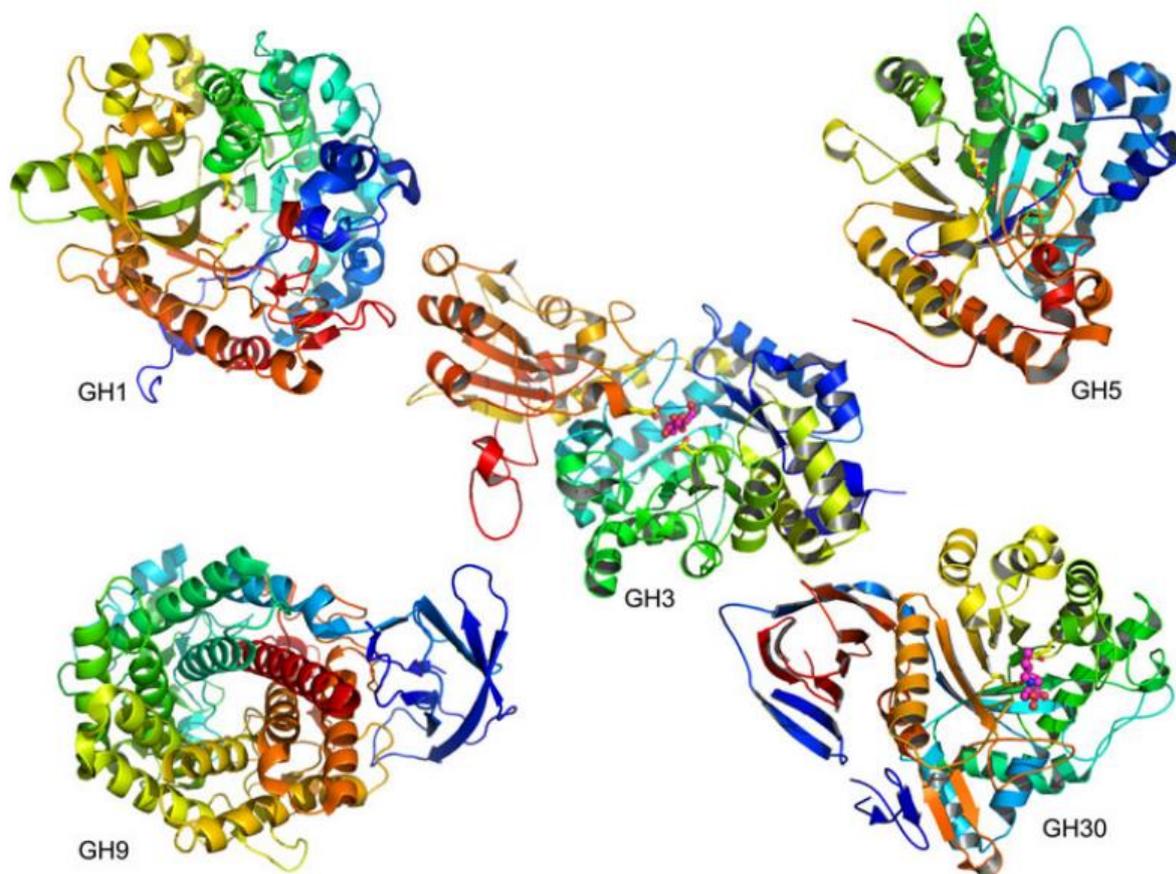


Figure 23 : Structure en ruban de glucosidases appartenant aux différentes familles de GH\* (Ketudat Cairns & Esen, 2010)

\*GH1 : *Zea mays* ZmGlu1, code PDB 1E1E ; GH3 : *Hordeum vulgare* Exo1  $\beta$ -glucan glucohydrolase, code PDB 1E1X ; GH5 : *Candida albicans* exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase Exg exoglucanase, code PDB 1CZ1 ; GH9 : *Vibrio parahaemolyticus*, putative exoglucanase, code PDB 3H7L ; GH30 : *Homo sapiens*, acid  $\beta$ -glucosidase/glucoerebrosidase GBA1, code

### 1.2.1.3 Fonction des glucosidases dans le vivant

#### 1.2.1.3.1 $\beta$ -glucosidases des mammifères

De nombreuses glucosidases ont été identifiées chez les mammifères, notamment chez l'Homme, comme la  $\beta$ -glucosidase acide humaine GH30 (GBA1), la  $\beta$ -glucosidase acide biliaire (GBA2) ou encore les enzymes de la famille GH1 avec entre autres les lactase-phloridzin hydrolases et les  $\beta$ -glucosidases cytoplasmiques. Elles jouent des rôles divers, en particulier dans le métabolisme des glycolipides et des glucosides alimentaires. De plus des protéines apparentées à la famille des GH1 joueraient un rôle de signal cellulaire.

Leur bon fonctionnement peut être crucial pour l'organisme. En effet une déficience en GBA1 conduit à la maladie de Gaucher qui survient lors d'une trop grande accumulation des substrats des GBA1, les glycosphingolipides (sphingolipides glycosylés), dans les tissus (Butters, 2007). Cette maladie se traduit par différents symptômes cardio-pulmonaires en fonction du degré de déficience observée pouvant aller jusqu'à la mort néonatale. Pour cette raison la GBA1 a été largement étudiée. Cette enzyme est présente dans le réticulum endoplasmique des cellules et est transportée, lorsque nécessaire, vers les lysosomes pour hydrolyser les glycosphingolipides.

La GBA2 a été retrouvée dans la fraction microsomiale des cellules du foie (Matern, Boermans, Lottspeich, & Matern, 2001). Il s'agit toutefois d'une enzyme membranaire, non lysosomiale contrairement à la GBA1. Sa déficience peut également provoquer la maladie de Gaucher mais elle aurait également un effet plus spécifique au niveau des cellules de Sertoli. En effet, cette enzyme évite chez la souris une perte de fertilité due à l'accumulation des sphingolipides dans ces cellules (Yildiz et al., 2006).

Actuellement 5 enzymes de la famille des GH1 sont connues chez l'Homme : la lactase-phloridzin hydrolase (LPH), la  $\beta$ -glucosidase cytoplasmique, la Klotho (KL), la  $\beta$ -Klotho ( $\beta$ -KL) et les protéines Klotho-LPH associées (KLPH) (Tribolo, Berrin, Kroon, Czjzek, & Juge, 2007). Ces enzymes jouent un rôle dans la digestion. Par exemple la LPH hydrolyse le lactose ou encore la  $\beta$ -glucosidase cytoplasmique. L'absence de la première provoque une intolérance au lactose et la seconde, présente en grande quantité dans les hépatocytes et le bord apical des cellules épithéliales, hydrolyse préférentiellement les glucosides de flavonoïdes issus de plantes facilitant ainsi leur assimilation (Day et al., 1998 ; Berrin et al., 2002). Enfin il est à noter que les KL ont un rôle de signalisation concernant le métabolisme du vieillissement (Kuro-o et al., 1997) et l'homéostasie du phosphate et du calcium (Chang et al., 2005 et Nabeshima & Imura, 2008).

#### 1.2.1.3.2 $\beta$ -glucosidases des plantes

Les glucosidases ont une multitude de fonctions dans les plantes. Elles peuvent avoir un rôle défensif, dans les interactions avec les microorganismes, dans le métabolisme de la paroi végétale, dans l'activation de phytohormones et dans le métabolisme secondaire de manière plus générale. Ces rôles seraient déterminés par leur localisation dans les tissus, par la compartimentation cellulaire et par leur spécificité de substrat (Repčák & Krausová, 2009).

Les plantes possèdent le plus grand nombre de protéines de la famille GH1, leur permettant d'assurer toutes ces fonctions. Dans *Arabidopsis thaliana* par exemple, 48 gènes différents de GH1 ont été trouvés (Xu et al., 2004).

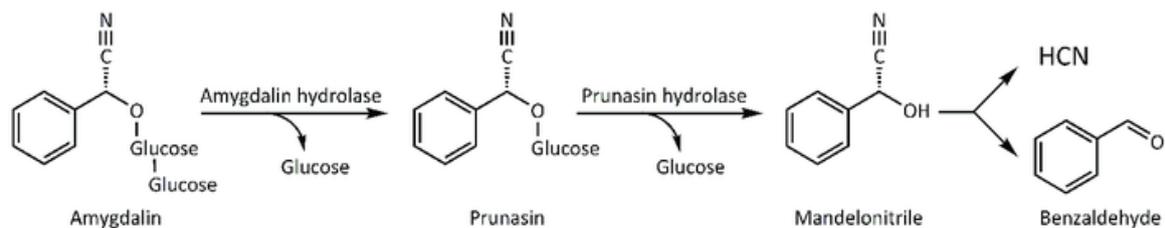


Figure 24 : Schéma de la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'amygdaline en benzaldéhyde (Vassão et al., 2018)

La libération de composés toxiques est un moyen de défense bien connu chez les plantes. Les glucosidases peuvent enclencher ce mécanisme comme un détonateur pour les bombes chimiques que sont les  $\beta$ -glucosides cyanogènes comme l'amygdaline dans l'abricot ou la prunasine dans la cerise (Poulton, 1990, Morant et al., 2008). Leur hydrolyse libère un  $\alpha$ -hydroxynitrile qui, enzymatiquement ou spontanément, se dissocie en aldéhyde et en cyanide (Figure 2). Ces glucosides tendent à être stockés dans les vacuoles alors que les glucosidases sont souvent trouvées dans les plastes et apoplastes. En plus des composés cyanogènes, les isoflavones, flavonoïdes ou encore coumarines sont d'autres molécules de défense qui sont glycosylées (Niemeyer, 1988, Morant et al., 2008). Les enzymes et les substrats sont mis en contact lors de la décompartmentation provoquée par une agression externe par un microorganisme ou un insecte. Par exemple, la AtBGLU26 (PEN2) myrosinase est principalement retrouvée dans le peroxyosome qui joue un rôle crucial pour la défense non-spécifique d'*Arabidopsis thaliana* (et des autres Brassicacées) contre les champignons en hydrolysant les glucosinolates initialement présents dans les vacuoles (Lipka et al., 2005, Bednarek et al., 2009).

Cette application est également retrouvée dans les relations symbiotiques entre les plantes et les microorganismes. C'est le cas pour *Arabidopsis thaliana* et le champignon endophyte, *Piriformospora indica*, dont la PYK10 empêche le développement du champignon sur les racines de la plante et, par conséquent, réduit la réponse défensive de la plante contre le champignon (Sherameti et al., 2008).

Dans le métabolisme de la paroi végétale, les glucosidases ont deux rôles majeurs, à savoir la dégradation des oligosaccharides générés durant le renouvellement de la paroi et la libération des monolignols permettant la lignification. Le premier de ces rôles a été observé dans l'orge et le riz et l'efficacité de ces enzymes varient en fonction des isoformes. En effet, dans le riz, la Os3BGlu7, la Os3BGlu8 et la Os3BGlu26 voient leur efficacité sur les cellooligosaccharides augmentée avec une augmentation du degré de polymérisation de 2 à 6, alors que la Os3BGlu6 est plus active sur les disaccharides (Ketudat Cairns & Esen, 2010). Le rôle des glucosidases dans la lignification de la paroi secondaire est l'activation des monolignols par élimination de la partie sucre de leur glycoside, comme le coumarol, le coniférol ou encore l'alcool cinnamique (Hosel, Surholt, & Borgmann, 1978).

Dans les plantes les glucosidases permettent aussi d'activer des phytohormones, plusieurs d'entre elles sont sous forme glycosylées comme la gibbérelline (Schliemann, 1984) ou la cytokinine (Brzobohatý et al., 1993). Les activités de la  $\beta$ -glucosidase endoplasmique (AtBG1) et la  $\beta$ -glucosidase vacuolaire (AtBG2) d'*Arabidopsis thaliana* sont de très bons exemples de ce rôle (Lee et al., 2006 et Xu et al., 2012). En effet il a été montré que l'hydrolyse de l'ester de glucosyl d'acide abscissique (ABA-GE) par ces enzymes est une réponse au stress hydrique et que des mutations dans leur gène provoque des désordres de la germination.

Les glucosidases sont également importantes pour la libération de composés volatils stockés sous forme de glycosides. Cette action rend les fleurs odorantes ce qui attire les insectes pollinisateurs (Reuveni, Sagi, Evmor, & Hetzroni, 1999). Chez certaines plantes, comme le chou, ces molécules servent de moyen de défense indirect en attirant les prédateurs des herbivores qui se nourrissent de ces plantes (Mattiacci, Dicke, & Posthumus, 1995).

### 1.2.1.3.3 $\beta$ -glucosidases des microorganismes

Les glycosidases dans les microorganismes n'ont qu'une seule fonction connue : la dégradation de la paroi végétale (Ketudat Cairns & Esen, 2010). Cette dégradation se fait via des activités cellulases, hémicellulases, pectinases,  $\beta$ -glucosidases et chitinase. Les microorganismes utilisent la déstructuration de la paroi de deux manières. La première est l'obtention de glucose pour créer de l'énergie, ainsi le champignon *Phanerochate chrysosporium* va produire 3 glucosidases différentes en fonction de la source de carbone à disposition (Lymar, Li, & Renganathan, 1995). En contact de cellulose il produira des  $\beta$ -glucosidases intra- et extracellulaires (Deshpande, Eriksson, & Pettersson, 1978) alors qu'en présence de cellobiose, il produira des  $\beta$ -glucosidases intracellulaires et transmembranaires (Smith & Gold, 1979).

La seconde utilisation est l'établissement infectieux ou symbiotique du microorganisme. Pour cette fonction les bactéries et champignons ont parfois recours à un cellulosome (Carvalho et al., 2007). C'est un complexe extracellulaire composé d'une partie transmembranaire et d'une partie extracellulaire avec des protéines de liaison à la paroi (Cellulose binding domain, CBD) et avec un ensemble de glycosidases. Le cellulosome commence par se fixer à la paroi végétale grâce au CBD puis les glycosidases dégradent progressivement la paroi jusqu'à donner accès aux tissus de la plante (Doi & Kosugi, 2004).

## 1.2.2 Substrats des glycosidases

### 1.2.2.1 Sucres

La partie sucre d'un glycoside est un mono-, un di- ou, dans de rares cas, un tri-saccharide. Dans tous les cas le sucre rattaché à l'aglycone est un  $D$ -glucose via une liaison osidique (Sarry & Günata, 2004). Le second sucre est variable, il peut être aussi bien un deuxième glucose (cellobiose), qu'un arabinose (vicianoside) ou encore un xylose (primeveroside) (Figure 25).

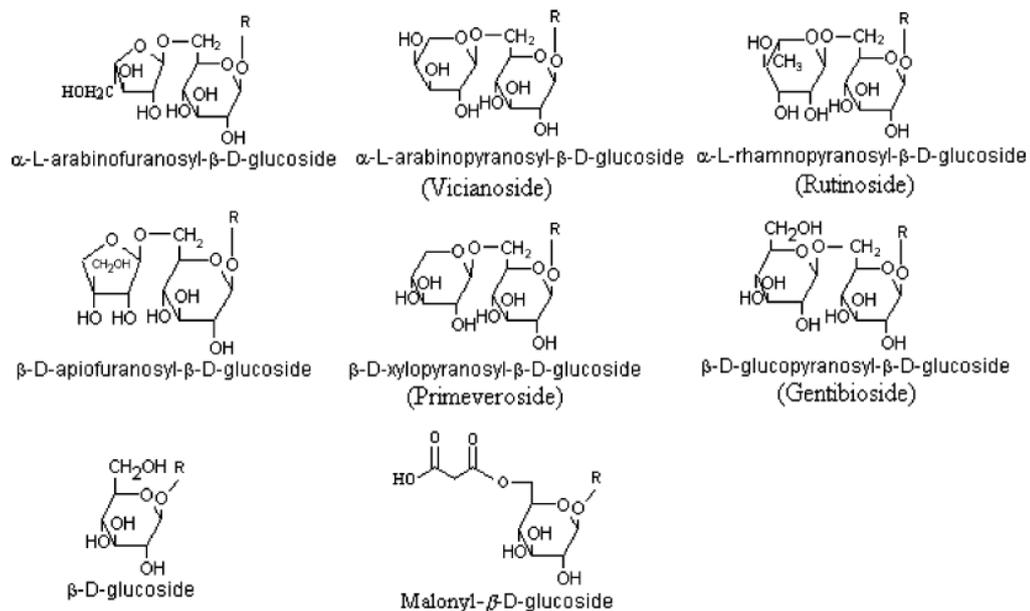


Figure 25 : Exemple de saccharides possibles pour la partie sucre d'un glycoside (Sarry & Günata, 2004)

### 1.2.2.2 Aglycones

Pour pouvoir être lié à la partie sucre par une liaison osidique, l'aglycone doit en général avoir une fonction alcool ou une fonction acide (Figure 26). Parmi les aglycones avec un pouvoir aromatique on retrouve des terpénols comme le géraniol ou le linalool, des lactones comme la  $\gamma$ -déalactone ou la  $\delta$ -caprolactone, des alcools comme l'hexanol ou le 3-méthylbutanol, des acides carboxyliques comme l'acide hexanoïque ou l'acide 2-méthylbutanoïque ou encore des norisoprénoïdes alcoolique comme l' $\alpha$ -ionol. Il existe cependant quelques exceptions comme le benzaldéhyde qui peut être l'aglycone d'un glycoside grâce à une forme intermédiaire le mandelonitrile (Figure 24). L'amygdaline en s'hydrolysant libère le mandelonitrile et ce dernier se dissocie spontanément en benzaldéhyde et acide cyanhydrique.

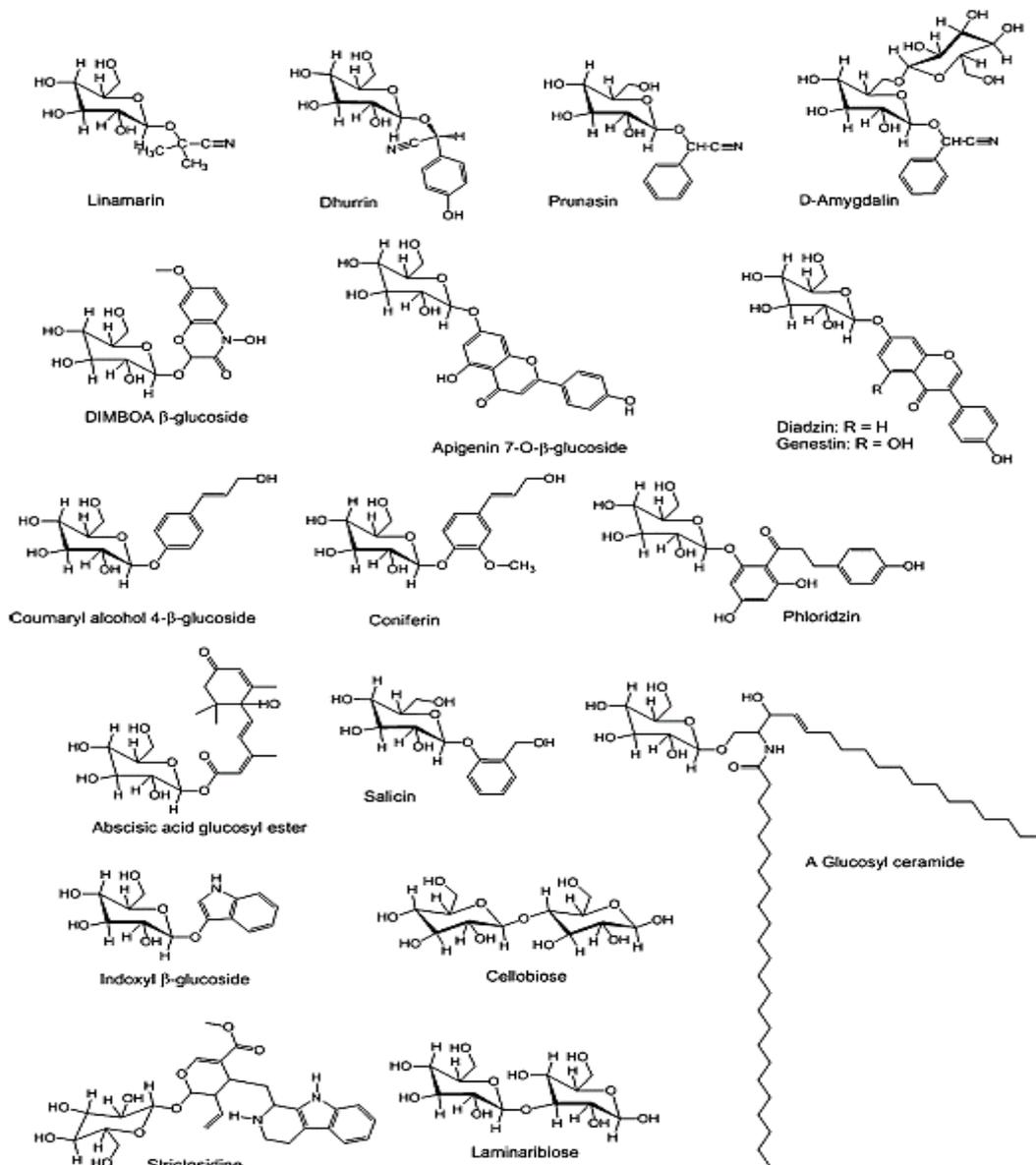


Figure 26 : Exemple de substrats de glycosidases (Ketudat Cairns & Esen, 2010)

## 1.2.3 Mécanismes d'action des glycosidases

### 1.2.3.1 Acides aminés clés de la réaction enzymatique

L'hydrolyse des liaisons osidiques se fait grâce à l'action combinée de deux acides aminés ayant une fonction acide sur la chaîne latérale. Ainsi la présence de L-Aspartate et/ou de L-Glutamate est nécessaire dans le site catalytique et son systématiquement retrouvé comme décrit en partie 1.2.1.2. Ils sont utilisés pour leur propriété acido-basique mais également pour leur propriété nucléophile.

### 1.2.3.2 Mécanisme avec inversion de conformation

La première étape de ce mécanisme est une réaction acido-basique pour obtenir la forme acide d'un des deux acides aminés. La suite consiste en une substitution nucléophile d'ordre 2.

Dans le même temps, une réaction acido-basique s'opère entre l'acide aminé sous forme basique et l'eau pour former le nucléophile  $\text{HO}^-$ . Ce nucléophile va alors attaquer le carbone en première position du glucose du glycoside. Ceci permet d'accéder à un état de transition d'une structure proche d'un cation oxocarbénium avant de rompre la liaison entre l'aglycone et la partie sucre. Ce dernier est alors stabilisé en captant le proton de la fonction acide du second acide aminé ( $\text{R-COOH}$ ), puis libéré du site catalytique de l'enzyme. La partie sucre est également libérée avec une inversion de la conformation  $\alpha$  ou  $\beta$  du premier sucre (Withers & Aebersold, 1995) (Figure 27).

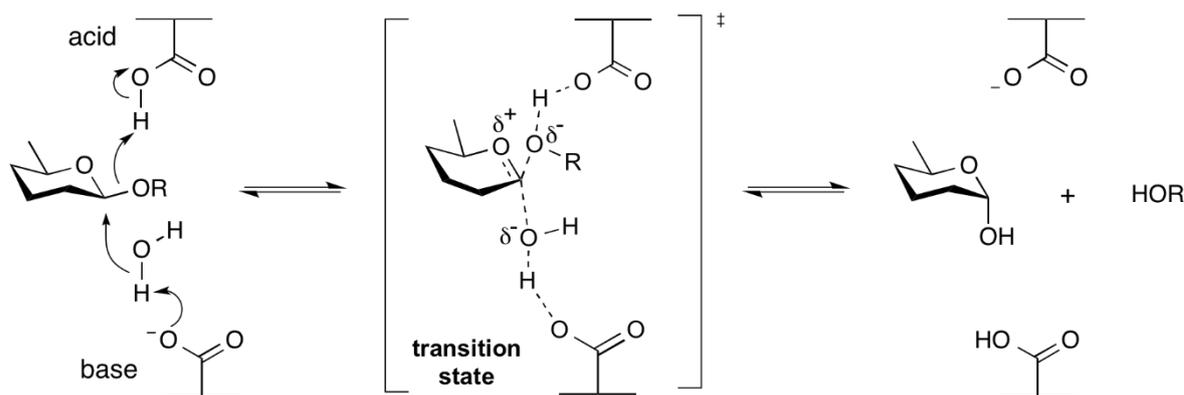


Figure 27 : Schéma de la réaction d'une glycosidase avec un mécanisme d'inversion de conformation (CAZpedia)

### 1.2.3.3 Mécanisme avec rétention de conformation

La première étape de ce mécanisme est une réaction acido-basique pour obtenir la forme acide d'un des deux acides aminés. La suite s'apparente à une substitution nucléophile d'ordre 1 avec, en premier lieu, une étape où l'acide aminé nucléophile ( $\text{R-COO}^-$ ) attaque le carbone en position un du glucose pour libérer l'aglycone du sucre en passant par un état de transition d'une structure proche d'un cation oxocarbénium. Il y a alors formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Dans le même temps l'aglycone est stabilisé en captant le proton de la fonction acide du second acide aminé ( $\text{R-COOH}$ ). L'aglycone est ensuite libéré du site catalytique de l'enzyme. La seconde étape de la substitution est une réaction acido-basique entre l'acide aminé sous forme basique et l'eau pour former le nucléophile  $\text{HO}^-$ . Ce nucléophile va alors attaquer le carbone en première position du glucose de l'intermédiaire réactionnel ce qui va rompre la liaison entre l'enzyme et la partie sucre du glycoside. Cette dernière est alors libérée du site catalytique de l'enzyme avec la rétention de la conformation  $\alpha$  ou  $\beta$  du premier sucre (McCarter & Withers, 1994) (Figure 28).

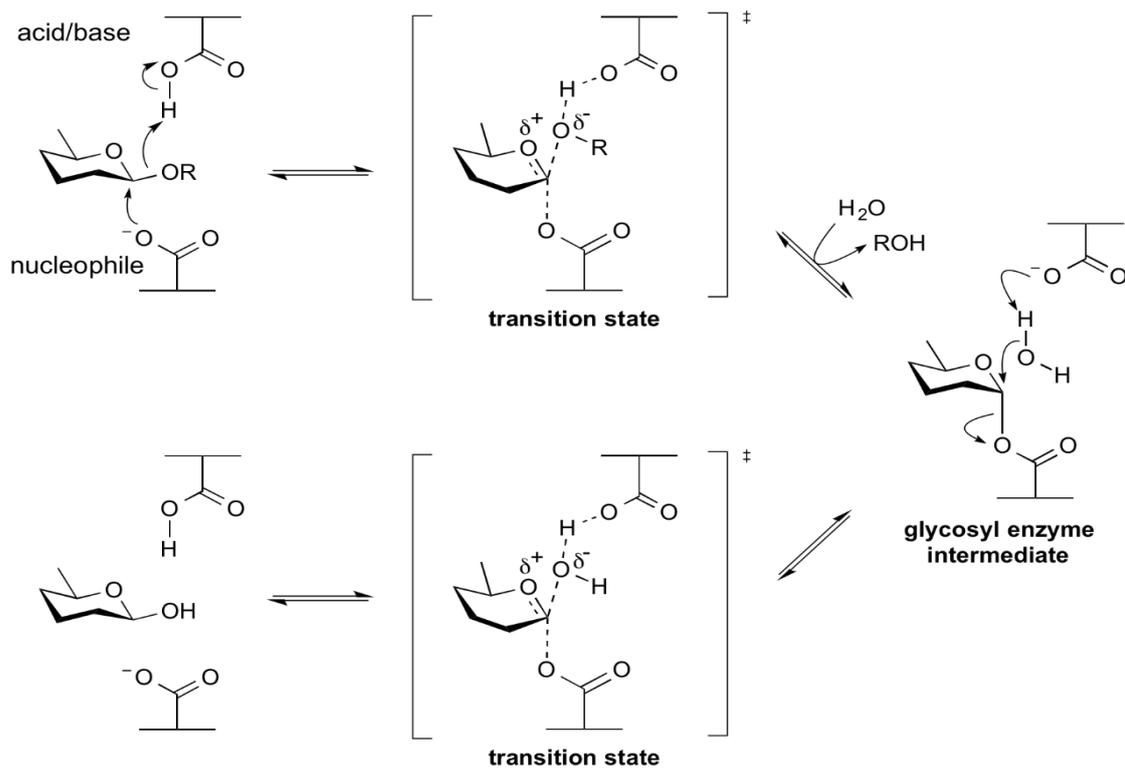


Figure 28 : Schéma de la réaction d'une glycosidase avec un mécanisme de rétention de conformation (CAZpedia)

#### 1.2.3.4 Synthèse de glycosides et transglycosylation

Deux autres réactions sont associées aux glucosidases. La première est la synthèse de glycosides qui peut théoriquement être réalisée par toutes les glucosidases. En effet l'hydrolyse catalysée par ces enzymes est une réaction réversible, et un aglycone peut être associé à un sucre par élimination d'une molécule d'eau (Figure 29).

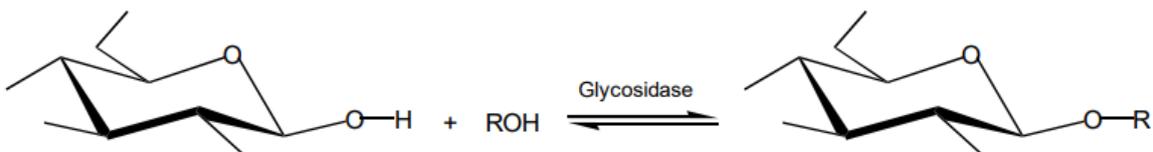


Figure 29 : Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosidases (Grokore, 2016)

Cependant l'équilibre de réaction est, la plupart du temps, en faveur de l'hydrolyse ce qui conduit à des rendements extrêmement faibles pour la synthèse. Même si elle peut être améliorée par élimination au fur et à mesure de l'eau libérée et/ou du produit formé, le rendement reste faible (Ajisaka, Nishida, & Fujimoto, 1987).

La seconde réaction est la transglycosylation qui fonctionne comme l'hydrolyse mais avec un accepteur différent de l'eau. Contrairement à la synthèse de glycosides, toutes les glucosidases ne sont pas capables de réaliser cette réaction. Le rendement de cette réaction peut être meilleur

que celui de la synthèse, mais diminue fortement en présence d'eau à cause d'une compétition entre la molécule d'eau et l'autre accepteur (Sinnott, 1990) (Figure 30).

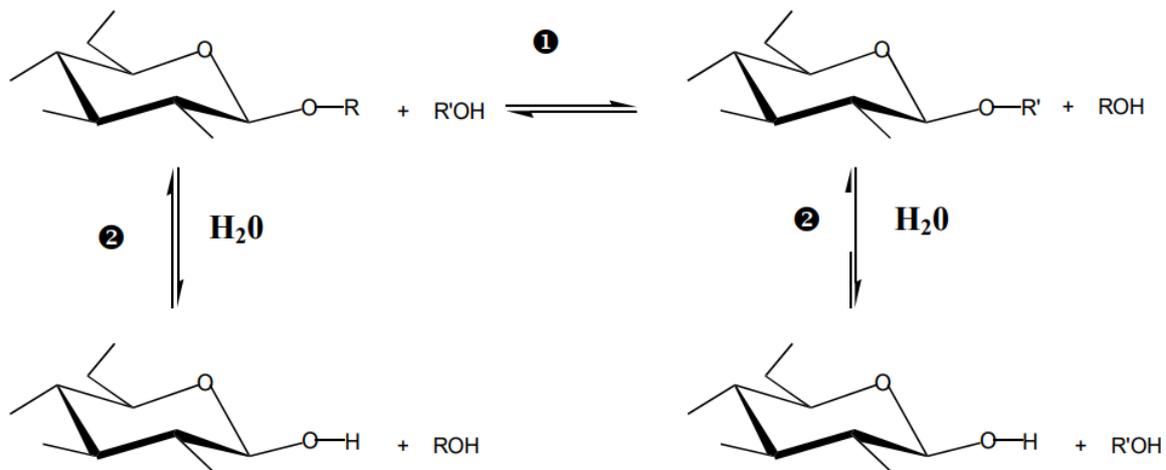


Figure 30 : Schéma global de la compétition entre la transglycosylation (1) et l'hydrolyse (2) (Grokore, 2016)

Comme pour la synthèse, il est possible d'améliorer les rendements en réduisant la teneur en eau du milieu réactionnel en travaillant avec des solvants organiques pouvant servir d'accepteur comme l'éthanol par exemple. Bien que présentes, ces deux réactions restent néanmoins négligeables par rapport à l'activité d'hydrolyse des glucosidases dans les conditions usuelles (milieux généralement riches en eau).

### 1.2.3.5 Libération des aglycones par réaction séquentielle

Il existe des exo- et endo-glucosidases qui libèrent, respectivement, des mono- et des polysaccharides après hydrolyse d'un glycoside à partir de la terminaison non-réductrice du glycoside (Kobata, 2013). En absence d'activité endoglycosidase spécifique, les di- et triglycosides doivent libérer l'aglycone via des réactions séquentielles. Ces réactions nécessitent une glucosidase par sucre présent sur le glycoside. Dans le raisin, par exemple, les glycosides de terpénols existent sous 3 formes principales : glucosides, rutinosides (rhamnose et glucose) et  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides. Une glucosidase ne pourra pas directement libérer les aglycones des rutinosides et  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides (Z. Günata, Bittour, Brillouet, Bayonove, & Cordonnier, 1988). Pour le rutinoside il faudra d'abord l'action d'une rhamnosidase puis d'une glucosidase (Figure 31). Les glucosidases ne peuvent donc pas, à elles seules, assurer l'hydrolyse complète des glycosides. Cependant ces enzymes sont indispensables pour libérer ces molécules car le premier sucre attaché aux aglycones de type composés volatils est toujours un glucose.

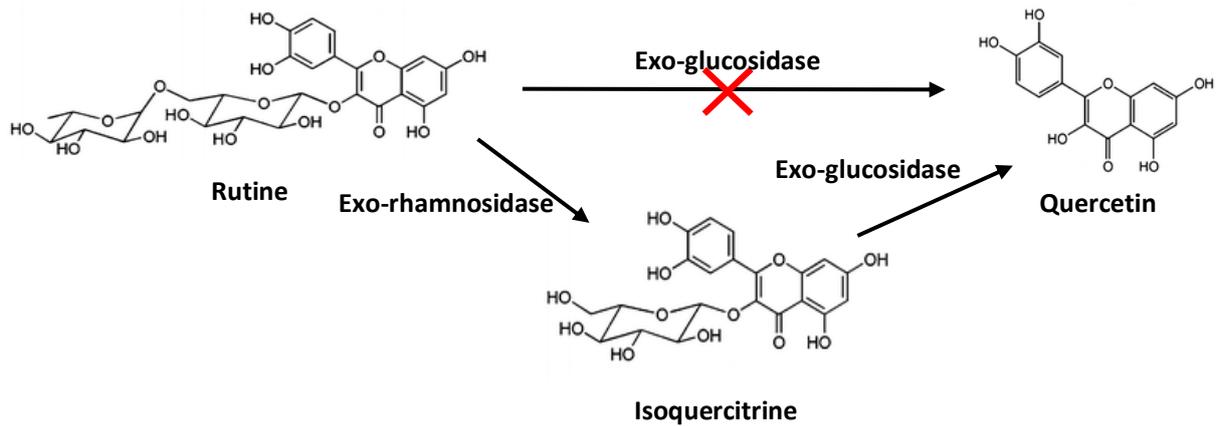


Figure 31 : Hydrolyse de la rutine en quercetine par des exo-glycosidases

## 1.2.4 Facteurs influençant l'activité des glycosidases

### 1.2.4.1 pH et températures optimaux

La plupart des glycosidases ont un pH optimal entre 4 et 7,5 (Figure 32 B). Cette valeur dépend fortement de la source de l'enzyme et du compartiment cellulaire où elle agit. Le mécanisme de réaction des glycosidases demande une coexistence d'aspartate et/ou de glutamate sous forme basique et acide. Il est donc cohérent que le pH optimal de ces enzymes soit voisin des pKa, respectivement de 3,9 et 4,15. L'activité de ces enzymes diminue graduellement de part et d'autre de ces pH optimaux jusqu'à une perte totale d'activité (réversible) en dessous du pH 2,8 et au-dessus du pH 9 (Ketudat Cairns & Esen, 2010 ; Sarry & Günata, 2004).

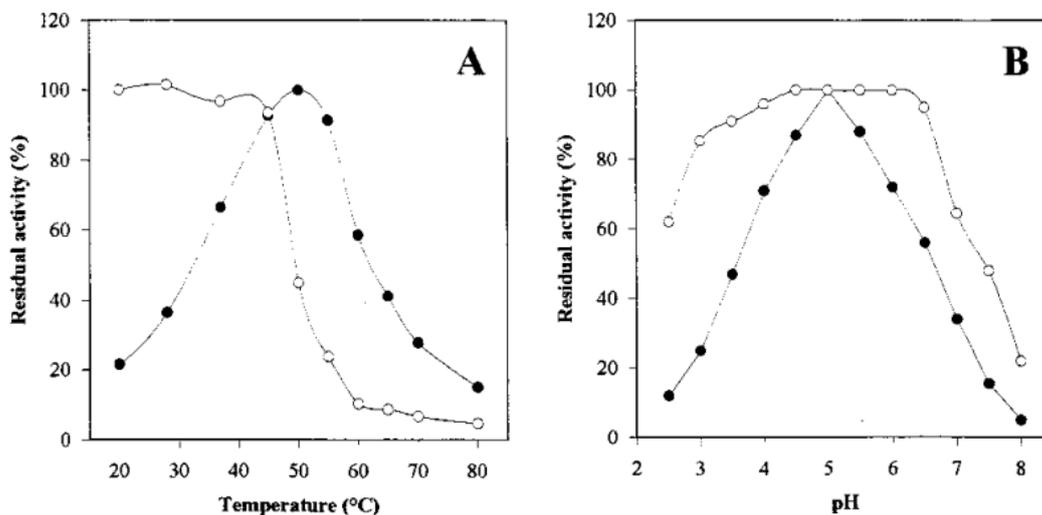


Figure 32 : Effets de la température (A) et du pH (B) sur l'activité (●) et sur la stabilité (○) d'une glucosidase d'*Aspergillus oryzae* (Riou et al., 1998)

Pour les glycosidases mésophiles, la température optimale d'activité est comprise entre 30°C et 65°C et leur température de dénaturation est comprise entre 55°C et 70°C (Figure 32 A). Il existe également des  $\beta$ -glycosidases thermophiles dont la température optimale dépasse les

100°C, notamment la glucosidase de *Pyrococcus furiosus* (Kengen, Luesink, Stams, & Zehnder, 1993). Cette thermostabilité est due en partie à un nombre plus important de résidus proline, de ponts électrostatiques et d'eau intramoléculaire, ainsi qu'à la liaison de davantage de sous-unité pour la structure quaternaire comparé aux enzymes mésophiles (Chi et al., 1999).

#### 1.2.4.2 Inhibitions et co-facteurs

L'aglycone, la partie sucre, certains glycosides et les analogues de l'état de transition comme la glucono- $\delta$ -lactone (Lecas, Günata, Sapis, & Bayonove, 1991) font partie des inhibiteurs compétitifs les plus connus des glucosidases. La sensibilité au glucose reste néanmoins très variable en fonction des sources d'enzyme (Günata & Vallier, 1999) allant d'une sensibilité très faible pour la levure *C. peltata* ( $K_i = 1400$  mM) (Saha & Bothast, 1996) à une très forte sensibilité pour la glucosidase de la levure *Dekkera intermedia* ( $K_i = 3$  mM) (Blondin, Ratomahenina, Arnaud, & Galzy, 1983). Les ions métalliques peuvent également être inhibiteurs des glucosidases, en particulier  $Ag^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  (Zollner, 1999a). Ainsi, ces ions font perdre respectivement 97%, 100% et 97% de l'activité de la glucosidase d'*Aspergillus niger* CBS12559 (Riou, Salmon, Vallier, Günata, & Barre, 1998).

En revanche peu de cofacteurs sont connus pour ces enzymes. Des études ont montré que l'ascorbate (Burmeister, Cottaz, Rollin, Vasella, & Henrissat, 2000) et certains ions peuvent parfois améliorer l'activité des glycosidases au lieu de la réduire comme le cation  $Zn^{2+}$  pour la myrosinase (Liang, Yuan, & Xiao, 2006). Par exemple, l'activité de la glucosidase d'*Aspergillus oryzae* CBS12559 augmente de 77% en présence de  $MnCl_2$  (Riou et al., 1998). Son activité augmente aussi de 30 % dans une solution à 15% d'éthanol (mL:mL) tout comme la glucosidase d'*Aspergillus niger* CCRC31494 (Yan & Lin, 1997).

#### 1.2.4.3 Spécificité des glucosidases

Les glycosidases ont deux types de spécificité : la spécificité par rapport au sucre et la spécificité par rapport à l'aglycone. La spécificité par rapport au sucre est la plupart du temps stricte. Une glucosidase hydrolysera un glucoside et une galactosidase un galactoside (Kobata, 2013). Il existe cependant quelques rares cas où cette spécificité est moins stricte. Par exemple, la glucosidase purifiée de l'amande hydrolyse des glucosides et également des galactosides (Helferich & Kleinschmidt, 1967).

Bien que les spécificités par rapport à l'aglycone soient très variables, elles reposent sur seulement quelques acides aminés voir parfois un seul. La glucosidase du maïs ZmGlu1 et la dhurrinase du sorgho SbDhr1 ont été comparées. Elles ont 70% de similitude de séquences mais ont des spécificités bien distinctes (Cicek, Blanchard, Bevan, & Esen, 2000). Celle de ZmGlu1 est large mais cette enzyme n'accepte pas la dhurrine alors qu'il s'agit de l'unique substrat de SbDhr1. Grâce à l'étude de mutants inactifs de ces enzymes, le complexe enzyme-substrat a pu être observé pour déterminer les origines structurelles de cette différence de spécificité. Dans ZmGlu1,

le tryptophane W378 et les phénylalanines F198, F205 et F466 sont nécessaires à la liaison des différents substrats au site actif. Dans SbDhr1, les trois phénylalanines sont remplacées par la valine V196, la leucine L203 et par la serine S462 (Czjzek et al., 2000) (Figure 33). Cela a eu pour conséquence la réduction de la taille du site actif et un changement dans les interactions hydrophobes du site actif, permettant à la dhurrine de devenir le substrat de cette enzyme. Le tryptophane W378 est présent pour les deux enzymes comme pour la plupart des GH1. Cet acide aminé hautement conservé serait un élément crucial à la fixation des substrats au site actif des glucosidases de la famille des GH1 (Verdoucq et al., 2004).

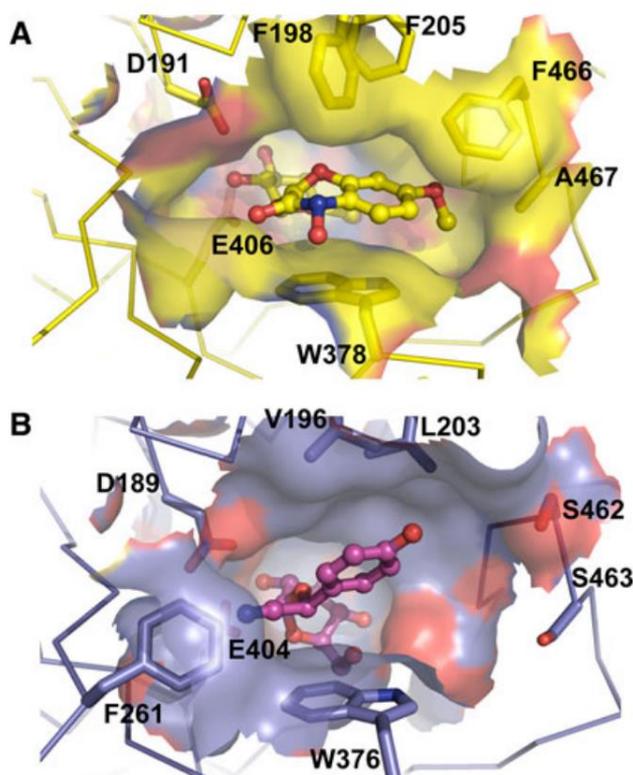


Figure 33 : Configurations des sites actifs de ZmGlu1 avec du DIMBOA (A) et de SbDhr1 avec de la dhurrine (B), (Czjzek et al., 2000)

### 1.2.5 Ingénierie enzymatique des $\beta$ -glycosidases

L'optimisation des glycosidases par ingénierie enzymatique est un des objectifs de la thèse. C'est une stratégie qui a déjà été utilisée sur les glycosidases pour diverses améliorations de ces enzymes.

Les glycosidases ont surtout été modifiées pour favoriser leurs activités secondaires de type glycosyltransférase et glycosynthase (H.-Y. Feng et al., 2005; Shim, Chen, Rich, Goddard-Borger, & Withers, 2012). Ainsi la glycosidase de *Thermus thermophilus* a subi une mutagenèse par approche semi-rationnelle qui a permis au mutant Y284F d'augmenter l'activité glycosyltransférase de 36% à 76% comparé à l'enzyme initiale (Teze et al., 2014). Dans le même esprit, Mayer et al. (2001) a développé par mutagenèse saturante de la  $\beta$ -glucosidase

d'*Agrobacterium*, Abg, le mutant E358G qui a une activité glucosynthase 50 fois meilleure que l'enzyme native.

Kaper, Brouns, Geerling, Vos, & Oost (2002) ont travaillé sur l'amélioration de deux glycosidases thermostables, CelB de *Pyrococcus furiosus* et LacS de *Sulfolobus solfataricus*, par brassage génétique (DNA shuffling) afin d'améliorer leur activité. Ils ont créé trois mutants performants ayant une activité d'hydrolyse du lactose jusqu'à 3,5 fois supérieure au parent CelB et jusqu'à 8,6 fois supérieure au parent LacS. Travaillant également sur la CelB de *Pyrococcus furiosus*, Lebbink, Kaper, Bron, van der Oost, & de Vos (2000) a également réussi à modifier l'un des paramètres optimaux d'activité de cette enzyme par mutagenèse aléatoire saturante : la température. Ainsi, ils ont obtenu une baisse de la température optimale pour le meilleur mutant développé allant jusqu'à une constante catalytique (kcat) 3 fois plus élevé que CelB à 20°C.

Durant les travaux de la thèse, de l'ingénierie enzymatique a été réalisée par la société Protéus via une méthode d'évolution dirigée qu'elle a développée et brevetée : le L-Shuffling™ (US20030092023A1, 2003). Cette technique se base sur la méthode de mutagenèse par recombinaison appelée shuffling. Elle consiste en un brassage génétique à partir de plusieurs gènes parents.

Tout d'abord, l'ADNase est utilisée pour fragmenter un ensemble de gènes. Ceux-ci sont ensuite soumis à une étape de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) sans amorce. Les fragments d'ADN avec une séquence homologue chevauchante suffisamment grande s'apparient et sont ensuite prolongés par l'ADN polymérase. Plusieurs tours de cette extension par PCR sont réalisés jusqu'à ce qu'un certain nombre de brins d'ADN atteigne la taille des gènes parentaux. Ces gènes peuvent ensuite être amplifiés avec une autre PCR, cette fois-ci avec des amorces conçues pour compléter les extrémités des brins. Les amorces peuvent avoir des séquences supplémentaires ajoutées à leurs extrémités 5', telles que des séquences pour des sites de reconnaissance d'enzyme de restriction, nécessaires à la ligature dans un vecteur de clonage (Harayama, 1998).

La société Protéus a repris ce protocole en supprimant l'utilisation de polymérases réduisant ainsi la probabilité d'obtenir des mutations non désirées. La recombinaison aléatoire est alors assurée par la ligature des extrémités de fragments des différents gènes parentaux hybridés sur une matrice d'assemblage, au moyen d'une ADN ligase (Figure 34). Ce processus basé sur la ligature permet une recombinaison aléatoire, conservant et combinant les informations d'ADN des gènes parent et générant une forte proportion de nouveaux variants fonctionnels.

Les deux principaux avantages de cette nouvelle technique comparé au *shuffling* classique sont la possibilité de recombiner des gènes longs et courts avec une homologie de séquence nécessaires plus faible et la capacité à générer davantage de gènes mutants fonctionnels (Fourage, Sonet, Monot, Ravot, & Margeot, 2013).

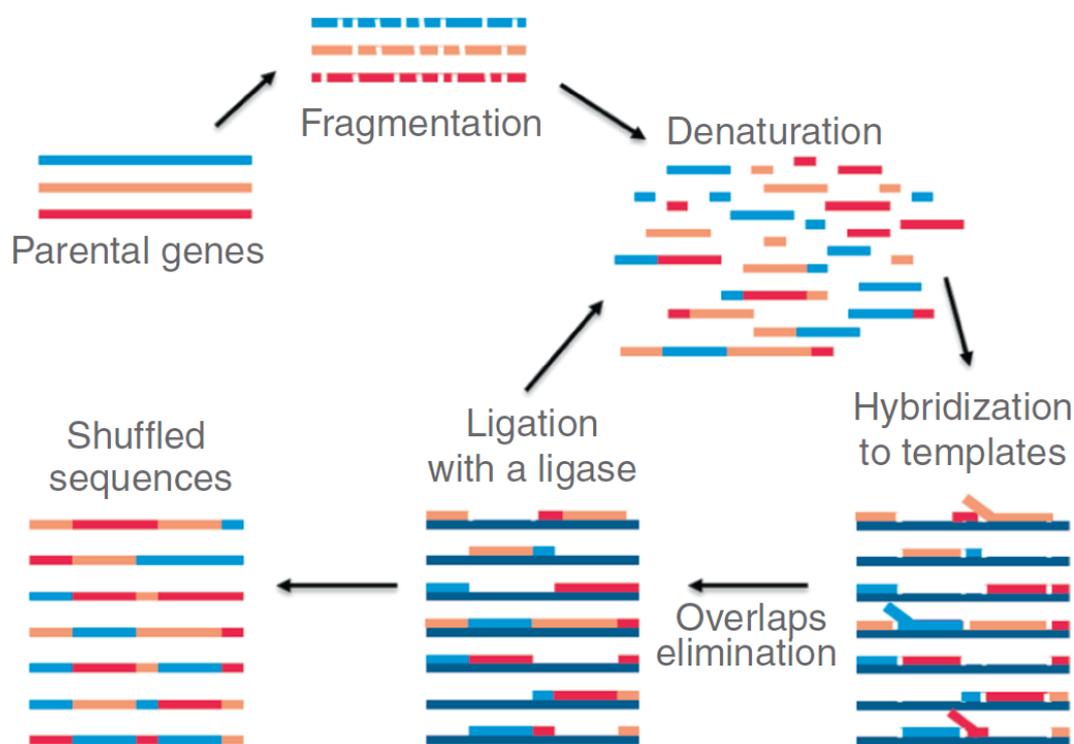


Figure 34 : Schéma du principe du L-Shuffling<sup>TM</sup> (Fourage et al., 2013)

## 1.2.6 Glycosides de composés volatils de la fraise et de l'abricot

### 1.2.6.1 Méthode de mesure des glycosides

La quantification des glycosides de composés volatils est traditionnellement faite par la méthode SPE (solid phase extraction) via une extraction par affinité des glycosides avec une résine de type C18 (Ubeda et al., 2012). Une colonne de résine de type C18 est conditionnée par une élution successive d'hexane, de méthanol et d'eau. La colonne est ensuite chargée avec l'échantillon contenant les glycosides. L'ensemble est lavé à l'eau pour éliminer les sucres. La seconde élution consiste à éliminer la fraction apolaire de l'échantillon (les composés volatils libres) le solvant utilisé varie alors en fonction du fruit dont sont extraits les glycosides. Pour le raisin, le pentane/dichlorométhane (2/1, v/v) peut être utilisé (Dziadas & Jeleń, 2010), pour la fraise ou la cerise du dichlorométhane (Ubeda et al., 2012; Wen et al., 2014), pour l'abricot du pentane (Krammer et al., 1991). Après élimination des composés volatils, la colonne est rincée au méthanol pour récupérer les glycosides (Sarry & Günata, 2004).

La quantification des glycosides avec cette méthode est cependant à considérer avec prudence. En effet, les travaux d'Hampel et al. (2014), comparant l'hydrolyse enzymatique directe (avec la préparation commerciale AR2000) à la SPE, montrent que l'extraction par affinité avec une résine C18 conduit à une sur-évaluation quantitative et à une discrimination de plusieurs composés. Dans cette étude, 95 nouveaux composés sont obtenus par hydrolyse directe de

Chardonnay contre 67 avec la SPE. La méthode d'hydrolyse directe paraît plus fiable et plus adaptée pour une étude quantitative de la réserve glycosidique dans les fruits. En effet, la thèse de Voirin (1990) montre un rendement de 15% de l'extraction par SPE sur de glycosides avec des aglycones phénoliques et un rendement allant de 70% à 100% pour l'extraction de glycosides avec des aglycones terpéniques.

### 1.2.6.2 Glycosides de la fraise

Les glycosides les plus souvent présents dans ce fruit sont les glycosides de furanéol, de mésifurane, de  $\gamma$ -décylactone et d'alcool benzylique (Tableau III) (Groyne, Lognay, & Marlier, 1999; Cristina Ubeda et al., 2012; Wintoch, Krammer, & Schreier, 1991). Trois de ces composés font partie des molécules clés de l'arôme de fraise : le furanéol, le mésifurane et la  $\gamma$ -décylactone (cf partie 1.1.1.1). Ils apportent des notes « caramel » et fruitées. Le mésifurane peut être sous forme de glycoside malgré une absence apparente de groupement hydroxyle ou carboxyle. En effet, la fonction cétone de cette molécule possède une forme « éno » stabilisée qui permet au mésifurane d'être stocké sous forme de glycoside. L'acide cinnamique est également présent dans chaque étude. Cette molécule est le précurseur de plusieurs molécules odorantes telles que l'eugénol ou le chavicol au seuil de détection bas.

Tableau III: Composés volatils présents dans la fraise sous forme glycosylée

	Seuil de detection dans l'eau ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>	Descripteurs <sup>b</sup>	Concentration ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>c</sup>	Concentration ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>d</sup>	Concentration ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>e</sup>
<b>Acides</b>					
Acide 2-méthylbutanoïque	180	Acide, fruité	-	>1000	6
Acide butanoïque	240	Fromage, aigre	-	50-200	-
Acide acétique	150	Acide, âcre	-	50-200	-
Acide hexanoïque	3000	Gras, fromage	-	200-1000	23
Acide (2E)-hexénoïque	-	Fruité, acide	-	<50	-
Acide 2-méthylpropanoïque	8100	Acide, aigre	-	1-50	-
Acide benzoïque	10000	Balsamique	80-131	>1000	-
Acide cinnamique	-	Balsamique, doux	178-1678	>1000	84
<b>Alcools</b>					
1-Butanol	500	Fermenté, fruité	-	<50	-
3-Méthylbutan-1-ol	250	Fermenté, alcoolique	-	<50	-
4-Méthylpentan-1-ol	-	Noisette	-	<50	-
1-Hexanol	800	Herbeux, vert	-	50-200	-
2-Heptanol	41	Fruité, citrus	-	<50	-
4-Vinylguaiacol	3	Fumé, boisé	31-76	50-200	-
4-Vinylphénol	10	Phénolique, médical	994-9602	>1000	-
Alcool benzylique	10000	Floral, fruité	8,45-37	>1000	5
(3Z)-Hexèn-1-ol	70	Vert, frais	4,10-5,26	<50	-
(2E)-Hexèn-1-ol	-	Vert, fruité	17-24	-	-

2-Phényléthanol	4	Floral, rose	6,09-9,39	50-200	-
2-Phénoxyéthanol	-	Floral, rose	3,29-7,95	-	-
Phénol	5900	Phénolique, plastique	-	200-1000	-
Eugénol	6	Sucré, épicé	0,17-0,91	-	-
Tyrosol	-	Florale, sucré	-	200-1000	-
<b>Aldéhydes</b>					
Benzaldéhyde	100	Fruité, amande	3,80-6,82	-	-
Phénylacétaldéhyde	4	Vert, miel	2,16-3,50	-	-
Vanilline	29	Vanille, sucré	1,46-4,12	-	-
Zingerone	20000	Epicé, sucré	0,76-1,07	-	-
<b>Furanes</b>					
Furanéol	0,03	Caramel, brûlé	8,15-39	>1000	494
Mésifurane	0,03	Moisi, caramel	5,07-42	200-1000	17
<b>Lactones</b>					
$\delta$ -Octalactone	-	Crèmeux, noix de coco	2,10-14	-	-
$\gamma$ -Nonalactone	7	Crèmeux, noix de coco	1,42-1,94	-	-
$\gamma$ -Déalactone	11	Fruité, pêche	5,55-26	<50	9
Pantolactone	-	Caramel, barbe à papa	0,84-1,66	-	-
<b>Terpènes</b>					
$\beta$ -Linalool	6	Floral, citrus	9,21-48	-	-
Linalool oxyde	320	Floral, vert	1,18-12,49	-	-
$\alpha$ -Terpinéol	300	Citrus, boisé	63-100	-	-
Nérol	680	Floral, rose	0,82-6,03	-	-
Géranol	4	Floral, citronnelle	18-45	-	-
Farnésol	1000	Floral, frais	9-18	-	-
Rose oxyde	20000	Rose, métallique	0,02	-	-
$\alpha$ -Terpinolène	2000	Boisé, frais	0,19-0,58	-	-
$\beta$ -Ionone	0,007	Floral, boisé	0,67-0,92	-	-
$\beta$ -Damascenone	0,0007	Boisé, floral	0,65-2,00	-	-
a : Burdock & Fenaroli, 2010					
b : "The Good Scents Company - Flavor, Fragrance, Food and Cosmetics Ingredients information"					
c : Teneurs en $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mesurées sur les variétés <i>Fuentepina</i> , <i>Camarosa</i> , <i>Candoga</i> et <i>Sabrina</i> par SPE (Cristina Ubada et al., 2012)					
d : Teneurs en $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mesurées sur la variété <i>Korona</i> par SPE (Wintoch et al., 1991)					
e : Teneur en $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mesurée sur la variété <i>Elsanta</i> par SPE (Groyne et al., 1999)					

### 1.2.6.3 Glycosides de l'abricot

Les glycosides les plus souvent présents dans l'abricot sont les glycosides de  $\beta$ -linalool, linalool oxyde,  $\alpha$ -terpinéol, nérol, géranol et d'alcool benzylique (Tableau IV) (Krammer et al., 1991; Salles et al., 1991; Solís-Solís, Calderón-Santoyo, Schorr-Galindo, Luna-Solano, & Ragazzo-

Sánchez, 2007). Ce sont principalement des terpènes qui apportent des notes florales et « citrus ». Deux d'entre eux font partie des molécules clé de l'arôme d'abricot : le  $\beta$ -linalool et l' $\alpha$ -terpinéol (cf partie 1.1.1.2). Le benzaldéhyde, le 2-phényléthanol, le (2E)-hexénol et l'eugénol sont régulièrement présent dans la réserve glycosidique des abricots. L'ensemble de ces molécules apporte des notes qui renforcent l'arôme global de l'abricot sans pour autant modifier la balance aromatique.

Il est cependant intéressant de constater que malgré son importance dans l'arôme de l'abricot, la  $\gamma$ -décàlactone est peu présente sous forme de réserve, seuls Solís-Solís et al. (2007) la retrouvent.

**Tableau IV : Composés volatils présents dans l'abricot sous forme glycosylée**

	Seuil de detection dans l'eau ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>	Descripteurs <sup>b</sup>	Krammer et al. <sup>c</sup>	Solis-solis et al. <sup>d</sup>	Salles et al. <sup>e</sup>
<b>Acides</b>					
Acide 2-méthylbutanoïque	180	Acide, fruité	+		
Acide 3-méthylbutanoïque	-	Fromage, lacté	+		
Acide butanoïque	240	Fromage, aigre	+		
Acide acétique	150	Acide, âcre	+		
Acide dodecanoïque	5000	Gras, noix de coco	+		
Acide hexanoïque	3000	Gras, fromage	+		
Acide benzoïque	85000	Balsamique	+		
Acide octanoïque	3000	Cireux, savon	+		
<b>Alcools</b>					
1-Butanol	500	Fermenté, fruité	+		
3-méthylbutan-1-ol	250	Fermenté, alcoolique	+		
1-Hexanol	800	Herbeux, vert		+	
4-vinylguaïacol	3	Fumé, boisé	+		
4-vinylphénol	10	Phénolique, médical	+		
Eugénol	6	Sucré, épicé	+	+	
(3Z)-Hexèn-1-ol	70	Vert, frais		+	
(2E)-Hexèn-1-ol	-	Vert, fruité	+	+	
Tyrosol	-	Florale, sucré	+		
Phénol	5900	Phénolique, plastique	+		
2-Phényléthanol	4	Floral, rose	+	+	
Alcool benzylique	10000	Floral, fruité	+	+	+
<b>Aldéhydes</b>					
Benzaldéhyde	100	Fruité, amande	+	+	
Phénylacétaldéhyde	4	Vert, miel	+		
Vanilline	29	Vanille, sucré	+		
6-Méthyl-5-heptèn-2-ol	-	Vert, sucré		+	
<b>Furanes</b>					

Furfural	280	Roussi, boisé		+		
<b>Cétones</b>						
Acétoïne	10000	Beurré, crémeux		+		
4-Hydroxyacétophénone	-	Sucré, aubépine		+		
6-Méthyl-5-heptèn-2-one	50	Vert, citrus				+
<b>Lactones</b>						
$\gamma$ -Décalactone	11	Fruité, pêche				+
$\gamma$ -Dodécalactone	7	Fruité, beurré				+
<b>Terpènes</b>						
$\beta$ -Linalool	6	Floral, citrus		+	+	+
$\alpha$ -Limonène	4	Citrus, doux			+	
$\alpha$ -Ionone	0,6	Floral, violette			+	
$\beta$ -Ionone	0,007	Floral, boisé			+	
(E,E)-Pseudoionone	-	Balsamique, floral		+		
Vomifoliol	-	Fruité		+		
Linalool oxyde	320	Floral, vert		+	+	+
Nérol	680	Floral, rose		+	+	+
$\beta$ -Cyclocitral	-	Tropical, safran			+	
Géraniol	4	Floral, citronnelle		+	+	+
$\alpha$ -Terpinéol	300	Citrus, boisé		+	+	+
$\gamma$ -Terpinéol	-	Floral, pin			+	
$\gamma$ -Terpinène	-	Terpénique, citrus			+	
4-Terpinol	-	Amer			+	

<sup>a</sup> : Burdock & Fenaroli, 2010

<sup>b</sup> : "The Good Scents Company - Flavor, Fragrance, Food and Cosmetics Ingredients information"

<sup>c</sup> : Identifié sur la variété *Reale* (Krammer et al., 1991)

<sup>d</sup> : Identifié sur les variétés *Goldrich, Orangered, Iranien, Monique, Hybride blanc, Double rouge* et *Bergeron* (Solís-Solís et al., 2007)

<sup>e</sup> : Identifié sur la variété *Rouge du Roussillon* (Salles et al., 1991)

## 1.2.7 Conclusion

Les glycosidases représentent une famille d'enzymes extrêmement vaste avec des rôles multiples. La diversité de ces rôles est directement liée à leur spécificité et leur présence dans tous les êtres vivants que ce soit les mammifères, les insectes, les plantes ou même les microorganismes.

Dans le cadre d'une application sur des fruits pour libérer la réserve aromatique, la glucosidase choisie devra avoir la spécificité la plus large possible pour libérer un maximum de glycosides différents. Il faudra également réaliser un travail, soit par sélection, soit par évolution dirigée, pour obtenir des glucosidases qui restent actives en milieu fruit, c'est-à-dire, avec une

concentration en sucre, notamment en glucose, élevée et avec un pH entre 2 et 5. La température optimale d'activité de ces enzymes sera également un paramètre important par rapport aux contraintes industrielles, notamment en termes de maintien en température et de conservation de la qualité aromatique des fruits traités.

## 1.3 Produits alimentaires intermédiaires (PAI) à base de fruit et leur fabrication

La partie précédente a montré l'utilisation actuelle des  $\beta$ -glucosidases dans l'industrie du vin afin d'améliorer la teneur en composés volatils. Ces enzymes possèdent beaucoup de contraintes pour une utilisation sur fruit. Il est donc nécessaire de définir les produits désirés par les partenaires, les PAI, et les possibles procédés pouvant aider à l'application industrielle des  $\beta$ -glucosidases.

### 1.3.1 Définition des produits alimentaires intermédiaires

Les produits alimentaires intermédiaires (PAI) sont des produits ayant subi une première transformation, même basique comme l'épluchage, et qui servira d'ingrédient pour un produit ayant un niveau de transformation plus élevé. Ils peuvent donc être des produits de la 2<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> gamme comme les conserves de fruits (2<sup>ème</sup> gamme), les cubes de fruits surgelés (3<sup>ème</sup> gamme) ou encore les purées de fruits pasteurisés (5<sup>ème</sup> gamme) (Tableau I). Les produits de la 4<sup>ème</sup> gamme représentent les fruits et légumes conditionnés en sachet. Ces derniers sont peu utilisés par les industriels de la transformation. Ils seront davantage retrouvés dans les cuisines des restaurateurs. Les PAI peuvent se diviser en deux catégories :

- Les PAI économiques, à valeur ajoutée faible. Dans le cadre des fruits il s'agira de tout ce qui est fruits coupés, purées, coulis, fruits en sirop, tout ce qui est prêt à l'emploi pour une nouvelle transformation. Leurs principaux intérêts sont de pouvoir gagner du temps sur des étapes laborieuses pour la confection d'un produit et de rendre disponible toute l'année des produits saisonniers comme l'abricot ou la pêche.
- Les PAI technologiques, à forte valeur ajoutée. Il s'agira ici d'ingrédients plus travaillés qui seront, le plus souvent ajoutés en fin de transformations. Parmi eux il y a des jus aromatisants pour rehausser le goût de jus de fruit ou de desserts, des « bases fruit » pour produits laitiers ou encore des bases de fruits riches en pectines pour texturer des confitures.

Les PAI à base de fruits regroupent une large gamme de produits :

- Les fruits sur sucres (en poches aseptique) et les fruits « IQF » (Individually Quick Frozen) qui entrent, par exemple, dans la fabrication des yaourts, des desserts aux fruits, des biscuits, ou des préparations pour pâtisserie
- Les purées de fruits et fruits morceaux qui entrent dans la préparation des plats cuisinés ou sont utilisés en restauration
- Les arômes (ou extraits), additifs (vitamines, texturants), concentrés ou poudres à base de fruits, très utilisés dans l'industrie des boissons et la confiserie

**Tableau V: Description des différentes gammes de produits alimentaires à base de fruits et légumes**

Gamme	Produits	Principe de conservation	Temps moyen de conservation
1 <sup>ère</sup> gamme	Les produits bruts : fruits, légumes, viandes, poissons	Conservation à température ambiante ou au froid positif	Court (quelques jours)
2 <sup>ème</sup> gamme	Les produits appertisés (en conserve)	Conservation à température ambiante après traitement thermique (stérilisation, pasteurisation) et par conditionnement étanche	Très long (DLUO d'environ 5 ans)
3 <sup>ème</sup> gamme	Les produits surgelés ou congelés	Conservation au froid négatif (-12°C minimum pour la congélation ; -18°C minimum pour la surgélation)	Long (plusieurs mois)
4 <sup>ème</sup> gamme	Les produits crus prêts à l'emploi	Conservation au froid positif avec conditionnement sous atmosphère contrôlée ou sous-vide	Court (entre 5 à 10 jours)
5 <sup>ème</sup> gamme	Les produits cuits ou précuits conditionnés	Conservation au froid positif avec conditionnement sous atmosphère contrôlée ou sous-vide	Moyen (de quelques jours à un mois selon le conditionnement)
6 <sup>ème</sup> gamme	Les produits déshydratés et ionisés	Conservation à température ambiante après séchage à l'air, lyophilisation ou ionisation	Long (plusieurs mois)

## 1.3.2 Etapes unitaires de la fabrication des PAI à base de fruits

### 1.3.2.1 Blanchiment et pasteurisation

#### 1.3.2.1.1 Principe du blanchiment

Le blanchiment est une étape de transformation visant principalement à inhiber les enzymes endogènes et à stabiliser la couleur du fruit. Le blanchiment peut être fait à l'eau, à la vapeur, à la vapeur à vide ou encore sous air chaud. La méthode la plus commune, par son faible coût, reste le blanchiment à l'eau dont les paramètres varient entre 75°C et 95°C pour une durée comprise entre 1 et 10 min (Rawson et al., 2011). Une alternative possible au blanchiment classique est la thermo-sonication consistant à combiner ultrasons et chauffage afin d'avoir des temps de traitement plus courts. Cette méthode permet par exemple aux fraises ayant subi ce traitement de conserver 2,5 fois plus de fermeté que les fraises ayant subi un blanchiment classique dans les mêmes conditions de temps et température (65°C pendant 2 min) (Alexandre, Santos-Pedro, Brandão, & Silva, 2011).

### 1.3.2.1.2 Principe de la pasteurisation

La pasteurisation est le deuxième traitement thermique qui peut être observé durant la transformation des fruits. Toutes les techniques de chauffage précédemment citées pour le blanchiment peuvent être utilisées en pasteurisation. A celles-ci s'ajoute d'autres méthodes telle que la flash pasteurisation, consistant à faire traverser un liquide (jus de fruits par exemple) dans des tubulaires chauffés afin d'augmenter la surface de contact avec la source de chaleur et ainsi diminuer le temps de chauffage du produit (Pederson & Tressler, 1938). Une autre technique est la pasteurisation par chauffage ohmique. Elle consiste en un chauffage via un courant électrique parcourant le produit. Cette méthode permet un traitement thermique rapide et uniforme sur le produit limitant les dégradations thermiques causées par une pasteurisation classique (Leizerson & Shimoni, 2005). Cette étape est appliquée sur des jus ou des purées et a pour but d'éliminer les microorganismes et d'inhiber la pectine méthylestérase (PME) du fruit (Rawson et al., 2011).

### 1.3.2.1.3 Impact du blanchiment et de la pasteurisation sur les propriétés organoleptiques

Le traitement thermique infligé aux fruits par le blanchiment a un impact sur leur couleur. Les principaux pigments que l'on retrouve dans les végétaux sont les carotènes, les caroténoïdes, les anthocyanes, les chlorophylles et les composés phénoliques (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000). Des essais de blanchiment sur des cubes de papaye et d'ananas à 70°C (pendant 4, 6, 8, 10 et 12 min), à 85°C (pendant 2, 4, 6, 8 et 10 min) et à 100°C (pendant 1, 2, 4, 6 et 8 min) ont montré une diminution de la teneur en caroténoïdes allant jusqu'à 20% et de la teneur en anthocyanes allant jusqu'à 32% pour les temps de blanchiment les plus longs (Sian & Ishak, 1991).

Un autre impact du blanchiment sur les fruits est une perte de texture. Des tests sur cubes de pommes ont montré une diminution de la force de fracture du fruit de 31% pour un blanchiment de 30 secondes à la vapeur et de 56% pour le même traitement dans de l'eau bouillante. Cette diminution monte jusqu'à 69% pour un blanchiment d'une minute (Mallidis & Katsaboxakis, 2002).

Les traitements thermiques dégradent également les composés thermolabiles comme les anthocyanes ou les caroténoïdes pouvant causer une dégradation de la couleur du fruit. Ainsi il a été reporté qu'un blanchiment de 80°C pendant 10 minutes sur de cubes d'ananas, de papaye et de baies d'açaï provoque une diminution des anthocyanes et des caroténoïdes (Sian & Ishak, 1991) et (Pacheco-Palencia, Duncan, & Talcott, 2009). Dans la papaye, les anthocyanes et les caroténoïdes passent, respectivement, de 39,4 et 97,4 µg/g de matières sèches à 35,0 et 89,6 µg/g de matières sèches. Dans l'ananas, ils passent respectivement de 8,1 et 22,8 µg/g de matières sèches à 7,3 et 20,6 µg/g de matières sèches (Sian & Ishak, 1991).

La pasteurisation a les mêmes impacts que le blanchiment sur les propriétés organoleptiques du produit, c'est-à-dire une perte de couleur et de texture. Une pasteurisation thermique conventionnelle (90°C pendant 15 min) sur de la purée de fraises (*Senga Sengana*) a provoqué une

augmentation du coefficient  $L^* \times a^*/b^*$  de 4,5 unités. Couplée à l'augmentation du paramètre  $L^*$  et la diminution des paramètres  $a^*$  et  $b^*$ , cela indique une dégradation thermique des anthocyanes du fruit (Marszałek, Mitek, & Skąpska, 2015). Une étude sur les conserves d'abricot de la variété *Bebeco* a montré une perte de texture de 15% après 6 min de pasteurisation à 84°C bien que cette variété soit connue pour avoir une bonne résistance aux traitements thermiques (Mallidis & Katsaboxakis, 2002).

### **1.3.2.2 Découpe et broyage**

#### **1.3.2.2.1 Principe du découpage**

La découpe est systématiquement mécanique mais plusieurs techniques existent. La plus connue et utilisée est l'utilisation de lames. Dans ce cas, c'est l'outil utilisé qui se révèle être le facteur déterminant la qualité du produit après découpe. En effet le tranchant de la lame affecte directement la durée de vie du produit en minimisant les blessures faites aux tissus du fruit ou du légume. Mishra et al. (2012) ont montré une diminution de 39% du brunissement de l'aubergine après une découpe avec une lame aiguisée (épaisseur de 0.04 mm) comparé à une découpe avec un couteau de cuisine avec en plus une augmentation de la durée de vie des tranches de 16, 12 et 5 jours, respectivement à 4°C, 10°C et 26°C.

Une autre technique plus récente est la découpe sous jet d'eau pressurisé. Cette technique permet à la fois de découper le produit et de laver les tissus blessés évitant ainsi certains dommages liés aux activités enzymatiques, les enzymes étant emportées par l'eau de lavage (Carreño-Olejua, Hofacker, & Hensel, 2010).. Cependant cette méthode a plusieurs désavantages, les principaux étant son coût et son incompatibilité avec les fruits et légumes sensibles.

#### **1.3.2.2.2 Impact du découpage et du broyage sur les propriétés organoleptiques**

Le principal impact de ces étapes de transformation est la décompartmentation cellulaire qui entraîne une multitude de réactions enzymatiques (décrite en I.1.3) si aucune inactivation des enzymes endogènes du fruit n'a eu lieu avant. Ces réactions enzymatiques toucheront aussi bien la texture, la couleur et l'arôme du produit.

### **1.3.2.3 Imprégnation sous-vide**

#### **1.3.2.3.1 Principe de l'imprégnation sous-vide**

Ce procédé consiste à retirer l'air des espaces vides à l'intérieur d'un fruit pour le remplacer par une solution qui modifiera les propriétés du produit. L'imprégnation sous-vide se déroule en 3 étapes. Tout d'abord, le fruit est mis en dans un environnement en dépression ce qui va chasser l'air des espaces vides. La seconde étape est une stabilisation de la pression entre le fruit et l'environnement. Pour finir le vide est relâché et la solution est alors aspirée par les capillaires du fruit pour remplir les espaces vide (Bellary & Rastogi, 2016; Fito et al., 2001; Radziejewska-Kubzdela, Biegańska-Marecik, & Kidoń, 2014). Le vide appliqué varie entre 1kPa et 86 kPa (Javeri,

Toledo, & Wicker, 1991; Van Buggenhout et al., 2006) pour une durée de traitement variant entre 2 et 120 min (Degraeve, Saurel, & Coutel, 2003; Javeri et al., 1991).

### 1.3.2.3.2 Impact du traitement sous-vide sur les propriétés organoleptiques

L'imprégnation sous-vide a rarement un impact direct sur les propriétés organoleptiques des fruits. Son effet sera en fonction des solutions imprégnées et des post-traitements subis, comme dans l'étude de (Velickova et al., 2018), où l'imprégnation sous-vide est un pré-traitement à la congélation de fraises. Dans cette étude l'imprégnation est utilisée pour infuser une solution cryoprotectrice à 12% de tréhalose sur la fraise. Après un cycle de congélation/décongélation les fraises traitées rejettent 2,6 fois moins d'exsudat que les fraises non-traitées. Un gain de fermeté après décongélation et un gain de couleur (augmentation du  $a^*$  et du  $b^*$  de 30% et de 50%, respectivement) sont également observés dans les mêmes conditions expérimentales. L'imprégnation sous-vide est utilisée sur la fraise pour améliorer sa fermeté et réduire son activité de l'eau (Tableau VI).

Tableau VI : Utilisations de l'imprégnation sous-vide sur la fraise

Composition de la solution infusée	Paramètres du procédé	Effet	Référence
Solution de saccharose à 65% (g:g)	Vide : 5 kPa Temps de vide : 5 min	Diminution de l' $a_w$	(Moreno, Chiralt, Escriche, & Serra, 2000)
Sirop de fructose à 50% (g :g) ou solution de pectine hautement méthoxylée à 3% (g:g)	Vide : 7 kPa Temps de vide : 15 min	Amélioration de la texture et réduction des exsudats après décongélation	(Xie & Zhao, 2004)
Solution de pectine hautement méthylée à 0,5% (g:g) avec 1% de $\text{CaCl}_2/2\text{H}_2\text{O}$ et 3% de pectine de pomme	Vide : 1 kPa Temps de vide : 5 min	Limitation des dommages structuraux durant des procédés de congélation rapide	(Van Buggenhout et al., 2006)
Solution de tréhalose à 12 g/	Vide : 86 kPa Temps de vide : 5 min	Amélioration de la tolérance à la congélation	(Velickova et al., 2013)
Solutions de $\text{CaCl}_2$ , de spermine et spermidine à 1, 10 et 100 mM	Vide : 16,9 kPa Temps de vide : 8 min	Augmentation de la fermeté	(Ponappa, Scheerens, & Miller, 1993)

### 1.3.2.4 Stockage en froid négatif

#### 1.3.2.4.1 Principe du stockage

Afin d'améliorer leur conservation les fruits destinés à la transformation sont généralement conservés à  $-20^\circ\text{C}$  par des méthodes IQF (Individual Quick Frozen). Il s'agit de méthodes de surgélation permettant de réduire au maximum la dégradation de la structure. Il existe une méthode mécanique par circulation d'un flux d'air froid et une méthode cryogénique par immersion dans de l'azote liquide (Heldman & Hartel, 1997).

#### 1.3.2.4.2 Impact du stockage sur les propriétés organoleptiques

Le stockage en froid négatif bien que performant pour la conservation des fruits pose des problèmes de coloration et de maintien de la texture lorsque le produit est décongelé. (Velickova et al., 2018) ont étudié l'impact de la congélation/décongélation sur la fraise. Au niveau de la texture la fraise perd toute sa résistance à la rupture en son centre et à l'extérieur et perd la moitié de sa résistance dans la zone médiane. Quant à la couleur, la congélation augmente la pâleur de la fraise en surface (augmentation de 25% du facteur L\*) mais les facteurs a\* et b\* diminuent en surface et à cœur indiquant une perte de la couleur rouge et jaune.

### 1.3.3 Impact de la décompartmentation cellulaire sur la qualité organoleptique des PAI

La rupture des tissus, principalement causée par les étapes de découpe et de broyage, va impacter 3 aspects de la qualité organoleptique : la couleur, la texture et l'arôme. Ces modifications seront principalement dues à l'action des enzymes endogènes du produit qui vont être libérées durant la découpe du fruit ou du légume.

#### 1.3.3.1 Impact sur la couleur du produit

Les principales enzymes responsables de l'altération des couleurs sont la polyphénol oxydase (PPO), la chlorophyllase, la peroxydase (POD), la lipoxygénase (LOX) et l'anthocyanase. Elles créent des changements de couleur au niveau des surfaces coupées, notamment le brunissement oxydatif qui représente un facteur déterminant dans la confection et le stockage des PAI à base de fruits (Brecht, 1995).

Les PPO sont des enzymes à cuivre faisant partie de la famille des oxydoréductases. Elles sont connues pour oxyder les composés phénoliques en pigments marrons au moment de la décompartmentation cellulaire des fruits et légumes. Elles sont la principale cause du brunissement enzymatique des fruits et légumes transformés (Lamikanra, 2002). Elles sont présentes sous deux formes dans la plante, une forme inactive membranaire et une forme active soluble intra cellulaire. La forme inactive est liée à la membrane des thylakoïdes et serait activée par des protéases spécifiques et des activateurs (Ludikhuyze, Van Loey, Indrawati, Smout, & Hendrickx, 2003). Les substrats des PPO sont les monophénols et les dérivés des *o*-hydroxyphénols. Ainsi les PPO sont connues sous différents noms en fonction du substrat qu'elles oxydent, par exemple la tyrosinase oxydent la tyrosine ; la catécholase, le catéchol et la crésolase, le crésol (Terefe, Buckow, & Versteeg, 2014).

Le brunissement enzymatique se fait en 2 étapes (Figure 1). D'abord la PPO utilise l'oxygène pour oxyder les composés phénoliques en *o*-quinones, de couleur jaune. Ces composés n'étant pas stable, les *o*-quinones vont réagir, puis condenser (Guyot, Vercauteren, & Cheynier, 1996). Il va résulter de cette réaction des pigments hétérogènes marron, voire noir, communément

appelés mélanines (Dea, Ghidelli, Pérez-Gago, & Poltto, 2011). Les PPO réalisent ce brunissement à partir de deux types d'activité distincte : monophénolase ou crésolase (de monophénol à *o*-diphénol) et diphénolase ou catécholase (de *o*-diphénol à *o*-quinone). Les deux activités ne sont pas forcément présentes dans toutes les PPO. Par exemple, la tyrosinase présente les deux activités, alors que crésolase et catécholase doivent se succéder pour passer du monophénol à l'*o*-quinone (Yemenicioğlu et al., 2015).

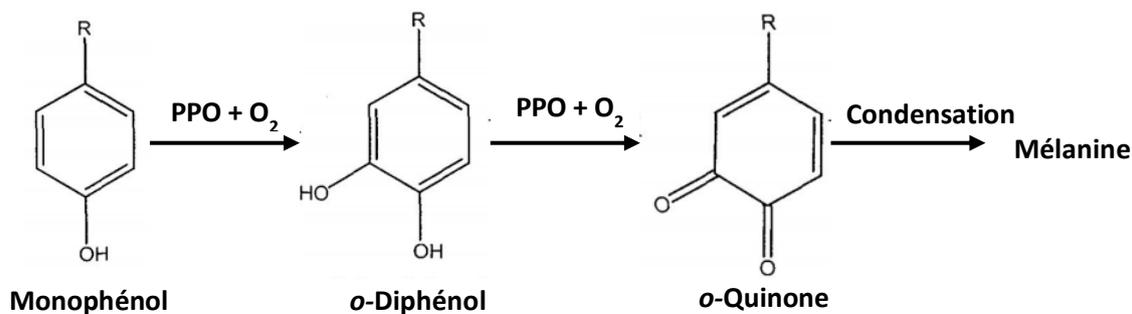


Figure 35 : Réaction enzymatique de brunissement par la PPO

La POD oxyde les composés phénoliques en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduisant à la formation de produits de dégradation marrons. L'eau oxygénée est essentielle à l'activité de la POD mais est normalement en faible concentration dans les plantes ce qui limite son action. Cependant l'activité de la PPO au niveau des tissus lésés va fournir l'eau oxygénée nécessaire au fonctionnement de la POD (Tomás-Barberán & Espín, 2001). Les POD ont une spécificité de substrat très faible ce qui leur permet d'accepter un large panel de substrats que ce soit des acides gras ou des composés phénoliques (Yemenicioğlu et al., 2015).

Le mécanisme de brunissement via la POD est toujours sujet à débat. Pour le moment deux mécanismes ont été proposés, ceux-ci étant étroitement liés à la faible spécificité de la POD. Le premier mécanisme implique la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via la PPO pour ensuite utiliser une activité peroxydasique classique et le second mécanisme implique l'utilisation de quinones comme substrat de la POD. Dans tous les cas, la PPO jouerait un rôle d'activateur de la POD (Lamikanra, 2002 ; Yemenicioğlu et al., 2015).

La phénylalanine ammonia lyase ou PAL n'a pas un rôle direct dans le brunissement enzymatique (Figure 2), mais est l'un des facteurs améliorant l'activité de la PPO et de la POD. L'activité de ces dernières est étroitement liée au métabolisme des phénylpropanoïdes qui fournit les substrats pour l'oxydation. Dans cette voie métabolique l'étape limitante est catalysée par la PAL. Or durant une blessure due à la découpe la production d'éthylène engendrée va augmenter l'activité de la PAL ce qui créera une accumulation de composés phénoliques favorable à l'activation de la PPO et de la POD (Lamikanra, 2002 ; Brecht, 1995).

La lyxogénase ou LOX a une action indirecte sur la coloration des produits. Comme décrit en 1.1.3.2, cette enzyme dégrade les acides gras par oxydation. Ce sont en réalité ses

produits de réaction, les hydroperoxydes et les radicaux libres qui peuvent endommager les pigments de type caroténoïdes (carotènes ou xanthophylles) ou polyphénols (anthocyanes). Lors de la découpe d'un végétal, il peut y avoir une perte de  $\beta$ -carotène et de chlorophylle durant la période d'activité de la LOX ([Yemenicioğlu et al., 2015](#)). En effet, normalement les caroténoïdes sont stables dans leur milieu mais la LOX permettrait une co-oxydation entre les caroténoïdes et les acides gras libres via un mécanisme impliquant des radicaux libres (Terefe et al., 2014).

L'anthocyanase est une  $\beta$ -glucosidase qui va s'attaquer à la partie sucre des anthocyanes, des pigment rouges et bleus présents dans les fruits de type baies. Cette hydrolyse produit alors des composés instables, les anthocyanidines. Cela provoque une sensibilité accrue du pigment au changement de pH ce qui peut faire perdre sa couleur au fruit, mais cela permet aussi à la PPO et à la POD d'utiliser le pigment comme substrat pour le brunissement enzymatique. En effet les sucres jouaient un rôle protecteur vis-à-vis de ces enzymes car ils provoquaient une gêne stérique empêchant d'atteindre les fonctions phénols (Terefe et al., 2014).

La chlorophyllase est une glycoprotéine de l'enveloppe du plastide qui hydrolyse la chlorophylle en chlorophyllide et phytol (Figure 3), la première étape de la dégradation de la chlorophylle. Dans un végétal brut cette enzyme est responsable de l'étape limitante du catabolisme de la chlorophylle. Ce pigment vert est dégradé en un pigment marron olive, la phéophytine (Dorantes-Alvarez & Chiralt, 2000). Ce composé apparait quand la chlorophylle perd sa liaison avec l'ion magnésium et qui est remplacé par un proton (Dea et al., 2011). La voie de dégradation de la chlorophylle n'est pas encore bien caractérisée. Plus de 20 enzymes, dont la chlorophyllase, seraient impliquées dans la cascade réactionnelle de dégradation de la chlorophylle en de nombreux catabolites incolores (Temiz & Ayhan, 2017).

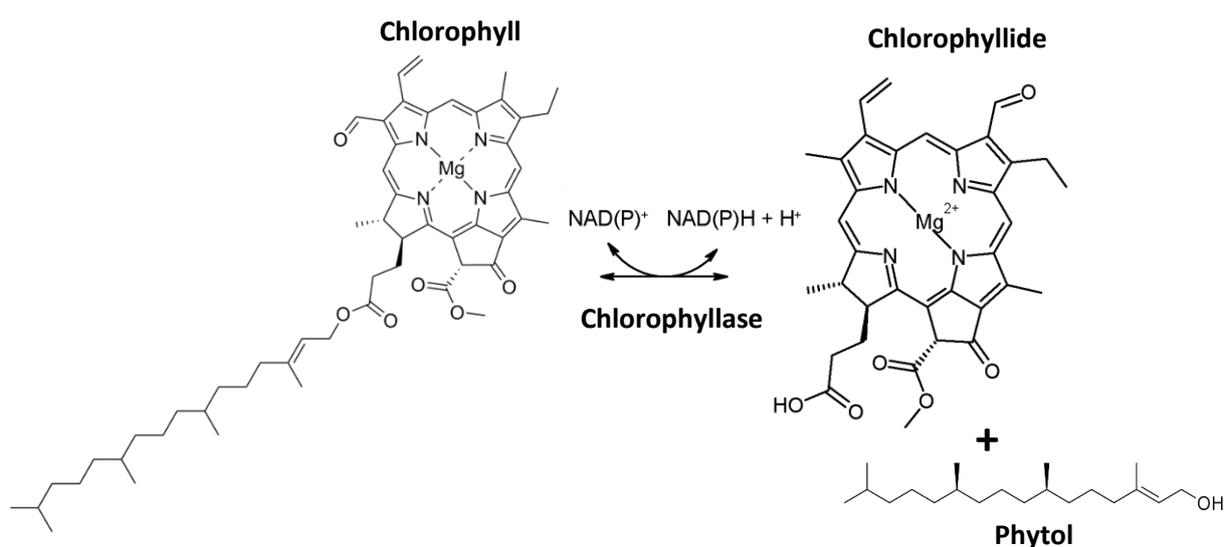


Figure 36 : Réaction catalysée par la chlorophyllase

### 1.3.3.2 Impact sur la texture du produit

Un autre aspect organoleptique modifié par les réactions enzymatiques est la texture, notamment avec les pectinases qui regroupent les trois catégories d'enzyme responsable de la dégradation des pectines à savoir la polygalacturonase (PG), la pectine méthyl estérase (PME) et les pectine (PL) et pectate lyases (PAL). Les PG sont classées en deux sous-groupes : les endo-PG (poly(1,4)- $\alpha$ -D-galacturonide glycanohydrolase) et les exo-PG (poly(1,4)- $\alpha$ -D-galacturonide galacturonohydrolase). Le substrat privilégié des PG est la pectine déméthoxylée par l'action de la PME (Balestrieri, Castaldo, Giovane, Quagliuolo, & Servillo, 1990). Les endo-PG vont rompre la liaison  $\alpha$ -(1-4) entre deux acides galacturoniques (GalA) non méthylés à l'intérieur de la molécule de pectine (Figure 4). Les exo-PG effectuent la même hydrolyse mais à l'extrémité non-réductrice de la molécule libérant les GalA un par un (Warriner & Zivanovic, 2005). En général les deux sous-groupes sont retrouvés dans les fruits en cours de maturation, alors que les endo-PG sont majoritaires dans les fruits mûrs (Lamikanra, 2002). Les PG existent sous plusieurs isoformes avec une spécificité, une activité spécifique, un optimal de pH et une stabilité variable. Deux formes de PG sont trouvées dans la tomate : PG1 et PG2 (Fachin et al., 2002). Dans les poires et les pêches « freestone » les deux activités sont effectivement retrouvées, alors que dans les pommes et les pêches « clingstone » seule l'action endo-PG est retrouvée. Cela se traduit par un ramollissement plus lent durant le mûrissement (Lamikanra, 2002).

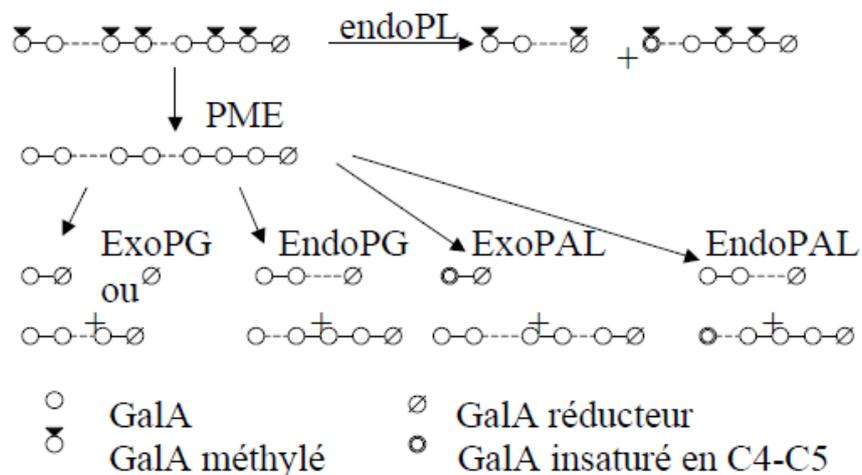


Figure 37 : Action de la PG, PME, PAL et PL sur l'homogalacturonane de la pectine

Les PME sont des estérases qui hydrolysent les unités estérifiées de pectines pour donner du méthanol et de l'acide pectique (Figure 4). Elles n'agissent pas directement la liaison osidique du polymère d'acide galacturonique mais peut altérer la solubilité des pectines. Les PME permettent de préparer le terrain pour l'action des PG. En effet les PG sont peu actives sur les unités galacturoniques estérifiées. (Warriner et Zivanovic, 2005 ; Bonnin, Garnier, & Ralet, 2014)). Dans un tissu végétal intact, les PME sont inactives. Cependant l'endommagement des tissus et l'augmentation de la concentration des cations les rendent actives (Buren, Moyer, & Robinson, 1962).

Les PL et PAL sont des enzymes ayant le même rôle que les PG. Elles vont rompre la liaison  $\alpha$ -(1-4) entre deux acides galacturoniques, mais par trans-élimination et non par hydrolyse (Figure 4). Il en résulte la formation d'une double liaison entre le C4 et le C5. La pectine lyase agissent comme une endoenzyme et agit sur les liaisons glycosidiques proches des groupes carboxyles méthyl-estérifiés alors que la pectate lyase a une activité endo- et exo- sur les liaisons proches des groupes carboxyles non estérifiés. Bien que ces enzymes soient principalement retrouvées dans les microorganismes, certains fruits possèdent des lyases (Warriner et Zivanovic, 2005 ; (Terefe et al., 2014).

### 1.3.3.3 Impact sur l'arôme du produit

Enfin le dernier paramètre organoleptique impacté par les enzymes pendant les procédés de transformation est l'arôme. C'est l'action de la LOX et de l'HPL qui font partie de la voie de la LOX (Figure x (partie 1.1.3.2)) pour la création des C6 et C9. La LOX a des effets désirables comme la création de composés volatiles aux notes fraîches et vertes comme l'hexanal ou le 3Z-hexenal (Rodrigo, Jolie, Van Loey, & Hendrickx, 2006) mais peut aussi avoir un effet délétère sur les arômes notamment durant l'étape de stockage avec la production de mauvais goûts comme l'acide hexanoïque par oxydation de l'hexanal. Durant le stockage de fruits ou légumes congelés les hydroperoxyde créés par la LOX peuvent également se dégrader et produire des composés aux notes d'herbe et de foin (Ludikhuyze, Indrawati, Van den Broeck, Weemaes, & Hendrickx, 1998).

La pyruvate décarboxylase (PDC) catalyse la décarboxylation de l'acide pyruvique en acétaldéhyde qui possède une note âcre. Cet acétaldéhyde peut également être pris en charge par les ADH pour former de l'éthanol, notamment en phase de fermentation. Cette production d'éthanol faciliterait la production d'esters via les AAT (Song, 2010). En effet il a été montré que dans la fraise les PDC et les AAT se développent en simultanément durant le développement du fruit (Aharoni, 2000).

Les ADH sont en effet responsables du passage des molécules de la forme aldéhyde à la forme alcool et inversement. Elles interviendront dans la formation d'alcools mais surtout à la suite de la voie de la LOX qui produit des aldéhydes en C6 et C9. Leurs activités ont surtout été détectées lors de condition de stress comme une forte concentration en CO<sub>2</sub> ou une faible concentration en oxygène (Imahori et al., 2003).

Les AAT réalisent l'estérification entre un alcool et un acyl-CoA. Cette enzyme endogène des plantes est la dernière étape des voies de biosynthèse des esters. L'AAT est largement représenté dans les plantes. Chez *A. thaliana* 88 gènes d'AATs ont été détectés et 40 chez le riz (H. Suzuki, Nishino, & Nakayama, 2007). Les AATs sont entièrement sous le contrôle de la maturation des fruits, son activité est multipliée par 16 entre le stade rose de la fraise et le stade entièrement rouge (Beekwilder, 2004). Dans la fraise, lors de la découpe, elle s'associera avec la voie de la LOX pour former l'hexyl acétate (C. Ubeda et al., 2014).

Les  $\beta$ -glucosidases auront accès à leur substrat via la décompartmentation cellulaire ce qui leur permet de hydrolyser les glycosides présents au niveau de la blessure. Les glucosidases peuvent libérer une gamme très large de composés volatils qui peuvent aussi bien être bénéfiques que délétères.

D'autres enzymes peuvent altérer l'arôme d'un fruit en cours de transformation, mais il s'agit de la formation d'un ou deux composé(s) volatile(s) spécifiques, comme les CCD présentes dans le melon et l'abricot. Après décompartmentation ces enzymes vont attaquer les caroténoïdes pour former des norisoprénoides comme la  $\beta$ -ionone (note florale) ou la damascenone (note boisée) (Ibdah et al., 2006b).

Tous ces effets sont à additionner aux effets des possibles traitements thermiques que vont subir les fruits. Si le récipient de chauffage n'est pas fermé il y aura obligatoirement une perte de composés volatils. Ainsi un jus de pomme pasteurisé à 90°C pendant 30 secondes a vu une perte de 100% d'acide acétique, de 62% d'hexanal, de 67% d'éthyl acétate et de 88% d'éthyl butyrate comparé au jus non traité thermiquement (Aguilar-Rosas, Ballinas-Casarrubias, Nevarez-Moorillon, Martin-Belloso, & Ortega-Rivas, 2007).

### 1.3.4 Utilisation des biotechnologies pour améliorer la qualité organoleptique des PAI

Les étapes de transformation des fruits en PAI apportent leur lot de modifications, très souvent délétères, de la qualité organoleptique avec des changements en termes d'aspect, texture et arôme. Ces changements sont en partie dus à l'augmentation de l'activité enzymatique des produits au niveau des tissus lésés pendant la découpe ou encore le broyage. Ces phénomènes ont inspiré l'industrie agroalimentaire qui a cherché à tirer profit des enzymes exogènes pour améliorer les qualités organoleptiques de leurs produits. Cette partie va traiter de l'utilisation des enzymes de la paroi végétale, pour jouer sur la texture et l'aspect du produit notamment dans l'industrie du jus de fruit, d'enzymes plus spécifiques qui joueront un rôle dans l'arôme du produit. L'utilisation des  $\beta$ -glucosidases sera traitée à part dans la partie suivante.

Les pectinases sont utilisées fréquemment dans l'industrie du jus de fruit comme aide au pressage. Ainsi, elles sont notamment utilisées sur les pommes *Golden Delicious*, réputées pour être difficiles à presser. L'utilisation de pectinases permet d'avoir un rendement d'extraction de jus compris entre 91 et 96% au lieu de 75% avec une extraction traditionnelle sans enzyme. Généralement les pectinases sont ajoutées à la pomme broyée. Le mélange macère ensuite à 30°C entre 15 minutes et 2 heures avant l'extraction du jus par pressage, ce temps dépendant de la nature des enzymes et de la quantité utilisée. Des pectinases commerciales ont été étudiées pour connaître leurs meilleures conditions d'utilisation pour ces deux applications. Deux PG commerciales (PG-Pectinol A1 et PG-Röhpect D5S) ont montré une inactivation au-delà de 50°C. De plus l'inactivation se ferait en deux phases à cause de la présence à la fois d'une fraction

thermolabile et d'une fraction thermostable. Ce qui n'est pas le cas pour la PL-Röhapect D5S qui subit également une inactivation au-delà de 50°C mais en une seule phase (L. Ceci & Lozano, 1998). Ainsi leur utilisation est recommandée entre 30°C et 50°C. Le pH des pectinases Röhapect D5S a également été étudié. Il s'avère que la PG et la PME ont le même profil avec un maximum d'activité à pH 4,6 avec une chute brutale de l'activité à partir de pH 5. Pour la PL l'optimum de pH est compris entre 5 et 6. Cela leur assure une relativement bonne activité dans la grande majorité des fruits (L. Ceci & Lozano, 1998).

Un autre procédé dans lequel les pectinases interviennent est la clarification des jus de fruits. Ce procédé consiste en une dégradation de la pectine par l'action des PG et PME. Ces enzymes sont parfois remplacées par des PL pour limiter la production de méthanol (Yadav, Yadav, Yadav, & Yadav, 2009). La dégradation des pectines va soit les rendre solubles, soit les condenser en fonction du pH du milieu (Denès, Baron, Renard, Péan, & Drilleau, 2000). Bien que traditionnellement les pectinases endogènes peuvent agir seule sur le nuage, l'ajout d'une préparation commerciale de pectinase peut diminuer le temps de clarification de plus de 8 heures. C'est le cas pour le jus de citron clarifié (Uçan, Akyildiz, & Ağçam, 2014). Cependant, ce jus ayant un pH inférieur à 2, les mélanges classiques de pectinases ne fonctionnent pas efficacement dans ce milieu. L'amélioration de ces enzymes par Novozyme a permis de créer un mélange de pectinases adaptés (Citrozym Ultra L) dont les spécifications indiquent un maximum d'activité sur un jus à 25-30°C pour un pH compris entre 1,8 et 2,2 ; sur un jus à 30-35°C pour un pH compris entre 2,2 et 2,6 et sur un jus à 35-40°C pour un pH compris entre 2,6 et 3,0 (Cautela, Castaldo, Servillo, & Giovane, 2010).

Une variante de la clarification par dépectinisation existe : la défécation. Cette technique n'est appliquée qu'à la fabrication du cidre. Elle se base sur la gélification de la pectine et non la dépectinisation comme la clarification des jus de fruits (Pollard & Kieser, 1959). Elle se fait via les PME qui augmentent les charges négatives de la pectine en la déméthylant. Cette dernière est donc plus sensible à la présence de cation bivalent comme l'ion calcium. La pectine va alors gélifier et remonter à la surface du liquide. Le gel de pectines est ensuite éliminé par soutirage. Cette clarification particulière a un deuxième avantage qui explique pourquoi elle est utilisée dans la confection du cidre après le début de la fermentation. Lors de la polymérisation, les pectines emprisonnent les levures présentes dans le milieu (Kashyap, Vohra, Chopra, & Tewari, 2001). Cela permet de réduire la vitesse de fermentation d'environ 50% et, ainsi, de réduire l'activité fermentaire donnant une meilleure stabilité post-fermentaire au cidre.

Les pectinases peuvent également être couplées à une amylase dans les fruits riches en amidon comme la pomme pour éviter la gélification durant les procédés thermiques appliqués au jus, comme la pasteurisation. Cette gélification survient quand les granules d'amidon ne sont pas complètement déstructurés, durant un traitement avec chauffe l'amidon est partiellement attaqué et rétrograde en cristallisant (Zobel, 1984). Deux enzymes commerciales ont été testées sur du jus de pomme : la Rohalase HT (AB Enzymes GmbH) et la Tyazyme L300 (Solvay Enzimas). Même avec

de faible concentration (Tyazyme à 10  $\mu\text{L/L}$  et Rohalase à 25  $\text{mg/L}$ ) en dessous des concentrations recommandées, à 50°C et après 30 min de macération l'amidon a complètement été digéré (Carrín, 2004). De plus ces enzymes commencent à s'inactiver à partir de 60°C et s'élimineront donc facilement durant la pasteurisation (Ceci & Lozano, 2002).

Les pectinases peuvent également être couplées à d'autres enzymes comme les cellulases pour faciliter la liquéfaction totale initiée par les pectinases avec une dégradation simultanée de la pectine et de la cellulose et aussi pour améliorer, pendant l'extraction, la libération des pigments piégés dans la peau des fruits comme les anthocyanes dans le raisin rouge (Maier, Göppert, Kammerer, Schieber, & Carle, 2008). Les pectinases, les cellulases et les hémicellulases, enzymes de la paroi végétale sont couramment utilisées dans l'industrie du jus de fruit avec différentes actions sur les qualités organoleptiques du produit (Will, Bauckhage, & Dietrich, 2000). Leurs activités, qui permettent de déstructurer le fruit et qui sont à éviter pour la fabrication de purée ou de morceaux de fruits, se révèlent extrêmement utiles dans le cadre de l'industrie du jus de fruit. Bien que non autorisée en Europe ("COUNCIL DIRECTIVE 2001/112/EC," 2001), la liquéfaction enzymatique est une technique couramment utilisée dans les autres pays pour obtenir des jus de fruit de qualité.

Une utilisation particulière de la PME sur les cubes de fruits a été étudiée. En effet associée à une solution de calcium la PME peut améliorer la texture des cubes de fruits. Après imprégnation sous-vide de l'enzyme et de la solution de chlorure de calcium, l'enzyme déméthyle la pectine qui devient plus sensible aux interactions avec les ions calcium chélatant les brins de pectines. Lors de la chélation la pectine adoptera une structure en « boîte d'œufs » qui aura comme conséquence d'augmenter la dureté du cube de fruit, comme pour les fraises (Van Buggenhout et al., 2006). Lors d'une étude, des cubes de mangues fraîches ont subi l'imprégnation sous-vide d'une solution à 0,001 UE/mL d'une PME d'*A. aculeatus* commerciale (Novozymes) et à 10 g/L de chlorure de sodium, avec une mise au vide de 10 min à 10 kPa (90% de vide) puis une remontée à pression atmosphérique en 1 min. La dureté des cubes a été mesurée et ils ont subi une augmentation de 35% de la dureté, passant de 52 N pour le contrôle à 70 N pour les cubes traités (Sirijariyawat, Charoenrein, & Barrett, 2012).

L'utilisation de pectinases doit cependant être maîtriser. Les pectinases issus de cultures de levure peuvent contenir une activité cinnamyl estérase responsable de la production mauvais goûts dans le vin avec le 4-vinylphenol et le 4-vinylguaiacol aux notes phénoliques et médicales si elles sont présentes à forte concentration (Suárez, Suárez-Lepe, Morata, & Calderón, 2007).

D'autres enzymes sont utilisées de manières plus ponctuelles pour empêcher l'apparition de mauvais goûts ou au contraire améliorer l'aspect aromatique d'un produit à base de fruit. Par exemple, la naringinase hydrolyse la naringine responsable de l'amertume dans les jus des fruits verts (Thomas, Smythe, & Labbee, 1958). Les lysosymes permettent également d'annuler ou de limiter la fermentation malolactique responsable de mauvais goûts dans le vin grâce à leur action

de stabilisation microbienne. Les glucanases peuvent également être utilisées pour la maturation du vin avec élimination des glucanes pour rendre l'action des bentonites possible et pour lyser les levures ce qui va libérer le contenu des cellules avec leurs arômes.

### 1.3.5 Utilisation des glycosidases en agroalimentaire

La possible application des glucosidases sur des fruits a déjà été étudiée. Des chercheurs ont testé la  $\beta$ -glucosidase 35M5N de *Candida moloschiana* sur des jus de fruits (pêche, raisin, pomme, papaye, cerise, orange, fraise, mangue, kiwi et fruit de la passion) (Gueguen, Chemardin, Janbon, Arnaud, & Galzy, 1996). Après immobilisation de l'enzyme, ils ont augmenté, sur le jus de fraise, la teneur en linalool, alcool benzylique et 2-phényléthanol de 670  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 180  $\mu\text{g}/\text{kg}$  et 770  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de jus, respectivement. Grâce à leur seuil de détection bas le linalool (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) et le 2-phényléthanol (0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) auront un impact certain sur l'arôme du jus de fraise en réhaussant sa note florale. Bien qu'il ait été augmenté l'alcool benzylique a un seuil de détection de 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  qui est plus de 5 fois supérieur à la quantité libérée.

Cependant les glycosidases sont déjà utilisées dans l'agroalimentaire principalement pour l'amélioration des arômes du vin. En effet plus de 800 composés volatiles ont été identifiés dans le vin. Parmi eux il y a ceux provenant du fruit initial, les composés aromatiques variétaux, dont certains sont présents sous forme de glycosides. Ces glycoconjugués ont été identifiés pour la première fois dans le Muscat d'Alexandrie en 1984 par (Bayonove, Günata, & Cordonnier, 1984). Ces réserves sont importantes au point de parfois dépasser largement la quantité libre dans le fruit. Dans le *Vitis vinifera* les aglycones sont principalement liés à des disaccharides, c'est-à-dire à un glucose lui-même relié à un autre sucre, rhamnose, arabinose ou apiose (Mateo & Di Stefano, 1997). Comme vu précédemment, cela va impliquer l'utilisation de plusieurs exo-glycosidases pour une libération en séquentiel de l'aglycone.

Les raisins contiennent des glycosidases qui seraient capables d'hydrolyser ces glycoconjugués. Cependant leur optimum de pH (pH 5) n'est pas adapté au milieu durant la vinification (pH 3-4). Il en va de même avec *S. cerevisiae* qui produit également des glycosidases avec un optimum de pH à 5 (Hernandez, 2003). De plus, la présence d'éthanol inhibe fortement les glycosidases venant de ces deux sources (Pogorzelski & Wilkowska, 2007). A cause de ces limitations la majeure partie des glycosides sont encore présents dans le jeune vin. La réponse apportée par les industriels est l'utilisation d'une préparation commerciale de glycosidase d'*A.niger* (Rapidase AR2000). Cette préparation contient des activités glucosidase, rhamnosidase, apiosidase et arabinosidase (Pogorzelski & Wilkowska, 2007). Cependant les glycosidases fongiques sont assez sensibles aux sucres, elles sont donc utilisées à la dernière étape de la vinification. Au bout d'un à quatre mois d'action, les enzymes sont éliminées par ajout de bentonite.

Dans le vin la partie aglycone libérée est souvent un terpène, un norisoprénoïde, un dérivé phénolique ou un alcool aliphatique. Ainsi lorsque (Hampel et al., 2014) ont utilisé de la Rapidase AR 2000 sur du Cabernet et sur du Cabernet Sauvignon, ils ont pu observer une augmentation de plusieurs molécules notamment de 3-méthyl-1-butanol, de 1-hexanol, de 1-heptanol, de 2-phényléthanol ou encore de  $\beta$ -damascenone. Palomo, Hidalgo, Gonzalezvinas, & Perezcoello (2005) observent des libérations de benzyle alcool et de 4-vinylguaiacol avec du Chardonnay, du Macabeo et de l'Airén.

L'action de la Rapidase AR2000 peut s'avérer négative, due à sa forte activité pectinase et sa capacité à déglycosyler les anthocyanes du vin rouge ce qui les rend instable et peut donc affecter la couleur du produit. En cherchant à comprendre ces mécanismes délétères, il a été découvert que les activités de deux glucosidases isolées d'*A.Niger* n'ont pas du tout les mêmes cibles (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998). La première agit quasi exclusivement sur les glycosides d'arôme et a une action très lente sur la malvidin-3-glucoside, l'anthocyane principale du raisin rouge ; la seconde est une anthocyanase spécifique des anthocyanidin-3-glucosides.

L'activité pectinase des préparations commerciales de glucosidases est un réel problème pour une application sur une autre matrice qu'un jus, sans compter l'anthocyanase qui peut altérer la couleur du produit. Ainsi, si on souhaite exploiter la réserve de glycoside des fruits durant leur transformation en PAI, il sera nécessaire de mettre au point de nouvelle préparation de glucosidases sans action parasite.



# Chapitre 2

---

## Problématique et démarche expérimentale

---

L'objectif du projet de thèse est de présenter un procédé adapté à la transformation de la fraise et de l'abricot permettant d'obtenir un produit fini avec un arôme amélioré par voie enzymatique sans bouleverser les procédés en place. Pour atteindre cet objectif plusieurs questions se posent. **Pourra-t-on utiliser cette méthode pour toutes les variétés d'abricots et de fraises ? Quelle(s) glycosidase(s) choisir pour avoir une activité optimale dans le milieu fruit ? Comment intégrer la réaction enzymatique dans les procédés de transformation des industriels ?** Toutes ces questions amènent une réflexion et une étude autour de trois grands axes : un axe biologique, un axe biotechnologique et un axe technologique.

### 2.1 Axe biologique : Caractérisation de la réserve glycosidique dans la fraise et l'abricot

Cette partie consiste en une caractérisation de la réserve aromatique des fraises et abricots.

**Comment les arômes et la réserve glycosidique peuvent être identifiés, quantifiés et comparés de manière efficace ?** Pour caractériser les arômes libres et la réserve des fruits à disposition il faut une méthode fiable. Dans la littérature, une méthode de référence se démarque pour l'analyse des glycosides. Elle consiste en une extraction en phase solide (SPE) dépendant de l'affinité pour isoler les glycosides avant de leur faire subir une hydrolyse pour finir par une analyse des composés volatils libérés lors du processus (Roscher, Herderich, Steffen, Schreier, & Schwab, 1996; Ubeda et al., 2012; Young & Paterson, 1995). Cette méthode est très performante pour caractériser de manière qualitative la réserve. Cependant, l'existence d'une étape de purification par affinité avec la colonne de SPE, généralement une C18, empêche de faire la comparaison avec les arômes libres initialement présent dans le fruit (Hampel, Robinson, Johnson, & Ebeler, 2014). La mise au point d'une nouvelle méthode a été nécessaire pour quantifier avec un minimum de biais la réserve et en même temps la comparer aux composés volatils initiaux. Pour ces raisons,

une méthode d'analyse de la réserve aromatique par hydrolyse enzymatique directe a été mise au point. La répétabilité de cette méthode d'analyse par GC-MS a été testée. Le solvant d'extraction a également été optimisé pour l'extraction du furanéol. L'impact exhausteur du NaCl et l'impact de la durée entre la préparation de l'échantillon et l'extraction ont également été étudiés. Pour compléter cette analyse un contrôle par HPLC permet d'observer la diminution du glycoside de furanéol et l'apparition du furanéol et ainsi de vérifier l'avancement de la réaction en milieu fruit.

**Les réserves glycosidiques sont-elles dans toutes les variétés fraises et tous les abricots ? Y a-t-il une différence dans les profils des arômes et de la réserve glycosidique entre les fraises de bouche et les fraises à destination de la transformation industrielle ?** La littérature assure que la part de réserve dans les fruits est bien supérieure à celle des composés volatils libres (cf. partie II.2.2), même si cette estimation pourrait être un biais de la méthode d'analyse utilisée (Hampel et al., 2014). Cependant les industriels travaillent avec différentes variétés et même le plus souvent avec des mélanges de 3 à 4 variétés dont une majoritaire. Les proportions qui composent ces mélanges peuvent varier au cours des différentes années voire même au cours d'une même saison. Il faut alors s'assurer que les industriels puissent appliquer la libération d'arôme avec la même efficacité d'une année sur l'autre. Pour ce faire 14 échantillons de fraises ont été caractérisées, 5 venant du CIREF (Centre Interrégional de Recherche et d'Expérimentation de la Fraise) ('*Gariguette*', '*Charlotte*', '*CIR121*', 2 '*Clery*' (plein champ et hors-sol)) et 9 variétés/mélanges utilisés par les industriels ('*Darselect*', '*Clery*', '*Honey*', '*Honeoye*', '*Siabel*', '*FCMO060*', '*Fraise19*', 2 '*Senga Sangana*' (une de Bulgarie et une de Pologne)). La nouvelle méthode d'analyse mise au point durant la thèse a été utilisée pour comparer les composés volatils et la réserve glycosidique de ces différents échantillons. Des abricots destinés à une utilisation industrielle ont été caractérisés.

## 2.2 Axe biotechnologique : Développement de glycosidases adaptées à une application sur fruits

Cette partie a été consacrée à tester et caractériser les enzymes produites par la société Protéus. Dans le cadre de la thèse, seules les glycosidases ont été étudiées de manière approfondie.

**Quelle(s) enzyme(s) parente(s) choisir pour réaliser l'évolution dirigée des glycosidases ? Comment choisir la(les) meilleure(s) enzyme(s) modifiée(s) ?** Protéus a fourni des parents potentiels pour l'évolution dirigée par L-Shuffling<sup>TM</sup>. Ces enzymes ont été testées en milieu modèle simple et complexe, en parallèle d'une enzyme commerciale de référence (AR2000), pour déterminer les plus performantes et désigner les meilleures candidates pour l'évolution dirigée. L'activité sur substrat modèle, la température optimale, le pH de fonctionnement, l'inhibition par les sucres et l'activité sur extrait de glycosides ont été mesurés. Il s'en est suivi un test sur purée de fraises des meilleures enzymes pour vérifier qu'elles soient effectivement actives en milieu fruit. La

société Protéus a alors réalisé le L-Shuffling™ pour améliorer l'activité de ces enzymes notamment en termes de pH optimal d'activité et d'inhibition produit par les sucres (cf partie II.2.4). Après un criblage haut débit permettant une pré-sélection des mutants intéressants, une sélection en entonnoir a été effectuée pour sélectionner l'(les) enzyme(s) à utiliser pour l'optimisation sur procédé (Figure 38). La première étape est une sélection sur modèle simple avec test d'activité sur substrat modèle, inhibition par les sucres et les profils pH et température. Il s'en suit l'étape de sélection sur milieu modèle complexe avec un test d'activité sur extrait de glycosides de fraise et un test de sélectivité par rapport à l'aglycone à partir d'un mélange de glycoconjugués caractéristiques. Pour finir un dernier test est réalisé pour vérifier que les enzymes sélectionnées soient toujours actives lors de l'application sur matrice.

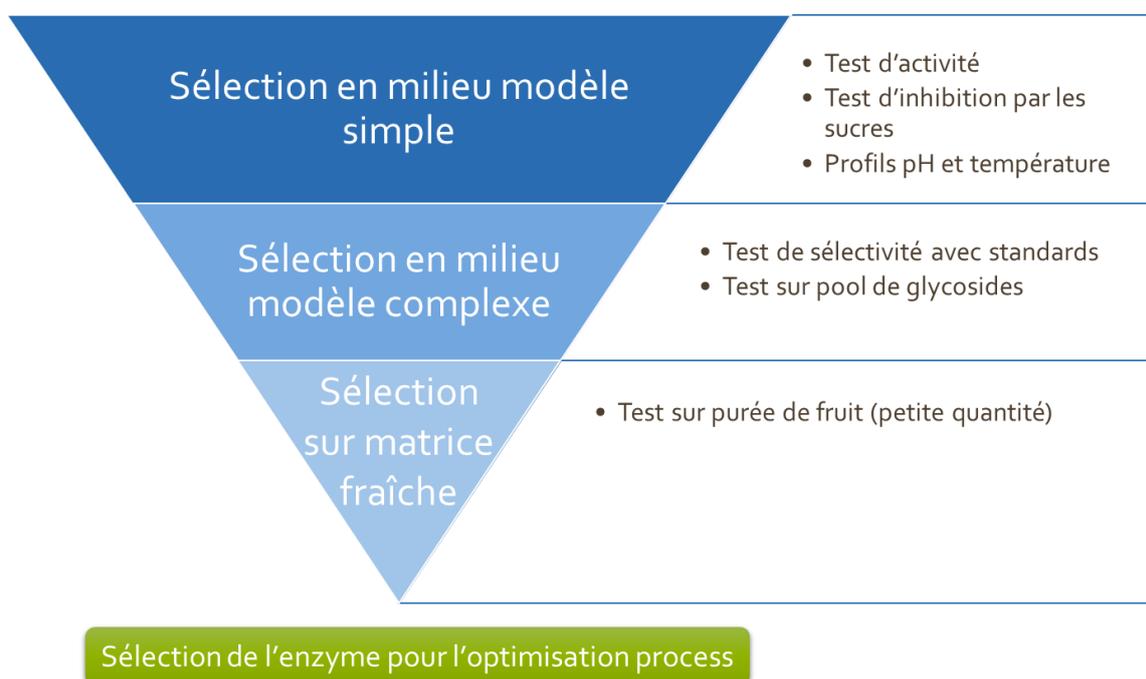


Figure 38 : Organigramme de la méthode de sélection des meilleures enzymes mutantes

Pourrait-on prédire l'activité des glycosidases étudiées en fonction des divers paramètres physico-chimique d'une matrice ? Dans le cadre du projet Natarôme+ les glycosidases ont été utilisées sur d'autres fruits comme les citrons, les cerises ou encore les figues, sans compter que d'autres produits peuvent être envisagés, comme les légumes. Il peut donc être avantageux de pouvoir prévoir, en partie, leur comportement lors d'un changement de produit à traiter. C'est dans cette optique que la modélisation des activités des enzymes étudiées a été réalisée à l'aide du logiciel R afin de créer un outil prédictif permettant d'appréhender l'évolution de l'activité enzymatique en fonction de la température, du pH et de la concentration en sucres. Deux plans d'expériences de type composite ont été réalisés. Le premier porte sur l'interaction du Brix, du pH et de la température, le second sur l'interaction entre la concentration en fructose, glucose et saccharose, les principaux sucres dans les fruits. La résolution des modèles a ensuite permis d'obtenir des représentations graphiques de l'activité.

## 2.3 Axe technologique : Intégration des enzymes optimisées dans les procédés de transformations

Cette partie aborde l'intégration des enzymes dans les procédés de transformations de fraises et l'optimisation de ce dernier. Plusieurs des points prévus ont dû être adaptés suite à des résultats imprévus.

**Quel produits finis veulent les industriels ? Quelle forme le fruit doit-il avoir dans ces produits finis ? Comment assurer une mise en contact optimale entre l'enzyme ajoutée et son substrat dans le fruit ?** Le projet Natarôme+ compte trois partenaires, utilisateurs de préparation de fruits : l'aromaticien Jean Niel, le confiturier Agro'Novae et le yaourtier Sénagral. Chacun de ces partenaires utilise les fruits sous une forme différente. Jean Niel a besoin de jus aromatique, Agro'Novae, d'une purée grossière et de fruits entiers et Sénagral, d'une purée et de cubes de fruit. Chacune de ces formes implique des phénomènes de diffusion différents qui joueront sur la qualité de la mise en contact du substrat et de l'enzyme. Il était prévu d'étudier les fraises sous forme de jus, de purée et de cubes. Les cubes sont les plus difficiles à exploiter pour plusieurs raisons. Tout d'abord l'enzyme doit pénétrer à l'intérieur du cube alors que le traitement enzymatique sera au maximum de 1% (g:g) de solution enzymatique ce qui pose le problème de l'homogénéisation de l'enzyme dans un batch et de la diffusion de l'enzyme au cœur d'un cube. La seconde raison est l'exigence du maintien de la texture des cubes malgré l'incubation pour la réaction enzymatique (temps, température, agitation).

Pour concilier ces divers points l'imprégnation sous-vide a été explorée. Une étude par étape a été envisagée (Figure 39). La première étape consiste en une recherche des paramètres optimaux pour imprégner à cœur un colorant alimentaire (faible poids moléculaire) à l'intérieur de cubes de pomme. Une fois ces paramètres obtenus, ils ont été adaptés pour l'imprégnation d'un colorant protéique qui a un poids moléculaire proche des glycosidases étudiées durant la thèse. Et pour finir il était prévu que les paramètres soient réajustés pour l'imprégnation des enzymes afin de s'assurer de leur fonctionnalité après le traitement d'imprégnation. Cette dernière étape n'a cependant pas pu être effectuée à cause de l'absence de déglycosylation lors de l'utilisation des enzymes sur des purées de fruit dans les conditions utilisées à l'échelle pilote de laboratoire. Ces dernières devront être réajustées avant de pouvoir continuer les essais.

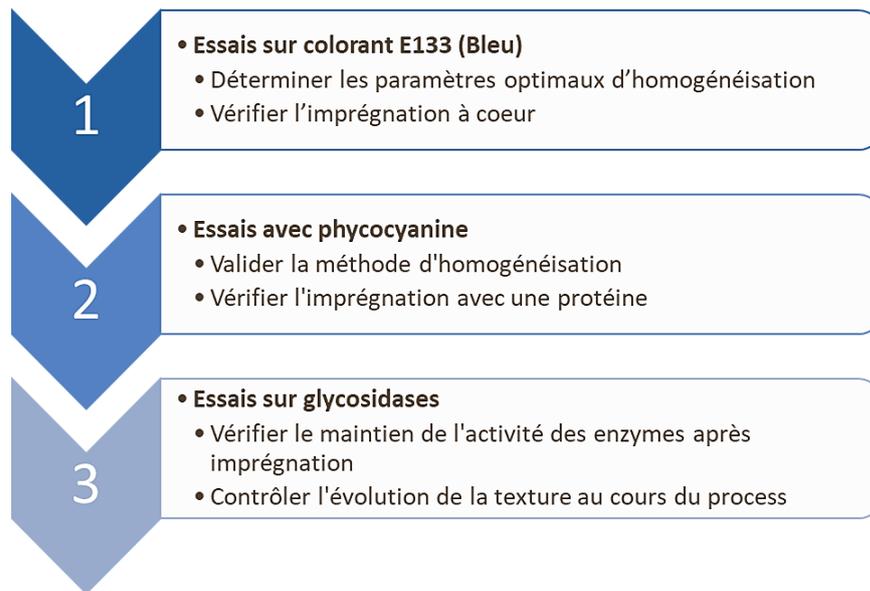


Figure 39 : Organigramme de l'étude de l'imprégnation sous-vide des enzymes dans des cubes de fruits

Combien de temps une cuve peut être allouée pour un lot de préparation de fruit ? Quelle température est la plus adaptée pour l'incubation ? Quelle quantité d'enzyme ajouter au procédé ? Quel est le meilleur compromis temps/quantité d'enzyme ? Une optimisation en termes de temps, température, quantité d'enzyme pour l'incubation était prévue. Cette optimisation devait tenir compte à la fois des besoins biochimiques de l'enzyme mais également des contraintes liées aux procédés déjà existant chez les industriels. Une fois celle-ci achevée sur la fraise, le procédé final aurait été testé et ajusté, le cas échéant, sur l'abricot.

Cette approche a dû être avortée suite à l'absence de déglycosylation lors des premiers essais à l'échelle pilote de laboratoire. Pour comprendre les raisons de ce dysfonctionnement plusieurs essais (quantité d'enzyme, pH de la matrice, traitements pré-transformation (lavage chloré, blanchiment)) ont été tentés, sans résultat concluant. Des cinétiques enzymatiques effectuées sur purée de fraises ont permis de mieux cerner l'origine du problème.



# Chapitre 3

---

## Matériels et méthodes

---

### 3.1 Réactifs et solvants

L'acétone (pureté :  $\geq 98\%$ ), l'hexane (pureté :  $\geq 98\%$ ), le dichlorométhane (pureté :  $\geq 99.9\%$ ), le pentane (pureté :  $\geq 99.9\%$ ), l'acétonitrile (pureté :  $\geq 99.9\%$ ), le méthanol (pureté :  $\geq 99.9\%$ ) et l'acétate d'éthyle (pureté :  $\geq 99.9\%$ ) proviennent de VWR International (Darmstadt, Allemagne). Les standards de 4-nonanol (pureté :  $\geq 97\%$ ), de furanéol (pureté :  $\geq 99\%$ ), l'acide formique (pureté :  $\geq 97\%$ ), le phosphate dibasique de sodium (pureté :  $\geq 98,5\%$ ), l'acide citrique monohydrate (pureté :  $\geq 98,5\%$ ), le carbonate de sodium (pureté :  $\geq 98,5\%$ ), le *p*-nitrophénol (*p*-NP) (pureté :  $\geq 99.0\%$ ), le  $\beta$ -D-glucoside de *p*-nitrophénol (glucoside de *p*-NP) (pureté :  $\geq 98,5\%$ ), le 4-pentèn-1-ol (pureté :  $\geq 99.0\%$ ), le  $\beta$ -D-glucoside de 4-pentèn-1-ol, le 1-hexanol (pureté :  $\geq 99.9\%$ ), le  $\beta$ -D-glucoside de 1-hexanol (pureté :  $\geq 98.0\%$ ), le phénol (pureté :  $\geq 99.0\%$ ), le  $\beta$ -D-glucoside de phénol (pureté :  $\geq 98,5\%$ ), le 1-dodecanol (pureté :  $\geq 98.0\%$ ), le  $\beta$ -D-glucopyranoside de 1-dodecanol (pureté :  $\geq 98.0\%$ ), le saccharose (pureté :  $\geq 98,5\%$ ), le fructose (pureté :  $\geq 98,5\%$ ), le glucose (pureté :  $\geq 98,5\%$ ) et la polyvinylpyrrolidone (PVPP) proviennent de Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne). Le  $\beta$ -D-glucoside de furanéol (Pureté :  $> 95\%$ ) provient d'Azur Isotopes SAS (Marseille, France). Les kits enzymatiques pour mesurer le glucose/fructose/saccharose (réf : K-SUFRG), l'acide L-malique (réf : K-LMAL) et l'acide L-citrique (réf : K-CITR) proviennent de Megazyme (Wicklow, Irlande). L'Hydromatrix™ (terre de Diatomées) provient d'Agilent Technologies (Les Ulis, France). La solution d'alcane saturés C7-C30 (1 g/L, réf : 49451-U) et la résine d'extraction XAD-2 proviennent de Supelco (Bellefonte, Pennsylvanie, USA). L'enzyme de référence AR2000 vient d'Oenobrand (Montferrier sur Lez, France), fournie en poudre lyophilysée (6.17 nkat/mg de poudre ; 85 mg de protéine/g de poudre). Le colorant bleu brillant FCF (E133) est fabriqué par la marque Vahiné, McCormick (Avignon, France). L'extrait de spiruline dosé en phycocyanine à 4 mg/mL (PhycoSaAN) provient de Flamant Vert (Bourges, France). L'eau de Javel à 9,6% de chlore actif vient de La Bovida (Marseille, France)

## 3.2 Matériel végétal

### 3.2.1 Fraises

Les fraises (*Fragaria x ananassa*) des variétés *Siabel*, *Clery*, *Honey*, *Honeoye*, *Senga Sangana* (Pologne et Bulgarie) et *Darselect*, récoltées en 2015, et les fraises *Mibao* et *Camarosa*, récoltées en 2017, sont des échantillons commerciaux pour la transformation en industrie. Elles ont directement été surgelées (IQF) et stocké à -20°C. La FCMO060 et la Fraise19 sont des mélanges de variétés utilisés, avec majoritairement de la *Camarosa*, par les industriels partenaires du projet Natarôme+. Elles ont été récoltées en 2015 et 2017, directement surgelées (IQF) et stocké à -20°C.

Les variétés Gariguette, Charlotte, Clery hors-sol (HS), Clery plein champ (PC) et CIR121 à destination du marché frais ont été récoltées en 2016 au Centre interrégional de recherche et d'expérimentation sur la fraise (CIREF), puis stockées à -20 °C.

### 3.2.2 Abricots

Les abricots (*Prunus armeniaca* L.) des variétés Bebeco et Canino proviennent des industriels partenaires du projet Natarôme+. Ils ont été récoltés en 2015, directement surgelées (IQF) et stockés à -20°C.

## 3.3 Glucosidases

E1487 (P1), E3923 (P2), E3936 (P3), E3973 (P4), E4078 (P5), E4079 (P5), E4103 (P7), E4177 (F1), E4179 (F2), E4180 (F3), E4181 (F4) et E4192 (F5) ont été produites par Protéus (Nîmes, France) et fournie en surnageant de culture. Les spécifications de ces enzymes sont décrites dans le Tableau VII.

Tableau VII: Spécification des glucosidases utilisées durant la thèse

Enzymes	Activité* (nkat/mL de solution ou mg de poudre)	Concentration en protéine (mg/ mL de solution ou g de poudre)	Vecteur d'expression
AR2000	6.17	85	<i>A.niger</i>
E4178	1.44	35.0	<i>E.coli</i>
E3923	1.28	6.30	<i>E.coli</i>
E3936	2.32	6.70	<i>E.coli</i>
E3973	1330	5.30	<i>E.coli</i>
E4078	31.2	5.47	<i>Y.lipolytica</i>
E4079	30.8	5.48	<i>Y.lipolytica</i>
E4103**	533	4.65	<i>Y.lipolytica</i>
E4177	450	4.41	<i>Y.lipolytica</i>
E4179	37.5	1.62	<i>Y.lipolytica</i>
E4180	62.3	1.70	<i>Y.lipolytica</i>
E4181	44.0	1.50	<i>Y.lipolytica</i>
E4192	159	9.71	<i>Y.lipolytica</i>

\*mesuré sur du glucoside de *p*-NP à pH 5 et à 50°C, \*\*Re-expression de E3973 dans *Y.lipolytica* (vecteur GRAS)

## 3.4 Caractérisation des glucosidases

### 3.4.1 Activité sur glucoside de *p*-NP

Après incubation (comme décrit en partie 3.4.3), les activités enzymatiques, mesurées à partir du *p*-NP, sont analysées par spectrophotométrie avec un lecteur de microplaque UV-visible thermostaté avec auto-injecteurs intégrés SAFAS (Safas, Monaco). Lorsque le pH du milieu où se trouve le *p*-NP devient alcalin (pH > 9) le composé prend une couleur jaune dont l'absorbance peut être mesurée à 420 nm. Une gamme étalon de ce composé a été réalisée (Figure 40), donnant l'équation :  $Abs(420nm) = 4,268 * [p\text{-NP} (\mu M)]$  avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9984$ .

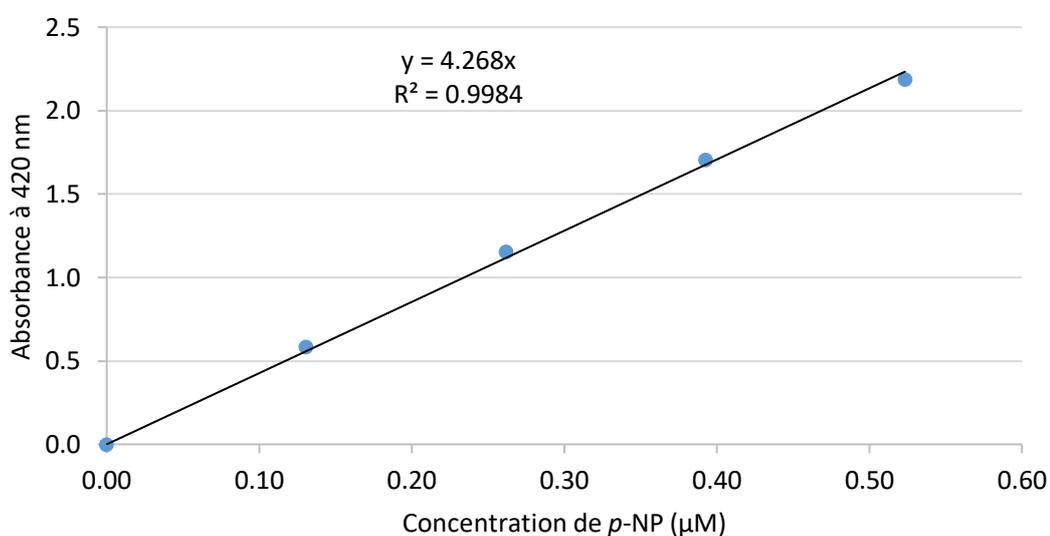


Figure 40 : Gamme étalon de *p*-NP à 420 nm

### 3.4.2 Activité sur glucoside de furanéol

Dans un flacon en verre l'enzyme est ajoutée à hauteur de 0,34 mg (enzymes parent) ou 16,7  $\mu$ kat (mesurée sur glucoside de *p*-NP à pH 5 et à 50°C). Ce volume est complété à 1 mL avec du tampon phosphate-citrate pH 3,6 (0,2M). Ce mélange est incubé 5 min à 30°C dans un bain marie agitant Julabo SW23 (Julabo GmbH, Seelbach, Allemagne). Pour obtenir un volume réactionnel final de 3 mL, 2 mL d'une solution de glucoside de furanéol à 86,2  $\mu$ M dans du tampon phosphate-citrate pH 3,6 (0,2M), préalablement incubée 5 min à 30°C dans un bain marie. Le milieu réactionnel a ensuite été incubé sous agitation (100 rpm) 16 min à 30°C dans un bain marie. Après l'incubation, 500  $\mu$ L du milieu réactionnel sont prélevés et ajoutés à 500  $\mu$ L de carbonate de sodium à 2 M à 4 °C dans un flacon pour HPLC pour arrêter la réaction. Puis les échantillons ont été analysés par HPLC. Les incubations ont été triplées.

### 3.4.3 Etude de l'inhibition par les sucres

Dans une microplaque 96 puits, les enzymes parents (0,34 mg) ou les enzymes filles ( 3,08 nkat mesuré sur glucoside de *p*-NP à pH 5 et à 50°C) sont diluées dans du tampon phosphate-citrate pH 3,6 (0,2 M) avec ou sans sucres (18 g/L de fructose, 16 g/L de glucose and 11 g/L de saccharose) pour un volume final de 160  $\mu$ L. La microplaque est mise dans un lecteur de microplaque UV-visible thermostaté avec auto-injecteur intégré SAFAS (Safas, Monaco). L'auto-injecteur ajoute 40  $\mu$ L d'une solution de glucoside de *p*-NP à 3 mM dans du tampon phosphate-citrate pH 3,6 (0,2 M) avec ou sans sucres (18 g/L de fructose, 16 g/L de glucose and 11 g/L de saccharose) pour un volume réactionnel final de 200  $\mu$ L. Le milieu réactionnel est ensuite incubé pendant 16 min, à 37°C avec une agitation de 30 rpm. Après l'incubation, l'auto-injecteur ajoute 100  $\mu$ L d'une solution de carbonate de sodium à 3 M pour stopper la réaction et révéler la couleur jaune du *p*-NP en alcalinisant le milieu réactionnel. L'absorbance du *p*-NP est mesuré à 420 nm. La perte d'activité est calculée par différence de l'activité en absence et en présence de sucres.

Les expériences ont été réalisées en triple.

### 3.4.4 Profil de pH

Ces expériences sont réalisées comme décrit dans la partie IV.4.1, avec différentes valeurs de pH pour le tampon phosphate-citrate (0.2 M) : pH 2,3 , 3,6, ; 5,1 , 6,3 et 7,4. Seuls les pH 2,3 , 3,6 et 5,1 ont été testés lors de la sélection des enzymes parents.

### 3.4.5 Profil de température

Ces expériences sont réalisées comme décrit dans la partie IV.4.1, avec différentes valeurs de température d'incubation : 30°C , 40°C , 50°C , 60°C , 70°C , ; 80°C et 90°C.

### 3.4.6 Sélectivité sur les aglycones

Comme dans le mode opératoire 3.4.2, les réactions enzymatiques ont été réalisées dans des flacons en verre avec une activité enzymatique de 16,7  $\mu$ kat, complétés à 1 mL avec du tampon phosphate-citrate 0,2 M à pH 3,6. Puis 4 mL de la solution équimolaire (0,5 mM de chaque composé) de standards de glucosides (glucosides de furanéol, 1-dodecanol, 1-hexanol, phénol et 4-penten-1-ol) sont ajoutés au mélange pour un volume réactionnel final de 5 mL. Le milieu réactionnel est ensuite incubé 1 heure à 30°C avec une agitation à 100 rpm. Après 1 ; 5 ; 10 ; 20 et 60 min d'incubation 300  $\mu$ L de milieu réactionnel sont ajouté à 300  $\mu$ L d'une solution de carbonate de sodium à 2 M à 4°C pour stopper la réaction. Les prélèvements sont ensuite extraits par extraction liquide-liquide 2 fois au même volume avec du pentane/acétate d'éthyle (1:2 ; mL/mL). Les extraits sont alors concentrés par flux d'azote jusqu'à 100 à 200  $\mu$ L avant d'être injectés en GC-MS. Le standard interne est utilisé pour corriger la différence de volume entre les échantillons. Les expériences ont été réalisées en triple.

### **3.4.7 Etude de spécificité sur extrait de glycosides de fraise**

#### **3.4.7.1 Extraction des glycosides de fraises**

##### **3.4.7.1.1 Préparation du jus de fruit**

Toutes les opérations de préparation qui suivent sont réalisées à 4°C. Environ 1,5 kg de fraises de fraises sont pesés. Ces fraises sont broyées avec une masse équivalente en eau distillée à l'aide d'un mixeur (Waring-Nova, Grosseron, St. Herblain, France). Une fois le tout homogénéisé, le jus de fraise est centrifugé 5 min à 8437 g à 4°C (centrifugeuse multifonction CR3i, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) et le surnageant est récupéré. Il est conservé à 4°C si l'extraction des glycosides est réalisée le jour même, sinon conservé à -20°C.

##### **3.4.7.1.2 Extraction des glycosides**

Environ 250 g de XAD-2 sont pesés et versé dans une fiole à vide. La résine est ensuite conditionnée comme indiqué dans différentes études (Günata, Bayonove, Baumes, & Cordonnier, 1985) : la résine est mise en contact pendant 10 min sous agitation avec, successivement, 300 mL d'hexane, 300 mL d'acétone et 300 mL de méthanol, avec une évacuation des solvants par filtration sur toile à beurre entre chaque étape.. Le jus de fruit est mis en contact avec la résine conditionnée 30 min à 4°C, puis est élué. Ensuite, 3 éluions successives sont réalisée avec 250 mL d'eau distillée puis 250 mL de dichlorométhane/pentane (1:2 mL/mL) et enfin 250 mL de méthanol. Avant l'éluion du méthanol, ce dernier est laissé en contact avec la résine sous agitation pendant 10 à 15 min. L'éluat méthanolique est récupéré dans un ballon. L'extrait de glycoside est évaporé à sec puis repris dans un minimum de tampon phosphate-citrate 0,2 M à pH 3,6. Pour finir l'extrait est lavé 5 fois à volume équivalent avec du dichlorométhane/pentane (1:2 mL/mL) pour éliminer les dernières traces de composés volatils.

##### **3.4.7.2 Hydrolyse enzymatique de l'extrait de glycosides de fraise**

Comme dans le paragraphe 3.4.2, les réactions enzymatiques ont été réalisées dans des flacons en verre avec une activité enzymatique de 16,7  $\mu$ kat, complétés à 1 mL avec du tampon phosphate-citrate 0,2 M à pH 3,6. Ce mélange ainsi que l'extrait de glycoside de fraise sont séparément incubés pendant 5 min à 30°C. Puis 4 mL d'extrait de glycosides sont ajoutés au mélange pour un volume réactionnel final de 5 mL. Le milieu réactionnel est ensuite incubé 4 heures à 30°C avec une agitation de 100 rpm. Après l'incubation, 500  $\mu$ L de milieu réactionnel sont ajoutés à 500  $\mu$ L d'une solution de carbonate de sodium à 2 M à 4°C pour stopper la réaction. Le prélèvement est ensuite extrait par extraction liquide-liquide 2 fois au même volume avec du pentane/acétate d'éthyle (1 : 2 ; mL/mL). Les extraits sont alors concentrés par flux d'azote jusqu'à 100 à 200  $\mu$ L avant d'être injecté en GC-MS. Le standard interne est utilisé pour corriger la différence de volume entre les échantillons. Les expériences ont été réalisées en triple.

## 3.5 Analyse des composés volatils

### 3.5.1 Extraction par ASE (extraction par solvant accélérée)



Figure 41: Photographie de l'appareil ASE 200 system de Dionex

#### 3.5.1.1 Description de l'appareil

L'appareil utilisé pour l'extraction est l'ASE 200 system (Dionex, Sunnyvale, CA) (Figure 41). Il s'agit d'un extracteur automatique pressurisé sous azote. Il a l'avantage de pouvoir réaliser des extractions en série grâce au carrousel et de les automatiser ce qui assure une meilleure répétabilité comparée à une extraction « manuelle ». De plus l'opérateur n'est jamais au contact du solvant durant le processus ce qui apporte un intérêt supplémentaire en termes de sécurité.

#### 3.5.1.2 Mode opératoire

L'Hydromatrix™ (environ 13 g), l'étalon interne, le 4-nonanol, (100  $\mu$ L d'une solution à 112,4 mg/L dans du méthanol) et environ 7,5 g de purée de fruit exactement pesée sont mélangés dans un bécher jusqu'à obtenir une poudre homogène. Cette poudre est ensuite transférée dans une cellule d'extraction pressurisée de 33 mL pour une extraction immédiate par l'ASE 200 system. L'acétate d'éthyle/pentane (2:1 ; mL/mL) est utilisé comme solvant d'extraction. Les paramètres instrumentaux de l'extracteur pour cette expérience sont : 40°C et  $10^7$  Pa. L'extraction commence par un rinçage des lignes par le solvant pour éviter toute contamination. Puis l'extraction se déroule en 3 étapes : la première est le remplissage de la cellule avec du solvant, puis la seconde consiste en 5 minutes de préchauffage de la cellule et la dernière étape consiste en 5 minutes d'incubation statique avant récupération de l'extrait. L'extrait est ensuite concentré à 1 mL par distillation sous-vide (300 Pa) à 25°C via un Multivapor R12 (Büchi, Rungis, France), puis par flux d'azote avant injection en chromatographie gazeuse.

### 3.5.2 Extraction liquide-liquide du furanéol

Une extraction liquide-liquide a été réalisée sur un standard de furanéol à 20 mg/L dans du tampon phosphate-citrate 0,2M, trois fois, volume pour volume avec soit du pentane/dichlorométhane (DCM) (2:1) mL/mL, soit du dichlorométhane, soit du pentane/acétate d'éthyle (1:2) mL/mL. Puis les extraits (phase organique) ont été analysés en GC-MS et les phases aqueuses en HPLC.

### 3.5.3 Analyse par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS)



Figure 42: Photographie du système GC-MS Trace 1300-ISQ LT de Thermo Scientific

#### 3.5.3.1 Méthode instrumentale

L'échantillon (1  $\mu$ L) est injecté dans le système GC-MS (Trace1300-ISQ LT, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (Figure 42) équipé d'une colonne TG-WAX MS (30m\*0,25mm ; 0,5  $\mu$ m d'épaisseur de film) (Thermo Scientific). L'injection s'effectue à 230°C en mode splitless (30 s) avec un débit de 5 mL/min. Le gaz vecteur (hélium) circule à un débit constant de 1,2 mL/min. Le gradient de température utilisé est décrit en Figure 43. Les spectres de masse sont obtenus par ionisation par impact électronique à 70 eV avec un scan de la masse m/z 30 à 250 à une vitesse de 2 scans/s.

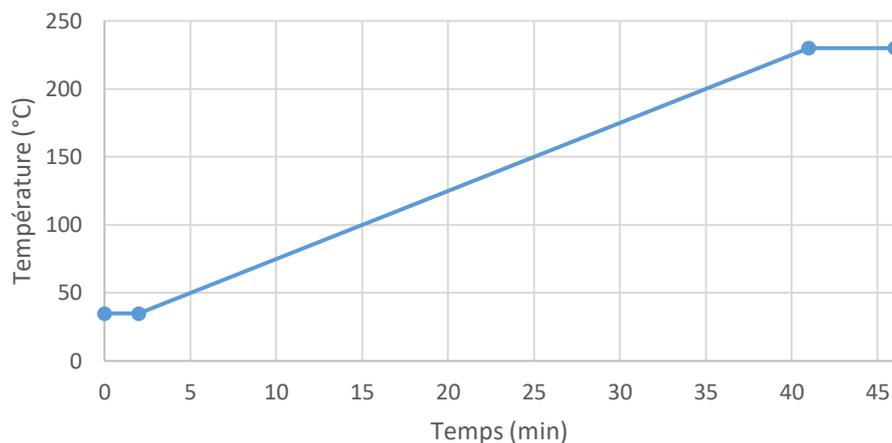


Figure 43 : Gradient de température pour l'injection en GC-MS

### 3.5.3.2 Analyse des données

Les données sont collectées par le logiciel GC-MS Chroméléon 7.2 et les composés majoritaires sont identifiés en calculant leur indice de rétention (RI) et en comparant leur spectre de masse avec la base de données NIST 14 (US National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA). Pour calculer les indices de rétention, une solution d'alcane est injectée avec le même programme que les échantillons. Il faut ensuite intégrer le temps de rétention du composé ( $tr(i)$ ), le temps de rétention de l'alcane à  $n$  carbone le plus proche qui sort avant notre composé ( $tr(n)$ ) et le temps de rétention de l'alcane suivant ( $tr(n+1)$ ) dans l'équation suivant :

$$RI = 100 * \left( n + \frac{tr(i) - tr(n)}{tr(n+1) - tr(n)} \right)$$

Ces indices de rétentions sont ensuite comparés à la base de données de Pherobase - Kovats (The Pherobase - Extensive Database of Pheromones and Semiochemicals ; Ashraf M. El-Sayed ; 2003-2018 ; <http://www.pherobase.com>). Pour la quantification des composés volatils, les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent 4-nonanol par kilogramme de matière fraîche (ppb). La réserve aromatique est calculée par différence entre l'échantillon ayant subi l'hydrolyse enzymatique et l'échantillon témoin (cf. partie IV.2.2). Puis l'évolution potentielle des composés volatils (augmentation et diminution) est évaluée en comparant la réserve aromatique au profil aromatique initial du lot de fraise. Cette évolution potentielle prend en compte les glycoconjugués libérés par l'AR2000 et l'action des enzymes endogènes.

## 3.5.4 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

### 3.5.4.1 Prétraitement des échantillons issus de fraise

Un prétraitement par la PVPP est effectué pour éliminer les polyphénols qui absorbent dans la zone utilisée pour la quantification du furanéol et de son glycoside à 275 et 285 nm

respectivement (Figure 44). A 5 g de purée de fraise, 250 mg de PVPP sont ajoutés (5% de la masse de purée) et mélangés. Le tout est agité à 4°C pendant 1 h. Pour finir le mélange est centrifugé à 8437 g, pendant 10 min, à 4°C avec une centrifuge CR3i multifonction (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Le surnageant est ensuite récupéré et filtré sur filtre à cellulose 0,20 µm avant injection.

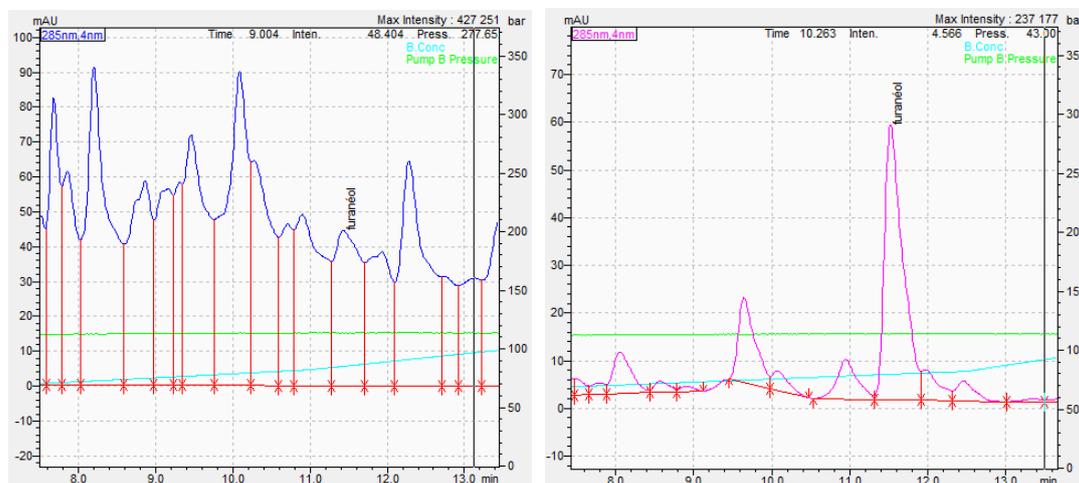


Figure 44 : chromatogramme d'un jus de fraise injecté par HPLC avant traitement au PVPP (à gauche) et après traitement au PVPP (à droite)

### 3.5.4.2 Méthode instrumentale

Les analyses HPLC ont été réalisées sur un système Shimadzu 20A avec :

- Deux pompes, modèles LC-20AD, pour réguler le débit des éluants à 1 mL/min.
- Un passeur thermostaté, modèle SIL-20AC HT, pour injecter automatiquement les échantillons en les conservant à 4°C.
- Un four, modèle CTO-20AC, pour maintenir la colonne à 30°C.
- Un détecteur DAD (UV-Visible), modèle SPD-M20A, pour détecter le furanéol à 285 nm et le glucoside de furanéol à 275 nm.
- Un logiciel de pilotage, d'acquisition et de retraitement des chromatogrammes LC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japon)

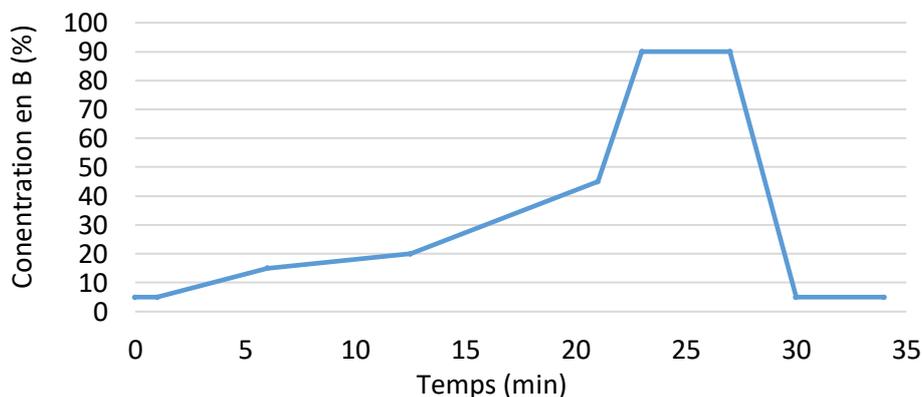


Figure 45: Gradient de la concentration en solvant B en fonction du temps d'analyse.

La colonne utilisée est une LiChrospher 100 RP 18 5 $\mu$ m (250x4,6mm) de chez Phenomenex. Les éluants sont de l'eau MiliQ avec de l'acide formique à 1 mL/L (Solvant A) et de l'acétonitrile (Solvant B). Le volume d'échantillon injecté est de 25  $\mu$ L. Un gradient, présenté en Figure 45, a été utilisé avec les deux éluants. Le glycoside de furanéol et le furanéol sont détectés, respectivement, à 8,2 min et à 10,1 min (Figure 46).

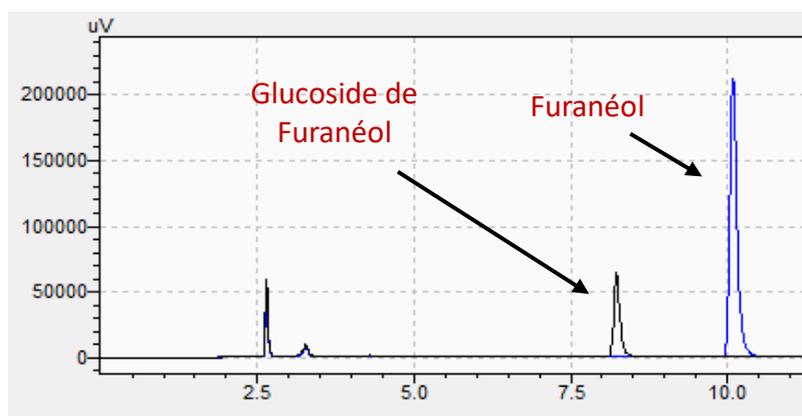


Figure 46: Chromatogramme HPLC avec le standard de furanéol et de glucoside de furanéol

## 3.6 Mesures physico-chimiques

### 3.6.1 Préparation des échantillons

Dans un blender 100g de fraises ou d'abricots sont broyés et homogénéisés à 4°C.

### 3.6.2 Brix

Le degré Brix est mesuré à partir d'un broyat de fruits (partie 3.6.1) avec un réfractomètre digital PR-101 (Agato, Tokyo, Japon) à température ambiante. Les mesures sont triplées à partir de 3 broyats différents.

### 3.6.3 pH

Le pH est mesuré à partir d'un broyat de fruits (partie 3.6.1) avec un pHmètre FE20 FireEasy (Mettler Toledo, Viroflay, France) à température ambiante.

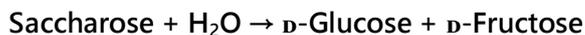
### 3.6.4 Dosage sucres et acides

Le glucose, le fructose, le saccharose, l'acide malique et l'acide citrique sont quantifiés par mesures colorimétrique grâce aux kits enzymatiques pour analyses alimentaire de Megazyme et sont exprimé en g/kg de matière fraîche. Les échantillons sont préparés à partir de 2,5 g de purée,

issu d'un lot de 300 g de purée de fruits, dilués dans 10 mL d'eau distillée qui sont homogénéisés, puis centrifugés à 8437 g, 10 min à 4°C.

Les réactions enzymatiques, pour le dosage des sucres consistent en 5 réactions avec 4 enzymes différentes :

- **$\beta$ -Fructosidase**



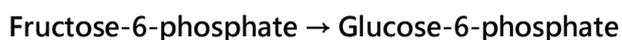
- **Hexokinase**



- **Glucose-6-phosphate déhydrogénase**



- **Phosphoglucose isomérase**



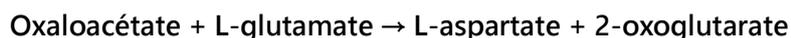
Le dosage se fait en trois temps. Tout d'abord le glucose est dosé via l'hexokinase et la Glucose-6-phosphate déhydrogénase en mesurant l'absorbance du NADPH libéré à 340 nm. Puis, le fructose est dosé par ajout de la phosphoglucose isomérase et par différence entre l'absorbance totale du NADPH et l'absorbance du NADPH pour le dosage du glucose. Pour finir, le saccharose est dosé avec la  $\beta$ -fructosidase, l'hexokinase et la Glucose-6-phosphate déhydrogénase par différence entre l'absorbance totale du NADPH et l'absorbance du NADPH pour le dosage du glucose.

Les réactions enzymatiques, pour le dosage de l'acide L-malique consistent en 2 réactions avec 2 enzymes différentes :

- **L-malate déhydrogénase**



- **Glutamate-oxaloacétate transaminase**



Le principe est de mesurer l'absorbance du NADPH libéré à 340 nm. La réaction catalysée par la glutamate-oxaloacétate transaminase est présente pour favoriser la réaction de la L-malate déhydrogénase vers la formation d'oxaloacétate.

Les réactions enzymatiques, pour le dosage de l'acide L-citrique consistent en 3 réactions avec 3 enzymes différentes :

- **Citrate lyase**  
Citrate → oxaloacétate + acétate
- **L-malate déhydrogénase**  
Oxaloacétate + NADH + H<sup>+</sup> → L-malate + NAD<sup>+</sup>
- **D-lactate déhydrogénase**  
Pyruvate + NADH + H<sup>+</sup> → D-lactate + NAD<sup>+</sup>

Le principe est de mesurer la perte d'absorbance du NADPH consommé à 340 nm et d'en déduire la concentration en acide L-citrique. La réaction catalysée par la D-lactate déhydrogénase est présente au cas où l'échantillon comporte une activité oxaloacétate décarboxylase qui transformera l'oxaloacétate en pyruvate.

Les mesures colorimétriques sont réalisées dans une microplaque 96 puits avec un SAFAS (FLX-Xenius, SAFAS, Monaco) équipé d'injecteurs automatisés.

## 3.7 Préparation des échantillons pour l'analyse des composés volatils

### 3.7.1 Principe

Les échantillons de purées de fruits sont préparés pour l'analyse de leur composition en composés volatils libres et sous forme glycosylée de manière à pouvoir comparer sans biais les concentrations mesurées.

### 3.7.2 Mode opératoire

A partir d'un lot de 300 g de purée de fruits, un premier aliquot de 40 g est isolé. Du chlorure de sodium (NaCl) est ajouté au reste de la purée à raison de 75 g de sel pour 100 g de purée de fruits. La purée avec le sel est homogénéisée dans un blender. Deux autres aliquots de 40 g chacun sont isolés à partir du mélange de purée et de sel (soit 23 g de purée et 17 g de sel). Dans le premier aliquot (sans sel), 40 mg d'AR2000 sont ajoutés. Ce dernier et l'un des deux aliquots « purée + sel » sont mis à incuber 21 h à 40°C avec une agitation à 120 rotations par minute (rpm), puis, après centrifugation de 8437 g pendant 10 min à 4°C, ils sont extraits par ASE. Le deuxième aliquot « purée + sel » est directement extrait par ASE, après centrifugation de 8437 g pendant 10 min à 4°C (Figure 47). Lors de l'analyse des résultats la dilution par le sel des jus de

fraises et d'abricots sera prise en compte en s'appuyant sur la solubilité du NaCl dans l'eau à 20°C (358,5 g/L)

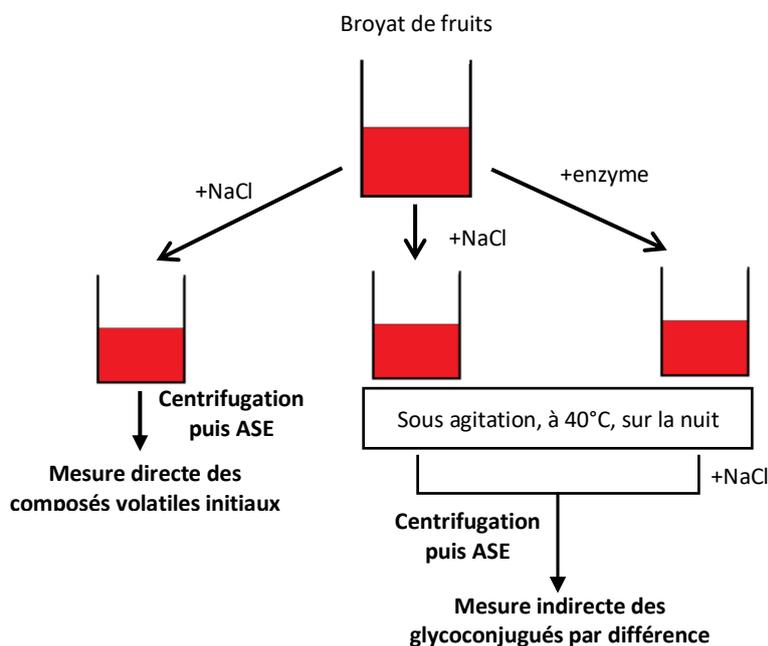


Figure 47 : Schéma du protocole de préparation des échantillons de purée de fruits pour l'analyse du profil et de la réserve aromatique

### 3.8 Cinétique enzymatique sur purée de fraises et d'abricots

Une purée de fraises ou d'abricots est réalisée à partir d'un lot d'un kilogramme de fruits congelés, deux aliquots de 300 g sont alors isolés dans des récipients en verre fermé. Le premier aliquot servira de témoin et le second est additionné d'enzyme pour 1,85 mkat total. Les deux échantillons sont incubés à 40°C sur 21 à 23 heures. Après, 1h, 2h, 4h, 8h, 20-21h et 23h (ce point a été prélevé uniquement sur la première cinétique), 25g de purée sont prélevés. Ce prélèvement est scindé en deux. Le premier, de 20 g, va servir à quantifier les composés volatils avec les protocoles IV.6.1 et IV.6.2. Le second, de 5 g, va servir pour le contrôle HPLC. Les cinétiques ont été doublées.

Pour les essais avec pectinase, 2,3 nkat de PME et 27,5 nkat de PG par gramme de fruit sont ajoutés à la cuve avec les fruits avant le début du procédé.

## 3.9 Modélisation de l'activité des glucosidases

### 3.9.1 Mise au point et réalisation du plan d'expérience

#### 3.9.1.1 Plan composite centré

Les divers paramètres influençant l'activité des enzymes (température, pH, sucres, etc...) peuvent avoir de possibles interactions entre eux et ces dernières ont été étudiées. Ces essais se sont limités aux interactions entre les 3 sucres majeurs dans les fruits (fructose, glucose et saccharose) ainsi qu'aux interactions entre la température, le pH et le Brix. Le but est de faire des modélisations de l'activité de chaque enzyme en fonction de ces paramètres. Si les modèles sont concluants, ils donneront un outil prédictif qui permettra, par simple dosage des sucres et mesure du pH, de savoir si une nouvelle matrice est compatible avec l'utilisation des glucosidases étudiées.

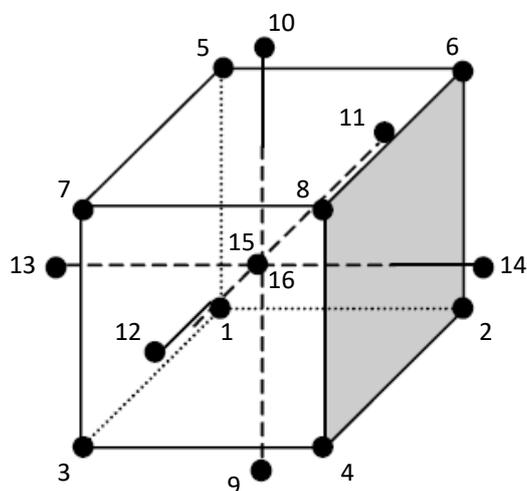


Figure 48 : Schéma du plan composite centré avec le numéro d'expérience pour chaque point

Le modèle composite centré a été choisi pour réaliser les plans d'expérience de ces essais (Figure 48). Les limites des deux plans sont présentées dans le Tableau VIII. Les limites pour les trois sucres sont de 0 à 8 g/kg de matière fraîche, le pH et le Brix correspondent aux limites dans la base de données des fruits du projet (du pH 2 à 5 et de 4° Brix à 20° Brix) et la limite en température correspond à la limite de température exploitable en industrie (30°C à 50°C).

Tableau VIII: Paramètres utilisés pour la réalisation des plans d'expérience pour les interactions fructose/glucose/saccharose (à gauche) et pour les interactions pH/Brix/température (à droite)

RUN	Fructose (g/kg de MF)	Glucose (g/kg de MF)	Saccharose (g/kg de MF)	RUN	Température (°C)	pH	Brix
1	16	16	16	1	34	2,6	7,2
2	16	16	64	2	34	2,6	16,8
3	16	64	16	3	34	4,4	7,2
4	16	64	64	4	34	4,4	16,8
5	64	16	16	5	46	2,6	7,2
6	64	16	64	6	46	2,6	16,8
7	64	64	16	7	46	4,4	7,2
8	64	64	64	8	46	4,4	16,8
9	0	40	40	9	30	3,5	12,0
10	80	40	40	10	50	3,5	12,0
11	40	0	40	11	40	2,0	12,0
12	40	80	40	12	40	5,0	12,0
13	40	40	0	13	40	3,5	4,0
14	40	40	80	14	40	3,5	20,0
15	40	40	40	15	40	3,5	12,0
16	40	40	40	16	40	3,5	12,0

### 3.9.1.2 Réalisation du plan d'expérience

Les plans d'expérience ont été réalisés sur du glucoside de p-NP dans des microplaques 96 puits en suivant le même protocole que pour déterminer le degré d'inhibition par les sucres (partie 3.4.3). Les concentrations en sucre, le pH et la température ont été ajustés pour correspondre aux différents points des plan d'expériences. Ces derniers ont été réalisés en double.

## 3.9.2 Modélisation mathématique et graphique

### 3.9.2.1 Résolution du modèle mathématique

La modélisation mathématique est réalisée avec le logiciel R (ver. 3.5.2, Vienne, Autriche). Les fonctions *summary*, *glm* et *lm* du package de base "*stats*" ont été utilisé pour élucider le modèle à partir des résultats des plan d'expérience. Les modèles ont été ajustés manuellement pour obtenir des équations avec des paramètres significatifs ( $p$ -value < 0.05), des coefficients de corrélation ( $R^2$ ) le plus proche possible de 1 pour valider la corrélation et des critères d'information d'Akaike (AIC) les plus bas possibles pour valider le critère de parcimonie.

### 3.9.2.2 Représentation graphique de l'activité des glucosidases

La modélisation mathématique est réalisée avec le logiciel R (ver. 3.5.2, Vienne, Autriche). Les fonctions *ggplot*, *geom\_rather*, *geom\_contour* et *direct\_label* des package "*ggplot2*" et "*directlabels*" ont été utilisé pour élucider le modèle à partir des équations obtenues lors de la modélisation mathématique. Ci-après le code utilisé pour obtenir les représentations graphiques

des modèles avec comme exemple le modèle de l'activité de la E4177 en fonction du Brix et du pH :

```
PH <- data.frame(matrix (seq(2,5, by=3/100),nrow=1,ncol=101))
brix <- data.frame(matrix (seq(4,20, by=16/100),nrow=1,ncol=101))
Act_E4177 <-function (PH,brix){52.1*PH+44.6*log(brix,exp(1))-
16.8*log(brix,exp(1))*PH-136 #intégration de l'équation de la modélisation
mathématiques
}
tbl_E4177 <- data.frame (matrix(1,nrow=length(brix)*length(PH),ncol=3))
colnames(tbl_E4177) <-c("pH","Brix","Activity")
k <- 1
for (i in 1:length(PH)){
for (j in 1:length(brix)){
tbl_E4177[k,1] <- PH[1,i]
tbl_E4177[k,2] <- brix[1,j]
tbl_E4177[k,3] <- Act_E4177(PH[1,i],brix[1,j])
if (tbl_E4177[k,3]<=0)
tbl_E4177[k,3] <-0
k <- k+1
}
}
tbl_E4177
d1 <- ggplot(tbl_E4177,aes(x=pH, y=Brix, z=Activity)) +
geom_raster(data=tbl_E4177, aes(fill=Activity),show.legend = TRUE) +
scale_fill_gradient(limits=range(tbl_E4177$Activity),
high = 'red',
low = 'yellow') +
geom_contour(data=tbl_E4177, aes(colour = ..level..)) +
scale_colour_gradient(guide = 'none')
d2 <- direct.label(d1,list("far.from.others.borders",
"calc.bboxes",
"enlarge.box",
hjust = 1,
vjust = -1,
box.color = NA,
fill = "transparent",
"draw.rects"))
d2
```

## 3.10 Essais à l'échelle pilote de laboratoire

### 3.10.1 RoboQbo



Figure 49 : Photographie du pilote de laboratoire roboQbo Qb8-3

Le roboQbo Qb8-3 (Roboqbo Srl, Bentivoglio, Italie) (Figure 49) est un pilote de laboratoire permettant de simuler des procédés de transformation de l'industrie agro-alimentaire. Cet appareil peut chauffer le produit via injection de vapeur dans la double membrane ou bien par injection directe de vapeur dans le produit à transformer. L'appareil est muni d'une pompe qui permet de réaliser des procédés sous pression, sous-vide (continu ou non) comme à pression atmosphérique. Des ingrédients peuvent être ajoutés durant un procédé via l'entonnoir au-dessus de la cuve et des échantillons peuvent être prélevés via la vanne d'évacuation situé en bas de la cuve. Les faces intérieures de la cuve et du couvercle peuvent être nettoyés par des racleurs. Deux différents outils peuvent également être installé à l'intérieur de la cuve : une pale permettant d'agiter la matrice à transformer et un couteau pour broyer le produit durant le procédé.

### 3.10.2 Imprégnation sous vide

#### 3.10.2.1 Préparation de cubes de pommes

Les essais préliminaires d'imprégnation sous vide sont réalisés sur des cubes de pommes d'arête 11 mm. Ces derniers sont réalisés à partir de pommes fraîches épluchées qui passent à deux reprises dans un coupe-frite. Les cubes sont traités dans un bain d'acide ascorbique à 0,5 g/L pendant 15 min. Une fois égouttés, les cubes sont surgelés et stockés à -20°C

#### 3.10.2.2 Protocole d'imprégnation

La pale d'agitation est montée sur le roboQbo. Dans la cuve sont ajoutés 1 kg de cubes de fruits et 1 mL de colorant (Bleu brillant FCF (E133) ou phycocyanine). Deux différents protocoles ont été utilisés avec 20 min d'homogénéisation du colorant suivi de l'imprégnation par rupture du vide :

**Procédé 1 :**

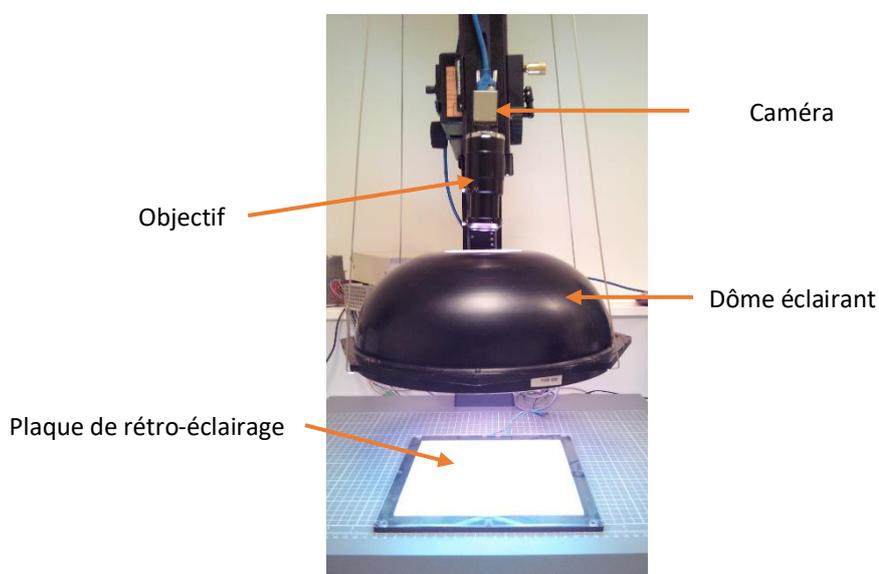
- 15 min à 30°C avec agitation à 100 rpm à pression atmosphérique
- 5 min à 30°C avec agitation à 100 rpm avec un vide de 50 hPa
- Le vide est rompu

**Procédé 2 :**

- 20 min 30°C avec agitation à 100 rpm avec un vide de 50 hPa
- Le vide est rompu

Les cubes sont ensuite récupérés pour évaluer l'imprégnation

### 3.10.2.3 Evaluation de l'homogénéisation et de l'imprégnation



**Figure 50 : Dispositif de capture d'image**

La première évaluation se fait sur l'aspect général du lot de cube de fruits traité. Le ratio masse de purée/masse de cube est calculé pour connaître le degré de déstructuration du lot. Dans un second temps, une quarantaine de cubes est isolée. Ces derniers sont coupés par la moitié et sont triés dans trois catégories : non coloré, coloré en surface et coloré à cœur. Le rendement d'imprégnation est calculé à partir de ces données. Pour finir, les cubes sont observés sous un dispositif de capture d'image (Figure 50) composé d'une caméra DFK 72AUC02 (ImagingSource, Bremen, Allemagne) munie d'un objectif 50 mm C5028-M (Pentax, Tokyo, Japon) ou un objectif macroscopique VS-TEC0513 (VS Technology Corp., Tokyo, Japon) avec éclairage par le dessus grâce à un dôme et avec rétro-éclairage pour observer la structure macroscopique des cubes de fruits.

### 3.10.3 Traitement enzymatique à l'échelle pilote de laboratoire

#### 3.10.3.1 Protocole principal

Le traitement enzymatique s'effectue sur 1,5 kg de fraises ou d'abricots. Le couteau est utilisé pour broyer les morceaux de fruits et les racleurs sont activés. Les fruits congelés sont ajoutés à la cuve ainsi que l'enzyme à hauteur de 6,17 mkat total (correspondant à un enzymage par 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177 ou E4179). Le procédé est ensuite lancé et s'effectue comme tel :

- Le vide est fait à température ambiante jusqu'à atteindre une dépression stabilisée à 50 hPa
- Le tirage à vide s'arrête et le chauffage à 40°C par injection de vapeur dans la double paroi s'enclenche. Le couteau est également actionné (150 rpm). A partir du moment où les 40°C sont atteints, cette étape durant entre 1 et 2 heures en fonction de l'expérience réalisées. Il s'agit de l'étape d'incubation enzymatique.
- Une fois le temps écoulé, la température est augmentée jusqu'à 75°C et est maintenue 3 min. Il s'agit de l'étape de pasteurisation.

Une fois le procédé terminé, le vide est cassé et la purée de fraises ou d'abricots enzymée est récupérée par la vanne d'évacuation dans des récipients en verre préalablement nettoyés d'abord à l'hypochlorite de sodium (80 ppm), puis à la vapeur. Ces récipients sont fermés et plongés dans un bain d'eau glacée. Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à analyse.

#### 3.10.3.2 Ajustement du protocole pour l'étude de l'impact des traitements industriels sur les fruits

Pour l'étude de l'impact des traitements industriels des fruits, plusieurs ajustements sont apportés au protocole principal. Pour l'étude du lavage les fruits congelés sont plongés dans un bain d'eau chloré à 80 mg/kg à température ambiante pendant 2 minutes. Pour l'étude du blanchiment, les fruits sont plongés, après lavage, dans de l'eau à 95°C pendant 1 minute. Ils sont ensuite récupérés et plongés dans de l'eau à 4°C pendant 30 secondes, puis égoutés. Pour l'ajustement au pH 5,5, du citrate de sodium est ajouté dans la cuve du roboQbo avec les fruits. Pour 1 kg de fraises à pH 3,6, il faut ajouter 12,6 g de citrate de sodium pour atteindre le pH de 5,5. Pour les essais avec pectinase, 2,3 mkat de PME et 27,5 mkat de PG par kilogramme de fruits sont ajoutés à la cuve avec les fruits avant le début du procédé.

### 3.10.4 Analyses sensorielles

#### 3.10.4.1 Tests triangulaires

Des tests triangulaires ont été réalisés sur des purées de fraises ayant subi le procédé de traitement enzymatique décrit en partie 3.10.3.1. Il s'agit de tests de dégustation à l'aveugle avec

2 échantillons comme témoins (procédé sans enzyme) et 1 échantillon ayant subi le procédé avec enzyme. Ces tests suivent une la loi de distribution binomiale (Kunert & Meyners, 1999). La table présentée ci-après (Tableau IX) permet de connaître les limites de significativité des tests en fonction du nombre d'individu participant au test et du nombres de réponse corectes en fonction de la certitude souhaitée. Ainsi pour un test avec 18 individus, il faut 12 réponses correctes minimum pour être sûr à 99% que les deux produits testés sont différents

**Tableau IX : Table de significativité de test triangulaire suivant un loi de distribution binomiale**

Nombre de participants au test	Nombre de réponses correctes nécessaires pour conclure à une différence significative		
	Certitude : 95%	Certitude : 99%	Certitude : 99,9%
7	5	6	7
8	6	7	8
9	6	7	8
10	7	8	9
11	7	8	9
12	8	9	10
13	8	9	10
14	9	10	11
15	9	10	12
16	10	11	12
17	10	11	13
18	10	12	13
19	11	12	14
20	11	12	14

#### 3.10.4.2 Analyse réalisée par la société Jean Niel

Des analyses sensorielles sont réalisées par la société Jean Niel. La dégustation des purées de fraises et d'abricots s'effectue par un panel de 5 testeurs. Les purées sont jugées par rapport à 5 descripteurs (Fruité, Florale, Vert, Confituré/cuit et Mûr) qui sont notés de 0 à 6 en fonction de leur intensité.

Dans le cas de purées ayant subi un traitement par l'AR2000, les échantillons sont dilués jusqu'à avoir une texture commune afin de ne pas biaiser les comparaisons. En effet cette préparation enzymatique possède des pectinases qui liquéfient le produit, lui donnant un aspect « jus » plutôt qu'un aspect « purée ».

### 3.10.5 Statistiques

L'ajustement des équations de modélisation a été réalisé en tenant compte du coefficient de corrélation  $R^2$ , du critère d'information d'Akaike (AIC) et de la p-value de chaque facteur (p-value < 0,05)

Pour l'analyse par composant principal (ACP), les facteurs de corrélation ont été calculés par la méthode de Pearson.

La comparaison des moyennes observées par nos série d'échantillons a été faite à partir du test t de Student.

Pour les séries d'échantillons de  $n=2$ , l'écart à la moyenne est calculé. Pour les séries d'échantillon de  $n > 2$ , l'écart-type est calculé.



# Chapitre 4

---

## Résultats et discussions

---

### 4.1 Caractérisation de la réserve glycosidique dans la fraise et l'abricot

#### 4.1.1 Mise au point de la méthode d'analyse des composés volatils et de la réserve

##### 4.1.1.1 Choix du protocole de préparation des échantillons

Pour analyser les composés volatils et ainsi obtenir le potentiel aromatique des fruits utilisés, la première méthode envisagée a été l'extraction d'affinité par SPE. Il s'agit de la méthode la plus employée pour analyser les glycosides de fruit. Mais le but de cette partie de la thèse étant de comparer la réserve de composés volatils et les volatils libres, cette méthode n'est pas adaptée comme expliqué dans la partie 1.2.6.1

Elle consiste en la création de 3 échantillons à partir d'un même broyat de fraise. Le premier échantillon subit une extraction juste après le broyage afin de connaître la composition initiale en molécules volatiles du lot. Cet échantillon donne le profil aromatique du fruit étudié. Le deuxième échantillon est celui qui subit l'hydrolyse directe et le troisième échantillon sera le témoin, il suit la même incubation que le deuxième échantillon mais sans ajout de glycosidases. La soustraction des profils aromatiques de ces deux échantillons donne le profil de la réserve aromatique.

En fonction du type de témoin qui est préparé il est possible d'obtenir deux types de résultats pour le profil de la réserve. Si le témoin est simplement un broyat de fruit, sa comparaison avec l'échantillon enzymé va donner l'impact uniquement de l'AR2000 ajoutée à la purée de fruit. Cependant il y a aussi la possibilité d'inhiber les enzymes endogènes du fruit dans le témoin par précipitation des protéines par des sels. Cela permet alors, par comparaison, d'avoir le profil de la réserve aromatique incluant l'action simultanée de l'AR2000 ajoutée et des enzymes endogènes.

Cette dernière approche est préférée pour la caractérisation du profil de la réserve aromatique. Les interactions de l'AR2000 et des produits de l'hydrolyse des glycosides avec les enzymes responsables de la création d'arôme dans les fruits peuvent ainsi être connues, notamment l'action des enzymes de type LOX/HPL, qui créent des notes vertes et fraîches, de type ADH, qui créent des alcools ou aldéhydes volatils, ou encore de type AAT, qui créent des esters aux notes « sweet » et fruitées (cf parties 1.1.2.1, 1.1.3.2 et 1.3.3). Cela donne une meilleure appréciation de l'évolution de l'arôme avec ajout d'AR2000 sur le produit fini. En effet, même si l'inhibition des enzymes endogènes du fruit par blanchiment reste utilisée en cas de dommages enzymatiques trop importants, notamment avec le brunissement enzymatique causé par la PPO, ce procédé est évité autant que possible pour ne pas abîmer le fruit et détériorer ses propriétés organoleptiques par le traitement thermique (cf partie 1.3.3), laissant les enzymes endogènes actives. Ce choix apporte cependant le biais de ne pas connaître la réserve glycosidique réelle car le profil aromatique est influencé par la glucosidase mais aussi les enzymes endogènes de la fraise et de l'abricot. Il sera préférable de parler de potentiel aromatique.

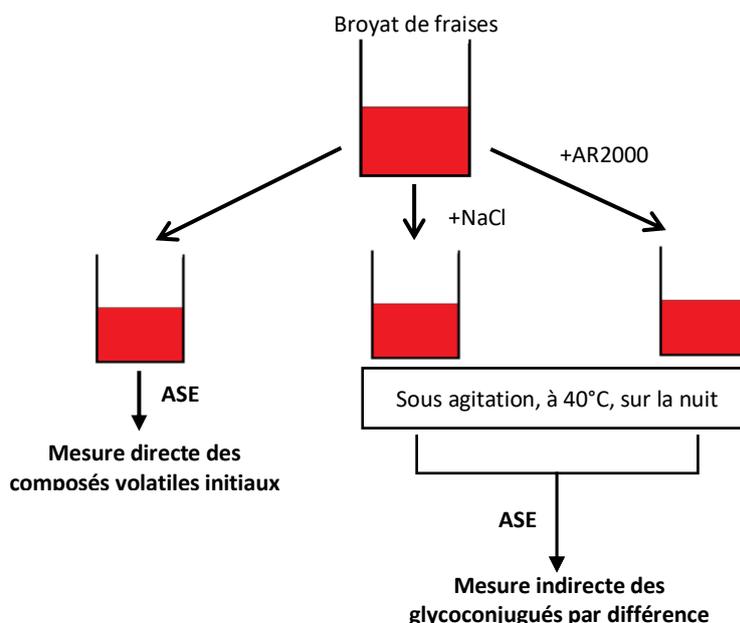


Figure 51: Schéma du protocole initial de la préparation des échantillons pour analyse

Pour finir tous les échantillons subissent une extraction par ASE (Accelerated solvent extraction) pour avoir une automatisation de cette étape et ainsi réduire au mieux les variations de résultats dues à cette étape. La Figure 51 montre le protocole initial de la préparation des échantillons.

#### 4.1.1.2 Choix du solvant d'extraction des composés volatils

La fraise est utilisée comme fruit de référence. Ainsi, les conditions d'extraction ont été optimisées pour l'extraction des composés volatils de la fraise. Ils ont été analysés dans plusieurs

travaux (cf partie 1.1.1.1) et mettent en évidence les molécules clés de l'arôme de fraise comme le butanoate d'éthyle, le mésifurane ou encore le furanéol.

La quantification du furanéol est un point clé de l'appréciation de la qualité aromatique des fraises. Il était donc important d'optimiser son extraction durant l'analyse des composés volatils de la fraise. La première étape a été le choix du solvant d'extraction, parmi 3 couramment utilisés : le pentane/dichlorométhane (DCM) (2:1) mL/mL, le dichlorométhane et le pentane/acétate d'éthyle (1:2) mL/mL. Pour les tester, l'extraction décrite en partie 3.5.2 a été réalisée sur un standard de furanéol.

L'acétate d'éthyle/pentane (2:1) extrait 90% du furanéol (en 3 extractions successives), contre 27% pour le DCM/pentane (1:2) (Figure 52). En effet, le furanéol étant un dérivé des sucres (cf partie II.1.4.2), il est plus polaire que la majorité des composés volatils et par conséquent plus le solvant utilisé est polaire, plus il sera extrait. L'acétate d'éthyle ayant l'index de polarité le plus élevé (4,4) comparé au DCM (3,1) et au pentane (0) ("Solvent Properties," 2003), il semble en effet être le plus adapté pour extraire des composés aussi polaires que le furanéol. Cependant, ce solvant ne permettra pas d'analyser l'acétate d'éthyle, présent dans la fraise.

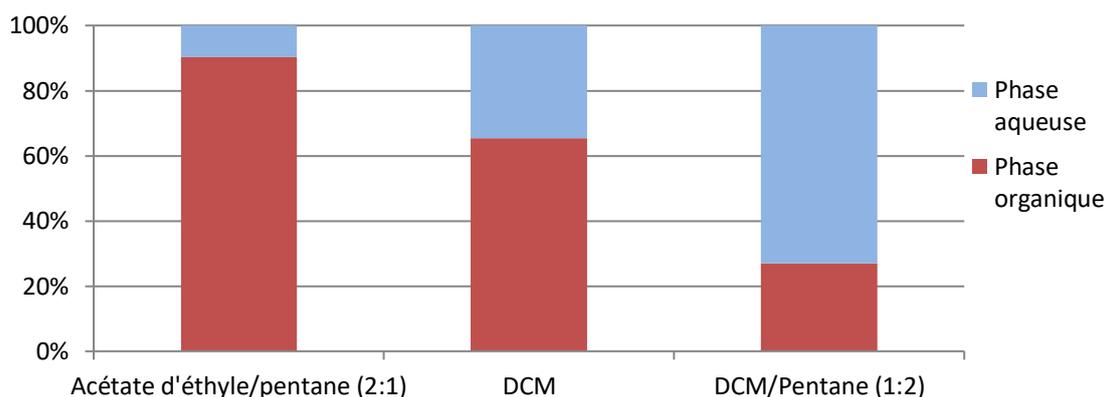


Figure 52: Ratio de furanéol entre la phase organique et la phase aqueuse

Pour confirmer ces résultats sur l'ensemble du profil aromatique une extraction d'une purée de fraise (*Senga sangana* (Bulgarie)) a été effectuée avec ces 3 solvants. Le mélange pentane/acétate d'éthyle présente les meilleurs résultats (Figure 53). La quantité de furanéol extraite sur purée de fraise est 1,7 fois celle extraite par le mélange pentane/DCM et la quantité de mésifurane 2,1 fois plus élevée. De plus, de nouveaux composés ont été extraits : l'hexanal, le butyrate d'éthyle, l'hexanoate de méthyle, l'acide cinnamique, le 8-hydroxylinalool, le 3-pentène-2-one, la pantolactone ou l'acide 3-hydroxybutyrique. Ainsi des composés clés de la fraise notamment le butyrate d'éthyle et l'hexanoate de méthyle qui n'étaient pas retrouvés avec les autres solvants sont extraits par le mélange acétate d'éthyle/pentane (2:1). De plus aucune molécule ne disparaît avec l'emploi de ce mélange.

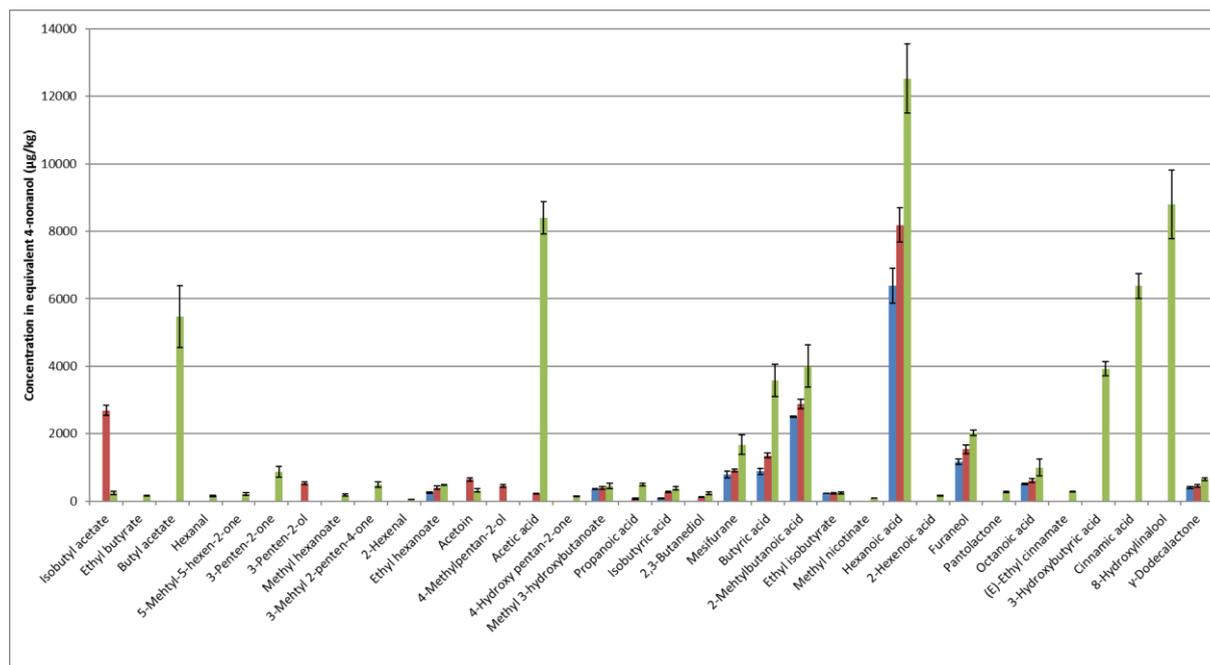


Figure 53: composés volatils extraits d'une purée de fraise avec 3 solvants différents (bleu : pentane/DCM (2:1) ; rouge : DCM ; vert : acétate d'éthyle/pentane (2:1))

L'acétate d'éthyle/pentane (2:1) mL/mL semble le meilleur mélange pour l'extraction des composés volatils de la fraise. Il a été choisi comme solvant pour le reste des travaux de thèse.

#### 4.1.1.3 Tests de divers paramètres pour le protocole de préparation

##### 4.1.1.3.1 Impact de l'ajout de sel sur le profil aromatique

A la suite de la première ébauche du protocole de préparation des échantillons, certains risques d'erreur systématique ont dû être testés. Le premier d'entre eux est l'impact de l'effet exhausteur du NaCl sur l'extraction des composés volatils. En effet le témoin est à saturation de NaCl pour inhiber les enzymes endogènes par précipitation. L'effet exhausteur des sels est connu (Sabatini, Perri, & Marsilio, 2009), il était donc nécessaire de vérifier son impact sur l'extraction des arômes de la fraise.

Lors de l'étude des composés volatils, conventionnellement, seules les modifications supérieures à 20% de la quantité initiale du composé doivent être prises en compte. Suite à l'ajout de sel, une dizaine de composés, parmi les 27 identifiés, subissent une augmentation ou une diminution de la quantité extraite de plus de 20% après correction par le 4-nonanol (standard interne). L'augmentation dépasse les 100% (x 2) pour le 3-penten-2-ol et l'acide nonanoïque, montrant ainsi qu'il est nécessaire de conserver le même pouvoir exhausteur dans chaque échantillon extrait (Figure 54). Seul le 2-hexenal disparaît complètement avec l'ajout de sel. Cette « disparition » est probablement un effet indirect de l'ajout de sel, dû à l'inhibition des enzymes endogènes, et spécifiquement celles de la voie de la LOX. En effet, les composés en C6 ne sont

formés que lors de la décompartmentation cellulaire permettant aux LOX et HLP d'être au contact de l'acide linoléique, précurseur des C6 comme le 2-hexénal (cf partie 1.1.3.2).

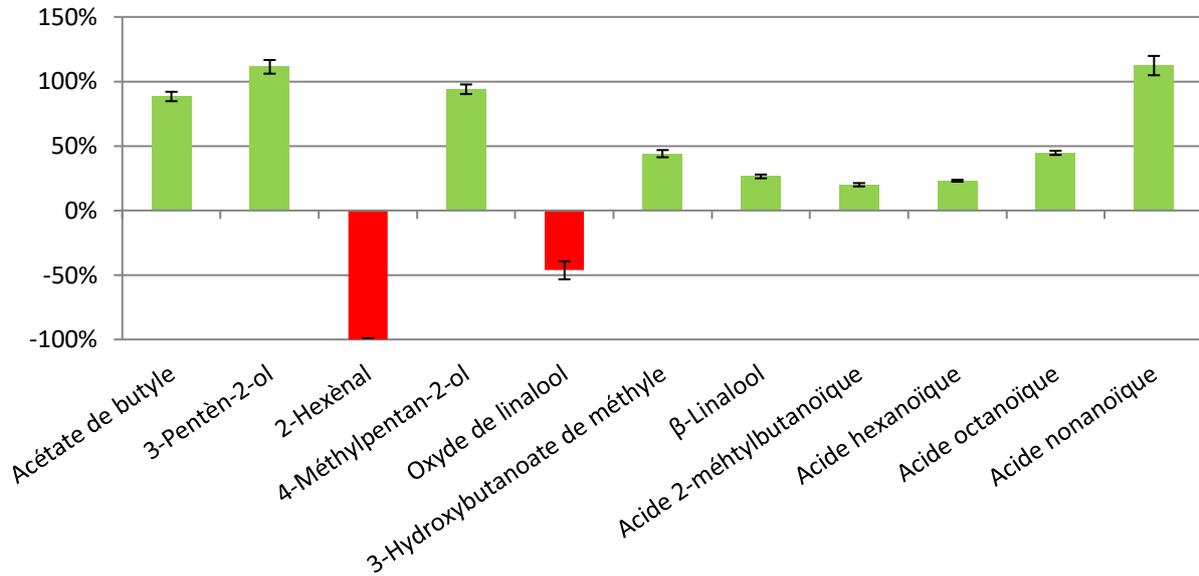


Figure 54: Augmentation ou diminution des composés volatils par ajout de NaCl dépassant les 20%

Ainsi le protocole a été modifié pour gérer l'effet exhausteur du NaCl en le rajoutant en même quantité pour l'échantillon permettant d'obtenir le profil aromatique et pour l'échantillon avec ajout d'AR2000 (Figure 55).

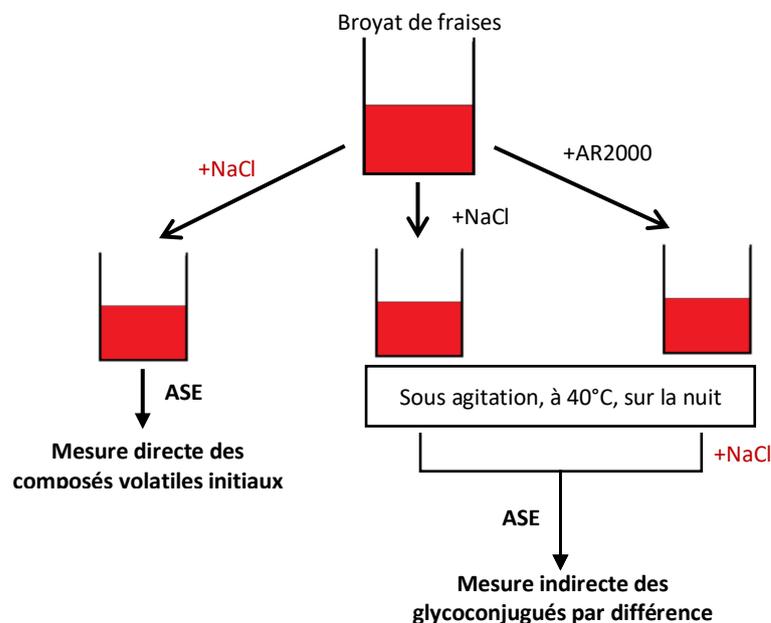


Figure 55: Schéma du protocole de préparation des échantillons à analyser avec la compensation de l'effet exhausteur du NaCl

#### 4.1.1.3.2 Impact du temps entre l'échantillonnage et l'extraction sur le profil aromatique

L'impact du temps entre la confection de la purée de fraise et l'extraction des composés volatils a été testé. Deux échantillons issus d'un même broyat de fraises *Senga sangana* (Bulgarie), l'un extrait quelques minutes après broyage et l'autre après 24h à 4°C, tous deux avec NaCl, ont été comparés (essais réalisés en triple). Les deux profils aromatiques montrent peu de différence, sauf pour l'acide hexanoïque (+50% après 24 h à 4°C) (Figure 56), l'augmentation générale observée après 24h n'étant pas significative vis-à-vis des écart-types. Aucune diminution n'a été observée lors de ces essais. Les enzymes endogènes étant inhibées par la présence de NaCl, cette modification viendrait d'une évolution chimique naturelle d'une molécule du broyat de fraises qui n'a pas été extraite (pas de diminution correspondant à l'augmentation d'acide hexanoïque entre 0 et 24 heures). Une nette augmentation des écart-types est constatée après 24 heures à 4°C. Bien que les composés volatils soient connus pour leur instabilité au cours du temps (Miekisch, Schubert, & Noeldge-Schomburg, 2004), il est plus probable que l'augmentation des coefficients de variations et l'augmentation générale non-significative de la teneur en composés volatils soient dus à une légère déshydratation de la purée par le stockage à froid (Jermini et al., 2006).

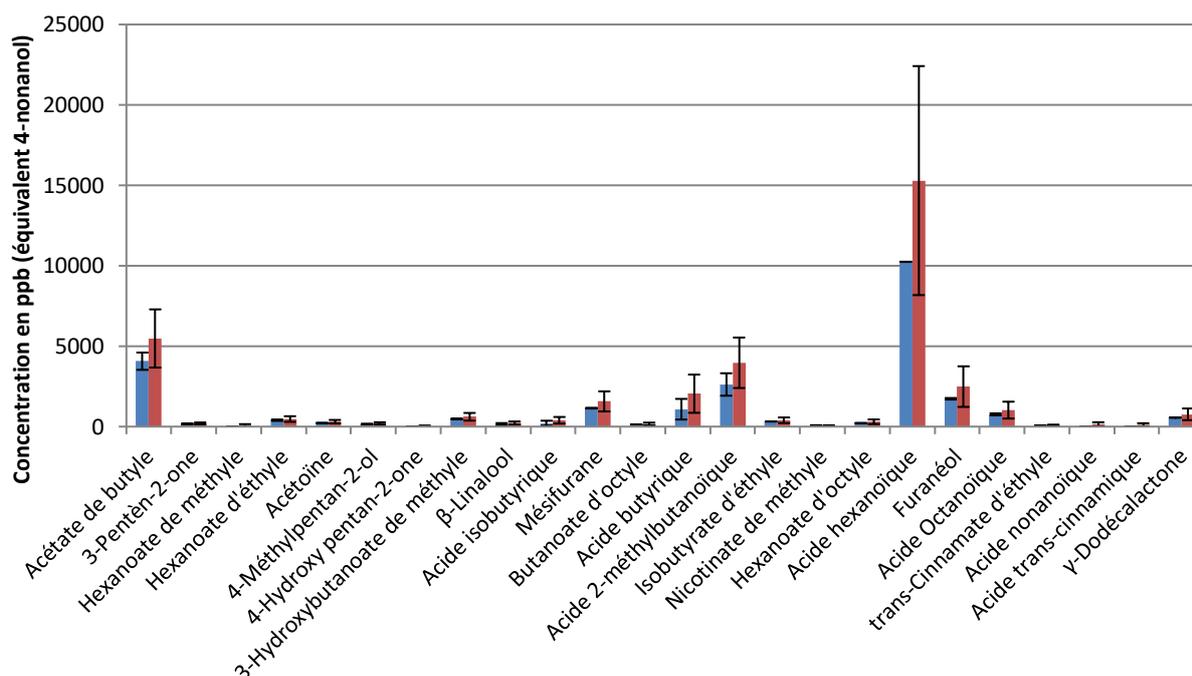


Figure 56: Comparaison des profils aromatique de purée salée de *Senga sangana* (Bulgarie) pour une extraction directement après le broyage (bleu) et après 24h à 4°C (rouge)

#### 4.1.1.4 Répétabilité de l'analyse des composés volatils

La répétabilité du protocole de préparation des échantillons et de leur analyse a été vérifiée sur de la *Senga Sangana* (Bulgarie) avec 5 répétitions. Sauf pour la coumarone et l'acide nonanoïque, le test montre des écart-types en-dessous de 20% qui est la limite de variation acceptable dans l'analyse des composés volatils (Figure 57). Ce protocole est donc validé et sera utilisé pour la caractérisation des fraises et abricots.

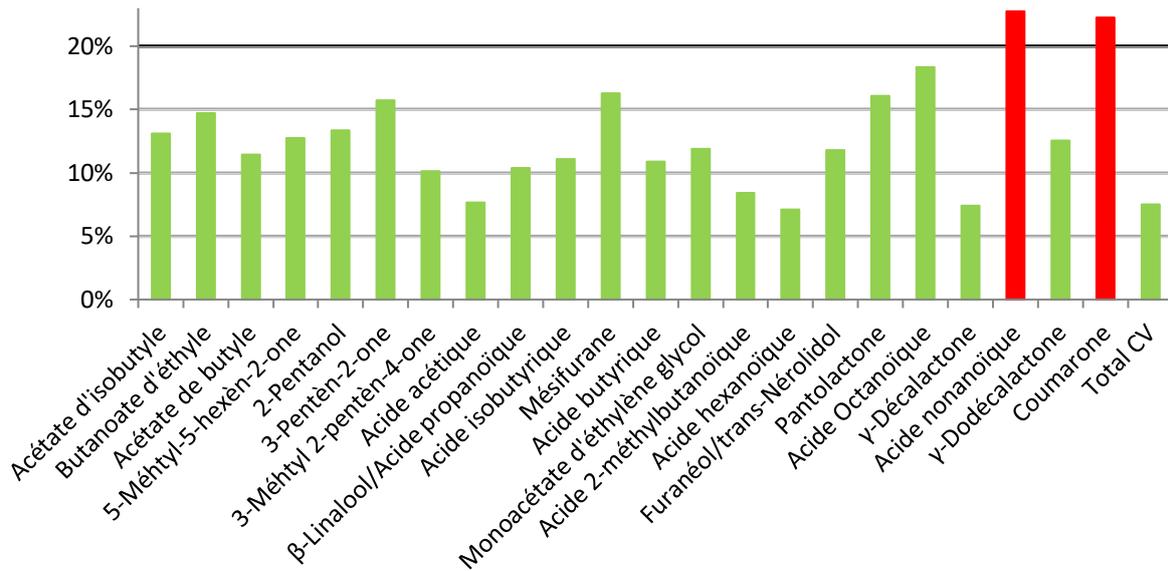


Figure 57: Coefficient de variation de la quantification des composés volatils de Sengasana (Bulgarie)

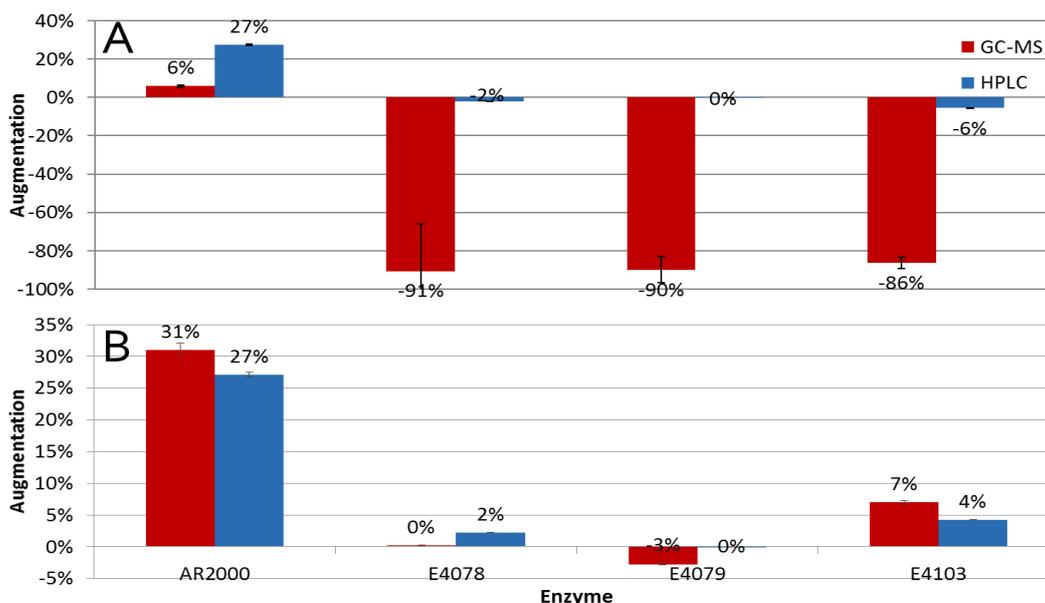
#### 4.1.1.5 Ajout d'une étape de centrifugation avant l'extraction des composés volatils

Lors de la validation de la méthode sur les différentes enzymes de *Protéus* sur fraise, les analyses par GC-MS indiquaient une perte de plus de 90% du furanéol durant l'incubation, alors que le contrôle par HPLC montrait un maintien du furanéol. Différentes hypothèses ont été proposées et vérifiées pour expliquer ces différences :

- Les enzymes ne prendraient pas en charge le glycoside de furanéol
- Des enzymes endogènes de la levure (utilisée pour la production de glycosidase) dégraderaient le furanéol
- Le milieu de culture dégraderait le furanéol

Chaque hypothèse a été testée, la première en effectuant un enzymage sur une purée de fraise avec un ajout dosé de standard de glucosides de furanéol ; ce dernier a bien été hydrolysé par les enzymes de *Protéus* (cf partie 4.2.4.1.1). La deuxième et la troisième ont été testées en comparant sur standard de glucoside de furanéol l'action d'une même enzyme de *Protéus* exprimée dans deux vecteurs différents : une bactérie, *E. coli*, et une levure, *Y. lipolytica*. Ces trois hypothèses ont été invalidées.

En effet, en HPLC la teneur en furanéol (et son glycoside) est stable après traitement par les enzymes de *Proteus*, tandis qu'après traitement par l'AR2000 la teneur en furanéol augmente de 27% (au lieu de 6% en GC-MS) (Figure 58 A), concomitamment à une diminution de 41% de la teneur en glycoside de furanéol. Il semble donc que la matrice pourrait avoir des interactions avec le furanéol durant l'extraction en ASE (rétention du furanéol par la matrice).



**Figure 58: Variation du furanéol par rapport aux composés volatiles initiaux sans centrifugation (A) et avec centrifugation (B) avant extraction**

Cette hypothèse a été testée par ajout d'une étape de centrifugation avant l'extraction par ASE. Cet ajout permet en effet de passer pour l'AR2000 de 6% d'augmentation de furanéol en GC-MS à 31% d'augmentation ce qui est alors concordant avec les résultats trouvés par analyse HPLC. Cette rétention pourrait venir de la paroi végétale. En effet, la rétention observée était moins grande avec l'AR2000 qu'avec les enzymes fournies par Protéus, or l'AR2000 possède une activité pectinase absente dans les enzymes de Protéus à ces enzymes (cf partie 1.3.5). Il est donc envisageable que la déstructuration partielle de la paroi avec l'hydrolyse de la pectine ait affaibli son effet de rétention. La solution envisagée pour contrer cet effet a été de rajouter au protocole initial une étape de centrifugation afin de ne réaliser l'extraction que sur du jus.

La quantification a été comparée entre le GC-MS et l'HPLC en prenant en compte le coefficient de réponse du furanéol par rapport au 4-nonanol pour la quantification en GC-MS. L'augmentation de furanéol avec l'AR2000 a été mesurée à 31% par GC-MS et 27% par HPLC (Figure 58 B), quant à la quantité de furanéol avec les autres enzymes, elle reste stable en HPLC et en GC-MS. Il existe donc bien une interaction entre la matrice et le furanéol dont une étape de centrifugation permet de s'affranchir (Figure 59).

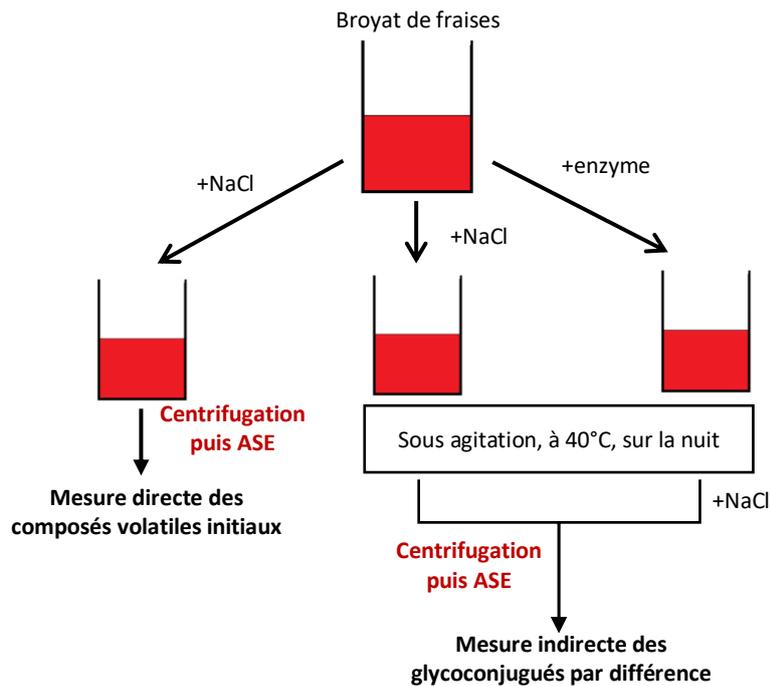


Figure 59: Schéma du protocole modifié de préparation des échantillons pour l'analyse des composés volatils

#### 4.1.1.6 Mise en place d'un contrôle HPLC pour suivre le glycoside de furanéol

La chromatographie en phase gazeuse ne permet d'apprécier l'effet des glycosidases que par l'apparition de produits volatils, sans confirmation de la consommation du substrat par l'AR2000. En effet, rien ne confirme que les molécules, dont la quantité a augmenté, viennent de l'hydrolyse des glycosides. Elle pourrait aussi bien venir de leur biosynthèse par les enzymes endogènes des fruits qui sont toujours actives.

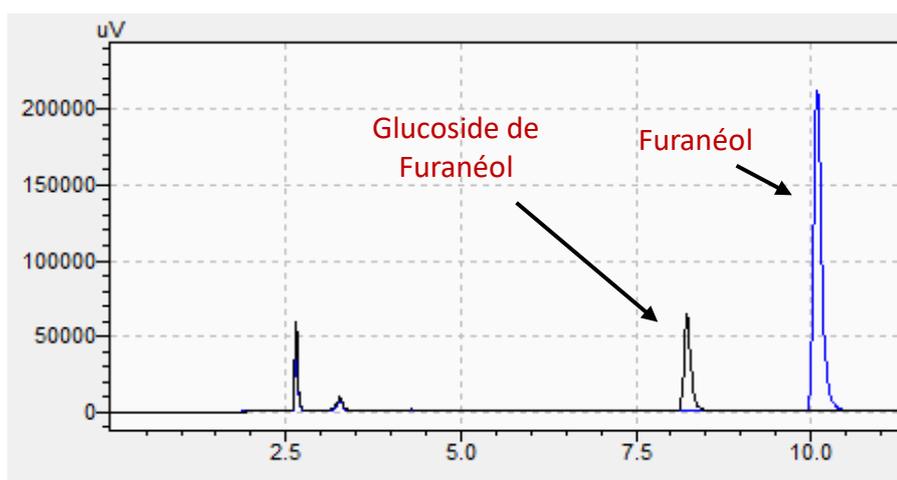


Figure 60: Chromatogramme HPLC avec le standard de furanéol et de glucoside de furanéol

Ainsi un contrôle de la réaction enzymatique a été mis en place par HPLC. Ce contrôle permet de quantifier à la fois le furanéol et le glycoside de furanéol, dont les maximums d'absorption sont respectivement de 285 nm et 275 nm (Figure 60). Cependant, ces longueurs d'onde coïncident avec une bande d'absorption commune aux polyphénols qui sont très présents dans les fruits (Muñoz et al., 2011). A cause de cela, la ligne de base était trop chargée pour obtenir une quantification convenable (cf Figure 44 en partie 3.5.4.1).

Dans un second temps, la quantification du furanéol et de son glucoside dans le jus de fraise a été effectuée après élimination des polyphénols par traitement au PVPP.

Le coefficient de réponse en GC-MS du furanéol par rapport au 4-nonanol est de 9. Ainsi, pour une même solution initiale à 1 g/L de furanéol, les concentrations mesurées par GC-MS et HPLC étaient respectivement de 0,11 g/L et de 1 g/L. L'analyse HPLC peut donc être utilisée comme un contrôle quantitatif de l'analyse par GC-MS de l'action des glycosidases.

#### **4.1.2 Caractérisation des composés volatils de fraises industrielles et de fraise de bouche et de sa réserve**

Cette partie est un article rédigé à la suite de l'étude et la comparaison des profils aromatiques et des profils de la réverse aromatique de fraises de bouches et de fraises destinées à la transformation en industrie. Il a été publié et accepté dans le journal « LWT – Food Science and Technology », volume 98 (2018), p. 187-196. Les auteurs sont Stéphane Gaborieau, Aurélie Cendrès, David Page, Christian Ginies et Catherine M.G.C. Renard. L'article s'intitule « Variability of free and glycosylated volatiles from strawberries destined for the fresh market and for processing, assessed using direct enzymatic hydrolysis ».

Résumé : Les profils des composés volatils libres et sous forme glycosylés de 14 variétés de fraises ont été comparés (9 destinées à la transformation industrielle ('Darselect', 'Clery', 'Honey', 'Honeoye', 'Siabel', 'FCMO060', 'Fraise19', 2 'Senga Sangana') et 5 pour le marché du frais ('Gariguette', 'Charlotte', 'CIR121', 2 'Clery' (plein champ et hydroponique))). Tous les composés volatils ont été analysés par GC-MS. Les substances volatiles provenant des glycosides ont d'abord été libérées par hydrolyse enzymatique directe. La méthode d'extraction a été optimisée pour le furanéol, un composant clé de l'arôme de fraise. Plus de 60 composés volatils ont été identifiés, les plus abondants étant l'acétate de butyle (moyenne : 17 mg/kg), le furanéol (moyenne : 2 mg/kg) et l'acide hexanoïque libre (moyenne : 3 mg/kg). Les profils des composés volatils libres montraient une séparation entre les fraises destinées au marché frais, caractérisées par des esters et des carbonyles comme l'acétate d'isobutyle ou l'hexanal, et les fraises destinées à la transformation, différenciées par des molécules telles que le 3-penten-2-one et le 1-butanol. Les trois profils de 'Clery' différaient notamment par leurs concentrations en hexanal, 4-vinylguaïacol et 3-pentèn-2-one. Les profils des composés volatils glycosylés étaient similaires chez la plupart des variétés de fraises, avec comme principaux composés volatils glycosylés, l'acide hexanoïque

(moyenne : 1,7 mg/kg), l'alcool benzylique (moyenne : 0,5 mg/kg), la gamma-décalactone (moyenne : 0,5 mg/kg) et le coumarone (moyenne : 2,5 mg/kg). Le potentiel d'amélioration volatile par déconjugaison était différent. Les fraises destinées au marché frais ont une augmentation potentielle en composés volatils de 6% contre 50% pour les fraises destinées à la transformation.

Les principales conclusions sont :

Une distinction notable se fait entre les profils aromatiques des fraises de bouche et ceux des fraises destinées à la transformation. Les premières sont plus riches en esters alors que les secondes sont plus riches en acides. Cette différence pourrait être expliquée par leurs utilisations, leur sélection résultant d'objectifs distincts. Les fraises à transformer doivent conserver leur texture et leur couleur après traitement, en particulier dans les produits laitiers alors que les fraises de bouche sont à consommer fraîches et demandent donc un arôme intense.

Dans cette étude, les profils de la réserve aromatique sont très proches peu importe la variété de fraise et son utilisation. Si cet aspect est généralisé, il serait très positif pour les industries de la transformation des fruits qui sont tributaires de la variabilité de la qualité et de l'origine de leur matière première. En effet les industriels ont besoin de normaliser leurs produits pour fidéliser leur clientèle et ce malgré des mélanges de variétés et des qualités organoleptiques variable d'une saison à l'autre (Pelayo-Zaldívar, Ebeler, & Kader, 2005). Avoir une réserve aromatique similaire dans toutes les variétés d'un même fruit permettrait d'appliquer un procédé de libération de cette réserve sans craindre de devoir systématiquement réajuster le produit fini.

La caractérisation des réserves glycosidiques des fraises de bouches et des fraises destinées à la transformation a mis en évidence l'intérêt de libérer la réserve des fraises des industriels avec une augmentation moyenne de la teneur en composés volatils de 50%. La caractérisation de la réserve des fraises des partenaires Agro'Novae et Sénagral montre que la libération de ces composés augmenterait principalement les notes fruitées (acétate de 3-méthylbutyle,  $\gamma$ -décalactone,  $\gamma$ -dodécalactone), florales (alcool benzylique, 2-phényléthanol) et vertes ((2E)-hexenol, coumarone) et elle augmenterait les notes fruitées (benzaldéhyde,  $\gamma$ -décalactone), florales (linalool, oxyde de linalool, 2-phényléthanol), « citrus » (limonène, terpinéol) et « herbe » (*p*-menth-1-ène-9-ol). Ces quantités de réserve sont à comparer aux quantités estimées en utilisant la méthode « classique » de SPE. Dans plusieurs études utilisant cette méthode la concentration en glycosides est estimée entre 2 à 8 fois supérieures comparées à leurs homologues libres dans la fraise (Roscher et al. 1997).

#### 4.1.2.1 Abstract

Free- and glycosylated-volatile profiles of 14 strawberry varieties, 9 for industrial processing ('Darselect', 'Clery', 'Honey', 'Honeye', 'Siabel', 'FCMO060', 'Fraise19', 2 'Senga Sangana') and 5 for fresh market ('Gariguet', 'Charlotte', 'CIR121', 2 'Clery' (full-field and hydroponic)), were compared. All volatiles were analysed by GC-MS. Volatiles from glycosides

were first released by direct enzymatic hydrolysis. The extraction method was optimised for furaneol, a key component of strawberry aroma. More than 60 volatile compounds were identified, the most abundant being butyl acetate (average: 17 mg/kg), furaneol (average: 2 mg/kg) and free hexanoic acid (average: 3 mg/kg). Free-volatile profiles showed a split between fresh market strawberries, distinguished by esters and carbonyl molecules like isobutyl acetate or hexanal, and strawberries for processing, distinguished by molecule like 3-penten-2-one and 1-butanol. The three 'Clery' profiles were different notably in their hexanal, 4-vinylguaiacol and 3-penten-2-one concentrations. The glycosylated volatile profiles were similar among most strawberry varieties with, as major glycosylated volatiles, hexanoic acid (average: 1.7 mg/kg), benzyl alcohol (average: 0.5 mg/kg), gamma-decalactone (average: 0.5 mg/kg) and coumarone (average: 2.5 mg/kg). The potential for volatile enhancement by deconjugation was different. Potentially fresh market strawberries had a volatile increase of 6% against 50% for strawberries for processing.

**Keywords:** glycoside, glycosidase, GC-MS, aroma, *Fragaria x ananassa*

#### 4.1.2.2 Introduction

Over 4.3 millions of tons of strawberries are produced each year, out of which 80% to 90% are destined for the fresh market (López-Aranda et al., 2011) and the rest for processing. Strawberries are found in juices, in jams and in semi-processed food products, which can be incorporated in yogurt, ice cream or pastry. Strawberry is also the most appreciated fruit by French consumers and 92% of them (Bhat et al., 2015) like strawberries because of their specific aroma. Therefore, aromatic potential of strawberries for processing interest for future process optimisation to preserve or enhance the aromatic power of strawberries.

The molecules most impacting strawberry aroma (Nuzzi et al., 2008) are furaneol, mesifuran, ethyl butanoate, ethyl hexanoate,  $\beta$ -linalool and hexanal. They are responsible for "caramel", "apple-like", "fruity" and "green" notes, respectively, in strawberries. Several molecules are not ubiquitous but are important for the aroma of strawberries in which they are found. This is the case of gamma-decalactone with "peach-like" note found in 'Elsanta' or 'Senga Sangana' varieties or trans-nerolidol with "floral" note found in 'Elvira' or 'Pandra' varieties (Larsen et al., 1992). Despite its complexity, scientists agree that furaneol is the key molecule (Wein et al., 2002); (Ulrich, Hoberg, Rapp, & Kecke, 1997). This furanone is obtained by several successive enzymatic transformations of D-fructose-1,6-diphosphate, the last one of which is a reduction by a quinone oxidoreductase (Raab, 2006).

Various parameters can influence the aroma of strawberries (Perez et al., 1992); (Miszczak, Forney, & Prange, 1995). The first one is genetic. Indeed (Aharoni, 2004) compared the aroma profile of wild strawberries (*Fragaria vesca*) and cultivated strawberries (*Fragaria x ananassa*). Nerolidol dominates among terpenes in cultivated strawberries, while, in wild strawberries, monoterpenes like  $\beta$ -myrcene and  $\alpha$ -pinene, responsible of the characteristic musky aroma of this species, are more prevalent (Bianchi, Lovazzano, Lanubile, & Marocco, 2014). Maturity also impacts

the strawberry aroma: (Forney, Kalt, & Jordan, 2000) showed an increase of methyl butanoate and methyl hexanoate with maturity and Darbellay, Luisier, Villettaz, Amadò, & Azodanlou (2004) a decrease of (Z)-3-hexenyl acetate and an increase of ethyl hexanoate during ripening in 'Carezza', 'Darselect' and 'Marmolada' varieties. The atmosphere during packaging also impacts volatile production: (Nielsen & Leufven, 2008) showed an increase of ethyl acetate (fermented molecules) with CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere in the 'Korona' variety.

However not all volatiles exist as such in the intact raw fruit. Some are formed during eating or processing by endogenous enzymes acting on precursors. A well-known reaction cascade is that of lipoxygenase leading to "green" notes from fatty acids (Pérez et al., 1999). Another major route is that of glycosides, where the flavour-bearing molecules (aglycones which become volatile if liberated) are bound to sugars for storage. The sugar moiety can be a mono- or disaccharide and more rarely a trisaccharide, the first aglycone-bound sugar always being  $\beta$ -D-glucose (Sarry & Günata, 2004). These precursors are present in all fruits, including strawberries. They were studied by (Stahl-Biskup, Intert, Holthuijzen, Stengele, & Schulz, 1993) in apples, apricots, blackberries, mangoes, plums and tomatoes or (Y. Z. Günata et al., 1985) in grapes. In strawberries, furaneol, mesifuran, benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, hydroxylinalool, 2-methylbutanoic acid or hexanoic acid can be found as glycosides (Groyne et al., 1999). For example furaneol is predominantly conjugated to malonyl-D-glucose (Raab, 2006).

These glycosides are traditionally identified and quantified after isolation by solid phase extraction (SPE) (Young & Paterson, 1995). SPE consists in injecting the fruit extract on an XAD-2 or a C18-column, which binds the aglycone moieties of the glycosides. The sugars and free volatiles are first eluted by water and dichloromethane, respectively; the glycosides are thereafter eluted with another solvent (generally methanol) (Ubeda et al., 2012; Roscher, Herderich, Steffen, Schreier, & Schwab, 1996). This method allows to eliminate matrix interactions. However, it is not adapted to compare free volatiles to bound volatiles because of the discrimination that is generated by affinity extraction, and because the natural evolution of volatiles in fruit matrices is not considered. Indeed, Hampel, Robinson, Johnson, & Ebeler (2014) showed that this pre-treatment leads to a loss and a discrimination of many compounds, and can not be used to compare free volatile to glycoconjugated volatiles. They advised direct hydrolysis to compare quantitatively free and bound volatiles.

The aim of this study is to establish direct hydrolysis by AR2000 glycosidase as a method to compare aroma profiles and aromatic potentials of processing and fresh market strawberries. Fourteen strawberry batches, 9 for processing (obtained from industrial sources) and 5 for fresh market (obtained from CIREF (Centre Interrégional de Recherche et d'Expérimentation de la Fraise, Douville (France)) were characterised. Direct enzymatic hydrolysis was combined with GC-MS analysis and descriptive statistics to evaluate aromatic potential of these strawberries.

### 4.1.2.3 Materials & methods

#### 4.1.2.3.1 Plant material

Strawberries for processing were commercial samples harvested in 2015, individually quick frozen (IQF), and stored at -20°C. Among them, 'FCMO' and 'Fraise19' are a mix of several strawberry varieties used by the French food industry. Fresh market strawberries were from CIREF, harvested in 2016, and were frozen at -20°C (Table X).

#### 4.1.2.3.2 Reagents and solvents

Pentane (Normapur purity ≥99.9%) and Ethyl acetate (purity ≥99.9%) were purchased from VWR International (Darmstadt, Germany). Enzymatic kits to measure D-glucose/fructose (ref: E 0139106), D-glucose (ref: E 0716251), L-malic acid (ref: E 0139 068) and citric acid (ref: E 0139076) were from R-Biopharm (Darmstadt, Germany). Hydromatrix™ (diatomaceous earth) was from Agilent Technologies (Les Ulis, France). The internal standard was 4-nonanol (purity > 97 %) from Merck Schuchardt (Hohenbrunn, Germany). The AR2000 enzyme to measure the aromatic potential came from Oenobrand (Montferrier-sur-Lez, France) as freeze-dried powder (6.17 nkat/mg of powder). For retention index (RI) calculations in GC-MS, a solution of C7-C30 saturated alkane 1000 µg/mL (ref: 49451-U) from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA) was used.

#### 4.1.2.3.3 Fruit characterisation

##### Brix and pH

Strawberries (about 100 g) were ground and used for measurement of Brix degree using a digital refractometer PR-101 from Agato (Tokyo, Japan) and of pH using pHmeter FE20 FireEasy from Mettler Toledo (Viroflay, France).

##### Sugars and Acids

Sugars (glucose, fructose, sucrose) and main organic acids (citric acid and malic acid) were quantified by colorimetric enzymatic measurements with kits for food analysis from R-Biopharm (Darmstadt, Germany) and expressed in g.kg<sup>-1</sup> FW. The measurements were performed on a 96 well-microplate with a SAFAS (FLX-Xenius, SAFAS, Monaco) equipped with an automatic injection device (Garcia & Renard, 2014).

#### 4.1.2.3.4 Characterization of Volatiles Compounds

##### Sample preparation:

A dozen of frozen strawberries (around 150 g) were mashed for 1 min in a blender (Waring-Nova, Grosseron, St. Herblain, France) (Figure 1). An aliquot (40 g) was sampled for enzymatic hydrolysis with 40 mg of AR2000. Sodium chloride was added to the rest of the mashed strawberries (75 g/100 g of strawberry) to inhibit endogenous enzymes. After another mixing, this was divided: one aliquot of 40 g used for incubation (hydrolysis negative control) and an aliquot for direct extraction (determination of free volatiles). After incubation (24 h, 40°C with stirring at

120 rpm), salt was added to the hydrolysed aliquots to have the same salting-out effect during extraction of volatile compounds by accelerated solvent extraction.

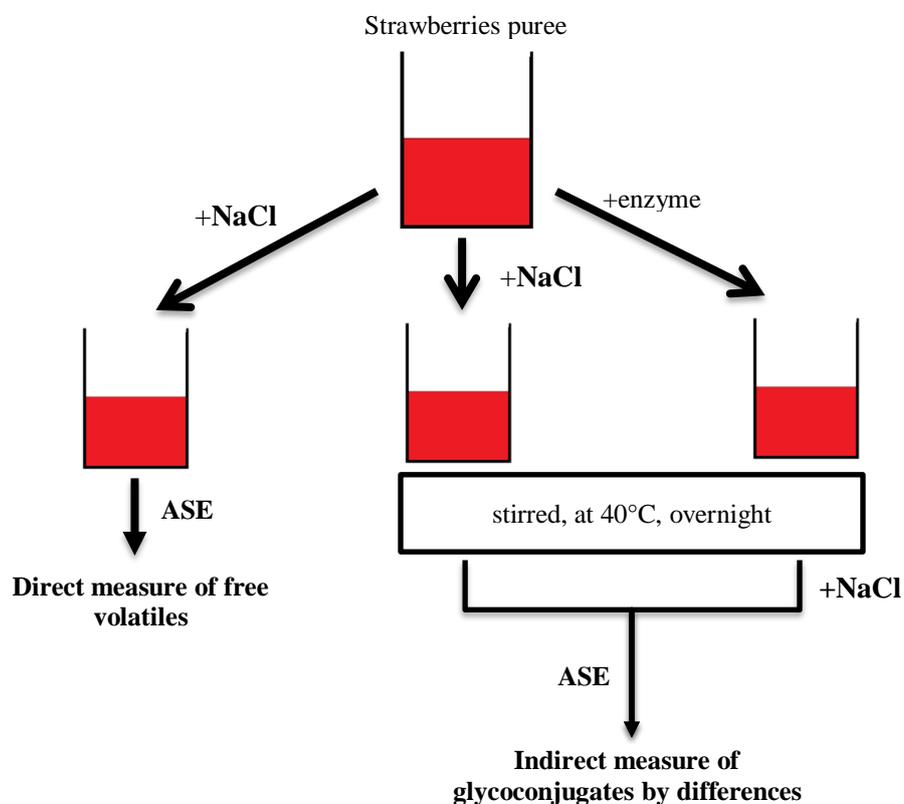


Figure 61 : Scheme of strawberries preparation for assisted-solvent extraction (ASE) of volatiles and sampling point for analysis of free- and bound-volatiles

#### Accelerated solvent extraction (ASE)

Hydromatrix™ (13 g) and 4-nonanol (11.24 µg diluted in 100 µL of methanol), as internal standard, were mixed with 7.5 g of mashed fruit to obtain a homogeneous powder while inactivating enzymes. The powder was rapidly transferred to a 33 mL pressurized extraction cell for immediate extraction. The extractor was an ASE 200 system (Dionex, Sunnyvale, CA). Extraction conditions were as follows: pentane and ethyl acetate (1:2, mL:mL) as solvent,  $10^7$  Pa, 40 °C, 5 min preheating then 5 min static incubation. The extract was concentrated to 1 mL by distillation under vacuum (300 Pa, 25°C, using a Multivapor R12, Büchi, Rungis, France) then by nitrogen flux prior to gas chromatography.

#### GC-MS

Samples (1 µL) were injected into a GC-MS system (Trace1300-ISQ LT; Thermo scientific, USA) equipped with a TG-WAXMS capillary column [30 m, 0.25 mm i.d., 0.5 µm film thickness] (Thermo scientific).

Injection was in splitless mode at 250 °C. The carrier gas was helium with a constant flow of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. Oven temperature program was 35 °C for 2 min ramped at 5°C.min<sup>-1</sup> to 230°C then held for 5 min. Mass spectra were obtained by electron ionization at 70 eV, with scanning from m/z 35 to 250 at 2 scans.s<sup>-1</sup>.

Volatile levels were expressed in micrograms per kilograms of juice (ppb) in 4-nonanol equivalent. Aromatic potential was calculated by difference between hydrolysed samples and incubated control samples. This aromatic potential was compared to the initial free volatile profile to observe molecules increase or decrease. Aromatic potential corresponds to glycoconjugates released by AR2000 and the evolution of these molecules and original free volatiles under action of endogenous enzymes.

Data were collected with GC-MS Solution software Chromeleon 7.2 and, when it was possible, the major compounds were identified by their retention index and their mass spectra using the mass spectral database NIST 14 (US National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA)].

#### 4.1.2.3.5 Statistics

For each batch, three samples of twelve strawberries each were analyzed. Principal Component Analysis (PCA) was performed with XLSTAT software (Addinsoft, France) to compare the 14 strawberry varieties with quantified volatiles as variables. Correlation factor was calculated by Pearson's method.

#### 4.1.2.4 Results

##### 4.1.2.4.1 General characteristics of the strawberries

Global characteristics of the strawberry are summarized in Table X. The average pH was 3.5 and the average Brix degree was between 8~9. This is coherent with previous studies (Schwieterman et al., 2014). The main acid was citric acid but with a high proportion (~30%) of malic acid. Acid concentrations were similar among all strawberries (fresh market or for processing). Glucose, fructose and sucrose are present in similar proportions (around 30% for glucose, 45% for fructose and 25% for sucrose) among the strawberries for processing while table strawberries had no sucrose but had higher fructose and glucose concentrations. In strawberries, sucrose does not vary during ripening (Sturm, Koron, & Stampar, 2003) so this difference can not be explained by a simple difference of maturity. Interestingly, the three Clery samples had similar pH but different Brix degree (7.8 for Clery; 6.9 for Clery PC; 8.6 for Clery HS) with an absence of sucrose for Clery PC and Clery HS from CIREF.

Tableau X : Physico-chemical characteristics and origin of strawberries material

	<i>Origin</i>	<i>Harvest year</i>	<i>Glucose<sup>a</sup></i>	<i>Fructose<sup>a</sup></i>	<i>Sucrose<sup>a</sup></i>	<i>Citric acid<sup>a</sup></i>	<i>Malic acid<sup>a</sup></i>	<i>Brix</i>	<i>pH</i>
<b>FCMO060</b>	Spain	2015	1.59±0.11	2.26±0.08	1.94±0.37	0.50±0.05	0.28±0.01	6.1±0.2	3.6±0.2
<b>Siabel</b>	Bulgaria	2015	1.75±0.25	2.49±0.08	1.41±0.35	0.70±0.08	0.31±0.03	ND	3.5±0.2
<b>Clery</b>	?	2015	2.12±0.31	3.19±0.46	1.88±0.32	0.40±0.01	0.18±0.01	7.8±0.2	3.7±0.2
<b>Honeoye</b>	Bulgaria	2015	2.30±0.28	2.92±0.33	1.91±0.40	0.62±0.09	0.27±0.03	8.6±0.3	3.8±0.2
<b>Honey</b>	China	2015	1.37±0.28	2.20±0.26	0.96±0.02	0.46±0.02	0.18±0.03	6.2±0.2	3.7±0.2
<b>Senga sangana</b>	Bulgaria	2015	2.49±0.31	2.83±0.34	2.32±0.27	0.70±0.20	0.37±0.01	9.7±0.3	3.5±0.2
<b>Darselect</b>	Germany	2015	2.36±0.62	2.84±0.17	1.43±0.30	0.66±0.21	0.18±0.01	8.4±0.3	3.5±0.2
<b>Senga sangana</b>	Poland	2015	1.59±0.48	2.40±0.37	1.17±0.13	0.50±0.02	0.25±0.05	7.7±0.3	3.4±0.2
<b>Fraise 19</b>	Morocco	2016	1.42±0.17	1.97±0.35	0.73±0.38	0.36±0.22	0.19±0.01	6.4±0.2	3.6±0.2
<b>CIR121</b>	France (CIREF)	2016	3.00±0.04	2.94±0.12	0.00	0.81±0.02	0.29±0.00	9.0±0.3	3.7±0.2
<b>Clery PC</b>	France (CIREF)	2016	2.39±0.03	2.39±0.11	0.00	0.59±0.03	0.19±0.00	6.9±0.2	3.5±0.2
<b>Clery HS</b>	France (CIREF)	2016	2.91±0.07	2.83±0.35	0.00	0.94±0.03	0.25±0.01	8.6±0.3	3.5±0.2
<b>Charlotte</b>	France (CIREF)	2016	3.60±0.04	3.67±0.19	0.00	0.73±0.02	0.21±0.00	11.1±0.3	3.9±0.2
<b>Gariguette</b>	France (CIREF)	2016	2.80±0.15	2.76±0.26	0.00	0.96±0.04	0.35±0.01	9.0±0.3	3.4±0.2

<sup>a</sup> in g per 100 g of fresh material ; PC : Full-field ; HS : Hydroponis

#### 4.1.2.4.2 Optimisation of volatile extraction

The extraction solvent was optimized for furaneol, being a key molecule for strawberry aroma. In a pre-test, a synthetic solution of furaneol (0.5 g/L) was extracted by n-pentane/dichloromethane (2:1 mL:mL), dichloromethane or n-pentane/ethyl acetate (1:2 mL:mL). One millilitre of this standard solution was extracted with 1 mL of solvent three times and extracts were injected after concentration. Extraction yields were of 27% with n-pentane/dichloromethane, 65% with dichloromethane and 90% with n-pentane/ethyl acetate, which was therefore retained as solvent for all subsequent extractions. This comparison was completed by ASE on strawberry purees and out of 34 quantified compounds (Figure 62), 30 compounds had a better extraction yield with n-pentane/ethyl acetate (1:2 mL:mL) compared to 4 compounds (isobutyl acetate, 3-penten-2-ol, acetoin and 4-methylpentan-2-ol) for dichloromethane. N-pentane/dichloromethane (2:1 mL:mL) seemed to be the worst solvent for strawberry volatile extraction. N-pentane/ethyl acetate was thus selected to extract volatiles from strawberries for this study.

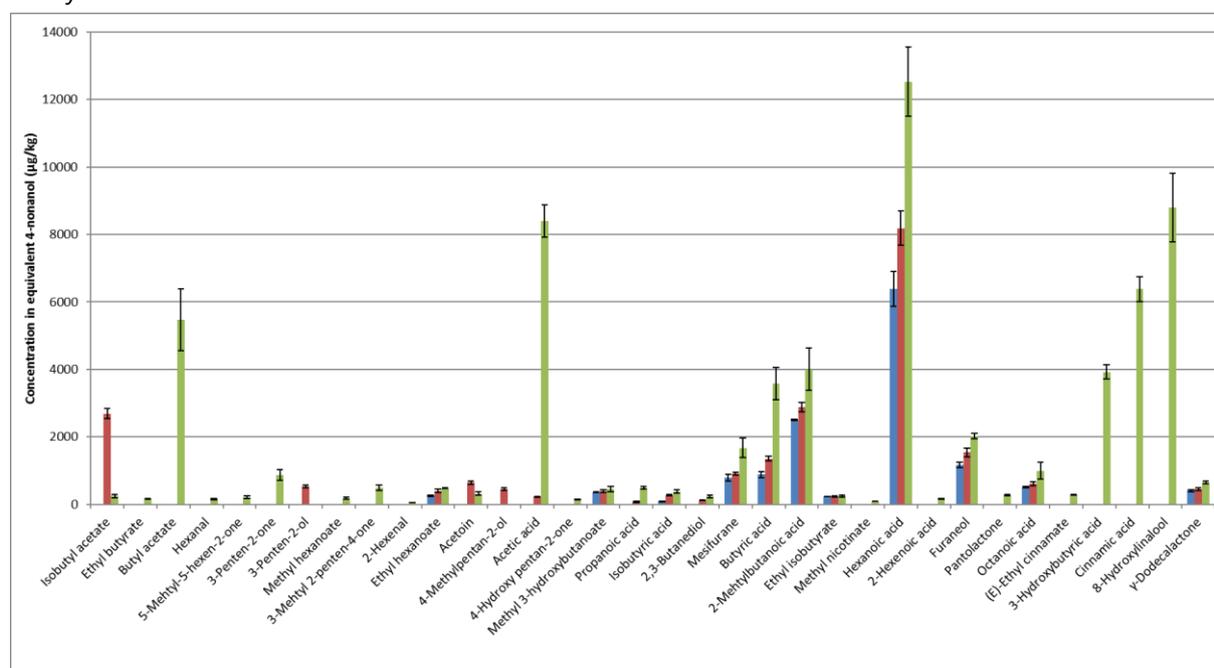


Figure 62: Concentration of volatiles after extraction by ASE method with: dichloromethane/pentane (1:2) (blue), dichloromethane (red), ethyl acetate/pentane (2:1) (green)

Tableau XI: Identified<sup>a</sup> volatile compound in GC-MS analyses of strawberries samples

	Calculated RI <sup>b</sup>	Perception threshold in water (µg/L)	Odortype	Ref <sup>c,d</sup>
<b>Acids</b>				
(E)-2-Hexenoic acid	1980	NA	fruity	7
2-Methylbutanoic acid	1662	180	acidic	1;2;3;6;7
3-Hexenoic acid	1954	NA	cheesy	
3-Methylhexanoic acid	1916	NA	-	7
Butanoic acid	1625	240	cheesy	1;2;5;7
Citraconic / itaconic acid*	1040	NA	-	
Formic acid	1503	NA	acetic	7
Hexanoic acid	1846	3000	fatty	1;2;5;7
Isobutanoic acid	1570	8100	acidic	1;2;5;7
Nonanoic acid	2171	3000	fatty	5;7
Octanoic acid	2060	3000	waxy	2;5;7
Propanoic acid	1535	20000	acidic	1;7
Succinic anhydride*	2103	NA	-	
<b>Alcohols</b>				
1-Butanol	1142	500	fermented	4;7
1-Hexanol	1355	800	herbal	1;2;3;5;7
2,3-Butanediol	1543	4500	creamy	
3-Phenylpropyl alcohol	2039	NA	balsamic	7
4-Vinylguaiacol	2188	3	spicy	4;7
Benzyl alcohol	1870	10000	floral	2;4;7
Chavicol	2334	NA	phenolic	
4-Ethylphenol	2187	NA	smoky	
Phenol	2000	5900	phenolic	
5-methyl-3-hexen-2-ol	1274	NA	green	
3-hexen-1-ol	1398	70	green	2;7
2-Phenylethyl alcohol	1906	4	floral	7
<b>Aldehydes</b>				
Hexanal	1078	NA	-	7
<b>Esters</b>				
3-Methylbutyl acetate	1122	2	fruity	3;7
Butyl acetate	1074	66	ethereal	1;2;3;5;6;7
Ethyl 3-hydroxybutanoate	1515	NA	fruity	7
Ethyl butanoate	1035	1	fruity	1;3;5;6;7
Ethyl (E)-cinnamate	2127	NA	balsamic	7
Ethyl hexanoate	1233	1	fruity	1;3;5;6;7
Ethyl isobutanoate	961	0.1	fruity	7
Isobutyl acetate	1012	66	fruity	7

Methyl 3-hydroxybutanoate	1461	NA	apple	7
<b>Furans</b>				
2-Hydroxyfuraneol	1518	NA	-	
5-(Hydroxymethyl)-2-furfural	1660	NA	fatty	
Furaneol	2031	0.03	caramellic	1;2;3;4;5;6;7
Mesifurane	1580	0.03	musty	1;2;3;4;5;6;7
<b>Ketones</b>				
1,2-Cyclopentanedione*	1742	NA	caramellic	
2-Hexanone	1083	NA	fruity	3;7
3-Methyl 2-penten-4-one	1187	NA	vegetable	
3-Penten-2-one	1128	1.5	fruity	7
Acetoin	1284	800	buttery	7
2-hydroxy-4-pyranone	1990	NA	-	
<b>Lactones</b>				
delta-Caprolactone	1791	NA	herbal	7
gamma-Caprolactone	1694	1600	tonka	2;5;7
gamma-Decalactone	2138	11	fruity	1;2;3;4;5;7
gamma-Dodecalactone	2374	7	fruity	2;7
Pantolactone	2029	NA	caramellic	4
<b>Terpenes</b>				
alpha-(E,E)-Farnesene	1746	NA	woody	
beta-Linalool	1547	6	floral	1;2;3;5;6;7
trans-Linalool oxide (pyranosid)	1721	320	floral	1;2;5;7
alpha-Muurolene	1726	NA	woody	
1-Terpineol	1576	300	citrus	4;7
trans-Nerolidol	2042	300	floral	1;2;3;5;7
<b>Others</b>				
Coumarone	2389	NA	green tea	
Ethyl methyl benzene*	1225	NA	-	
Ethylene glycol diacetate	1535	NA	-	
1,1-diethoxybutane	990	NA	-	7
unknown	1995	NA	green	

<sup>a</sup> Identified by NIST library (version 2.2)

<sup>b</sup> On polar column (TG Wax)

<sup>c</sup> References where identified volatiles were also found.

<sup>d</sup> 1: Larsen et al. (1992); 2: Ménager et al. (2004); 3: Schwieterman et al. (2014); 4: Ubeda et al. (2014); 5: Lambert et al. (1999); 6: Darbellay et al. (2003); 7: VCF Volatile Compounds in Food database – Strawberry fruit (2007-Feb-08 version 9.1)

\*only identified by MS

#### 4.1.2.4.3 Identification of volatiles

More than 60 volatile compounds were detected and identified (Table XI). Most representative compounds of a strawberry aroma were found: furaneol, mesifuran, ethyl butanoate, gamma-decalactone,  $\beta$ -linalool, trans-nerolidol, butyl acetate, ethyl hexanoate, butanoic acid, isobutanoic acid and hexanoic acid (Larsen et al., 1992) ; Ménager, Jost, & Aubert, 2004 ; (Schwieterman et al., 2014) ; Ubeda, Callejón, Troncoso, Morales, & Garcia-Parrilla, 2014 ; (Lambert et al., 1999) ; (Darbellay et al., 2004). Some molecules, like 2-phenylethyl alcohol (rose aroma) or 1-terpineol (citrus aroma), were only detected after glycoconjugate release. Cinnamic acid, another characteristic molecule of strawberry, was also found but it had a variability too large to be considered in interpreting the results. In the same triplicate, it can be absent or present in a quantity higher than 10 mg/kg.

#### 4.1.2.4.4 Free volatiles profile

Free volatiles profiles (Suppl. data) were analyzed by PCA (Figure 63) and their repartition by chemical class is presented in Table XII. The sample map (Figure 63 A) showed two groups of samples. The first principal component clearly separated strawberries for processing from fresh market strawberries while the second principal component differentiated 'Darselect' from all others. Each initial batch was distinct from the others except 'Fraise19' and 'FCM0', which were co-located. These two "varieties" come from a mix used by food industry, which may explain the similitudes between them. The correlation circle (Figure 63 B) indicated that strawberries for processing are differentiated by volatiles like 2,3-butanediol, pantolactone, acetoin, 3-phenylpropyl alcohol or butanoic acid. Molecules like benzyl alcohol, caprolactones, octanoic acid and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural with, respectively, floral, fruity, acidic and caramel notes, seemed responsible for the 'Darselect' differentiation. Fresh market strawberries were differentiated by carbonyls and esters like hexanal, 3-methylbutyl acetate, isobutyl acetate, 2-hexanone. Again, the three 'Clery' batches were distinct, indicating that their volatile profile would not depend only on genetics but also on cultivation method and pedoclimatic conditions. The variety 'Gariguette' was distinguished by methyl hexanoate, 2-methylbutanoic acid and isobutyric acid.

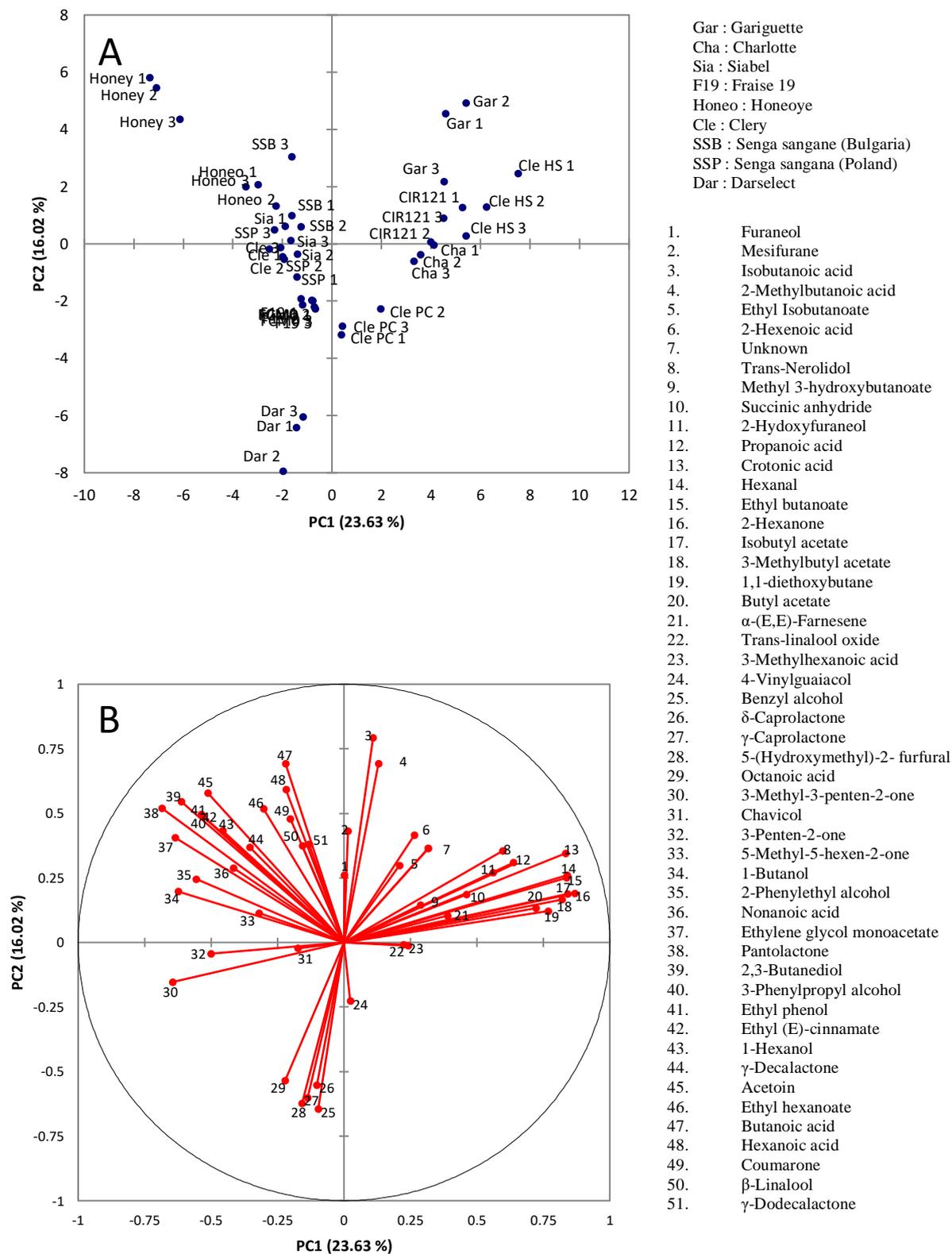


Figure 63: Principal component analysis of free-volatiles in strawberries. *A. Sample map; B. Variable correlation map*

Tableau XII: Number of molecules and quantitative repartition for chemical classes in strawberries free-volatiles

	TOTAL (µg/kg <sup>a</sup> )	Acid		Alcohol		Aldehyde		Ester		Furan		Ketone		Lactone		Terpene		Other	
		Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio
Clery	16608±1099	6	44%	3	7%	0	0%	4	15%	1	13%	4	6%	4	4%	2	3%	2	8%
Darselect	13187±2627	2	38%	1	1%	0	0%	2	19%	3	26%	2	5%	3	10%	1	0%	0	0%
FCMO060	9130±877	3	27%	1	7%	0	0%	1	15%	1	16%	1	4%	2	24%	1	1%	1	7%
Fraise19	9769±1415	4	33%	1	5%	0	0%	1	13%	2	13%	1	16%	2	14%	1	1%	1	6%
Honeoye	34176±1785	6	48%	1	2%	0	0%	2	12%	2	8%	4	4%	4	17%	2	2%	2	6%
Honey	30505±1274	7	28%	5	21%	0	0%	3	10%	2	8%	4	12%	3	14%	2	1%	2	6%
Senga sangana (Bulgaria)	21154±2672	7	38%	2	5%	0	0%	4	11%	2	19%	3	3%	3	5%	2	2%	1	19%
Senga sangana (Poland)	19822±2682	5	43%	2	7%	0	0%	1	10%	3	16%	3	4%	3	15%	2	2%	2	2%
Siabel	22984±2484	8	20%	2	1%	0	0%	2	24%	2	35%	3	5%	3	9%	1	2%	2	4%
Clery PC	41746±29012	7	3%	0	0%	0	0%	4	90%	1	1%	3	1%	3	0%	2	1%	2	4%
Gariguette	47980±7387	10	26%	1	0%	1	1%	8	58%	3	4%	2	1%	1	0%	3	5%	3	4%
Clery HS	95633±9752	8	6%	0	0%	1	1%	5	79%	2	4%	2	1%	2	0%	2	4%	2	4%
CIR121	115250±22173	6	5%	0	0%	1	1%	4	84%	2	2%	2	1%	2	4%	2	2%	2	1%
Charlotte	58259±7228	8	6%	0	0%	1	1%	6	79%	2	5%	2	1%	1	2%	3	2%	2	5%

<sup>a</sup> in equivalent 4-nonanol

Fresh market strawberries (Table XII) had on average three times as much volatile compounds as strawberries for processing, and esters as the most abundant molecules, whereas strawberries for processing were rich in acids, except for 'Darselect,' which was rich in esters.

#### 4.1.2.4.5 Glycoconjugated volatile profile

Glycoconjugated volatile profiles (Suppl. data) were analyzed by PCA (Figure 64) and their repartition by chemical class is presented in Table XIII.

Alcohols and acids were preponderantly present as glycoconjugates rather than free volatiles. They represent on average 50% of the glycosides. 'Senga Sangana' (Bulgaria) had the highest glycoside concentration and also the highest concentration of glycoconjugated ketones. The highest concentration of glycoconjugated furans, of which furaneol glycoside was the most abundant, was found in 'Siabel' (45% of total glycoconjugates). 'Darselect' was also different from other varieties in glycoconjugates, as it had a very low concentration of coumarone (in "other compounds") and a high level of lactones (25% of total glycoconjugates).

The PCA sample map (Figure 64 A) revealed another trend. All strawberries, except 'Darselect', 'Senga Sangana' (Bulgaria) and 'Gariguette' (but this last with very high variability), were clustered in the center of the PCA sample map, indicating that their glycoconjugated pools were qualitatively similar. 'Darselect' differed in having higher concentrations of 1-terpineol, gamma-caprolactone and ethyl 3-hydroxybutanoate than the others. 'Senga Sangana' (Bulgaria) was differentiated by 2- and 3-hexenoic acid, 1,2-cyclopentanedione and phenol. Finally, 2-hexanone, propanoic acid, acetoin, 2-hydroxyfuraneol and isobutanoic acid were glycoconjugates specific to 'Gariguette'.

Although strawberries for processing and fresh market strawberries had generally similar glycoconjugate profiles, the ratio "glycoconjugates/volatile compounds" was higher in strawberries for processing. Indeed, strawberries for fresh market had an average of 6% of potential volatile increase, except for "Gariguette" (36%), as opposed to strawberries for processing, which had an average volatile increase of 50%. The highest increase (87 %) was found for "Senga Sangana" (Bulgaria). So strawberries for processing seem to have a higher aromatic potential.

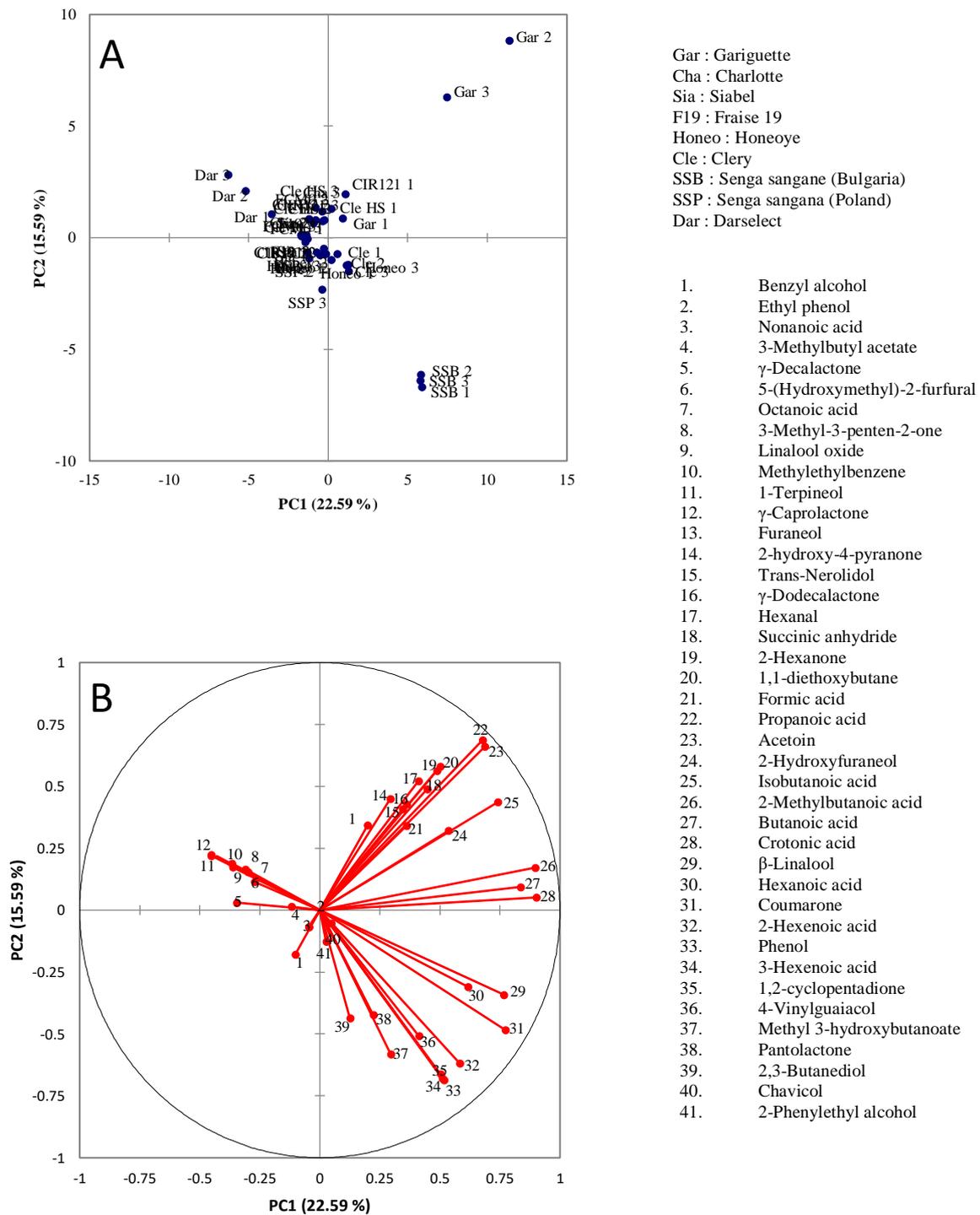


Figure 64: Principal component analysis of glycoconjugates in strawberries. *A. Sample map* ; *B. Variable correlation map*

Tableau XIII: Number of molecules and quantitative repartition of chemical classes in strawberries glycoconjugates

	TOTAL ( $\mu\text{g}/\text{kg}^{\text{a}}$ )	Acid		Alcohol		Aldehyde		Ester		Furan		Ketone		Lactone		Terpene		Other	
		Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio	Number	Ratio
Clery	10867±869	6	39%	4	20%	0	0%	1	1%	1	2%	1	3%	2	2%	1	1%	1	33%
Darselect	7705±2774	3	43%	1	5%	0	0%	0	0%	1	15%	1	2%	2	26%	2	2%	2	7%
FCMO060	4848±1697	2	13%	2	19%	1	6%	1	3%	0	0%	1	8%	1	13%	0	0%	1	38%
Fraise19	4655±745	4	30%	2	17%	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	1	10%	0	0%	1	38%
Honeoye	14044±5056	5	44%	3	11%	0	0%	0	0%	1	5%	1	5%	2	12%	1	1%	1	23%
Honey	9982±998	6	47%	4	19%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	1	1%	1	27%
Senga sangana (Bulgaria)	20166±1613	8	51%	5	9%	0	0%	1	1%	1	0%	1	4%	1	0%	0	0%	1	34%
Senga sangana (Poland)	7350±2352	4	37%	3	23%	0	0%	1	3%	0	0%	1	2%	2	12%	1	1%	1	25%
Siabel	9268±1112	3	13%	3	9%	0	0%	0	0%	1	54%	0	0%	2	5%	0	0%	1	19%
Clery PC	2524±606	4	11%	4	22%	1	0%	0	0%	2	0%	1	12%	1	3%	0	0%	2	52%
Gariguette	18074±9398	10	54%	2	2%	1	2%	0	0%	2	13%	3	5%	1	0%	2	3%	2	23%
Clery HS	5258±578	6	19%	3	12%	1	0%	0	0%	2	16%	2	11%	0	0%	1	1%	2	40%
CIR121	7052±3103	8	20%	3	10%	1	1%	0	0%	1	2%	2	8%	2	14%	1	10%	2	43%
Charlotte	3657±1060	6	10%	2	2%	1	2%	0	0%	1	4%	2	11%	0	0%	0	0%	2	71%

<sup>a</sup> in equivalent 4-nonanol

#### 4.1.2.5 Discussion

##### 4.1.2.5.1 Methodology

Glycosides are generally quantified using a SPE pre-treatment but this separation technique, by affinity, may not be optimal to assess quantitatively free volatiles and glycosides. By this method, Roscher, Koch, Herderich, Schreier, & Schwab (1997) estimated the glycosylated furaneol to be between 66% and 750% of the free furaneol in strawberries, whereas in this study it represented on average 14% of free furaneol (except in 'Gariguettes' where bound furaneol was more than twice the amount of free furaneol). Hampel et al. (Hampel et al., 2014a) confirmed obtaining differing results depending on the method with many molecules, like for 1-nonanol in 'Cabernet Sauvignon', which is multiplied by approximately 7 after direct hydrolysis and by more than 22 using the SPE method. The differences are also qualitative. They identified 95 new compounds using direct hydrolysis by glycosidases, to be compared to only 67 using the SPE method in the Chardonnay grapes. Furthermore, they observed that 24 volatiles are significantly increased and 5 decreased using direct hydrolysis as opposed to SPE, which showed an increase for 17 compounds and a decrease for 13 compounds. (Hampel et al., 2014a) assumed that glycosides of terpenes are more retained on SPE columns, which is confirmed by Baek & Cadwallader (1999). (Hampel et al., 2014a) have a similar result on melon. (Voirin, 1990) confirms these observations on grape. He obtained an SPE yield of 15% for glycosides with phenyl-type aglycone and 70% to 100% for glycosides of terpene aglycones.

##### 4.1.2.5.2 Volatile molecules of strawberries

Although furaneol is the key molecule for strawberry aroma, it was not qualitatively discriminant to compare volatile profile, as expected because it is ubiquitous in strawberries. This molecule is already found when strawberry volatiles are analyzed by liquid extraction (Larsen et al., 1992); (Lambert et al., 1999) and sometimes found with solid phase microextraction (SPME)/headspace (Darbellay et al., 2004) which confirms this conclusion. The comparisons have to rely on other molecules.

In strawberries, the 2-methylbutanoate and 2-methylbutyl esters are present in all reference articles but only 3-methylbutyl acetate and 2-methylbutanoic acid were found here (as identified by their retention index and MS spectra). These molecules come from two different amino acids, L-leucine (for 3-methylbutyl/butanoate) and L-isoleucine (for 2-methylbutyl/butanoate) by the same pathway (Pérez, Olías, Luaces, & Sanz, 2002). The nature of amino acid supplies could explain the absence or presence of 2-methyl and 3-methyl butyl compounds. The C6 carbonyls 3-hexenal and 2-hexenal with their green odor types, other important molecules of strawberry aroma, were absent. This was expected in the aliquots which were salted during mashing as this treatment aims to inhibit the endogenous enzymes of the lipoxygenase (LOX) pathway. This absence could also be explained by their further degradation to hexenol by action of alcohol dehydrogenase (ADH) (Speirs et al., 1998) or hexenoic acid by

oxidation in AR2000-treated samples. Indeed, although 2- and 3-hexenal were not found, 2- and 3-hexenoic acid (quantifiable) and 3-hexenol (not quantifiable) were present. The identified volatiles had mainly fruity or floral odor type. These differences could arise from extraction with ethyl acetate/n-pentane (2:1), which is more polar than dichloromethane (the usual solvent) and the long incubation time (overnight) allowing chemical degradation. Between control samples with and without incubation, decreases of molecules like 2-methylbutanoic acid and hexanoic acid and increases of molecules like 2-hexenoic acid and 2-hydroxy-4-pyranone were observed and some molecules became undetectable like ethyl cinnamate and ethyl hexanoate.

#### 4.1.2.5.3 Comparison of industrial and fresh-market strawberries

##### Free volatiles

The differentiation between industrial and fresh market strawberry aroma profiles may explain their different uses, resulting from distinct selection goals. Strawberries for processing need to keep their texture and color after treatment especially in dairy products. Fresh market strawberries, which are produced to be eaten as-is, need to have a good instant aromatic quality to attract consumers. This is reflected in the present results by generally higher contents of free volatiles in the fresh-market strawberries. (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012) studied the natural genetic variability of aroma in strawberry. They compared genomes of plants stem from 2 parents and associated them to aroma differences. This genetic approach probably could be interesting to complete this comparison between strawberries for process and for fresh market. An interesting point was that the 3 studied 'Clery' have different volatiles profiles. These differences can not be explained only by genetics especially considering that the two samples from CIREF come from the same cultivar and were grown at the same location. The only difference was that one sample was in full-field and the other in hydroponics. The cultivation method also appeared to have a non-negligible effect on aroma profile.

##### *Glycoconjugated volatiles*

However limited differences were observed between fresh-market and industrial strawberries in the case of glycoconjugated volatiles. Indeed previous studies (Ubeda et al., 2012; Groyne et al., 1999) found as main glycoconjugated volatiles in strawberries furaneol, benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, 4-vinylphenol, 4-vinylguaiacol and hexanoic acid. Results are consistent with literature for 'Gariguettes' where Lambert et al. (1999) found also methyl hexanoate, 2-methylbutanoic acid as well as hexanoic acid as main glycoconjugated volatiles. Except for 4-vinylphenol, all were also found in this study. The importance of glycoconjugates of benzyl alcohol and 2-phenylethyl alcohol in strawberries was confirmed by the low discriminant effect of these molecules in the glycoconjugates profiles. Among released aglycones some molecules are interesting for flavor thanks their low thresholds, like 2-phenylethyl alcohol (rose note) with a threshold of 4 µg/kg (4 parts per billion (ppb)) (Burdock & Fenaroli, 2010), furaneol (caramellic note)

with a threshold of 0.03 µg/kg or γ-decalactone (peach note) with a threshold of 11 µg/kg. These increases show that deglycosylation could be a way to enrich natural aroma extracts.

#### 4.1.2.6 Conclusion

Direct enzymatic hydrolysis allowed to reexamine the free to glycoconjugated volatile ratios in strawberries. Free volatiles were more abundant than glycoconjugated volatiles, especially in fresh market strawberries, and that the glycosylated/free volatiles ratio was higher in strawberries for processing. All tested strawberries had similar glycoconjugates profiles (except for "Darselect", "Senga Sangana" (Bulgaria) and "Gariguette"). Indeed, the release of glycoconjugated volatiles would enhance aroma in a similar manner for all varieties. It can therefore be an interesting way to enhance the aromatic power of strawberry preparations in industry. Besides fresh market strawberries had a lower aromatic reserve, which indicates that strawberries for processing would be better candidates for future experiments on glycoside hydrolysis during process.

#### 4.1.3 Caractérisation des composés volatils d'abricots industriels et de leur réserve

L'abricot est le second fruit étudié durant la thèse et la caractérisation de son profil aromatique et de sa réserve ont été réalisés avec le même protocole que pour la fraise. Les industriels partenaires du projet Natarôme+ ont fourni les abricots utilisés dans leurs procédés de transformation. Ainsi deux variétés ont pu être testées : *Canino* et *Bebeco*. Trent sept molécules ont été identifiées dans les deux variétés dont 29 quantifiables pour la variété Canino et 21 pour la variété Bebeco. Une majeure partie des molécules clés de l'arôme de l'abricot ont été retrouvées dans les deux variétés : l'acétate de butyle, l'hexanol, le terpinéol, le γ-décalactone, le benzaldéhyde, le limonène et le linalool (cf partie 1.1.1.2 et Tableau XIV).

Tableau XIV : Liste des composés volatils identifiés dans les abricots *Bebeco* et *Canino*

	RI calculé	Seuil de detection dans l'eau (µg/L) <sup>a</sup>	Descripteurs <sup>b</sup>	Rèf <sup>c</sup>
<b>Acides</b>				
Acide 2-méthylbutanoïque	1662	180	Acide, fruité	4
Acide butanoïque	1625	240	Fromage, aigre	4
Acide acétique	1451	150	Acide, âcre	2;3;4;6
Acide pentanoïque	1733	940	Acide, fromage	4
Acide hexanoïque	1846	3000	Gras, fromage	3;4
Acide benzoïque	2412	10000	Balsamique	-
Acide formique	1503	-	Acétique	-
Acide isobutyrique	1570	8100	Acide, aigre	-
Acide citraconique/itaconique	1040	-	-	-
<b>Alcools</b>				
1-Hexanol	1355	800	Herbeux, vert	1;3;4;6
2-Phényléthanol	1906	4	Floral, rose	3
Alcool benzylique	1870	10000	Floral, fruité	-
Chavicol	2334	-	Phénolique	-
4-Vinylguaiacol	2188	3	Fumé, boisé	-
Phénol	2000	5900	Phénolique	-
Méthoxyphénol	1873	-	Phénolique	-
<b>Aldéhydes</b>				
Benzaldéhyde	1525	100	Fruité, amande	3;4;6
2-Ethyl-(2E)-hexènal	1333	-	Vert	-
2-Ethyl-(2E)-butènal	1117	-	Vert	-
<b>Esters</b>				
Acétate de butyle	1074	66	Fruité, éthéré	1;2;4;5;6
Acétate de 3-méthylbutyle	1122	2	Fruité, banane	2
Acétate d'isobutyle	1012	66	Fruité	-
<b>Furanes</b>				
Furfural	1473	280	Roussi, boisé	3;4
5-Hydroxyméthylfurfural	1660	-	Gras	-
<b>Cétones</b>				
Acétoïne	1284	800	Crémeux, beurré	3;4
<b>Lactones</b>				
γ-Décalactone	2138	11	Fruité, pêche	3;4;5;6
Butyrolactone	1640	20	Crémeux, lacté	-

<i>Terpènes</i>				
$\beta$ -Linalool	1547	6	Floral, citrus	1;2;3;5;6
$\alpha$ -Limonène	1212	4	Citrus, doux	1;2;3;4;5
Géraniol	1853	4	Floral, citronnelle	3;5
4-Carvomenthène	1591	-	Epicé, frais	5
$\alpha$ -Terpinéol	1576	300	Citrus, boisé	2;3;4;5;6
8-Hydroxylinalool	1145	-	-	-
6,7-Dihydro-7-hydroxylinalool	2220	-	-	-
Oxyde de linalool	1721	320	Florale, vert	-
$p$ -Menthadiène	1261	-	-	-
<i>Divers</i>				
Coumaran	2389	-	Thé vert	-

<sup>a</sup> : Burdock & Fenaroli, 2010

<sup>b</sup> : "The Good Scents Company - Flavor, Fragrance, Food and Cosmetics Ingredients information"

<sup>c</sup> : 1 : Karabulut et al. (2018) ; 2 : Feng et al. (2015) ; 3 : Riu-Aumatell, López-Tamames, & Buxaderas (2005) ; 4 : Imrak et al. (2016) ; 5 : Gomez, Ledbetter, & Hartsell (1993) ; 6 : Aubert, Bony, Chalot, & Hero (2010)

La Figure 65 montre le profil aromatique des deux variétés d'abricots étudiées. Les profils aromatiques des deux variétés se distinguent par quelques molécules. La variété Canino est plus riche en benzaldéhyde (note amande amère), en acétate de butyle (note fruitée), en (iso)eugénol (note boisée, épicée), et en acide acétique (note acide de type vinaigre), alors que la variété Bebeco est plus riche en oxyde de linalool (note florale), en acétate de 2-méthylbutyle (note fruitée), en limonène (note citrus) et en 6,7-dihydro-7-hydroxylinalool. Cinq molécules sont typiques de l'arôme de l'abricot du point de vue organoleptique : l'acétate d'hexyle, la  $\gamma$ -decé lactone, la  $\gamma$ -octalactone, le (3Z)-hexénol et l'acétate de butyle (Guichard, Schlich, & Issanchou, 1990). Il est intéressant de constater que la variété Canino aurait un arôme plus « typique » de l'abricot avec sa concentration plus élevée en acétate de butyle. Dans cette même étude le benzaldéhyde n'aurait pas une saveur typique de l'abricot mais il influe positivement sur l'appréciation des abricots. Il apporterait une saveur supplémentaire et complémentaire de l'arôme de l'abricot (Guichard, Schlich, & Issanchou, 1990). Il s'agit du Canino qui bénéficie le plus de cet effet grâce à sa concentration plus élevée en benzaldéhyde.

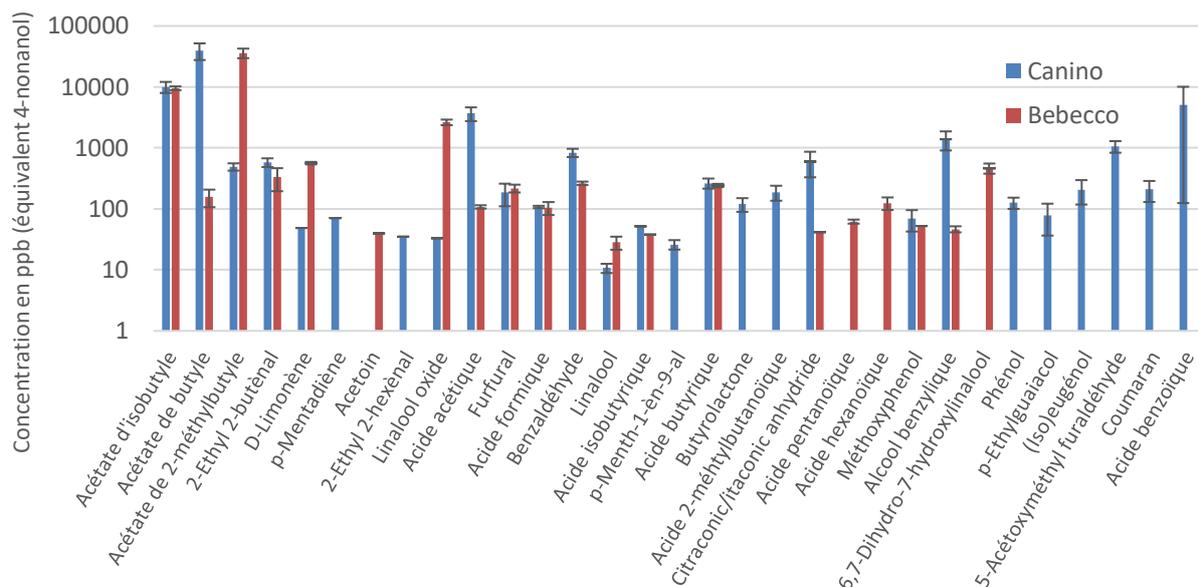


Figure 65: Composés volatils quantifiables des abricots *Canino* et *Bebeco*

L'une des molécules clés de l'arôme de l'abricot est cependant absente : la  $\beta$ -ionone (note fruitée de type baies). Son absence pourrait simplement signifier que ce composé n'est pas synthétisé par ces variétés, mais il est retrouvé dans tous les profils aromatiques des abricots réalisés en injection liquide (cf 1.1.1.2). Il serait plus probable que le problème vienne de la méthode GC-MS choisie, cette molécule, de masse molaire élevée (192,3 g/mol), ne désorberait qu'à la fin de la méthode d'injection.

Une autre interrogation se pose concernant la quantification des composés. En effet le linalool (note florale) est retrouvé mais sa concentration semble plus faible que ce qui est attendu par rapport à la quantification faite par Gomez et al. (1993). Cette étude a quantifié par étalon interne les composés volatils après injection liquide. C'est la méthode la plus proche de celle qui est réalisée ici. Cependant Gomez et al. (1993) mesurent une concentration de linalool entre 150 et 671 mg/kg d'abricot frais en équivalent 3-hexanone alors qu'une concentration en linalool entre 10 et 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'abricot frais est mesurée avec la méthode employée durant la thèse. Ces concentrations concordent par contre avec celles d'Aubert et al. (2010) qui sont comprise entre 7 et 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'abricot frais en équivalent 2-octanol. Cette différence pourrait s'expliquer de deux manières.

La première est l'étalon interne choisi. Aubert et al. (2010) utilisent le 2-octanol pour quantifier les composés, une molécule structurellement proche du 4-nonanol utilisé dans cette étude alors que Gomez et al. (1993) utilisent du 3-hexanone, qui a une chaîne carbonnée plus courte et une fonction cétone au lieu d'une fonction alcool qui pourrait se traduire pour cette molécule par un coefficient de réponse différent de ceux des alcools.

La seconde explication possible est le solvant utilisé. En effet l'hexane utilisé par Gomez et al. (1993) est plus apolaire que le chloroforme ou le mélange acétate d'éthyle/pentane (2:1) utilisés

respectivement par Aubert et al. (2010) et ce protocole ("Solvent Properties," 2003). Le linalool est possiblement mieux extrait dans les solvants polaires ce qui expliquerait la plus grande concentration retrouvée par Gomez et al. (1993) Si cette dernière hypothèse est validée, cela conduirait à une sous-estimation du linalool par le protocole utilisé dans la thèse.

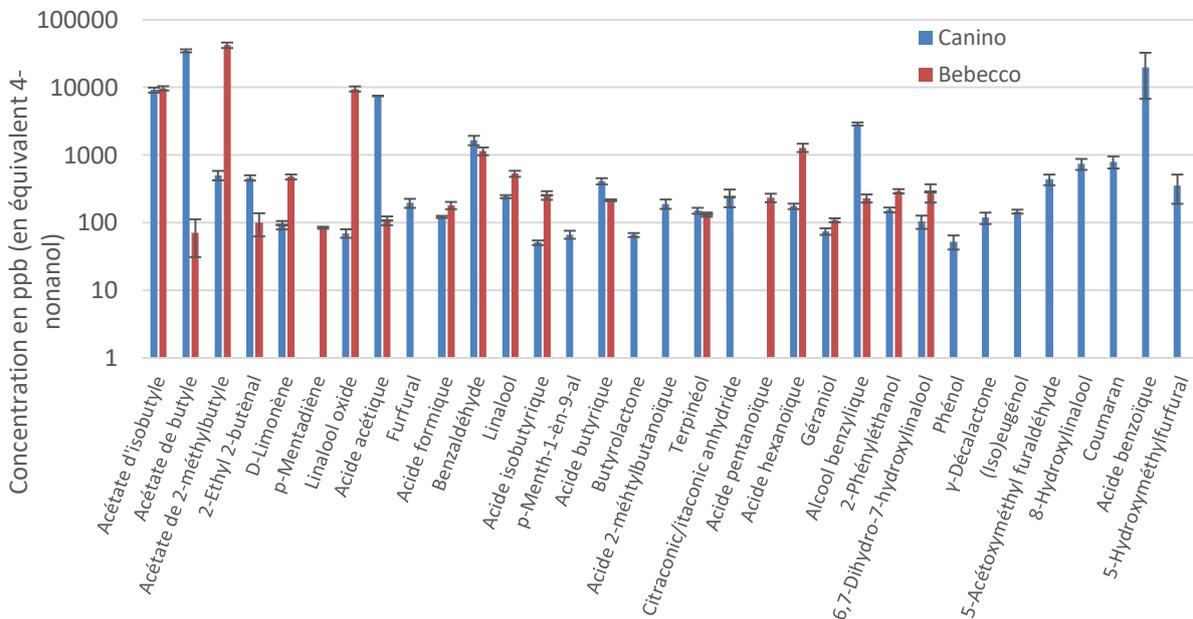


Figure 66: Composés volatils quantifiables après hydrolyse de la réserve des abricots Canino et Bebeco

Concernant la réserve aromatique, les deux variétés ont une augmentation commune du benzaldéhyde, du linalool, du terpinéol, du géranol et du 2-phényléthanol (Figure 66 & Tableau XV). Ainsi l'hydrolyse des glycosides de l'abricot augmentera ces notes fruitées et florales pour les deux variétés. A cela s'ajoute des augmentations spécifiques. La variété Bebeco se distingue par l'augmentation du linalool oxyde (note florale), de l'acétate d'isobutyle (note fruitée) et du 2-méthylbutyle (note fruitée) ce qui va davantage renforcer l'aspect fruité de l'abricot. La variété Canino se distingue par le D-limonène (note citrus), la gamma-décalactone (note fruitée de type pêche), l'(iso)eugéol (note épicée, boisée) et le 8-hydroxylinalool, ce qui va renforcer de manière plus équilibrée l'arôme de cette variété.

Parmi ces molécules libérées, le terpinéol (note boisée, citrus) (pour la variété Canino) et le 2-phényléthanol (note florale de type rose) sont « néoformés » grâce à l'hydrolyse des glycosides. Cela signifie que la libération de la réserve aromatique de l'abricot apporterait de nouveaux arômes aux notes florales et boisées.

Tableau XV: Tableau des molécules augmentées et diminuées durant l'hydrolyse de purées d'abricots

	Canino	Bebeco	Seuil de détection (ppb)	Descripteurs
Acétate d'isobutyle	~	20%	66	Fruity
Acétate de 2-méthylbutyle	~	24%	2	Fruity
D-limonène	191%	~	10	Citrus
<i>p</i> -mentha-3,8-diène	Néoformé	Néoformé	-	-
Hexan-1-ol	Néoformé	~	200	Herbal
Linalool oxide	21%	288%	320	Floral
Acide acétique	138%	~	10000	Acidic
Furfural	35%	~	0,03	Caramelic
Benzaldéhyde	161%	346%	100	Fruity
Linalool	1861%	1792%	6	Floral
Acide isobutyrique	~	527%	8100	Acidic
<i>p</i> -menth-1-èn-9-al	77%	Néoformé	-	Herbal
Acide butyrique	41%	~	240	Cheesy
Acide 2-méthylbutanoïque	38%	~	180	Acidic
Terpinéol	Néoformé	Augmenté	330	Woody
Citraconic/itaconic anhydride	26%	~	-	-
Acide pentanoïque	Néoformé	62%	3000	Cheesy
Acide hexanoïque	Néoformé	920%	3000	Fatty
Géraniol	Néoformé	Néoformé	40	Floral
Alcool benzylique	188%	~	10000	Floral
2-Phényléthanol	Néoformé	Néoformé	3	Floral
6,7-dihydro-7-hydroxylinalool	Néoformé	-32%	-	-
$\gamma$ -decalactone	Augmenté	~	11	Fruity
(Iso)eugénol	43%	~	6	Spicy
8-hydroxy-linalool	Néoformé	~	-	-
Coumarone	347%	~	-	Green tea
Acide benzoïque	322%	~	85	Balsamic
5-hydroxyméthylfurfural	Néoformé	~	-	Musty

Une augmentation du D-limonène, de l'acétate d'isobutyle et de l'acétate de 2-méthylbutyle est observée. Cependant leur structure chimique ne leur permet pas d'exister sous forme de glycoside à cause de l'absence de fonction hydroxyle ou carboxyle nécessaire à la liaison osidique (cf partie 1.2.2.2). Cette augmentation n'est donc pas directement due à l'activité glycosidase de l'AR2000. Cependant, ce cocktail enzymatique commercial contient d'autres activités (cf partie 1.3.5), et les enzymes endogènes n'ont pas été inactivées. Il est possible qu'une partie des alcools libérés par les glycosidases soit prise en charge par une AAT endogène pour former des esters. Le D-limonène, qui est un terpène, pourrait venir de l'évolution d'un terpénol libéré par les glycosidases. Par ailleurs, comme dans la fraise, l'activité pectinase de l'AR2000 qui modifie la structure de la matrice en dégradant la paroi végétale pourrait faciliter l'extraction de composés comme les terpènes (Guichard, 1996).

Les plus fortes augmentations sont observées pour le linalool, le benzaldéhyde, le linalool oxyde (pour la variété Bebeco), la  $\gamma$ -décylactone (pour la variété Canino), ce qui est très intéressant pour l'objectif du projet Natarôme+ consistant à renforcer l'arôme initial des fruits. En effet ces composés font tous parties des molécules clés de l'arôme de l'abricot (cf partie 1.1.1.2). La variété Canino semble avoir la réserve la plus riche autant en termes de quantité libérée qu'en termes de diversité de molécules d'intérêts libérées.

#### 4.1.4 Synthèse de chapitre

##### Mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse de la réserve glycosidique

Le nouvelle méthode mise au point a été vérifiée et validée. Elle permet une comparaison plus fiable que l'analyse traditionnelle par SPE des glycosides qui a tendance à favoriser l'extraction des glycosides de terpénols à cause de son principe reposant sur l'affinité des composés à la résine utilisée pour l'extraction. Cette nouvelle méthode a également une bonne répétabilité avec des coefficients de variation pour la quantification de composés volatiles majoritairement inférieur à 15%.

##### La caractérisation des réserves glycosidiques

La caractérisation des réserves glycosidiques des fraises de bouches et des fraises destinées à la transformation a mis en évidence l'intérêt de libérer la réserve des fraises des industriels avec une augmentation moyenne de la teneur en composés volatils de 50%. La caractérisation de la réserve des fraises des partenaires Agro'Novae et Sénagral montre que la libération de ces composés augmenterait principalement les notes fruitées (acétate de 3-méthylbutyle,  $\gamma$ -décylactone,  $\gamma$ -dodécylactone), florales (alcool benzylique, 2-phényléthanol) et vertes ((2E)-hexenol, coumaran) et elle augmenterait les notes fruitées (benzaldéhyde,  $\gamma$ -décylactone), florales (linalool, oxyde de linalool, 2-phényléthanol), « citrus » (limonène, terpinéol) et « herbe » (*p*-menth-1-èn-9-ol).



## 4.2 Développement de glycosidases adaptées à une application sur fruits

Cette partie est un article rédigé à la suite du développement de nouvelles glucosidases adaptées au milieu fraise pour être appliquées à la transformation des fruits en industrie. Il sera soumis dans le journal « Biochemistry process ». Les auteurs sont Stéphane Gaborieau, Catherine M.G.C. Renard, Cécile Persillon, Stéphanie Pallas et Aurélie Cendrès. L'article s'intitule « Development of new glucosidases adapted for the release of fruit volatile compounds in industrial processes ».

Résumé : De nouvelles glucosidases ont été mises au point pour libérer les composés volatils des glycosides de fruits (dans cette étude la fraise). Tout d'abord, certaines glucosidases parents ont été sélectionnées pour une évolution dirigée par L-Shuffling™ afin d'obtenir de nouvelles glucosidases, optimisées pour une application sur les fruits. L'activité des potentiels glucosidases parents a été déterminée sur glucoside de furanéol, ainsi que leur degré d'inhibition par les sucres, leurs profils de pH et de température et comparé à la préparation commerciale de glucosidase, AR2000. La P4 a été choisie comme enzyme parent principale pour l'évolution dirigée en raison de sa forte activité (0,42 nkat / mg de protéine comparée à 0,08 nkat / mg de protéine pour AR2000) à pH 3,5. Le L-Shuffling™ a produit 17553 mutants, dont cinq ont été retenus pour une caractérisation en profondeur après un criblage haut débit. Enfin, l'une d'entre elles (F1) a été sélectionnée en raison de son inhibition limitée par le glucose (27% de la perte d'activité dans des conditions de fraise par rapport à une moyenne de 80% pour toutes les autres glucosidases). Une seconde glucosidase (F2) a également été choisie en raison de son taux élevé de conversion du glucoside de furanéol et de l'augmentation possible du niveau d'expression. Pour confirmer cette sélection, l'impact de la température, du pH, du Brix (avec des proportions variables de glucose, de fructose et de saccharose) sur F1 et F2 a été modélisé.

Les principales conclusions sont :

L'évolution dirigée par L-Shuffling™ a permis de développer 2 nouvelles glucosidases adaptées à une application sur fraises et abricots : E4177 et E4179. La première a une tolérance aux sucres, notamment au glucose, 3 fois supérieure à celle des autres glucosidases testées, dont l'AR2000, et la seconde a une activité en conditions standards 2 fois supérieures à celle de l'AR2000. De plus, l'absence d'activité pectinase permet de ne pas liquéfier les fruits auxquels elles sont appliquées ce qui en font de bonnes alternatives aux préparations commerciales, comme l'AR2000. Afin d'éviter la reproduction des enzymes par les entreprises concurrentes, les deux nouvelles enzymes pourront être associées pour former une « boîte noire »

La modélisation de l'activité des enzymes en fonction des 3 sucres majoritaires de la fraise a mis en évidence le rôle inhibiteur du glucose avec un impact moins important pour la E4078, la E4079 et la E4177. Ce sera le paramètre le plus important à suivre pour estimer la possibilité

d'activité dans un fruit. L'activité des glucosidases E4177 et E4179 a également été modélisée mathématiquement en fonction de la température, du pH et du Brix. Cette modélisation a permis de mettre au point un outil prédictif indiquant si l'enzyme est adaptée ou non à l'utilisation sur une nouvelle matrice par simple connaissance de son pH, de son Brix, de sa concentration en sucres et de la température d'incubation souhaitée sans avoir besoin, dans un premier temps, de l'analyse complète du profil de la réserve.

#### 4.2.1 Abstract

New glucosidases were developed to release volatiles compounds from fruit (here strawberry) glycosides. First some parental glucosidases were selected for a directed evolution by L-Shuffling™ to obtain new glucosidases, optimized for an application on fruits. Activity of potential parental glucosidases was determined on furaneol glucosides, as well as their degree of inhibition by sugars, pH and temperature profiles, compared to the commercial glucosidase preparation, AR2000. P4 was selected as main parent enzyme for directed evolution because of its high activity (0.42 nkat/mg of protein compared to 0.08 nkat/mg of protein for AR2000) at pH 3.5. L-Shuffling™ produced 17553 mutants out of which five were retained for in-depth characterization after screening. Finally, one of them (F1) was selected because of its limited inhibition by glucose (27% of activity loss in strawberry conditions compared to an average of 80% for all other glucosidases). A second one was also chosen because of a high level of conversion of furaneol glucoside thanks to a possible increase of expression level. To confirm this selection, impact of temperature, pH, Brix (with varying proportions of glucose, fructose and sucrose) on F1 and F2 were modelled.

**Keywords:** glucosidase, L-Shuffling (ou "directed evolution"), aroma, furaneol, enzyme inhibition

#### 4.2.2 Introduction

Volatile compounds of fruits, being determinants of their aromas, have been widely studied for example in strawberries (Schwieterman et al., 2014; J. Yan et al., 2018), apricots (Goliáš, Létal, Kožíšková, & Dokoupil, 2013; Karabulut et al., 2018), bananas (Beekwilder, 2004; Pérez et al., 1997b), etc. However, not all volatiles exist as such in the intact raw fruits. Some are formed during eating or processing by endogenous enzymes acting on precursors. A well-known reaction cascade is that of lipoxygenase leading to "green" notes from linoleic acid (Pérez et al., 1999). Another major way is that of glycosides. They are precursors of volatile compounds which are formed with an aglycon bound to sugars for storage (Ketudat Cairns & Esen, 2010). The aglycon has an alcohol or acid function to allow a link with a sugar. The sugar moiety can be a mono- or di-saccharide and more rarely a tri-saccharide, the aglycon-bearing sugar always being  $\beta$ -D-glucose (Sarry & Günata, 2004). Glycoconjugation of volatile compounds leads to loss of their volatility and therefore of their aroma potential, because of the increase of weight and of water solubility. These precursors are present in all fruits and are an essential part of their aromatic

potential (Z. Xu et al., 2004). They were studied by different research groups, like Stahl-Biskup et al. (Stahl-Biskup et al., 1993) did in apples, apricots, blackberries, mangoes, plums and tomatoes, Günata et al. (Y. Z. Günata et al., 1985) did in grapes or Ubeda et al. (Cristina Ubeda et al., 2012) did in strawberries and their release can enhance aroma.

Glycosidases release aglycons from glycosides by hydrolysis of the glycosidic bond. However, glycosidases are not adapted for a direct application on fruits for a number of reasons. One of them is the pH range for optimal activity. The optimal pH range for glycosidases is between 4 and 7.5, with total reversible loss of activity below pH 2.8 or above pH 9 (Ketudat Cairns & Esen, 2010; Sarry & Günata, 2004), while the pH of fruits is between 2 and 6. Another reason is the inhibition by glucose, one of the main sugars in fruits. Nevertheless, the glucose sensitivity varies widely depending on the enzyme sources (Sarry & Günata, 2004): it can range from a very low sensitivity for a glucosidase from the yeast *Candida peltata* ( $K_i = 1400$  mM) (Saha & Bothast, 1996) to a very high sensitivity for the glucosidase from the yeast *Dekkera intermedia* ( $K_i = 3$  mM) (Blondin et al., 1983). Despite these drawbacks a commercial glycosidase was developed to improve aroma of wine: Rapidase AR2000 from *A. niger*. However, fungal glycosidases are quite sensitive to sugars, so it is only used at the last stage of vinification (Pogorzelski & Wilkowska, 2007). This enzymatic preparation has also a pectinase activity which degrades texture of fruits (Kis, Potocká, Mastihuba, & Mastihubová, 2016). This is an important disadvantage for an application on fruit puree or dices. Another disadvantage is its anthocyanase which hydrolyzes anthocyanins (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998). These glycosylated molecules are responsible of red and blue colors from berries and the sugar part allows to stabilize these molecules (Deineka, Sorokopudov, Deineka, Shaposhnik, & Kol'tsov, 2005). So AR2000 can degrade color in products with berries. Thus, it is necessary to develop new glycosidase preparations to exploit the glycoside reserve of fruits during preparation of semi-processed food. The aim of this study was to develop new glucosidases without pectinase activity and more adapted for an application on fruits in industrial process to improve their aroma quality.

For this development, the application on strawberries was studied because of their relevance in the semi-processed fruit market. Strawberries are found in juices, in jams and in semi-processed food products, which can be incorporated in yogurt, ice cream or pastry. Strawberry is also the most appreciated fruit by French consumers and 92% of them (Bhat et al., 2015) like strawberries due to their specific aroma. Besides, strawberry fruit contains several glycosides of volatiles which are important for its specific aroma. Furanol, mesifuran, benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, hydroxylinalool, 2-methylbutanoic acid or hexanoic acid can be found as glycosides in strawberries (Groyne et al., 1999). Gaborieau et al. (Gaborieau, Cendrès, Page, Ginies, & Renard, 2018) showed that the concentrations of some aroma-active volatiles can increase by 50% with application of glycosidases on strawberries for processing. This highlights the potential of releasing the aglycons from glycosides to enhance aroma in strawberries instead of adding aromas.

In this study we chose to develop new enzymes by directed evolution with L-Shuffling™ method. To achieve these aims, a selection of parental gene, a selection of the most adapted new glucosidases for use on strawberries and a modeling of their activity are realized.

## 4.2.3 Material & method

### 4.2.3.1 Plant material

Strawberries were commercial samples harvested in 2017, individually quick frozen (IQF), and stored at -20°C. They are a mix of several strawberries varieties (with *Camarosa* as main variety) used by French food industry.

### 4.2.3.2 Reagents and solvents

The reference enzyme AR2000 came from Oenobrand (Montferrier sur Lez, France) as freeze-dried powder. The resin for glycoside extraction XAD-2 and GC-MS a solution of C7-C30 saturated alkane 1000 µg/mL (ref: 49451-U) for retention index (RI) calculations came from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA). The standard furaneol β-D-glucopyranoside (purity: ≥ 98.5 %) was purchased from Azur Isotopes (Marseille, France). Acetone (purity: ≥ 98%), acetonitrile (purity: ≥ 99.9%), hexane (purity: ≥ 98%), methanol (purity: ≥ 99.9%), dichloromethane (purity: ≥ 99.9%), pentane (Normapur purity ≥99.9%) and Ethyl acetate (purity ≥99.9%) were purchased from VWR International (Darmstadt, Germany). Hydromatrix™ (diatomaceous earth) was from Agilent Technologies (Les Ulis, France). The chemicals disodium phosphate (purity: ≥ 98.5%), citric acid monohydrate (purity: ≥ 98.5%), sodium carbonate (purity: ≥ 98.5%), *p*-nitrophenol (*p*-NP) (purity: ≥ 99.0%), *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*-NP-glucoside) (purity: ≥ 98.5%), formic acid (purity: ≥ 98.5%), sucrose (purity: ≥ 98.5%), fructose (purity: ≥ 98.5%), glucose (purity: ≥ 98.5%), 4-penten-1-ol (purity: ≥ 99.0%), 4-pentenyl β-D-glucopyranoside, 1-hexanol (purity: ≥ 99.9%), hexyl β-D-glucopyranoside (purity: ≥ 98.0%), phenol (purity: ≥ 99.0%), phenyl β-D-glucopyranoside (purity: ≥ 98.5%), furaneol (purity: ≥ 98.5%), 1-decanol (purity: ≥ 98.0%), decyl β-D-glucopyranoside (purity: ≥ 98.0%), and the internal standard 4-nonanol (purity > 97 %) were from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

### 4.2.3.3 Preparation of strawberry glycosides

Around 1.5 kg of strawberries were mixed with 1.5 kg of water in a blender at 4°C. The resulting juice was centrifuged at 8437g during 10 min at 4°C (CR3i multifunction centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Supernatant was collected and stored at 4°C. As described in Günata et al. (Y. Z. Günata et al., 1985), 250 g of XAD-2 was conditioned by washing successively with hexane, acetone and methanol. XAD-2 was added to strawberries juice and stirred 30 min à 4 °C. Then juice was collected. XAD-2 was successively rinsed with 250 mL of water, 250 mL of dichloromethane/pentane (1:2, mL/mL) and 250 mL of methanol. The methanol extract was dry concentrated and dissolved in the minimum of phosphate-citrate buffer pH 3.5 (0.2 M).

Extract was washed 5 times with the same volume of dichloromethane/pentane (1:2, mL/mL) to remove free volatile compounds and stocked at -20°C.

#### 4.2.3.4 Glycosidases engineering

##### 4.2.3.4.1 L-Shuffling™ library

The gene shuffling method L-Shuffling™, proprietary to Protéus, uses template based recombinations and *in vitro* ligations of randomly digested fragments (Ayrinhac et al., 2011; Chodorge, Fourage, Ravot, Jermutus, & Minter, 2008; EP1104457B1, 2005). A round of gene shuffling was performed with seven genes of WT- $\beta$ -glucosidases as parent genes (Figure 67).

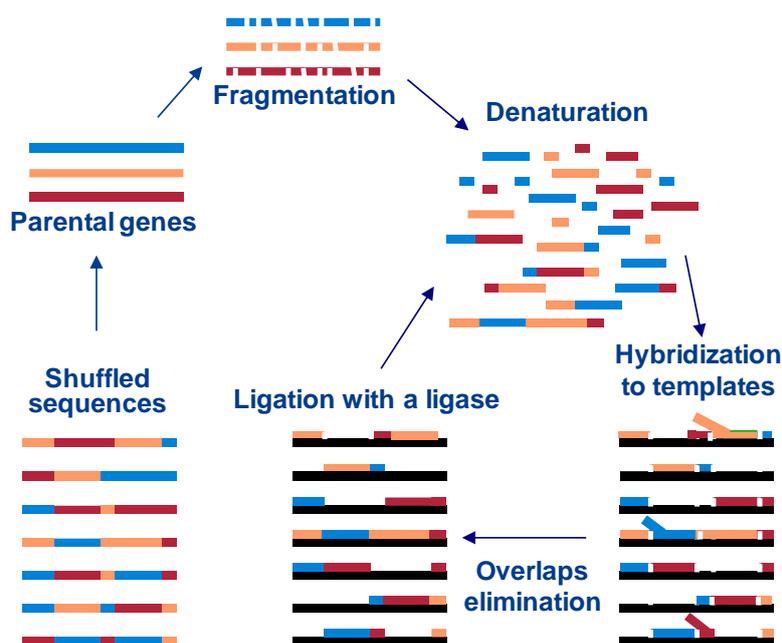


Figure 67 : Principle of L-Shuffling™ method

#### 4.2.3.4.2 Glucosidases

P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, F1, F2, F3, F4 and F5 were produced by Protéus (Nîmes, France) as culture supernatants. Their specifications are described in Table XVI.

Table XVI: Specifications of studied enzymes

Enzymes	Activity* (nkat/mL of solution or mg of powder)	Protein concentration (mg/ mL of solution or g of powder)	Expression vector
AR2000	6.17	85	<i>A.niger</i>
E4178	1.44	35.0	<i>E.coli</i>
E3923	1.28	6.30	<i>E.coli</i>
E3936	2.32	6.70	<i>E.coli</i>
E3973	1330	5.30	<i>E.coli</i>
E4078	31.2	5.47	<i>Y.lipolytica</i>
E4079	30.8	5.48	<i>Y.lipolytica</i>
E4103**	533	4.65	<i>Y.lipolytica</i>
E4177	450	4.41	<i>Y.lipolytica</i>
E4179	37.5	1.62	<i>Y.lipolytica</i>
E4180	62.3	1.70	<i>Y.lipolytica</i>
E4181	44.0	1.50	<i>Y.lipolytica</i>
E4192	159	9.71	<i>Y.lipolytica</i>

\*Based on *p*-NP-glucoside at pH 5 and 50°C, \*\*Re-expression of E3973 in *Y.lipolytica* (GRAS vector)

#### 4.2.3.5 Screening of mutant bank

##### 4.2.3.5.1 Screening of L-Shuffling™ Library

*Yarrowia lipolytica* colonies expressing the  $\beta$ -glucosidase variants were picked from an agar plate and grown on 96-well microtiter plates at 28°C during 48 h in 170  $\mu$ L of YPD medium (10 g/L of yeast extract, 10 g/L of peptone, 10 g/L of glucose). The plates were frozen for later use adding 60  $\mu$ L per well of 78 g/L of glycerol, 4.7 g/L of sodium chloride, 0.2 g/L of potassium chloride, 0.3 g/L of calcium chloride, 0.1 g/L of sodium bicarbonate and 1.6 g/L of MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid). 15  $\mu$ L of the clones from the frozen plates were used to initiate a second culture in the same conditions (150  $\mu$ L of YPD medium) on 96-well microtiter plates incubated at 28°C during 24 h. 25  $\mu$ L of the supernatants from the second culture were used to initiate a third culture with 475  $\mu$ L of Y5T10 medium (10 g/L of yeast extract, 20 g/L of bacto peptone), 50 mM of sodium potassium phosphate buffer at pH6.8 and glycerol 1% incubated at 28°C during 48 h.

After centrifugation (5 min at 2000 g), 35  $\mu$ L of third culture supernatants were diluted 10 times and transferred on a plate containing 35  $\mu$ L of citrate-phosphate buffer at pH3.6 with 88 mM of glucose, 100 mM of fructose, 32 mM of sucrose and 2 mM of 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside. The plates were incubated during 1h30 at 37°C. After incubation, 70  $\mu$ L of sodium carbonate 200 mM was added and activities were estimated spectrophotometrically by

measuring the release of p-nitrophenolate ion at 414 nm. For each plate, the optical density (OD) values from each well were compared to the reference value obtained using a clone of the reference WT-gucosidase. The variants having more than 25% increased activity compared to that of the reference WT-gucosidase were selected for validation.

#### 4.2.3.5.2 Validation assays

Initial validations of the selected hits were carried out on 96-microtiter plates (in triplicate on separate plates for each improved variant) under the same conditions as described in paragraph 4.2.3.5.1. Validated hits were then submitted to a second validation at larger scale. Validated variants were grown in shake flasks containing 10 mL of Y5T10 medium (10 g/L of yeast extract, 20 g/L of bacto peptone), 50 mM of sodium potassium phosphate buffer at pH 6.8 and glycerol 1% on a rotary shaker at 180 rpm at 30°C for 72 hours. The cultures were performed in triplicate for each improved variant. Cells were harvested by centrifugation (15 min at 8000g) at 4°C. The supernatants were then diluted 10 times and the activity of each was measured following the same procedure as described in paragraph 4.2.3.5.1

#### 4.2.3.6 Inhibition by sugars

In 96-wells microplates, 3.08 nkat (measured on p-NP-gucoside at pH 5 and 50°C) of enzyme or 0.34 mg of protein (for parental enzymes) were incubated in 200 µL p-NP glucoside at XX mM in citrate-phosphate buffer 0.2 M, pH 3. with and without sugars (18 g/kg of fructose, 16 g/kg of glucose and 11 g/kg of sucrose). The medium was incubated under stirring (30 rpm) at 37°C during 16 min, after which reaction was stopped by addition of sodium carbonate (3 M; 100 µL) prior to reading of absorbances at 420 nm in a Safas microplate spectrophotometer (Monaco). The loss of activity was calculated by subtraction between activities of incubations without and with sugars, then division by activity without sugars. Experiments were realized 3 times.

#### 4.2.3.7 Activity modelling

##### 4.2.3.7.1 Experimental designs

Two central composite designs were realized. For the first one the variable factors were temperature (from 30°C to 50°C), pH (from 2 to 5) and Brix (from 4 to 20). Brix was obtained by a mixture of fructose/glucose/sucrose (40:35:25, g/g/g). Conditions of the 16 points of this design are introduced in Table VI. The variable factors for the second are fructose concentration (0 g/kg to 80 g/kg), glucose concentration (0 g/kg to 80 g/kg) and sucrose concentration (0 g/kg to 80 g/kg). Conditions of the 16 points of this design are introduces in Table VII. Experiments were carried out as described in §2.6. Each experimental design was duplicated.

##### 4.2.3.7.2 Modelling

Mathematical modelling was performed with R software (ver. 3.5.2, Vienna, Austria) using *lm* and *glm* function from package *stats*. Activity equations were manually simplified to obtain the lowest AIC, the closest R<sup>2</sup> to 1 and a p-value < 0.05 for general equation and for each factor.

These models were plotted using R software (ver. 3.5.2, Vienna, Austria) using *ggplot*, *geom\_rather*, *geom\_contour* and *direct\_label* functions from package *ggplot2* and *directlabels*.

#### 4.2.3.8 Hydrolysis of furaneol glucoside

Enzyme solutions, phosphate-citrate buffers and substrate solutions were preincubated in a water bath (Shaking Water Bath Julabo SW23, Julabo GmbH (Seelbach, Germany)) during 5 min at incubation temperature. Experiments were realized 3 times.

##### 4.2.3.8.1 Activity tests

In a glass vial the enzyme is added for an activity of 16.7 nkat (measured on *p*-NP-glucoside at pH 5 and 50°C) or 0.34 mg of protein for parental enzymes, and volume was completed to 1 mL with phosphate-citrate buffer pH 3.6 (0.2 M). After pre-incubation, 2 mL of furaneol glucoside in phosphate-citrate buffer were added to reach a final concentration of at 56,8 µM. The reaction medium was incubated under stirring (100 rpm) at 30°C during 16 min. After incubation 500 µL of reaction medium are sampled and added in a HPLC vial at 4°C with 500 µL of sodium carbonate (2M) to quench the enzymatic reaction. Then, samples were analyzed by HPLC (as described in 2.12).

##### 4.2.3.8.2 pH profile

Experiments were carried out as described above (§2.8.1) except for pH of the phosphate-citrate buffer (0.2 M): pH 2.3, 3.6, 5.1, 6.3 and 7.4 (only pH 2.3, 3.6 and 5.1 for parental enzyme selection) and analyzed by HPLC (as described in 2.12).

##### 4.2.3.8.3 Temperature profile

Experiments were carried out as described above (§2.8.1) except for temperature for pre-incubation and incubation: 30°C, 40°C, 50°C, 60°, 70°C, 80°C and 90°C and analyzed by HPLC (described in 2.12)

#### 4.2.3.9 Hydrolysis of glucoside standards

In a glass vial the enzyme is added for an activity of 16.7 nkat (measured on *p*-NP-glucoside at pH 5 and 50°C) and volume was completed to 1 mL with phosphate-citrate buffer pH 3.6 (0.2 M). After pre-incubation, 4 mL of solution of equimolar standard glucosides in phosphate-citrate buffer pH 3.5 (0.2 M) were added to reach a final concentration of at 0,4 mM for each standard. The reaction medium was incubated under stirring (100 rpm) at 30°C during 1 hours. After 1, 5, 10, 20 and 60 min of incubation 300 µL are sampled and poured in a glass vial at 4°C with 300 µL of sodium carbonate (2M) to quench enzymatic reaction. This solution was extracted twice by 600 µL of pentane/ethyl acetate (1: 2; mL/mL). Then, samples were analyzed by GC-MS (described in 2.13).

#### 4.2.3.10 Hydrolysis of strawberry glycoside extract

In a glass vial the enzyme is added for an activity of 16.7 nkat (measured on *p*-NP-glucoside at pH 5 and 50°C) and volume was completed to 1 mL with phosphate-citrate buffer pH 3.6 (0.2 M). After pre-incubation, 4 mL of glucoside extract were added to reach a final volume of 5 mL. The reaction medium was incubated under stirring (100 rpm) at 30°C during 4 hours. After incubation 300 µL are sampled and poured in a glass vial at 4°C with 300 µL of sodium carbonate (2M) to quench enzymatic reaction. This solution was extracted twice by 600 µL of pentane/ethyl acetate (1:2; mL/mL). Then, samples were analyzed by GC-MS (described in 2.13).

#### 4.2.3.11 Hydrolysis of strawberry puree

##### 4.2.3.11.1 Enzymation of strawberry puree

Enzyme treatment of 300 g of frozen strawberries was realized as described in the study of Gaborieau et al. (Gaborieau et al., 2018). In short, an aliquot of 40 g was incubated with 247 nkat of glycosidase (measured on *p*-NP-glucoside at pH 5 and 50°C). Two other aliquots were sampled from puree after adding of NaCl (75 g/100g). One of these aliquots and the enzyme-treated aliquot were incubated 24 h at 40°C with stirring at 120 rpm. The last aliquot was directly centrifuged at 8437g during 10 min at 4°C. After incubation, the enzyme-treated aliquot was salted and both purees were centrifuged as above. All supernatants were stored at -20°C until extraction of volatile compounds. Experiment was realized 3 times.

##### 4.2.3.11.2 Extraction of volatile compounds from strawberry puree by accelerated solvent extraction (ASE)

Hydromatrix™ (13 g) and 4-nonanol (11.24 µg diluted in 100 µL of methanol), as internal standard, were mixed with 7.5 g of supernatant of strawberry puree to obtain a homogeneous powder. The powder was rapidly transferred to a 33 mL pressurized extraction cell for immediate extraction. The extractor was an ASE 200 system (Dionex, Sunnyvale, CA). Extraction conditions were: solvent pentane and ethyl acetate (1:2; mL/mL), 10<sup>7</sup> Pa, 40 °C, 5 min preheating then 5 min static incubation. The extract was concentrated to 1 mL by distillation under vacuum (300 Pa, 25°C, Multivapor R12, Buchi, Rungis, France) then by nitrogen flux prior to gas chromatography.

##### 4.2.3.12 Furaneol quantification by HPLC

Samples (25 µL) were injected on a Shimadzu 20A system with DAD detector SPD-M20A (UV-visible) equipped with a LiChrospher 100 RP 18 5µm (250x4.6mm) (Phenomenex, Ville, Pays) quantify furaneol at 285 nm and furaneol glucoside at 275 nm. Samples were eluted by a gradient of MilliQ water with 1 g/L of formic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient was: 5% of solvent B during 1 min, Solvent B up to 12% in 5 min, then solvent B up to 20% in 6 min, after solvent B up to 45% in 9 min and to 90% in 2 min and stabilized during 5 min, to finish solvent B down to 5% in 2 min and stabilized during 5 min.

#### 4.2.3.13 Volatile compounds quantification by GC-MS

Samples (1  $\mu\text{L}$ ) were injected into a GC-MS system (Trace1300-ISQ LT; Thermo scientific, USA) equipped with a TG-WAXMS capillary column [30 m, 0.25 mm i.d., 0.5  $\mu\text{m}$  film thickness] (Thermo scientific).

Injection was in splitless mode at 250  $^{\circ}\text{C}$ . The carrier gas was helium with a constant flow 1.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Oven temperature program was 35  $^{\circ}\text{C}$  for 2 min ramped at 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  to 230 $^{\circ}\text{C}$ , and held for 5 min. Mass spectra were obtained by electron ionization at 70 eV, with scanning from  $m/z$  35 to 250 at 2 scans. $\text{s}^{-1}$ . Data were collected with GC-MS Solution software Chromeleon 7.2 and the major compounds were identified using the mass spectral database NIST 14 (US National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA)].

Volatile compound concentrations were expressed in micrograms per kilograms of juice (ppb) in 4-nonanol equivalent. Increase of volatiles were calculated as described on the study of Gaborieau et al. (Gaborieau et al., 2018). It was calculated by differences between enzymated samples and incubated blank samples. Then it was compared to the initial free volatiles profile to observe molecules increase or decrease.

### 4.2.4 Results

#### 4.2.4.1 Parental enzyme selection

##### 4.2.4.1.1 Characterization of potential parental enzymes

Furaneol glucoside is a natural compound which is found in strawberry's glycosidic reserve (Cristina Ubeda et al., 2012), which is why it was chosen instead of the conventional glucoside of *p*-nitrophenyl for activity tests.

Table XVII show a conversion of furaneol glucoside of 16% for AR2000, and between 3 and 88% for the potential parental enzymes and P1, P3, P4, P5 and P6 have a corresponding activity of, respectively, 0.08, 0.09, 0.02, 0.42, 0.04 and 0.10 nkat/mg of protein on furaneol glucoside at 30 $^{\circ}\text{C}$  and pH 3.6. No conversion was observed with P2. P4 had the highest specific activity, 5.3 times higher than the commercial glycosidase AR2000.

**Tableau XVII: Activity test with conversion of glucoside of furaneol by AR2000 and potential parental enzymes at 30 $^{\circ}\text{C}$  and pH 3.6**

Enzymes	AR2000	E1487	E3923	E3936	E3973	E4078	E4079
Conversion	16% $\pm$ 0%	18% $\pm$ 1%	0% $\pm$ 0%	3.4% $\pm$ 3%	88% $\pm$ 0%	14% $\pm$ 0%	40% $\pm$ 0%
Activity (nkat/mg of protein)	0.08	0.09	0	0.02	0.42	0.04	0.10

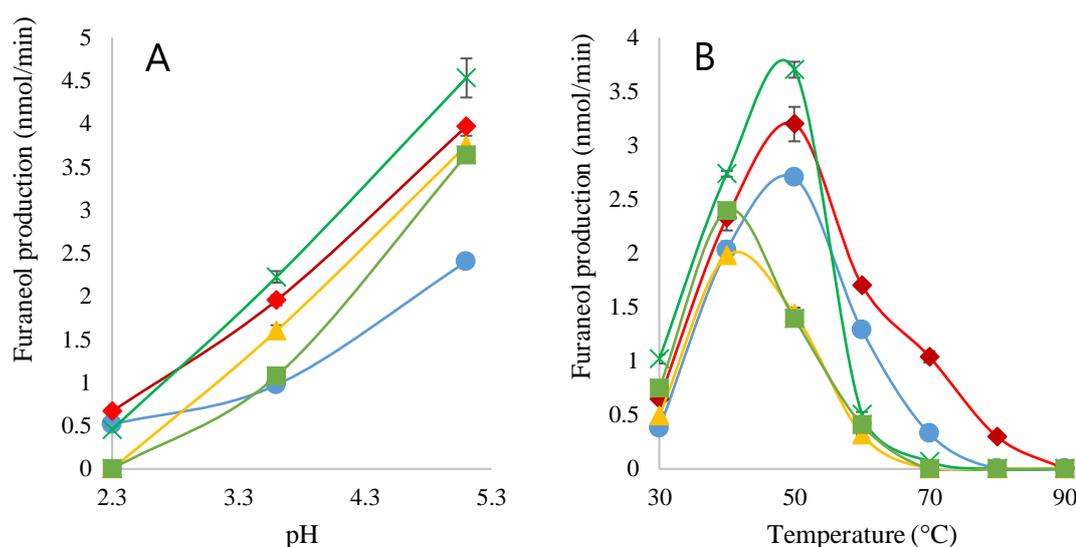
Tests to determine the level of inhibition by sugars was based on the average concentrations of the three major sugars reported in (Schwieterman et al., 2014) for 54 varieties of

strawberries (fructose: 18 g/kg; glucose: 16 g/kg; sucrose: 11 g/kg). For AR2000, P1 and P4 the inhibition was between 70 % and 82%. P5 and P6 only lost 26% and 28% activity, respectively, in presence of sugars (Table XVIII). No conversion was found with P2 and P3 in presence of sugars, they were therefore not further tested or used as L-Shuffling™ parents.

**Tableau XVIII: Activity loss by inhibition from sugars for AR2000 and potential parental enzymes at 37°C and pH 3.6 with 18 g/kg of fructose, 16 g/kg of glucose and 11 g/kg of sucrose.**

Enzymes	AR2000	E1487	E3973	E4078	E4079
Activity loss	82%±2%	70%±11%	76%±2%	26%±1%	-36%±0%

All tested enzymes (AR2000, P1, P2, P3, P4, P5 and P6) had the same behavior regarding pH (between 2.3 and 5.1). Their activity increased with pH between pH 2.3 and pH 5.1 (Figure 68 A). P5 and P6 had no activity at pH 2.3. However, these enzymes as well as E1478 and P4 had a higher specific activity than AR2000 between pH 3.6 and 5.1. At pH 5.1, the potential parent enzymes had higher activities than AR200 (40% to 80% higher).



**Figure 68 : pH (A) and temperature (B) profile of AR2000 (round), E1487 (diamond), E3973 (cross), E4078 (triangle) and E4079 (square)**

A temperature profile was carried out between 20°C and 90°C to identify optimal and inactivation temperature. The optimal temperature for AR2000, P4 and P1 was between 45°C and 50°C and between 40°C and 45°C for P5 and P6 (Figure 68 B). AR2000, P4, P5 and P6 showed residual activity after 5 min at 70°C and were totally inactivated after 5 min at 80°C. For P1, some residual activity was measured after 5 min at 80°C but not at 90°C.

#### 4.2.4.1.2 Experimental designs

To complete data obtained by previous tests, experimental designs were realized on AR2000, P5, P6 and P7 (re-expression of P4 in *Y.lipolytica* a generally recognized as safe (GRAS) vector).

The first design (Table XIX & Figure 69 A, 69 B, 69 C and 69 D) studied impact of temperature, pH and Brix on glucosidases activity. For AR2000, the highest activities (0.18 nkat/mg of protein) were found for 46°C/pH 4.4/7.2° Brix and 40°C/pH 3.5/4° Brix and the lowest activity (0.01 nkat/mg of protein) was for 40°C/pH 3.5/20° Brix. These results, coupled with low activities for points with 16.8° Brix, showed the sugar sensitivity of AR2000. For P5, the highest activity (0.40 nkat/mg of protein) was found at 46°C/pH 4.4/7.2° Brix and there was some activity for 40°C/pH 2.0/12° Brix. These results coupled with no activity at pH 2.0 and its lowest activity (0.03-0.05 nkat/mg of protein) at pH 2.6. The pH sensitivity was higher for P6. Indeed, this enzyme had not activity for pH lower or equal to 2.6 and the highest activity (0.47 nkat/mg of protein) was for 40°C/pH 5.0/12° Brix. This sensitivity was also confirmed in pH optima profiles. For P7, the highest activity (0.12 nkat/mg of protein) was for 40°C/pH 3.5/4° Brix and the enzyme had no or low activities for points with 12° Brix or higher. These results showed the high sugar sensibility of P7.

These conclusions were confirmed by the equations expressed with the most important factors which showed interaction between temperature, pH and Brix were negligible (*Suppl. Data*). The models are a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.81, 0.83, 0.80 and 0.60 for AR2000, P5, P6 and P7, respectively.

The second design (Table XX and Figure 70 A, 70 B and 70 C) studied impact of fructose, glucose and sucrose on glucosidases activity. As expected, glucose was the sugar which had the most impact on glucosidase activities. The highest activities of AR2000, P5, P6 and P7 (between 0.09 and 0.56 nkat/mg of protein) were found when there was no glucose. These conclusions were confirmed by equations obtained by modelling from experimental design data (*Annexe*). Indeed, the glucose in these equations had the better p-value (<0.001), this was even the only point where it had activity, pointing out its high sensitivity to inhibition by glucose, because of that no model could be built with this design for this enzyme. Other enzymes have their lowest activity with glucose at 80 g/kg. P5 and P6 were less affected than AR2000 by glucose. Indeed, their activities were varied, respectively, between 0.22 and 0.13 nkat/mg of protein and between 0.09 and 0.04 nkat/mg of protein, while the activity of AR2000 varied between 0.47 and 0.02 nkat/mg of protein.

None of the interaction factors were statistically significant (p-value < 0.05) i.e. interaction between concentrations of fructose, glucose and sucrose were negligible. The points with 0 g/kg of glucose were clearly outliers in all the experimental designs and was therefore not used in modelling and a point was added by 40 g of fructose/8 g of glucose/40 g of sucrose. The models are a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.93, 0.85 and 0.83 for AR2000, P5 and P6, respectively.

Tableau XIX: Parameters and results of centre composite design to study interaction between temperature, pH and Brix on glucosidase activity

Run	Temperature (°C)	pH	Brix	AR2000 activity (nkat/mg of protein)	E4078 activity (nkat/mg of protein)	E4079 activity (nkat/mg of protein)	E4103 activity (nkat/mg of protein)	E4177 activity (nkat/mg of protein)	E4179 activity (nkat/mg of protein)
1	34	2.6	7.2	0.07	0.03	0.00	0.02	2.4	1.3
2	34	2.6	16.8	0.03	0.05	0.00	0.00	1.1	0.6
3	34	4.4	7.2	0.11	0.24	0.35	0.07	34.0	5.0
4	34	4.4	16.8	0.04	0.19	0.25	0.02	12.1	1.9
5	46	2.6	7.2	0.12	0.03	0.00	0.03	3.5	1.8
6	46	2.6	16.8	0.04	0.05	0.00	0.01	1.7	1.0
7	46	4.4	7.2	0.18	0.40	0.38	0.10	48.2	7.0
8	46	4.4	16.8	0.06	0.33	0.32	0.04	20.0	2.5
9	30	3.5	12.0	0.03	0.05	0.04	0.02	6.3	1.6
10	50	3.5	12.0	0.09	0.24	0.22	0.08	14.4	3.6
11	40	2.0	12.0	0.02	0.00	0.00	0.00	1.0	0.6
12	40	5.0	12.0	0.04	0.27	0.47	0.01	20.4	2.4
13	40	3.5	4.0	0.18	0.18	0.16	0.12	23.5	6.2
14	40	3.5	20.0	0.01	0.15	0.11	0.00	5.2	1.3
15	40	3.5	12.0	0.05	0.17	0.13	0.00	9.0	2.2
16	40	3.5	12.0	0.04	0.17	0.14	0.01	9.1	2.2

Tableau XX: Parameters and results of centre composite design to study interaction between concentrations of fructose, glucose and sucrose on glucosidase activity

Run	Fructose (g/kg)	Glucose (g/kg)	Sucrose (g/kg)	AR2000 activity (nkat/mg of protein)	E4078 activity (nkat/mg of protein)	E4079 activity (nkat/mg of protein)	E4103 activity (nkat/mg of protein)	E4177 activity (nkat/mg of protein)	E4179 activity (nkat/mg of protein)
1	16	16	16	0.12	0.18	0.09	0.00	14.7	5.1
2	16	16	64	0.11	0.18	0.08	0.00	13.7	4.2
3	16	64	16	0.04	0.14	0.05	0.00	4.7	1.3
4	16	64	64	0.03	0.13	0.05	0.00	4.5	1.2
5	64	16	16	0.09	0.17	0.07	0.00	14.0	3.0
6	64	16	64	0.08	0.17	0.08	0.00	12.0	3.1
7	64	64	16	0.02	0.14	0.05	0.00	3.8	1.0
8	64	64	64	0.02	0.18	0.07	0.00	3.6	1.0
9	0	40	40	0.06	0.17	0.07	0.00	7.7	1.4
10	80	40	40	0.03	0.17	0.06	0.00	5.9	1.5
11	40	0	40	0.47	0.22	0.09	0.56	41.3	109.5
12	40	80	40	0.02	0.13	0.04	0.00	3.6	0.9
13	40	40	0	0.04	0.17	0.06	0.00	8.5	1.9
14	40	40	80	0.04	0.16	0.07	0.00	6.2	1.3
15	40	40	40	0.04	0.16	0.06	0.00	5.6	1.5
16	40	40	40	0.05	0.17	0.07	0.00	5.5	1.8

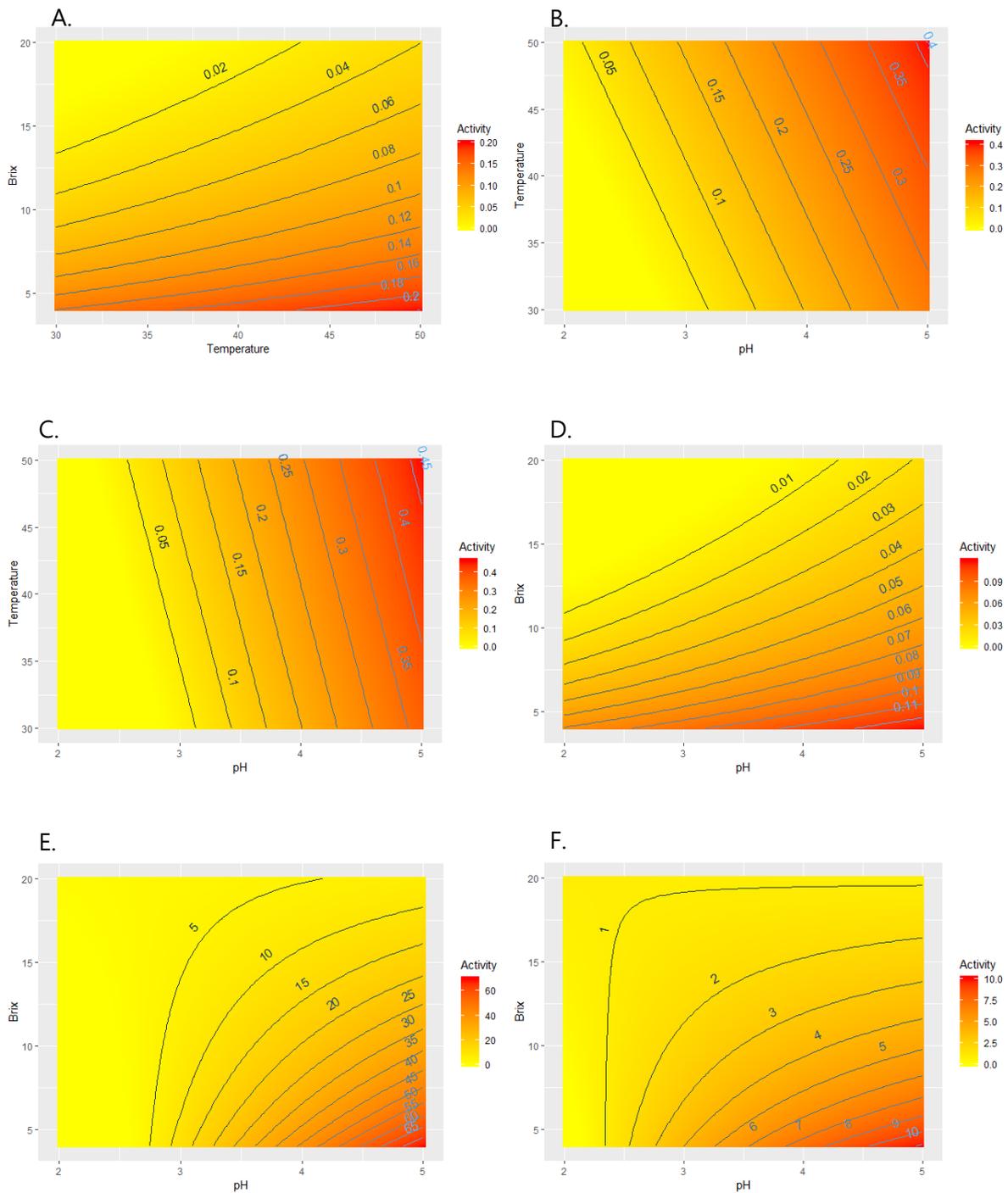


Figure 69 : Graphical modelling of activity (nkat/mg of protein) of AR2000 (A), P5 (B), P6 (C), P7 (D), F1 (E) and F2 (F) from experimental design on temperature, pH and Brix

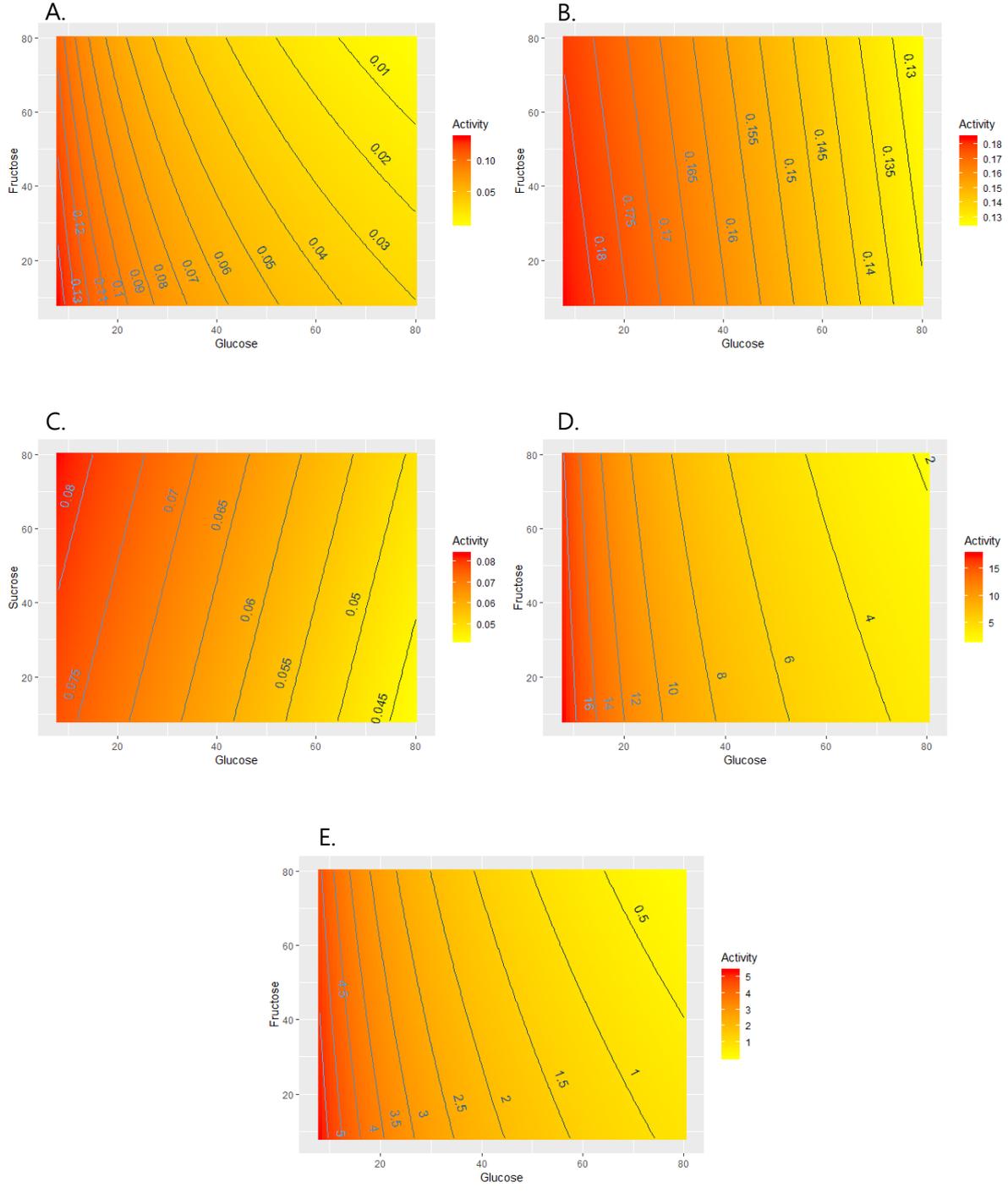


Figure 70 : Graphical modelling of activity (nkat/mg of protein) of AR2000 (A), P5 (B), P6 (C), F1 (D) and F2 (E) from experimental design on concentration of glucose, fructose and sucrose

The selection of parental enzyme was based on parameters, which allow the best application on fruit, with the case of strawberry, without the parasitic reaction (pectinase, anthocyanase) of the present commercial glucosidase preparation AR2000. These parameters included a high level of activity at strawberry pH (around 3.5), resistance to inhibition by product (glucose), low temperature optimum (to prevent degradation of volatile compounds during incubation and to reduce the cost of this step) and low inactivation temperature for ease of elimination of glucosidases during pasteurization. Most of these parameters must be validated by parent enzymes to limit the number of optimizations needed during directed evolution.

In short, P4, P5 et P6 were the best candidates for directed evolution. However, L-Shuffling™ demands genes with a minimum of 70% of similarity (US20030092023A1, 2003) and these three enzymes were below this aim. P5 and P6 had the highest resistance to the presence of sugars but their low activity and their pH sensitivity involved two parameters to optimize. P4 needs one parameter improvement because it had good activity and less pH sensitivity than P5 and P6. Finally, P4 was chosen as the main parent for directed evolution by L-Shuffling™, together with glycosidases from Proteus database with 70% or more similarity of genome.

#### 4.2.4.2 Directed evolution of glycosidases

The gene shuffling method L-Shuffling™, proprietary to Protéus, using template based recombinations and *in vitro* ligations of randomly digested fragments (Ayrinhac et al., 2011; Chodorge et al., 2008; EP1104457B1, 2005) was used to generate a library of variants. Seven genes of WT- $\beta$ -glucosidases sharing 70% of amino acid identity were selected as parent genes. The aim of this round of directed evolution was to adapt a  $\beta$ -glucosidase to acidic pH (pH 3.5) and high concentrations of sugars (88 mM of glucose, 100 mM of fructose, 32 mM of sucrose) simulating fruit matrix. In the fruit matrix, the pH ranges from 2 and 5.5 and the sugar concentrations (fructose, glucose and sucrose) range from 0 to 80 g/kg while the WT  $\beta$ -glucosidases have optimal pH at about 5 and they are inhibited by high concentrations of sugars.

The activity test measuring the  $\beta$ -glucosidases' conversion rates was optimized using one of the parent WT-glucosidases. Among all the parent WT-glucosidases, the  $\beta$ -glucosidase encoded by the gene P8 was chosen as the reference WT  $\beta$ -glucosidase because its activity on the conversion of *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside was the highest compared to that of the other WT  $\beta$ -glucosidases. The substrate concentration and the incubation time were adjusted so as to detect a low but significant OD value, which was set far from the saturation value to allow the detection of improved variants during the screening.

The library prepared from running the L-Shuffling™ method on these 7 parent genes produced about 20,000 clones. These clones were first screened for their activity using *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside substrate at 1 mM. 65 clones having substantially improved activity compared to that of the reference WT  $\beta$ -glucosidase were selected for validation. The validation assays were performed in triplicates on microtiter plates. The activity of 17 clones was

confirmed and these were selected as the most promising variants. The confirmed clones were retested at larger scale (cultures in flasks) and 8 of them had the conversion rate improved by at least 45%.

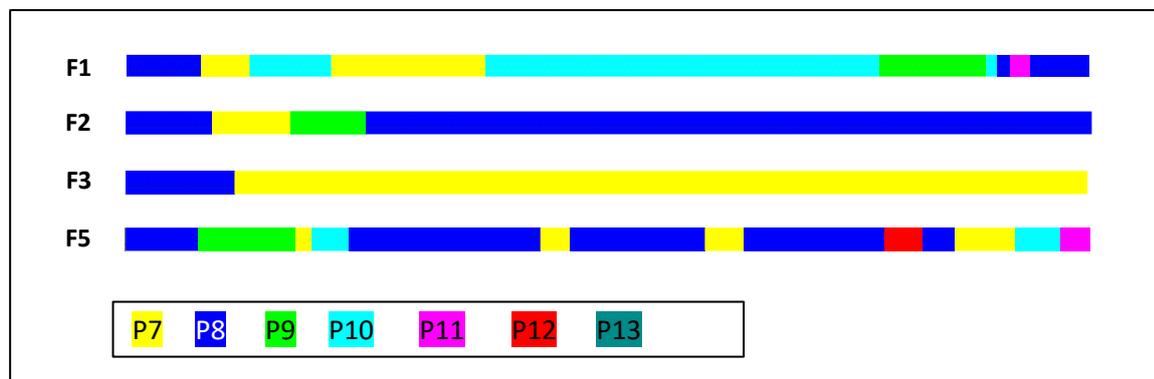


Figure 71 : Sequence alignment of improved variants resulting from L-Shuffling<sup>TM</sup> experiment. Each color represents fragment from a parent gene among the seven selected.

The genes of the 8 clones were sequenced leading to only 4 distinct sequences resulting from different recombination events (F1, F2, F3, and F5) (Figure 71). The activity improvement of these variants was about 120% for F1, 50% for F2, 45% for F3 and 45% for F5 compared to that of the reference WT  $\beta$ -glucosidase (P8). These four best variants were produced at larger scale (in fermenter) for the subsequent tests.

#### 4.2.4.3 Selection of best mutants for strawberry application

##### 4.2.4.3.1 Characterization of mutant enzymes

Table XXI showed a conversion of furaneol glucoside and the corresponding activity Except for F5, all mutants had better activity than AR2000 in strawberry pH conditions and all mutants had lower activity than P7 although F2, F3 and F4 had the higher conversions.

Tableau XXI: Activity test with conversion of glucoside of furaneol by AR2000, E4103 and mutants at 30°C and pH 3.6

Enzymes	AR2000	E4103	E4177	E4179	E4180	E4181	E4192
Conversion	18%±0%	36%±0%	17%±0%	50%±3%	49%±2%	45%±3%	25%±0%
Activity (nkat/mg of protein)	0.086	0.237	0.099	0.103	0.154	0.114	0.024

Tests to determine the level of inhibition by sugars were realized on AR2000, P7, F1, F2, F3, F4 and F5. For the news enzymes F2, F3, F4 and F5 the inhibition varied between 71 % and 81% (Table XXII) as for parent and commercial glucosidases. However, the loss of activity of F1 was only 27% in presence of sugars. Its inhibition by sugars was 3 times lower than AR2000 and P7.

Tableau XXII: Activity loss by inhibition from sugars for AR2000, E4103 and mutants at 37°C and pH 3.6 with 18 g/kg of fructose, 16 g/kg of glucose and 11 g/kg of sucrose

Enzymes	AR2000	E4103	E4177	E4179	E4180	E4181	E4192
Activity loss	81%±1%	75%±6%	27%±1%	71%±4%	81%±3%	76%±3%	79%±2%

A pH profile between 2.3 to 7.3 was realized on AR2000, P7, E3177, F2, F3, F4 and F5. The activity optima were found around pH 5 for AR2000 and P7, around pH 5.5 for F2, F3 and F4 and around pH 6 for F1 and F5 (Figure 72 A). The pH optima were shifted moderately towards neutral pH during the directed evolution.

A temperature profile was realized on AR2000, P7, F1, F2, F3, F4 and F5 between 20°C and 90°C to know optimal and inactivation temperature. A decrease of activity optima from 50°C, found for AR2000 and P7, to 40°C was observed for all mutants (Figure 72 B). Besides, the inactivation temperatures of F1, F2, F3 and F4 decreased from 70-80°C (for AR2000, P7) to 60-70°C. However, this inactivation temperature did not change for F5, staying between 70°C and 80°C.

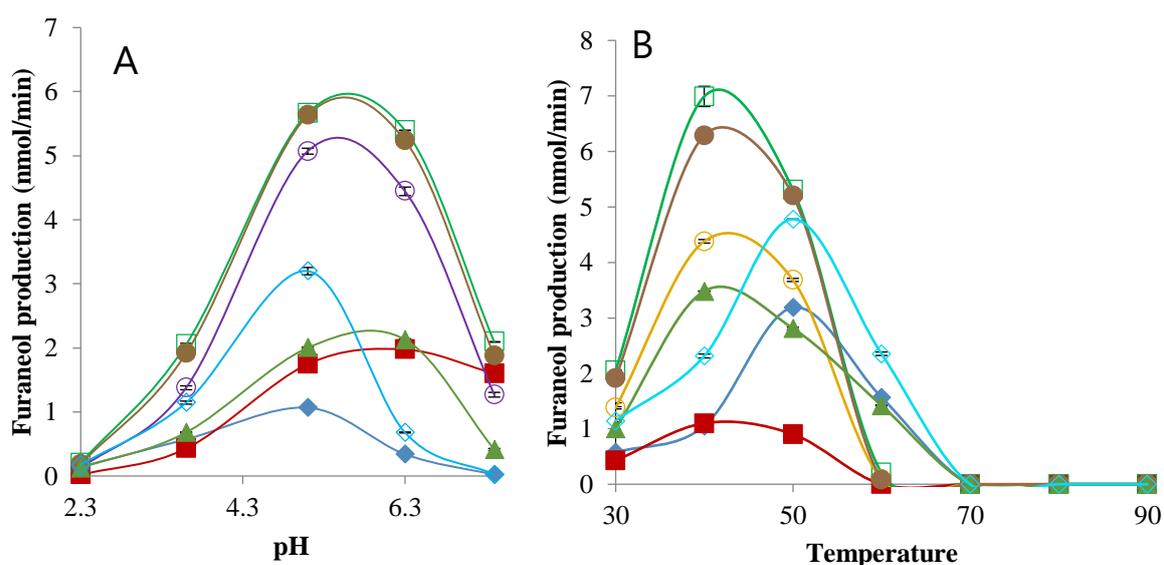


Figure 72 : pH (A) and temperature (B) profile of AR2000 (full diamond), E4103 (empty diamond), E4177 (full square), E4179 (empty square), E4180 (empty round), E4181 (full round), E4192 (triangle)

#### 4.2.4.3.2 Selectivity on standards

A selectivity test on aglycons was carried out with glucosides of furaneol, 1-hexanol, phenol, 1-décanol and 4-penten-1-ol for AR2000, P7, F1, F2, F3, F4 and F5. The order of selectivity

was the same for all tested enzymes (Figure 73). First phenol and 1-decanol were released, then the 1-hexanol, the 4-penten-1-ol and last the furaneol, i.e. from less to more polar aglycons.

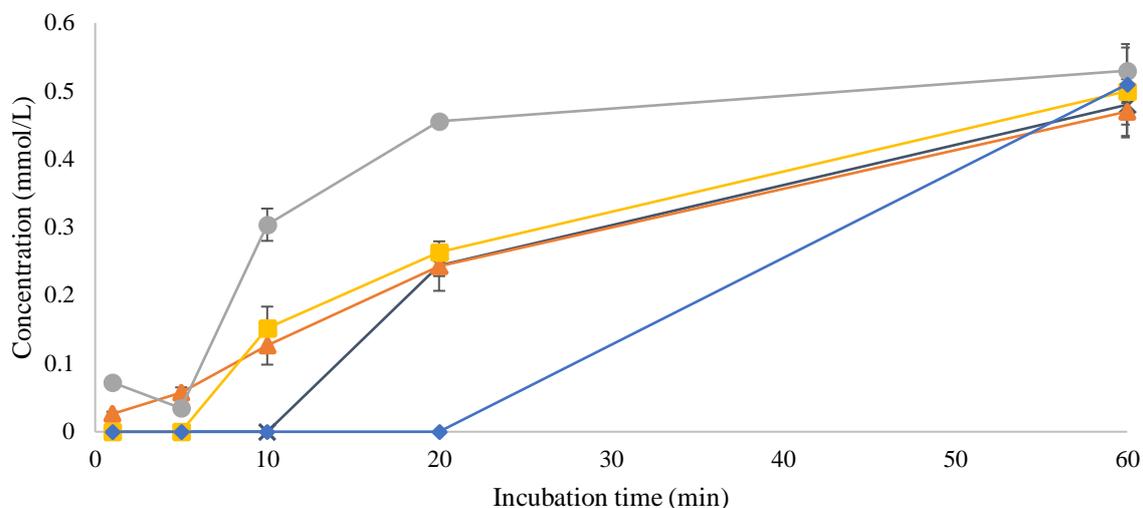


Figure 73: Kinetic of release of 1-dodecanol (round), phenol (triangle), 1-hexanol (square), 4-penten-1-ol (cross) and furaneol (diamond) by E4177

#### 4.2.4.3.3 Specificity on strawberry glycosides

A test for specificity of AR2000, P7, F1, F2, F3, F4 and F5 was realised the pool of extracted strawberry glycosides. Contrary to AR2000 and F1, the enzymes F2, F3, F4 and F5 hydrolysed linalool (floral note) glycoside to release an average of 65  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of fresh strawberry in 4-nonanol equivalent (Table XXIII). All mutants released benzaldehyde (almond note) with a mean of 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (in 4-nonanol equivalent) and they also released cinnamic acid (a volatile compound precursor) with between 122 and 155  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (in 4-nonanol equivalent). AR2000 released more phenylethyl alcohol (rose note) than mutants which released an average of 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (in 4-nonanol equivalent) of phenylethyl alcohol. However, these mutants released more hexanoic acid (acid note), between 513 and 629  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (in 4-nonanol equivalent) and octanoic acid (cheesy note), between 34 and 74  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (in 4-nonanol equivalent), than AR2000.

Tableau XXIII: Volatile compounds released from glycoside extract at 30°C and pH 3.6 by AR2000, E4177, E4179, E4180, E4181 and E4192 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  in equivalent 4-nonanol)

	AR2000	E4177	E4179	E4180	E4181	E4192
Benzaldehyde	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	8 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1
Linalool	0 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0	66 $\pm$ 3	69 $\pm$ 7	63 $\pm$ 3	63 $\pm$ 3
$\gamma$ -Caprolactone	12 $\pm$ 0	12 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
Hexanoic acid	136 $\pm$ 5	629 $\pm$ 67	513 $\pm$ 27	586 $\pm$ 18	558 $\pm$ 29	576 $\pm$ 30
Phenylethyl alcohol	103 $\pm$ 2	22 $\pm$ 4	39 $\pm$ 11	24 $\pm$ 10	30 $\pm$ 8	22 $\pm$ 6
$\gamma$ -Butyl- $\gamma$ -butyrolactone	2 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0	2 $\pm$ 2	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0
Octanoic acid	1 $\pm$ 0	74 $\pm$ 10	34 $\pm$ 4	58 $\pm$ 5	56 $\pm$ 6	36 $\pm$ 4
8-Hydroxylinalool	79 $\pm$ 22	120 $\pm$ 18	36 $\pm$ 0	56 $\pm$ 11	47 $\pm$ 0	52 $\pm$ 1
Coumarone	558 $\pm$ 31	676 $\pm$ 66	960 $\pm$ 186	415 $\pm$ 371	386 $\pm$ 75	481 $\pm$ 93
Cinnamic acid	0 $\pm$ 0	155 $\pm$ 28	122 $\pm$ 16	129 $\pm$ 14	131 $\pm$ 17	126 $\pm$ 16

F5 was removed from the selection because this enzyme has high sugar sensitivity, low activity and any different specificity compared other mutants.

#### 4.2.4.3.4 Assay on strawberry puree

As F2, F3 and F4 were similar in terms of sugars inhibition, gene, pH and temperature profiles and specificity, only two of them (F2 and F3) and F1 were tested on strawberry puree. These three glucosidases were tested on strawberry puree to ensure that their activity was preserved in strawberry conditions: pH, Brix and possible presence of glycosidase inhibitors such as metallic cations ( $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), or transition state analogs (for example: glucono- $\delta$ -lactone) (Lecas et al., 1991; Zollner, 1999b). All enzymes were active in strawberry puree (Table XXIV). Benzaldehyde concentration was increased by > 80% with all three enzymes, and linalool by 55% and 57% with F2 and F3 respectively. Increases of coumarone (green tea note) and phenylethyl alcohol concentrations showed high variation coefficient for all three enzymes, between 18% and 41% for phenylethyl alcohol and between 10% and 81% for coumarone. So these increases must be considered carefully.

Tableau XXIV: Increase of volatile compounds in strawberry puree by deglycosylation

	AR2000	E4177	E4179	E4180
Benzaldehyde	-	83 $\pm$ 14%	81 $\pm$ 11%	96 $\pm$ 16%
Linalool	-	-	55 $\pm$ 2%	57 $\pm$ 6%
$\gamma$ -Caprolactone	48 $\pm$ 1%	48 $\pm$ 5%	22 $\pm$ 3%	37 $\pm$ 2%
Hexanoic acid	-	23 $\pm$ 2%	24 $\pm$ 1%	27 $\pm$ 1%
Phenylethyl alcohol	1079 $\pm$ 17%	146 $\pm$ 26%	445 $\pm$ 122%	271 $\pm$ 111%
$\gamma$ -Butyl- $\gamma$ -butyrolactone	32 $\pm$ 5%	83 $\pm$ 19%	50 $\pm$ 6%	26 $\pm$ 22%
Octanoic acid	-	69 $\pm$ 9%	45 $\pm$ 5%	77 $\pm$ 7%
8-Hydroxylinalool	23 $\pm$ 6%	35 $\pm$ 5%	18 $\pm$ 0%	28 $\pm$ 5%
Coumarone	190 $\pm$ 11%	230 $\pm$ 23%	738 $\pm$ 143%	319 $\pm$ 285%
Cinnamic acid	-	40 $\pm$ 7%	42 $\pm$ 5%	45 $\pm$ 5%

#### 4.2.4.3.5 Experimental designs

To complete data obtained by previous tests, the same experimental designs as above were carried out on two selected glucosidases: F1 and F2. The first design (Table XIX and Figure 69 E & 69 F) studied interaction between temperature, pH and Brix on glucosidases activity. Both enzymes showed high pH sensitivity, but they kept some activity at pH 2.0. Both had their highest activity and their lowest activity for the same points, respectively (46°C/pH 4.4/7.2° Brix) and (40°C/pH 2/12° Brix and 34°C/pH 2.6/16.8° Brix). These conclusions are confirmed by equations obtained by modelling from experimental design data (*Suppl. Data*). The interaction between pH and Brix is a major factor to determine the activity of F1 and F2 ("*Brix\*pH*" p-value <0.01 and <0.05, respectively). The models are a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.83 for both enzymes.

The second design (Table XX and Figure 70 D & 70 E) studied interaction between fructose, glucose and sucrose on glucosidases activity. The best activities for F1 and F2 are respectively 41.3 and 109.5 nkat/mg of protein for the point with glucose at 0 g/kg. Results show the glucose concentration has the most impact on glucosidase activity. This conclusion was confirmed by the modelling equations with a "*glucose*" p-value <0.001 for both enzymes (*Annexe*). The second factor in equation was concentration of fructose with a low significativity (p-value <0.1) for F1 and F2. Modelling showed interaction between concentrations of fructose, glucose and sucrose are negligible (p-value >0.1 for all interactions). The points with 0 g/kg of glucose were clearly outliers in all the experimental designs and was therefore not used in modelling and a point was added by 40 g of fructose/8 g of glucose/40 g of sucrose. The models are a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.93 and 0.87 for F1 and F2, respectively.

## 4.2.5 Discussion

### 4.2.5.1 Activity on furaneol glucoside

P4 activity on furaneol glucoside at pH 3.6 and 30°C was only 1/20<sup>th</sup> of that measured on *p*-NP glucoside at 50°C and pH 5, while for AR2000 is was only 1%. This activity on strawberry pH condition was the main reason to choose P4 (and consequently P7) as main parent enzyme for directed evolution. The incoherence between higher conversion with F2, F3 and F4 than with P7 and their specific activity could be explained by the quantity of glucosidases produced by yeasts. Indeed, if the conversion of mutants was higher than P7 for the same activity in reaction medium but their specific activity was lower, it means the improvement during L-Shuffling<sup>TM</sup> would not be on specific activity but on the level of expression of these enzymes by yeasts.

### 4.2.5.2 Inhibition by sugars

Inhibition by sugars is one of the most critical parameters in this study, as fruits are rich in sugars, notably glucose which has an inhibitory action on glycosidase by product effect, and these

sugars can not be removed during process. The average of 80% of activity loss found on most tested enzymes was in accordance with the conventional behavior of glucosidases in presence of glucose (Sarry & Günata, 2004). Experimental design on interaction between glucose, fructose and sucrose confirmed that glucose was effectively the sugar with the most impact on glucosidase activity. No change on activity was observed for P5 and P6 in presence of fructose or saccharose up to 80 g/kg. Indeed, as described in introduction, sensitivity to glucose varied between glucosidases. P5 and P6 with their respective activity loss of 27% and 28% should be the best parents for directed evolution. Glucosidases with high tolerance for glucose have already been observed by Günata & Vallier (1999) and Riou et al. (1998). These enzymes with high tolerance for glucose come from *Aspergillus oryzae* and could have structural similarity with P5 and P6.

About mutant enzymes, F1's activity on pnP-glucose was much less affected by the presence of glucose than AR2000 and the parent P7. Indeed, F1 lost 63% of its activity when glucose up from 0 g/kg to 16 g/kg against 75% and 100% respectively for AR2000 and P7.

#### 4.2.5.3 Optima of pH and temperature

The P4 enzyme had a favourable pH profile, keeping high levels of activity from pH 2.8 to pH 5.1. No activity was found for P5 and P6 at pH 2, which would be acceptable in the case of strawberry but not on other fruits of the Natarôme project, namely lemon (mean pH: 2.4 (Maldonado, Belfiore, & Navarro, 2008)).

The optimization of pH parameter on mutant enzymes has two aspects. The first is in favor of an application on fruits. Despite a low shift of optimal pH from around 5 to around 5.5-6 for all mutant glucosidases, they had higher activities than parent and commercial glucosidases at fruits pH range (pH 2 to pH 5). The second aspect is in disfavor of application on fruits. Experimental design on interaction between temperature, pH and Brix showed a high sensibility for pH decrease. F1 lost 95% of its activity and F2 lost 75% of its activity when pH decreased from 5 to 2. For an application on strawberry this could be acceptable but for further application on acid fruits like citrus this parameter is determining.

The last parameter tested for selection of parent glucosidases was temperature. For an application in industrial process the optimal activity temperature should be as low as possible to reduce the cost during incubation. Fruit based products are generally pasteurized and not sterilized, consisting in a heating treatment of 3-5 min at 70-90°C (Rawson et al., 2011). This process improves shelf-life while preserving a maximum of fresh flavors. P4, though its temperature optimum was 50°C, kept a higher activity than P5 and P6 at 40° and 30°C. P4 was retained for the parameter of incubation temperature. Another factor is that these enzymes must be inactivated by pasteurization. AR2000, P4, P5 and P6 would be inactivated with a pasteurization at medium temperature (inactivation between 70°C and 80°C) and P1 would be inactivated with a pasteurization at high temperature (inactivation at 90°C).

For all mutants the optimal temperature decreased from 50°C to 40°C. This type of evolution was already realized on thermophilic glucosidase from *Pyrococcus furiosus* by Lebbink et al. (Lebbink et al., 2000). They were able to triple the catalytic constant (k<sub>cat</sub>) at 20°C compared to wildtype enzyme. The decrease of inactivation temperature for F1, F2, F3 and F4 was another positive modification for industrial application, as it can allow lowering pasteurization intensity.

#### 4.2.5.4 Aglycon selectivity of glucosidases

The mutant glucosidases, AR2000 and P7 showed selectivity for apolar substrates. Glucosidases possess a hydrophobic cavity which receives the aglycon part of glycosides (Czjzek et al., 2000; Verdoucq et al., 2004). It could explain that tested enzymes were all the more active as the aglycone is hydrophobe.

#### 4.2.5.5 Application of enzymes on strawberry puree

While AR2000 would increase more rose note of strawberries, F1 would increase almond note and F2, F3, F4 and F5 both almond and floral notes. When glucosidases were applied on strawberry puree, F2 and F3 had again similar results excepted for coumarone (green tea note). So only F2 and F1 are conserved for experimental designs. They showed that these new enzymes had an activity minimum 20 times higher than AR2000 or P7. So F1 and F2 were selected as optimized glucosidases for application on strawberries.

### 4.2.6 Conclusion

Thanks to directed evolution by L-Shuffling™, 2 new glycosidases adapted for application on strawberries were developed. One has a better resistance to inhibition by sugars (a mixture of fructose, glucose and sucrose) than regular glucosidases and the other one has a higher activity than commercial glucosidase. Both were devoid of pectinase activity which allows to apply these enzymes on fruit puree or dices without impact on their structure. Besides modelling of new glycosidases activity allowed to create a predictive tool know if these enzymes would be active on a matrix only with pH and sugar concentration measurement and not with a total volatiles profile analysis.

### 4.2.7 Synthèse de chapitre

#### Développement de nouvelles glucosidases adaptées au milieu fraise/abricot

Après sélection d'enzymes parents pour l'évolution dirigée par L-Shuffling™, 5 mutants ont été présélectionnés et caractérisés pour déterminer ceux qui sont les plus adaptés à une application sur fruits. Ainsi 2 enzymes ont été sélectionnées pour l'optimisation en procédé industriel : La E4177 pour sa tolérance aux sucres 3 fois supérieure à celle des autres glucosidases testées, dont l'AR2000, et la E4179 pour son activité en conditions standards 2 fois supérieure à

celle de l'AR2000. Le fait d'avoir deux enzymes utilisables dans les fraises et abricots va permettre de créer une « boîte noire » pour éviter la reproduction des enzymes par les sociétés concurrentes.

### **L'outil prédictif**

La caractérisation des enzymes parents a permis de mettre en place les deux plans composites centrés. Ces plans ont permis de voir les interactions entre pH, Brix et température et entre les concentrations en glucose, fructose et saccharose. Pour l'AR2000, la E4078 et la E4079, cela a permis de montrer qu'aucune interaction entre ces 6 paramètres n'intervenait dans l'activité de ces trois glycosidases. Pour l'AR2000, c'est la température et le Brix (principalement via la concentration en glucose) qui seront les paramètres influençant le plus l'activité de l'enzyme alors que pour les mutants retenus E4177 et E4179 il s'agira du pH et du Brix, où ces paramètres sont interdépendants. La modélisation des activités des glucosidases à partir de ces plans d'expérience a permis de mettre au point un outil prédictif indiquant si l'enzyme est adaptée pour l'utilisation d'une nouvelle matrice par simple connaissance de son pH, de son Brix, de sa concentration en sucres et de la température d'incubation souhaitée.



## 4.3 Intégration des enzymes optimisées dans les procédés de transformation

### 4.3.1 Choix du fruit

#### 4.3.1.1 Démarche

Pour répondre aux demandes des partenaires du projet Natarôme+, notamment aux partenaires laitier et confiturier, 2 types d'application ont été principalement traitées : le traitement enzymatique de la purée de fruits et l'imprégnation de l'enzyme dans des cubes de fruits. Ces deux procédés ont des contraintes différentes. Alors que le premier vise exclusivement le meilleur rendement possible de libération de la réserve, le second procédé possèdera une contrainte supplémentaire puisque la structure du cube devra être conservée. Pour l'optimisation de ces procédés, le choix de la matrice à utiliser est donc un facteur déterminant. Ainsi à partir des résultats obtenus durant la caractérisation des profils aromatiques et des réserves des différentes variétés de fraises (partie V.1.2), un lot de 300 kg de cubes de fraises *Camarosa* du Maroc (récolte 2017) a été commandé. De plus, il a été décidé par le consortium du projet Natarôme+ de cibler également des lots de fraises utilisées par les partenaires et, ainsi, 3 autres lots de fraises ont été caractérisées avec le protocole présenté en partie IV.8.2 : des fraises bio d'Agro'Novae, des fraises d'Espagne de Sénagral et des *Mibao* (fraises chinoises). Le lot de fraise sera choisi selon deux critères : un potentiel aromatique suffisant pour rehausser l'arôme de la fraise et une réserve de furanéol, molécule clé de l'arôme de fraise, exploitable. Le procédé optimisé aura pour but d'être transposé à l'abricot. Ainsi une variété d'abricot a également été caractérisée pour s'assurer qu'elle ait une réserve suffisante. Tous les essais ont été réalisés sur des fruits surgelés (IQF).

#### 4.3.1.2 Choix de la fraise

##### 4.3.1.2.1 Détermination de la réserve de furanéol dans les différentes variétés de fraise

La première étape pour choisir la variété de fraise pour l'optimisation sur procédé est le dosage de la réserve de furanéol par HPLC (Tableau XXV). Les fraises de Sénagral, la *Camarosa* d'Espagne et les fraises d'Agro'Novae ont, respectivement, un potentiel d'augmentation du furanéol de 61%, 133% et 102%. C'est trois lots ont une réserve de furanéol suffisante pour être exploitée. En revanche, la *Mibao* n'ayant pas de réserve de furanéol elle ne sera pas davantage étudiée. Ces réserves de furanéol sont en accord avec celles observées sur les fraises de la saison 2015 destinées à la transformation décrite en IV.1.2.4 (entre 5,9 et 37 mg/kg de glycosides de furanéol) et confirme le biais apporté par la quantification par SPE des glycosides, estimant la quantité de furanéol lié entre 26, 2 mg/kg à 60,2 mg/kg, soit 2,5 à 13 fois supérieur à la quantité de furanéol libre trouvée dans leurs fraises (Roscher et al., 1997).

**Tableau XXV : Quantité de furanéol libre et lié dans les différentes fraises possibles pour l'optimisation de la libération de la réserve d'arôme (n=3)**

Molécule	Mibao	Fraises d'Agro'Novae	Fraises de Sénégal	Camarosa (Maroc)
Furanéol libre (mg/kg)	15±3,6	45±1,8	18±0,3	6±0,0
Furanéol lié (mg/kg)	0±0	46±2,9	11±0,1	8±0,1

#### 4.3.1.2.2 Caractérisation du profil des fraises disposant de glycoside de furanéol

Les résultats de la caractérisation des 3 lots de fraises sont présentés dans le Tableau XXVI avec les molécules odorantes ayant augmentées ou diminuées de manière significative (variation de plus de 20% (cf partie 4.1.1.4)). La caractérisation est faite en conservant l'activité des enzymes endogènes des fraises. Elle sera donc plus proche d'un potentiel aromatique que d'une quantification de la réserve glycosidique avec un bilan final des composés volatils ayant augmenté via l'ajout de glycosidases et via l'action des enzymes endogènes, mais également des composés volatils ayant diminué à cause de la volatilisation ou de la conversion de ses derniers par des enzymes endogènes. Ce choix a été fait car le résultat sera plus proche du résultat obtenu en industrie où l'inactivation des enzymes endogènes des fruits avant transformation n'est pas systématique. Dans la même optique les concentrations des molécules seront relativisées par rapport à leur seuil de détection et leur puissance olfactive, ou LogOdor, sera discutée.

Pour les fraises de la société Agro'Novae, il y a eu 7 molécules néoformées dont 3 avec un seuil inconnu : le pyrulvaldéhyde (note caramel), l'acide (2E)-hexénoïque (note fruitée) et le 2-hydroxyfuranéol (note « caramel »). Malgré leur note intéressante, il reste difficile de conclure sur l'impact de ces arômes sans seuil de détection (les seuils de détection permettant de relativiser la concentration d'une molécule et ainsi d'estimer son pouvoir aromatique exprimé par le LogOdor (LO)). Parmi les molécules qui augmentent 5 ont un LogOdor supérieur à 1 qui implique une concentration supérieure au seuil de détection et donc la possibilité d'être perçue par une personne comme énoncé en partie 1.1.1. Ces composés sont : le 2-phényléthanol (note floral), le (2E)-hexénal (note verte), l'acide acétique (note acide), l'acide 2-méthylbutanoïque (note acide) et l'acide hexanoïque (note grasse). Le 2-phényléthanol est le composé augmentant qui aurait le plus fort impact sur l'arôme de la fraise avec un LO de 27, suivi du (2E)-hexénal avec un LO de 3,27. Cependant ce composé ne peut directement venir d'une déglycosylation (cf partie II.1.4.3), il viendrait soit de l'action des enzymes endogènes de la voie de la LOX responsable de la formation des composés en C6 (cf partie 1.1.3.2), soit de l'action d'une ADH après libération de (2E)-hexénol par la glucosidase (cf partie 1.1.2.1).

Tableau XXVI : Augmentation de composés volatils par action de l'AR2000 dans les différentes « variétés » de fraises mises à disposition par les partenaire du projet Natarôme+ (n=3)

Molécules	Descripteur	Seuil de détection (ppb)	Fraises de Agro'Novae			Fraises de Sénagral			Camarosa (Maroc)		
			Variation (en µg/kg*)	Augmentation relative	LogOdor	Variation (en µg/kg*)	Augmentation relative	LogOdor	Variation (en µg/kg*)	Augmentation relative	LogOdor
Acide acétique	Acide	10000	12226±2078,4	82%	1,22	13705±822,3	89%	1,37	22569±2934	339%	2,26
Acide 2-méthylbutanoïque	Acide	180	428±42,8	28%	2,38	186±16,7	+/-	1,03	173±17,3	+/-	0,96
Acide pentanoïque	Fromage	3000	37±1,1	43%	0,01	0,0	+/-	0,00	-13±-0,1	+/-	0,00
Acide heptanoïque	Fromage	3000	5±0,4	+/-	0,00	169±18,6	Néoformé	0,06	-11±-0,4	-33%	0,00
Butyrolactone	Crémeux	20000	-7±-1,1	+/-	0,00	16±2,4	Néoformé	0,00	0,0	+/-	0,00
Acide octanoïque	Gras	3000	179±28,7	157%	0,06	59±8,9	106%	0,02	-100±-17,1	-41%	-0,03
Acide hexanoïque	Gras	3000	3323±465,2	70%	1,11	728±65,5	+/-	0,24	1574±236,1	+/-	0,52
Butanol	Fermenté	500	32±0,3	Néoformé	0,06	30±1,2	+/-	0,06	0,0	+/-	0,00
2-Phényléthanol	Floral	3	81±12,2	Néoformé	27	0,0	+/-	0,00	72±4,3	Néoformé	24
Alcool benzylrique	Floral	10000	450±40,5	373%	0,04	807±104,9	1041%	0,08	317±25,3	Néoformé	0,03
(2E)-Hexèn-1-ol	Fruité	400	6±0,4	+/-	0,01	6±0,8	+/-	0,01	0,0	+/-	0,00
γ-Dodécalactone	Fruité	7	0,0	+/-	0,00	489±34,2	Néoformé	70	0±0	+/-	0,00
(2E)-Hexénal	Vert	17	56±0,6	Néoformé	3,27	79±11,9	197%	4,67	87±0,9	296%	5,11
1-Hexanol	Herbeux	800	11±0,6	+/-	0,01	26±1	149%	0,03	20±3,3	+/-	0,03
γ-Caprolactone	Tonka	1600	26±0,5	30%	0,02	0,0	+/-	0,00	0±0	39%	0,00
Acétate de 3-méthylbutyle	Fruité	2	-160±-17,6	+/-	-80	-241±-38,6	+/-	-121	-5±-0,1	+/-	-2,60
Pentanol	Fermenté	1.6	0,0	+/-	0,00	0,0	+/-	0,00	3±0,1	36%	1,91
2-Pentanol	Fermenté	4000	50±1,5	Néoformé	0,01	0,0	+/-	0,00	0±0	168%	0,00
Acide propanoïque	Acide	20000	-82±-4,1	-25%	0,00	-35±-5,6	+/-	0,00	55±0,6	345%	0,00
Nonanal	Vert	1	2±0,2	+/-	2,49	0,0	+/-	0,00	29±2,3	64%	29
Acétoïne	Beurré	800	-179±-26,9	+/-	-0,22	-69±-2,8	-70%	-0,09	-1236±-197,7	Disparu	-1,54
Furanéol	Caramel	0.03	-3303±-561,6	-66%	-110113	-1581±-205,6	-77%	-52713	-2615±-261,5	-39%	-87171
Linalool	Floral	6	-64±-4,5	Disparu	-11	-52±-5,2	-78%	-8,63	-38±-0,8	-57%	-6,35
trans-Nérolidol	Floral	300	35±5,2	+/-	0,12	-178±-30,2	Disparu	-0,59	-340±-54,4	Disparu	-1,13
γ-Décalactone	Fruité	11	-674±-20,2	-87%	-61	-346±-44,9	-87%	-31	-223±-2,2	-74%	-20
Hexanoate d'éthyle	Fruité	1	-98±-13,7	+/-	-98	0,0	+/-	0,00	-8±-0,6	+/-	-7,81
Mésifurane	Moisi	0.03	-241±-28,9	-38%	-8020	-370±-51,8	-63%	-12332	-212±-27,6	+/-	-7078
Acétate d'hexyle	Fruité	2	0,0	+/-	0,00	0,0	+/-	0,00	0,0	+/-	0,00
Benzaldéhyde	Fruité	100	0,0	+/-	0,00	0,0	+/-	0,00	0,0	+/-	0,00
Géranol	Floral	40	0,0	+/-	0,00	0,0	+/-	0,00	0,0	+/-	0,00
Acide formique	Acétique	46000	-168±-5	+/-	0,00	73±3,7	+/-	0,00	-186±-5,6	+/-	0,00

+/- : variation non significative car comprise entre -20% et +20% ; en rouge les diminutions significatives (< -20%) ; en vert les augmentations significatives (> 20%)

\* : en équivalent 4-nonanol

Pour les fraises de la société Sénagral, il y a eu 5 molécules néoformées dont 2 avec un seuil inconnu : la  $\delta$ -caprolactone (note « herbe ») et le 2-hydroxyfuranéol (note caramel). Trois molécules augmentent avec un LO supérieur à 1 : la  $\gamma$ -dodécalactone (note crèmeuse), le (2E)-hexènal et l'acide acétique. La  $\gamma$ -dodécalactone (avec un LO de 70) et sa note « crème » sont assez recherchées par les fabricants de yaourts comme Sénagral pour compenser la perte de matière grasse des produits allégés et cette augmentation pourrait ouvrir des perspectives au-delà du renforcement de l'arôme du fruit.

L'analyse de la *Camarosa* du Maroc a montré 4 molécules néoformées durant le traitement enzymatique dont 2 avec un seuil inconnu : la coumarone (note thé vert) et la pantolactone (note caramel). Cinq molécules qui augmentent ont un LO supérieur à 1, donc susceptible d'être ressenties : le 2-phényléthanol, le nonanal (note verte), le (2E)-hexènal, le pentanol (note fermentée) et l'acide acétique. Le 2-phényléthanol et le nonanal auraient tous les deux un impact équivalent sur l'arôme de la fraise avec des LO respectifs de 24 et 29. Comme le (2E)-hexènal, le nonanal ne peut venir directement de l'hydrolyse d'un glycoside, il viendrait de la voie de la LOX responsable de la formation des composés en C6 (cf partie II.1.3.2) ou de l'action d'une ADH après libération du nonanol par la glucosidase (cf partie II.1.2.1).

Toutes les molécules ayant augmentées avec un impact sur son LO supérieur à 1, à savoir le 2-phényléthanol, le (2E)-hexènal, l'acide 2-méthylbutanoïque, l'acide hexanoïque, la  $\gamma$ -dodécalactone, le nonanal, le pentanol et l'acide acétique, font partie des composés volatils de la fraise qui sont retrouvés dans la littérature (cf partie 1.1.1.1) et dans les précédentes caractérisations réalisées durant la thèse (cf partie 4.1.2.4).

Ces augmentations sont également accompagnées de diminutions. Le point le plus critique est la diminution de 4 composés avec un seuil de détection bas durant le traitement enzymatique indépendamment de la variété testée : le furanéol (note « caramel »), le mésifurane (note moisie, « caramel »), le linalool (note florale) et la  $\gamma$ -décalactone (note fruitée de pêche). Ce sont des molécules clés de l'arôme de la fraise et leur diminution a un impact certain sur l'arôme du fruit. La perte de furanéol a été investiguée et les résultats sont présentés en 4.3.1.2.4.

Suite à l'analyse du potentiel aromatique des fraises de Sénagral, des *Camarosa* d'Espagne et des fraises d'Agro'Novae et malgré les pertes observées pour certaine molécules clés de l'arome de fraise, le choix de la fraise de référence se porterait sur les fraises d'Agro'Novae principalement du à sa grande quantité de furanéol sous forme lié (45 ppm) qui a été validée par analyse HPLC.

#### **4.3.1.2.3 Confirmation du potentiel aromatique des fraises de la société Agro'Novae avec l'enzyme E4177**

Afin de confirmer le choix des fraises de la société Agro'Novae comme référence pour l'optimisation du traitement enzymatique, une dernière caractérisation a été réalisée avec

l'enzyme E4177 pour s'assurer de l'exploitabilité de l'enzyme développée par le partenaire du projet Protéus. Il s'agit également de la glucosidase mutante la plus performante lors des essais à l'échelle laboratoire dans les conditions de la fraise. Pour cette caractérisation, il n'y a pas de molécules néoformées, en contrepartie un nombre plus importante de molécules ont augmenté (Tableau XXVII). Cinq molécules augmentent avec un LO supérieur à 1 : la  $\gamma$ -dodécalactone, le (2E)-hexanal, l'acide 2-méthylbutanoïque, le pentanol et l'acétate de 3-méthylbutyle (note fruitée). Cet ester, retrouvé dans la majorité des fraises (cf 1.1.1.1), aurait le plus fort impact sur l'arôme de la fraise avec un LO de 380. Bien que l'acétate de 3-méthylbutyle ne puisse être directement libéré par l'action d'une glucosidase, sa formation pourrait venir d'une action conjointe de la glucosidase rajoutée et d'une AAT (alcool acyl transférase) endogène de la fraise. Cette dernière crée des esters à partir d'alcool et d'acylCo-A, ainsi la glucosidase aurait libéré l'alcool 3-méthylbutanol qui aurait ensuite été pris en charge par l'AAT de la fraise pour former l'ester (cf 1.1.2.1. et Perez, Sanz, & Olias, 1993). Contrairement à la caractérisation avec l'AR2000, il n'y a plus d'augmentation significative du 2-phényléthanol. Cela est concordant avec les essais de spécificité/sélectivité des enzymes produites par évolution dirigée qui relâchaient une plus faible quantité de ce composés comparé à l'AR2000 (cf 4.2.4). Lors de cette caractérisation, il n'y a plus de perte significative de  $\gamma$ -décalactone et de linalool. En revanche, la perte de furanéol et de mésifurane est toujours observée.

Bien que l'acétate de 3-méthylbutyle ne puisse être directement libéré par l'action d'une glucosidase, sa formation pourrait venir d'une action conjointe de la glucosidase rajoutée et d'une AAT (alcool acyl transférase) endogène de la fraise. Cette dernière crée des esters à partir d'alcool et d'acylCo-A, ainsi la glucosidase aurait libéré l'alcool 3-méthylbutanol qui aurait ensuite été pris en charge par l'AAT pour former l'ester (cf II.1.2.1.). Contrairement à la caractérisation avec l'AR2000, il n'y a plus d'augmentation significative du 2-phényléthanol. Cela est concordant avec les essais de spécificité/sélectivité des enzymes produites par évolution dirigée qui relâchaient une plus faible quantité de ce composés comparé à l'AR2000 (cf V.2.4). Lors de cette caractérisation, il n'y a plus de perte significative de  $\gamma$ -décalactone et de linalool. En revanche, la perte de furanéol et de mésifurane est toujours observée.

Cette dernière caractérisation à confirmer l'utilisation des fraises de la société Agro'Novae pour l'optimisation du procédé. Cependant ces fraises sont conditionnées entières et pour l'étude de l'imprégnation sous-vide des fraises conditionnées en cubes sont nécessaires. Pour cette optimisation ce seront les *Camarosa* du Maroc, conditionnées en cubes, qui seront utilisées.

Tableau XXVII : Augmentation de composés volatils par action de la E4177 sur les fraises de la société Agro'Novae (n=3)

Molécule	Descripteur	Seuil de détection (ppb)	Agro'Novae		
			Variation après traitement enzymatique (en µg/kg*)	Augmentation	LogOdor
Acide acétique	Acide	10000	2408±72.3	22%	0.24
Acide 2-méthylbutanoïque	Acide	180	319±6.4	30%	1.77
Acide heptanoïque	Fromage	3000	10±1.3	31%	0
Acide octanoïque	Gras	3000	92±12.9	64%	0.03
Acide hexanoïque	Gras	3000	2248±314.7	71%	0.75
Butanol	Fermenté	500	20±2	125%	0.07
Alcool benzylique	Floral	10000	135±8.1	174%	0
(2E)-Hexèn-1-ol	Fruité	400	27±3.2	41%	0.05
γ-Dodécalactone	Fruité	7	761±76.1	199%	19
(2E)-Hexénal*	Vert	17	17±0.8	261%	1.58
Acétate de 3-méthylbutyle	Fruité	2	22±0.4	125%	380
Pentanol	Fermenté	1.6	401±16	275%	11
2-Pentanol	Fermenté	4000	-2371±-189.7	-85%	0
Acétoïne	Beurré	800	-165±-14.8	-56%	0.5
Furanéol	Caramel	0.03	-196±-33.3	-100%	-79033
<i>trans</i> -Nérolidol	Floral	300	-8±-0.5	-57%	0.55
Mésifurane	Moisi	0.03	-27±-3.5	-36%	-6521
Acétate d'hexyle	Fruité	2	-8±-1.1	-27%	-4.02
Benzaldéhyde	Fruité	100	-27±-3.7	-91%	-0.27

en rouge les diminutions significatives (< -20%); en vert les augmentations significatives (> 20%)

\* : en équivalent 4-nonanol

#### 4.3.1.2.4 Etude de la perte de furanéol

Avant de réaliser l'optimisation du procédé de traitement enzymatique, il a été nécessaire de comprendre la diminution du furanéol malgré une réserve de glycosides de furanéol pouvant potentiellement doubler la quantité de furanéol dans les fraises de la société d'Agro'Novae. Différentes hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer ce phénomène :

- Est-ce un problème méthodologique du à l'impact du sel ou à la centrifugation ?
- Est-ce un problème analytique, par une erreur sur le standard interne ou une mauvaise répétabilité des injections ?
- Est-ce une perte d'activité de l'enzyme due au vieillissement du lot ?
- Est-ce un problème venant des fraises qui auraient trop de glucose ?

Pour vérifier l'hypothèse méthodologique, une nouvelle caractérisation a été faite avec les fraises d'Agro'Novae. Le protocole présenté en IV.8.2 a été comparé à ce même protocole sans

ajout de sel et/ou sans centrifugation. Il n'y a pas de changement significatif dans les résultats, excepté pour la perte de furanéol qui est un peu plus faible avec l'extraction sur purée (protocole sans centrifugation), en moyenne -63%, mais cette variation peut être due à l'interaction entre le furanéol et la matrice observée lors de la mise au point de la méthode (partie 4.1.1.5).

Pour vérifier l'hypothèse analytique, les injections anciennes et récentes ont été comparées pour leur pic de standard (4-nonanol) et leur coefficient de variation. Le pic de standard reste toujours dans le même ordre de grandeur et les coefficients de variation sont plus faibles depuis l'ajout de la centrifugation dans le protocole de caractérisation.

L'activité des deux lots d'AR2000 à disposition est régulièrement contrôlée en milieu modèle et que ce soit avec le glucoside de furanéol ou le glucoside de *p*-NP, aucune perte d'activité, ni de furanéol, n'a été constatée.

Avec les précédentes expériences, les hypothèses sur des problèmes analytiques, l'efficacité de l'extraction, ou l'activité enzymatique sont exclues. Il reste à vérifier les fraises et la partie traitement enzymatique de la méthode. Dans un premier temps l'hypothèse impliquant les fraises est étudiée. Leurs principaux sucres ont donc été dosés. Bien que le taux de glucose des fraises d'Agro'Novae soit plus élevé que la moyenne (3,74 g/100 g de fraises fraîches), ceux des fraises de Sénégal et de la *Mibao* sont faibles, respectivement de 1,68 et 1,76 g/100 g de fraises fraîches (Tableau XXVIII) ce qui exclut l'hypothèse d'une inactivation de l'enzyme par le glucose durant la caractérisation.

**Tableau XXVIII : Dosage des trois sucres majeur dans les fraises d'Agro'Novae, de Sénégal et la Mibao (n=3)**

Variétés	Saccharose (g/100 g)	Glucose (g/100 g)	Fructose (g/100 g)
Fraises Agro'Novae	0,15±0,01	3,74±0,03	4,23±0,04
Fraises Sénégal	0,11±0,01	1,68±0,01	2,01±0,03
Mibao	0,00±0,00	1,76±0,02	2,16±0,01

#### 4.3.1.2.5 Impact des prétraitements l'hydrolyse du glycoside de furanéol

Un dosage du furanéol et du glycoside de furanéol par HPLC a été réalisé afin de confirmer les résultats obtenus par GC-MS après des traitements de :

- Lavage en bain chloré, servant, en industrie, à éliminer la flore initiale du fruit
- Blanchiment, servant à inactiver les enzymes endogènes du fruit (cf partie 1.3.2.1.1)

- Ajustement du pH de la purée de fraise (de pH 3,6 à pH 5,5) par ajout de citrate de sodium, servant à modifier les propriétés organoleptiques des produits alimentaire ("Additifs Alimentaires - Webadditifs,")
- Ajout de pectinase, servant d'aide au pressage des fruits (cf partie 1.3.4).

Les résultats ont été compilés dans le Tableau XXIX. Après lavage, l'augmentation de furanéol observée entre le témoin et les fraises traitées avec E4177 est de 17% (à la limite de la significativité en GC-MS (cf partie 4.1.)). Cette augmentation est accompagnée d'une baisse du glycoside de furanéol moitié moins importante. Il est tout de même à noter que le processus complet (lavage + incubation + pasteurisation) fait drastiquement diminuer la quantité de

		Concentration en glycoside de furanéol (mg/L)	Concentration en furanéol (mg/L)	Concentration en glycoside de furanéol (µmol/L)	Concentration en furanéol (µmol/L)
Purée de fraise sans traitement (n=3)		101 ± 4,4	45 ± 2,9	351 ± 15	351 ± 23
Lavage	Témoin (n=3)	21 ± 1,4	11 ± 0,5	75 ± 5	92 ± 4
	AR2000 (n=2)	22 ± 1,4	12 ± 0,7	76 ± 5	98 ± 5
	E4177 (n=2)	19 ± 0,6	15 ± 0,5	67 ± 2	121 ± 4
Lavage + blanchiment	Témoin (n=3)	18 ± 0,8	9,4 ± 0,2	61 ± 3	73 ± 1
	AR2000 (n=2)	15 ± 1,0	16 ± 0,8	52 ± 3	132 ± 6
	E4177 (n=2)	23 ± 1,3	13 ± 0,5	81 ± 5	103 ± 4
Lavage + pH 5,5	Témoin (n=3)	22 ± 0,9	14 ± 0,5	78 ± 3	112 ± 4
	AR2000 (n=2)	24 ± 1,3	18 ± 0,3	82 ± 5	145 ± 3
	E4177 (n=2)	8,0 ± 0,3	9,4 ± 0,3	27 ± 1	73 ± 2
	E4179 (n=2)	16 ± 0,5	10 ± 0,5	56 ± 2	84 ± 4
Lavage + pectinase	Témoin (n=3)	62 ± 3,0	16 ± 1,1	215 ± 10	130 ± 9
	AR2000 (n=2)	58 ± 2,8	19 ± 0,4	202 ± 10	150 ± 3
	E4177 (n=2)	65 ± 4,2	17 ± 0,2	225 ± 14	135 ± 2

furanéol et de glycoside de furanéol avec une perte respective de 75% et 80%. Cette diminution ne peut cependant pas être attribuée à la pasteurisation. En effet, les essais concernant l'impact de la pasteurisation (75°C, 3 min) sur l'hydrolyse du glycoside de furanéol n'ont pas montré de variation de concentration du glycoside par rapport au témoin non pasteurisé (Figure 74). En revanche les fruits étant surgelés, il est possible que cette perte importante vienne de la perte de l'exsudat libéré avec la remonté en température des fraises durant le lavage (Puksza & Palich, 2007).

**Tableau XXIX : Dosage du furanéol et du glycoside de furanéol par HPLC après traitement**

Après lavage et blanchiment, la quantité totale de furanéol (libre + lié) passe de 134,9  $\mu\text{M}$  dans le témoin à 184,9  $\mu\text{M}$  après traitement par l'AR2000 ou la E4177, soit une augmentation de 37% de la quantité totale de furanéol. Ces résultats pourraient indiquer une production de furanéol et/ou glycoside de furanéol durant le procédé. Cependant une erreur dans le traitement de lavage est plus probable, surtout que la grande majorité des enzymes endogènes a été inactivée durant le blanchiment.

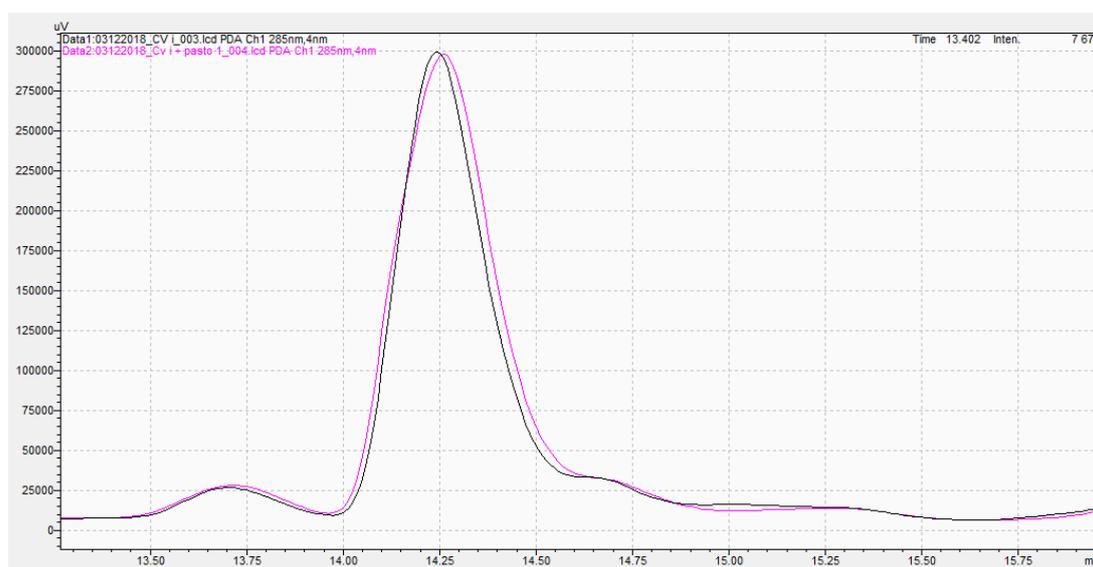


Figure 74 : Chromatogramme HPLC avec le pic de glycoside de furanéol avant (noir) et après (rose) pasteurisation 3 minutes à 75°C

Après lavage, l'ajustement à pH 5,5 permet en théorie de faciliter l'action des glucosidases car leur optimum de pH est proche de cette valeur. Ces résultats mettent en évidence une nette diminution de la teneur en glycosides de furanéol qui pourrait être liée à l'action des glucosidases E4177 et E4179. Cependant, cette diminution n'est pas en adéquation avec l'augmentation du furanéol libre, puisque celui-ci diminue de 47% et de 26% comparé au témoin. La perte du furanéol pourrait être le résultat d'une consommation de la molécule par un microorganisme (contamination) ou par une enzyme native de *Y. lipolytica*, la souche d'expression des enzymes de la société Protéus, qui serait plus active à pH 5,5 qu'à pH 3,5.

Tableau XXX: Dosage du furanéol et du glycoside de furanéol par HPLC après traitement par de la E4177 stérilisée par microfiltration ou de la E4177 sur de la fraise lavée à l'hypochlorite de sodium

	Concentration en glycoside de furanéol (mg/L)	Concentration en furanéol (mg/L)	Concentration en glycoside de furanéol ( $\mu\text{mol/L}$ )	Concentration en furanéol ( $\mu\text{mol/L}$ )
Témoin (n=3)	61,75 $\pm$ 3,0	21,83 $\pm$ 1,0	213 $\pm$ 8,7	170 $\pm$ 8,6
E4177 (n=2)	61,45 $\pm$ 2,1	19,71 $\pm$ 0,8	212 $\pm$ 5,5	154 $\pm$ 6,8
E4177 filtrée (n=2)	59,69 $\pm$ 2,2	19,88 $\pm$ 1,2	206 $\pm$ 6,4	155 $\pm$ 8,8

Pour vérifier l'hypothèse de la contamination par un microorganisme un dosage du furanéol et glycoside de furanéol a été réalisé sur des lots de fraises blanchies (pour éliminer l'action des enzymes endogènes), ajusté à pH 5,5 et traités avec la E4177 stérilisée ou non (Tableau XXX). Les résultats sont identiques que l'enzyme ait été filtrée ou non. Cela exclut l'hypothèse d'une contamination qui consommerait le furanéol et le glycoside de furanéol dans les solutions enzymatiques. Le fait que le furanéol total n'ait pas diminué au cours de l'incubation montre que l'hypothèse qu'une enzyme de *Y. lipolytica* soit responsable de la consommation du furanéol est également invalidée. Une dernière possibilité consisterait en une interaction entre une ou des enzymes endogènes de la fraise et un composé présent dans la solution enzymatique. Pour tester cette hypothèse, il faudrait vérifier l'évolution du furanéol sur des fraises non blanchies avec ajout d'un témoin négatif enzymatique (milieu de culture avec vecteur d'expression sans transformation pour produire des glucosidases).

Le dernier traitement étudié est l'ajout de pectinase. En effet les pectines de la fraise pourraient retenir une partie du furanéol et glycoside de furanéol (E. (Institut N. de la R. A. Guichard, 1996). Les lots traités avec la E4177 + pectinase ne présentent pas de variation significative de la quantité de glycosides de furanéol et de furanéol comparé aux résultats avec la E4177 stérilisée (sans activité pectinase) (Tableau XXIX et XXX). Ces résultats excluent une possible rétention du furanéol par les pectines.

Une différence remarquable est à noter concernant les concentrations en furanéol et glycoside de furanéol retrouvées entre les procédés de lavage, lavage + blanchiment, lavage + ajustement de pH et les procédés lavage + stérilisation des enzyme, lavage + ajout de pectinases. Ce passage d'un total de furanéol (lié + libre) moyen de 150  $\mu\text{M}$  à 350  $\mu\text{M}$  est incohérent par rapport aux différents paramètres étudiés. La partie analytique a été mise hors de cause. L'hypothèse la plus probable serait une erreur lors de l'application des procédés. Des essais seront refaits pour vérifier cette hypothèse.

#### **4.3.1.3 Validation de la variété d'abricot pour l'optimisation du procédé de traitement enzymatique**

Les abricots mis à disposition par la société Sénagral ont été caractérisé avec l'AR2000 pour savoir si leur potentiel aromatique était suffisant pour la transposition des procédés optimisés sur la fraise. Durant le traitement enzymatique, 5 molécules ont été néoformées (Tableau XXXI) : le 2-phényléthanol, l'acide 3-méthylbutanoïque (note acide), le benzaldéhyde (note fruitée d'amande amère), le géraniol (note florale) et la  $\gamma$ -décylactone. Parmi les molécules qui augmentent ou sont néoformés, cinq ont un LO supérieur à 1, donc susceptible d'être ressenties : l'acide acétique, le 2-phényléthanol, le benzaldéhyde, le géraniol et la  $\gamma$ -décylactone. Le 2-phényléthanol, le benzaldéhyde et la  $\gamma$ -décylactone auraient le plus d'impact sur l'arôme des abricots avec des LO

respectifs de 18, 20 et 17. Ces trois composés sont des molécules clés de l'arôme de l'abricot comme décrit en 1.1.1.2.

Le benzaldéhyde est bien issu de l'hydrolyse par la glycosidase malgré que ce soit un aldéhyde et pas un alcool ou un acide. En effet, cette molécule est stockée sous forme d'amygdaline. C'est un cellobioside qui libère un composé cyanogéné après hydrolyse. Ce composé se réarrange instantanément en benzaldéhyde et acide cyanogénique comme présenté en 1.2.1.3.2. Il est prévu de vérifier par analyse HPLC que l'acide cyanogénique ne soit pas libéré en quantité suffisante pour rendre le produit toxique (dose létale estimée entre 50 et 60 mg ("Hydrocyanic Acid, Liquefied | Cameo Chemicals | Noaa,")). Une seule perte significative est observée : l' $\alpha$ -terpinéol. Ce composé disparaît également dans le témoin, il s'agit donc d'une perte naturelle qui peut s'expliquer par l'origine terpénique de cette molécule, les terpènes étant réputés pour leur volatilité.

Ces résultats confirment que les abricots de la société Senagral ont un potentiel aromatique suffisant pour subir la transposition du procédé optimisé sur fraises.

**Tableau XXXI : Augmentation de composés volatils par action de l'AR2000 dans le lot d'abricots de la société Senagral (n=3)**

Molécule	Descripteur	Seuil de détection (ppb)	Abricots de Sénagral		
			Variation après traitement enzymatique (en $\mu\text{g}/\text{kg}^*$ )	Augmentation	LogOdor
Acide acétique	Acide	10000	44133 $\pm$ 5737.4	353%	4.41
Acide 2-méthylbutanoïque	Acide	180	57 $\pm$ 6.3	Néoformé	0.32
2-Phényléthanol	Floral	3	54 $\pm$ 5.4	Néoformé	18
Alcool benzylique	Floral	10000	1161 $\pm$ 174.2	1849%	0.12
Acide propanoïque	Acide	20000	808 $\pm$ 16.2	203%	0.04
$\gamma$ -Décalactone	Fruité	11	188 $\pm$ 28.2	Néoformé	17
Benzaldéhyde	Fruité	100	2045 $\pm$ 265.8	Néoformé	20
Géranol	Floral	40	55 $\pm$ 1.7	Néoformé	1.38
Acide formique	Acétique	46000	149 $\pm$ 17.9	131%	0.00
$\alpha$ -Terpinéol	Terpénique	330	-201 $\pm$ -8	Disparu	-0.61

en rouge les diminutions significatives (< -20%) ; en vert les augmentations significatives (> 20%)

\* : en équivalent 4-nonanol

## 4.3.2 Etude du traitement du fruit avant incubation

### 4.3.2.1 Mise en place des limites et conditions de validation des procédés

L'optimisation du procédé est réalisée pour une application en industrie ce qui implique différentes contraintes donnant des limites aux différents paramètres étudiés. Ces limites doivent

coïncider avec les conditions d'utilisation des glucosidases. Les résultats obtenus avec la caractérisation des enzymes ont permis de fixer la température d'incubation à 40°C, une température proche du maximum d'activité (partie V.2.4). Le traitement enzymatique se fera à 1 g/kg d'AR2000, ce qui correspond à 10 mL/kg de E4177 ou E4179 pour une activité totale équivalente. L'enzyme E4177 sera privilégiée dans les essais par rapport à la E4179 car elle résiste plus au glucose. Cependant, la E4179 sera utilisée dans le traitement avec ajustement au pH 5,5, qui est son pH optimal et pourrait éventuellement compenser sa sensibilité au glucose. Comme le blocage d'une cuve pendant plusieurs heures est coûteux, mais qu'il faut en même temps laisser le temps aux enzymes d'agir, la durée de l'incubation ne pourra excéder 2 heures. Il faudra donc jouer sur le couple temps/quantité d'enzyme pour garder cet objectif, sachant que la quantité d'enzyme que l'on peut rajouter est également limitée pour une question de coût et de dilution du produit. Dans un premier temps les essais sont analysés par GC-MS et par HPLC, puis des échantillons sont envoyés à la société Jean Niel pour subir une analyse sensorielle. Le but du projet étant de fournir un produit avec un arôme amélioré, cette analyse sera celle qui déterminera si l'amélioration est suffisante.

### 4.3.2.2 Impact des prétraitements sur la libération de la réserve

Les matrices fruits sont sujets à différents traitements avant l'étape finale de transformation. Outre le possible bouleversement du profil aromatique, il est également possible que ces traitements jouent un rôle sur la réserve d'arôme et sa libération. Ainsi, à partir des fraises de la société Agro'Novae (choisies comme références), l'impact de plusieurs traitements sur la libération de la réserve aromatique a été étudié : le lavage en bain chloré (élimination de la flore initiale du fruit) le blanchiment (inactivation des enzymes endogènes), l'ajustement de la purée de fraise au pH 5,5 (conditions plus favorables aux glucosidases) et l'ajout de pectinase (décompartmentation cellulaire favorisée). Les augmentations en composés volatils observées dans cette partie ont été réalisées par rapport à un témoin sans enzyme ayant subi les mêmes traitements et procédés afin de ne pas avoir à tenir compte de l'impact des traitements sur le profil initial des fraises.

Une étude sensorielle a pu mettre en évidence une corrélation entre la « strawberry flavor » et certains composés volatils : Furanéol, mésifurane, 3-méthylbutanoate de méthyle (note fruitée), butanoate d'éthyle (note fruitée) et thioacétate de méthyle (Du, Plotto, Baldwin, & Rouseff, 2011). En plus de la réserve d'arôme, il sera donc intéressant de suivre l'évolution du furanéol, du mésifurane et du butanoate d'éthyle les molécules de cette liste qui ont été identifiées et quantifiées.

### 4.3.2.3 Impact des traitements sur le profil initial

L'impact des traitements a été étudié en comparant le profil aromatique de fraises broyées en purée avant et après avoir subi tout le cycle de transformation (traitement, incubation 2h à 40°C

sans enzyme et pasteurisation). Les composés volatils ont été quantifiés et les résultats sont présentés dans le Tableau XXXII.

Le lavage en bain chloré provoque une diminution de la concentration de la majorité des composés pouvant aller jusqu'à la disparition (3-méthylbutanol ou hexanoate d'éthyle). Cependant, le linalool, le furanéol, l'alcool benzylique, la 4-hydroxy-2-pyranone, la pantolactone, le trans-nérolidol et le mésifurane ne semblent pas être affectés par le lavage. L'ajout du blanchiment au lavage n'a d'impact que sur les esters dont la concentration double en moyenne. L'ajustement au pH 5,5 avec du citrate de sodium de la matrice affecte la concentration d'acide acétique qui est divisée par trois, ce qui est attendu. De plus le 8-hydroxylinalool est multipliée par 7. Le profil du témoin ayant subi l'action des pectinases est très proche de celui n'ayant subi que le lavage. La seule différence notable est la réapparition des molécules emportées par le lavage comme le 3-méthylbutanol ou le nicotinate d'éthyle. Ces modifications de profils sont à prendre en considération étant donné que l'évolution de la teneur en glycoside après le lavage n'est pas connue. Ainsi les évolutions de profils ne pourront être comparées en dehors du cadre des traitements étudiés, notamment à cause du lavage qui a le plus d'impact sur le profil initial de la fraise.

Tableau XXXII : Concentration des composés volatils de purée de fraises ayant subi divers traitements, sans ajout de glucosidases (en µg/kg en équivalent 4-nonanol) (n=3)

Molécules	Avant traitement	Lavage	Lavage + blanchiment	Lavage + pH 5,5	Lavage + pectinase
Ethyl propanoate	710±92	136±12	274±49	156±25	122±16
Acétate de propyle	20165±2823	4240±721	9080±982	4146±663	4739±758
2-Hexanone	461±69	-	-	-	-
Acétate d'isobutyle	18188±1455	5098±816	10639±879	6073±668	5847±585
Butanoate d'éthyle	382±46	100±13	248±17	149±12	131±18
Acétate de butyle	6419±1027	2081±187	4239±340	1769±212	2945±459
Acétate de 3-méthylbutyle	609±73	238±19	363±93	286±31	275±38
trans-2-Ethylbut-2-èneal	540±49	249±35	409±21	288±49	238±33
3-Méthylbutanol	21±1	-	-	-	26±4
Hexanoate d'éthyle	267±52	-	-	-	35±4
Acétoïne	714±60	64±7	88±7	95±14	615±92
2-Ethyl-(2E)-hexèneal	64±10	-	-	-	13±1
2-Heptèneal	47±5	-	-	-	-
Acétate de (2E)-hexèneyle	25±3	14±2	14±3	11±2	-
1-Hexanol	54±11	19±2	14±0	50±6	42±7
Nonanal	28±4	-	-	-	-
(2E)-Hexène-1-ol	48±7	75±14	55±5	73±12	16±2
Acide acétique	11062±1659	3437±344	4971±129	1166±117	4897±490
2-Ethyl-1-hexanol	40±6	20±3	16±3	31±4	48±8
2-Hydroxyfuranéol	53±7	11±1	13±1	26±4	38±5
Benzaldéhyde	29±3	-	-	-	-
Acide propanoïque	200±32	95±8	115±4	80±10	137±15

<b>β-Linalool</b>	46±4	114±9	68±6	93±16	44±8
<b>Acide isobutyrique</b>	475±86	286±31	279±6	317±41	236±33
<b>2,3-Butanediol</b>	911±155	22±1	18±3	30±4	104±18
<b>Mésifurane</b>	546±76	733±76	632±123	788±126	1395±212
<b>Acide butyrique</b>	5563±1001	1970±387	2219±4	1790±233	2310±395
<b>Acide 2-méthylbutanoïque</b>	1073±161	779±21	637±11	865±104	868±117
<b>Acide pentanoïc</b>	120±23	51±0	48±8	51±6	-
<b>Nicotinate d'éthyle</b>	84±8	-	-	-	46±5
<b>Acide hexanoïc</b>	3169±493	2021±263	1433±75	2638±343	2048±91
<b>Alcool benzylique</b>	78±9	153±18	94±7	262±21	49±0
<b>4-Hydroxy-2-pyranone</b>	25±0	339±34	287±28	349±52	604±50
<b>Furanéol</b>	2367±237	3304±330	2514±570	3157±505	3322±238
<b>Pantolactone</b>	107±11	273±5	229±30	210±17	32±2
<b>trans-Nérolidol</b>	287±31	416±14	241±17	910±146	31±1
<b>Acide octanoïque</b>	144±24	171±33	137±33	42±7	72±2
<b>γ-Décalactone</b>	731±66	611±90	313±28	182±24	970±45
<b>8-Hydroxylinalool</b>	-	209±36	135±0	1442±260	13±2

### Impact du lavage à l'hypochlorite de sodium

Le premier traitement étudié a été le lavage en bain chloré. Avec ce traitement 18 composés ont été augmentés avec l'AR2000 et la E4177 (Tableau XXXIII). Il n'y a pas de différence majeure entre AR2000 et E4177, sauf pour la γ-décalactone pour AR2000 (+60%) et le mésifurane (note « moisi », « caramel ») pour E4177 (+33% correspondant à une augmentation du LogOdor (LO) du mésifurane de 8033). Cependant le furanéol n'a pas varié significativement ni avec l'AR2000 ni avec E4177. Enfin plusieurs esters ont fortement augmenté autant avec l'AR2000 qu'avec la E4177, par exemple le butanoate d'éthyle augmente, respectivement, de 114% et 108% correspondant à une augmentation du LO de 144 et 108. Les esters ne sont pas les produits directs de l'hydrolyse des glycosides. Ils ne sont donc pas dus à l'action des glycosidases. Il est possible que ces esters se soient formés à partir des alcools et acides, libérés par les glycosidases, qui auraient été pris en charge par des AAT endogènes, une activité enzymatique importante dans la fraise (partie 1.1.2.1). Ainsi l'utilisation de glucosidases sur des fruits ayant préalablement subi un lavage permettrait une augmentation des notes « fruité », « caramel » (pour E4177) et « floral » (pour AR2000) grâce, respectivement, aux esters, au mésifurane et au linalool. Le lavage, en plus de diminuer le taux de sucres dans le fruit (passage d'un Brix 7,5 à un Brix 6,6), pourrait également diminuer la concentration de certains ions métalliques inhibiteurs des glucosidases qui pourrait être présent dans les fraises (cf partie 1.2.4.2).

Tableau XXXIII : Augmentations et diminutions des composés volatils après traitement avec de l'AR2000 ou de la E4177 de fraises lavées avec de l'hypochlorite de sodium (n=2)

	AR2000		E4177	
	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative
Propanoate d'éthyle	161±3.2	118%	86±3.4	63%
Acétate de propyle	5446±326.8	128%	3298±560.7	78%
Acétate d'isobutyle	6185±618.5	121%	4890±586.8	96%
Butanoate d'éthyle	114±19.4	114%	108±18.4	108%
1,1-Diéthoxybutane	583±52.5	69%	387±38.7	46%
Acétate de 3-méthylbutyle	152±6.1	64%	125±16.3	53%
2-Ethylbut-(2E)-énal	195±27.3	78%	170±28.9	68%
Acétoïne	50±1.5	78%	47±1.4	73%
Acide acétique	5339±747.5	155%	2418±120.9	70%
2-Hydroxyfuranéol	17±2.2	157%	14±0.3	134%
Acide propanoïque	43±7.3	45%	45±4.1	47%
Linalool	26±2.6	23%	12±0.6	+/-
Acide isobutyrique	73±12.4	25%	110±5.5	39%
Mésifurane	24±0.5	+/-	241±14.5	33%
Acide butyrique	465±37.2	24%	582±5.8	30%
Acide 2-méthylbutanoïque	71±9.2	+/-	156±18.7	20%
2-Hydroxy-4-pyranone	300±12	88%	145±13.1	43%
Furanéol	-126±-16.4	+/-	553±49.8	+/-
<i>trans</i> -Nérolidol	-155±-17.1	-37%	-71±-2.8	+/-
Acide octanoïque	-16±-1.9	+/-	-39±-4.7	-23%
γ-Décalactone	366±22	60%	30±2.1	+/-
8-Hydroxylinalool	-35±-5.6	+/-	-58±-8.7	-28%
Chavicol	31±2.2	81%	23±2.8	59%
Coumarone	2574±77.2	311%	4019±80.4	486%

+/- : variation non significative car comprise entre -20% et +20% ; en rouge les diminutions significatives (< -20%) ; en vert les augmentations significatives (> 20%)

\* : en équivalent 4-nonanol

### Impact du lavage à l'hypochlorite de sodium suivi d'un blanchiment

Le deuxième pré-traitement testé a été un lavage suivi d'un blanchiment (1 minute à 95°C). Ce traitement est utilisé sur des fruits comme l'abricot afin d'inactiver les enzymes responsables du brunissement. Le blanchiment est systématiquement présent pour les fruits sensibles à l'oxydation enzymatique, il faut en connaître l'impact sur la libération d'arôme. L'augmentation en composés volatils est similaire pour AR2000 et E4177 sauf pour le linalool (augmentation de 62% pour E4177 comparé à l'augmentation de 24% pour AR2000), la γ-décalactone (augmentation de 180% pour E4177 comparé à l'augmentation de 49% pour AR2000), la 2-hydroxy-4-pyranone

(augmentation de 149% pour AR2000 comparé à l'augmentation de 44% pour E4177) et le *trans*-nérolidol (diminution de 33% pour AR2000 comparé à une augmentation de 25% pour E4177). Ce type de différence de libération entre l'AR2000 est les enzymes produites par la société Protéus a déjà pu être observé sur le linalool (cf partie 4.2.4). Avec ce traitement une diminution moyenne de 30% des esters est observée avec l'AR2000 et de 70% en moyenne avec la E4177 avec une perte de LO pour le butanoate d'éthyle de 92 et 185, respectivement (Tableau XXXIV).

**Tableau XXXIV : Augmentation et diminution des composés volatils après traitement avec de l'AR2000 ou de la E4177 de fraises lavées à l'hypochlorite de sodium et blanchies (n=2)**

	AR20000		E4177	
	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative
Propanoate d'éthyle	-90±2.7	-33%	-209±16.7	-76%
Acétate de propyle	-3518±457.3	-39%	-7036±985	-77%
Acétate d'isobutyle	-3334±500.1	-31%	-7862±1336.5	-74%
Butanoate d'éthyle	-92±12.9	-37%	-185±24.1	-74%
Acétate de 3-méthylbutyle	-66±2	-18%	-217±26	-60%
<i>trans</i> -2-Ethylbut-2-èneal	-81±4.1	-20%	-266±29.3	-65%
Acétoïne	-5±0.8	+/-	-42±5.5	-48%
(2E)-Hexèn-1-ol	-3±0.3	+/-	-16±1.9	-30%
Acide acétique	1853±315	37%	-2446±48.9	-49%
Linalool	16±2.6	24%	42±2.5	62%
Acide isobutyrique	-1±0	+/-	-59±8.9	-21%
Mésifurane	91±13.7	+/-	155±4.7	25%
Acide méthacrylique	-32±1.3	-76%	-35±0.7	-84%
Acide hexanoïque	315±18.9	22%	595±41.7	42%
Alcool benzylique	41±6.2	43%	39±5.1	41%
2-Hydroxy-4-pyranone	426±42.6	149%	127±20.3	44%
Furanéol	330±3.3	+/-	456±36.5	+/-
<i>trans</i> -Nérolidol	-80±6.4	-33%	61±7.9	25%
γ-Décalactone	152±1.5	49%	562±50.6	180%
Acide 3-Hydroxybutanoïque	59±3	29%	39±4.3	+/-
Chavicol	38±0.4	135%	30±3	106%

+/- : variation non significative car comprise entre -20% et +20% ; en rouge les diminutions significatives (< -20%) ; en vert les augmentations significatives (> 20%)

\* : en équivalent 4-nonanol

Ces résultats additionnés à l'augmentation des esters avec le lavage conforte l'hypothèse que l'augmentation des esters viendrait d'une AAT endogène qui aurait été inactivée durant l'étape de blanchiment, l'AAT de la fraise ayant une température d'inactivation de 60°C (Perez, Sanz, & Olias, 1993). Cependant la diminution de ces esters ne peut être entièrement expliqué par

l'inactivation des AAT qui aurait conduit à un maintien de la quantité d'esters et non à une perte. Les préparations de glucosidases n'étant pas pures, il est possible qu'elles comportent une activité parasite estérase qui ne puisse être contrebalancé par les AAT endogènes de la fraise après blanchiment. En effet le vecteur *Y.lipolytica*, dans lequel est fabriqué les glucosidases utilisées, est connu pour exprimer des lipases qui hydrolysent les esters (Fickers, Marty, & Nicaud, 2011). Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en milieu témoin avec un témoin de culture négatif (culture de *Y.lipolytica* sans sans le plasmide exprimant la glucosidase). Suite à ce traitement l'ajout de glucosidases engendrerait une diminution importante de la note « fruité » à cause d'une perte d'une grande partie des esters.

#### **Impact du lavage à l'hypochlorite de sodium suivi d'un ajustement à pH 5,5**

L'ajustement du pH d'un produit est une technique qui peut être utilisé dans certain cas, notamment pour la réalisation de jus aromatique. Pour tester l'impact du changement de pH sur la libération des glycosides, la purée de fraise a été ajusté à pH 5,5, condition proche du pH optimal des glucosidases. Trois molécules augmentent avec E4177 (2-méthoxy-4-vinylphgénol, chavicol, coumarone) pour 8 diminutions significatives dont le linalool, le furanéol, le *trans*-nérolidol et la  $\gamma$ -décylactone (Tableau XXXV). Avec la E4179, 5 esters augmentent dont 4 esters d'acétate. Etant donné que l'augmentation n'apparaît que pour cette enzyme, l'action des AAT endogènes de la fraise est exclue. Pour l'AR2000, une diminution de 4 esters est obtenue avec une perte moyenne de 34% ce qui impacterait de manière significative la note « fruité » de la fraise. Cette diminution s'accompagne néanmoins d'une augmentation du furanéol de 21%, du nérolidol de 41% et de la  $\gamma$ -décylactone de 34%, 3 molécules importantes de l'arôme de fraise. Bien que le pH ait été adapté pour permettre une meilleure activité des glucosidases dans la fraise, l'augmentation des composés volatils est moins bonne qu'à pH 3,5. Il est possible que des enzymes endogènes de la fraise ayant de meilleures activités à pH 5,5 prennent en charge une partie des composés volatils de la fraise. Cela n'explique cependant pas les différences entre l'AR2000 et les deux autres enzymes (Pour la E4177 et la E4179, les profils sont similaire à l'exception de l'évolution des esters qui pourrait être due à une activité transglycosylase de la E4179). Ces différences pourraient venir de réactions parasites déjà évoquées lors de l'essai précédent. En effet la lipase LIP2 de *Y. lipolytica* a un maximum d'activité entre le pH 5 et 6 (Aloulou et al., 2007). Ainsi le réajustement du pH lors de l'application des glucosidase a un effet délétère sur l'amélioration aromatique et ce traitement est à déconseiller lors de l'utilisation de préparation de glucosidases.

Tableau XXXV : Augmentation et diminution des composés volatils après traitement avec de l'AR2000, de la E4177 ou de la E4179 sur de la fraise lavée à l'hypochlorite de sodium et réajustée à pH 5,5 (n=2)

	AR2000		E4177		E4179	
	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative
Propanote d'éthyle	-68±11.6	-44%	-6±0.8	+/-	28±1.7	+/-
Acétate de propyle	-792±39.6	+/-	171±18.8	+/-	1229±159.8	30%
Méthylisobutanone	-48±6.7	-37%	5±0.4	+/-	39±1.6	30%
Acétate d'isobutyle	-1663±133	-27%	184±31.3	+/-	1566±234.9	26%
Butanoate d'éthyle	-46±4.6	-31%	2±0.2	+/-	37±1.9	25%
1,1-Diéthoxybutane	-334±3.3	-29%	24±3.1	+/-	283±11.3	25%
Acétate de butyle	4040±484.8	23%	1379±179.3	+/-	6017±541.5	34%
Acétate de 3-méthylbutyle	-85±11.1	-30%	11±0.4	+/-	74±8.9	26%
<i>trans</i> -2-Ethylbut-2-èneal	-93±1.9	-32%	14±2.1	+/-	80±8	28%
Acide acétique	387±23.2	33%	147±16.2	+/-	131±6.6	+/-
Linalool	-28±1.4	-30%	-20±1.4	-22%	-7±0.1	+/-
Acide 2-méthylbutanoïque	-214±23.5	-25%	-183±14.6	-21%	-82±3.3	+/-
Acide hexanoïque	-407±16.3	+/-	-952±85.7	-36%	-629±81.8	-24%
Alcool benzylique	63±8.2	24%	-1±0	+/-	31±1.2	+/-
2-Hydroxy-4-pyranone	44±2.2	120%	-1±0.1	+/-	6±0.1	+/-
Furanéol	650±6.5	21%	-718±93.3	-23%	-87±6.1	+/-
Pantolactone	45±6.3	+/-	-59±7.1	-21%	-3±0.1	+/-
<i>trans</i> -Nérolidol	-142±1.4	41%	-138±22.1	-40%	-101±2	-29%
Acide octanoïque	-21±2.1	+/-	-69±9	-33%	-78±3.1	-37%
γ-Décalactone	306±18.4	34%	-532±16	-58%	-337±23.6	-37%
2-Méthoxy-4-vinylphénol	37±5.6	88%	33±5	78%	95±12.4	227%
5-Hydroxymaltol	37±3.7	44%	-1±0.1	+/-	37±4.1	45%
Chavicol	34±0.7	157%	20±1.6	92%	32±1.3	152%
Coumarone	917±137.6	64%	1251±25	87%	2314±277.7	160%

+/- : variation non significative car comprise entre -20% et +20% ; en rouge les diminutions significatives (< -20%) ; en vert les augmentations significatives (> 20%)

\* : en équivalent 4-nonanol

### Impact du lavage à l'hypochlorite de sodium suivi d'un traitement par des pectinases

L'ajout de pectinase durant le procédé a été testé pour estimer l'impact de l'activité pectinase de l'AR2000 sur la libération des composés volatils. Ce traitement (ajout d'un mélange de polygalacturonase et pectine méthylestérase) a été fait dans le lot témoin et le lot traité avec la E4177 pour être comparé avec le traitement de l'AR2000 sans pectinases supplémentaires. Cet ajout a permis d'avoir le même profil d'amélioration entre l'AR2000 et la E4177 (Tableau XXXVI).

Le profil des lots traités avec l'AR2000 et la E4177 + pectinase sont très proches et il n'y a que peu d'augmentation par rapport au témoin + pectinase. Il est possible que l'ajout de pectinase dans le témoin ait pu faciliter l'hydrolyse de sa réserve sans ajout de glucosidases supplémentaire. En effet en comparant les profils des témoins ayant subi le lavage avec et sans pectinase, plusieurs molécules ont été augmentées dont le mésifurane, le furanéol ou encore l'acide hexanoïque.

**Tableau XXXVI : Augmentation et diminution des composés volatils après tritement avec de l'AR2000 ou de la E4177 + pectinases sur de fraises lavées à l'hypochlorite de sodium (n=2)**

	AR2000		E4177 + pectinase	
	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative	Variation après traitement enzymatique (en ppb*)	Augmentation relative
Acétate de 3-methylbutyle	9±1.4	+/-	31±4.7	+/-
Linalool	-5±0.8	+/-	0±0	+/-
Mésifurane	72±7.2	+/-	-17±0.3	+/-
Acide isobutyrique	-1±0.1	+/-	7±1.2	+/-
Acide hexanoïque	389±38.9	+/-	61±4.3	+/-
2-Hydroxy-4-pyranone	-19±1	+/-	-43±0.9	+/-
Furanéol	342±13.7	+/-	-221±15.5	+/-
γ-Décalactone	245±12.3	25%	228±13.7	23%
trans-Nérolidol	-9±1.2	-30%	-9±1.4	-28%
Coumarone	85±11.1	71%	59±5.9	49%

+/- : variation non significative car comprise entre -20% et +20% ; en rouge les diminutions significatives (< -20%) ; en vert les augmentations significatives (> 20%)

\* : en équivalent 4-nonanol

#### 4.3.2.4 Analyses sensorielles des essais

Les analyses sensorielles ont un rôle déterminant pour la validation du produit. Ce sont en effet ces analyses qui permettent de mieux apprécier son rendu gustatif et olfactif contrairement aux analyses instrumentales comme la chromatographie en phase gazeuse. Cela est dû au fait que la dégustation prend en compte divers paramètres physico-chimiques comme la texture, le taux de sucre ou encore l'acidité titrable (Du et al., 2011). En effet, la texture peut par exemple avoir des effets de rétention d'arôme modifiant la manière de ressentir une molécule alors que sa concentration est la même dans les deux matrices (Guichard, 1996). C'est pour cela que le panel de la société Jean Niel a été obligé de diluer les échantillons fournis pour pouvoir comparer les purées traitées avec E4177 et celles liquéfiées par les pectinases de l'AR2000.

Un test sensoriel en interne a été effectué auprès de 18 individus sur le témoin et les fraises traitées avec E4103 et traitée avec E4177. La purée traitée avec AR2000 a été exclue du test car les pectinases présentes liquéfient la purée indiquant visuellement la différence avec les autres

échantillons. Bien que la variation de texture soit un paramètre clé du goût ressenti, dans ce cas il est écarté car l'objectif est de constater ou non une amélioration du goût uniquement due à l'action des glucosidases. Le test comprenait 3 étapes (Tableau XXXVII) : deux tests triangulaires (2 témoins et 1 E4103 ; 2 témoins et 1 E4177) et un test de préférence entre E4103 et E4177. Pour le premier test triangulaire (témoin et E4103), seulement 5 personnes ont identifié l'échantillon traité avec de l'enzyme. Pour le second test 8 personnes ont identifié l'échantillon traité. Pour finir, 8 personnes du panel ont préféré la purée traitée avec E4177. Les tests triangulaires répondent à une distribution binomiale (Kunert & Meyners, 1999). Ainsi pour qu'un test triangulaire incluant 18 individus indique une différence significative avec une certitude de 95%, il faut au minimum 10 bonnes réponses. La différence de goût des purées n'est donc pas significative. Après analyse au GC-MS, chaque échantillon avait un profil identique confirmant les résultats des tests triangulaires. Ce résultat a été attribué à une évaporation des composé volatils qui serait due au vide dynamique appliqué durant le procédé. (Pino, Panadés, Fito, Chiralt, & Ortega, 2008) ont démontré une perte en composés volatils 50% plus importante entre un même procédé réalisé à pression atmosphérique et sous-vide continu (pour 1h à 40°C).

**Tableau XXXVII : Résultats du test sensoriel en interne sur les lots de fraises enzymé avec E4103 et E4177 en comparaison avec un témoin sans enzyme (n=1)**

	Participants ayant identifié le lot traité	Participant n'ayant pas identifié le lot traité	Participants préférant E4103	Participants préférant E4177	Total participants
<b>Test triangulaire 1 (2 témoins et 1 E4103)</b>	5	13	-	-	18
<b>Test triangulaire 1 (2 témoins et 1 E4177)</b>	8	10	-	-	18
<b>Test de préférence (E4103 et E4177)</b>	-	-	10	8	18

La suite des analyses sensorielles a été réalisée par les aromaticiens de la société Jean Niel avec un panel de 5 personnes entraînées et expérimentées pour ces analyses. Des essais de traitement enzymatique avec 5 ; 10 et 20 mL/kg de E4177 pendant 2 heures à 40°C ont été effectués sur des purées de fraises et des purées d'abricots, puis transmis à la société Jean Niel pour une analyse (Tableau XXXVIII et XXXIX).

Sur les purées de fraises (Tableau XXXVIII), le témoin montre une supériorité pour les notes « mûr » et « confiture » et l'échantillon traité par l'enzyme à 20 mL/kg une supériorité pour la note « vert ». Cependant les écart-types de l'analyse sensorielle sont trop élevés pour conclure à une différence significative. Donc selon le panel de la société Jean Niel aucune différence notable n'a été ressentie entre les différents échantillons. Cela montre que même sans le vide dynamique la

variation entre le profil aromatique du témoin et des lots traités avec les enzymes reste trop faible pour avoir un impact significatif sur le goût de la purée.

**Tableau XXXVIII : Résultats de l'analyse sensorielle des fraises de la société Agro'Novae traitées avec E4177**

	Témoin	Enzyme à 5 mL/kg	Enzyme à 10 mL/kg	Enzyme à 20 mL/kg
<b>Fruité</b>	5.5±2.07	4.5±1.97	5.67±1.51	5.17±1.17
<b>Florale</b>	2.17±1.17	2.33±1.97	2.33±1.51	2.33±1.75
<b>Vert</b>	3.17±1.83	3.67±1.86	3.67±1.03	4.67±1.21
<b>Confituré/cuit</b>	5.33±2.34	4.5±2.81	3.33±2.25	3.5±1.87
<b>Mûr</b>	5.17±0.98	3.83±1.94	3.67±2.42	3.5±1.76

Sur les purées d'abricots (Figure XXXIX), le témoin montre une supériorité pour les notes « mûr » et « confiture », la purée traitée par l'enzyme à 20 mL/kg est la plus fruitée et l'échantillon traité par l'enzyme à 5 mL/kg a la note « vert » la plus élevée. Cependant, comme pour l'analyse précédente, les écart-types de l'analyse sensorielle (Tableau XXXVII) sont trop élevés pour conclure à une différence significative.

**Tableau XXXIX : Résultats de l'analyse sensorielle des abricots de la société Sénagral traités avec E4177**

	Témoin	Enzyme à 5 mL/kg	Enzyme à 10 mL/kg	Enzyme à 20 mL/kg
<b>Fruité</b>	5.17±1.6	5.67±0.52	5.67±1.03	5.17±1.17
<b>Florale</b>	3.17±1.47	3.33±1.63	3.5±2.07	3.5±2.07
<b>Vert</b>	4.33±1.97	5.33±1.86	4.83±2.32	4.83±1.47
<b>Confituré/cuit</b>	4.17±2.14	2.6±1.14	3.67±2.07	3.33±2.25
<b>Mûr</b>	2.83±1.47	2.5±1.05	2.5±2.26	2.5±1.52

Suite à ces essais, l'impact des traitements des fruits avant l'action des enzymes a été testé. Des échantillons de ces expériences ont été envoyés à la société Jean Niel pour analyse sensorielle. Les purées ayant subi un lavage et traitées par les enzymes perdent leur aspect « Vert » comparé au témoin (Tableau XL). Une perte de la note « confiture » est également perçue avec l'AR2000 et un gain avec la E4177 par rapport au témoin, bien que les variations de furanéol ne soient pas significatives d'un point de vue analytique, elles pourraient expliquer ce ressenti car ce composé à un seuil de détection très faible (0,03 µg/kg, partie 1.1.1.1). De plus une étude sur le vin à montrer une corrélation directe entre la note « cuit/caramel » et la concentration en furanéol dans les vins (Kotseridis, Razungles, Bertrand, & Baumes, 2000). Cependant ces quelques variations ne sont pas significatives au vu des écart-types. Les résultats de la libération des composés volatils des fraises lavées avant action des enzymes (notamment avec l'augmentation de plusieurs esters) n'ont pas

été suffisants pour créer une différenciation au niveau sensorielle alors que l'augmentation du butanoate d'éthyle se traduisait pas une augmentation du LogOdor de ce composé, respectivement pour l'AR2000 et la E4177, de 108 et 114.

**Tableau XL : Résultats de l'analyse sensoriel des fraises de la société Agro'Novae traités dans un bain d'hypochlorite de sodium et avec l'AR2000 ou la E4177**

	Témoin	AR2000 à 1 g/kg	E4177 à 10 mL/kg
<b>Fruité</b>	5,33±1.5	5,43±1.2	5,00±1.5
<b>Florale</b>	3,00±1.6	3,29±2.2	2,71±1.9
<b>Vert</b>	5,43±1.7	4,43±2.6	4,00±1.9
<b>Confituré/cuit</b>	3,57±1.3	3,00±1.5	4,14±2.7
<b>Mûr</b>	3,00±2.0	3,43±2.1	3,29±1.6

Les purées ayant subi un lavage, un blanchiment et traitées par les enzymes perdent en note « mûr » comparé au témoin mais gagnent en note florale (Tableau XLI). Ce dernier point serait en adéquation avec l'augmentation de linalool observée avec AR2000 et E4177, respectivement de 24% et 62%. Une perte de la note « fruité » est également ressentie pour la purée traitée avec la E4177 ce qui concorderait avec la perte d'esters observée (75% de perte pour le butanoate d'éthyle correspondant a un LogOdor de 185). En revanche avec l'AR2000 qui a également subi une perte d'esters, bien que plus faible (37% de perte pour le butanoate d'éthyle correspondant a un LogOdor de 92), la perte de note « fruité » n'est pas sentie.

**Tableau XLI : Résultats de l'analyse sensoriel des fraises de la société Agro'Novae traités dans un bain d'hypochlorite de sodium, blanchies et avec l'AR2000 ou la E4177**

	Témoin	AR2000 à 1 g/kg	E4177 à 10 mL/kg
<b>Fruité</b>	4,29±1.6	4,57±0.8	3,71±1.8
<b>Florale</b>	2,43±1.8	2,71±2.3	3,14±2.7
<b>Vert</b>	4,57±2.1	4,71±1.8	4,71±1.9
<b>Confituré/cuit</b>	3,57±2.3	3,00±1.5	3,57±2.1
<b>Mûr</b>	4,00±2.1	3,14±2.1	3,14±1.6

Le bilan général de la société Jean Niel sur ces essais est que les différences de notes sont trop subtiles pour être perçue par des consommateurs. Des différences plus importantes sont nécessaires pour avoir un produit considéré comme enrichi en arôme.

Les autres essais sur le traitement de la matrice avant incubation n'ont pas été envoyé à Jean Niel pour analyse car les résultats par GC-MS était moins différents que celui avec le traitement de lavage et ce dernier n'a rien donné de significatif par analyse sensorielle. Le bilan des essais au roboQbo n'est pas à la hauteur des attentes fixées par le projet. En effet bien que

quelques améliorations aient été observées sur le plan analytique, il n'y a pas suffisamment de changement sensoriel pour pouvoir exploiter industriellement les glucosidases. Pour mieux comprendre ce taux très faible de déglycosylation, il a été décidé de réaliser des cinétiques avec de plus petits volumes de purée de fruit.

### 4.3.3 Cinétiques

Des cinétiques ont été réalisées sur une vingtaine d'heure (avec un point supplémentaire à 28 heures pour la première) afin de visualiser l'évolution des composés volatils au cours du temps après ajout de glucosidases et ainsi de comprendre les résultats insatisfaisants obtenus lors des essais de procédé. La première cinétique est calquée sur les paramètres des essais précédents réalisés avec le roboQbo, c'est-à-dire des essais sur purée de fraises et purée d'abricots avec un enzymage à 1 g/kg d'AR2000 ou équivalent à 40°C et est réalisée sur fraises (essai unique). Les cinétiques suivantes ont été réalisées en double (répétitions techniques)

#### 4.3.3.1 Evolution des composés volatils de la fraise par traitement enzymatique

La cinétique sur purée de fraises montre pour la coumarone (Figure 75) et le furanéol (Figure 12), comme pour tous les composés volatils quantifiés, un temps de latence d'environ 4 heures avant le début de la déglycosylation des composés volatils pour une libération maximale comprise après 8 à 20 heures d'incubation. Ce temps de latence expliquerait l'absence de résultat des essais au roboQbo avec la fraise car le temps d'incubation pour ces derniers était compris entre 1 et 2 heures. Bien que non-observé sur les  $\beta$ -glucosidases, un temps de latence a déjà été observé sur des  $\alpha$ -glucosidases de lysozome de foie de rat (Burton & Lloyd, 1976). Ce retard d'activité ne pourrait également être qu'apparent. En effet il est possible que les glucosidases aient une affinité plus grande pour des glycosides dont l'aglycone n'est pas volatile. Les polyphénols par exemple sont connus pour être majoritairement sous forme glycosylée dans les plantes, dont la fraise (Kårlund et al., 2016). En effet lors des essais sur milieu modèle et extrait de glycosides de fraises (partie 4.2.4), ce phénomène n'avait pas été observé. Néanmoins il n'y a pas de changement notable de la couleur des lots de fraises après 28h, les anthocyanes ne semblent donc pas avoir été touchée par la déglycosylation. A cause de leur instabilité native, les anthocyanes commencent à perdre leur couleur 20 minutes après avoir subi une déglycosylation (Keppler & Humpf, 2005).

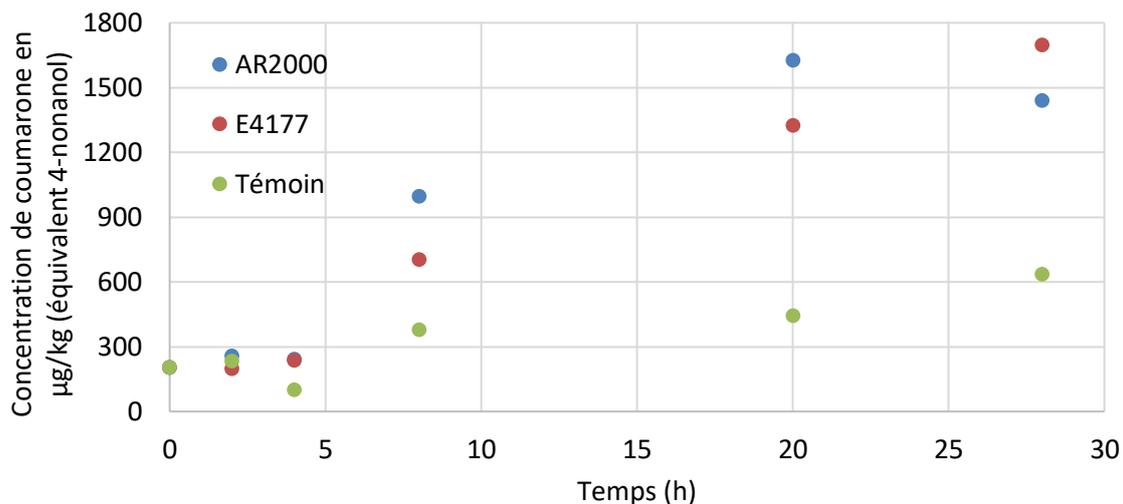


Figure 75 : Cinétique du coumarone pour un traitement à 1 g/kg d'AR2000 ou à 10 mL/kg E4177 d'une purée de fraise (n=1)

Un autre point à remarquer est la différence de quantité maximale de furanéol libéré entre l'AR2000 et la E4177 (Figure 76). L'AR2000 libère presque deux fois plus de furanéol que la E4177 qui a été développée pour optimiser l'hydrolyse du glucoside de furanéol. Une des hypothèses serait un manque de disponibilité du glycoside de furanéol. En effet les glycosides sont souvent stockés dans les vacuoles des cellules végétales (partie 1.2.2). La déstructuration de la purée réalisée par les pectinases de l'AR2000 facilite la décompartmentation cellulaire ce qui rendrait le glycoside de furanéol plus disponible pour la glucosidase de l'AR2000.

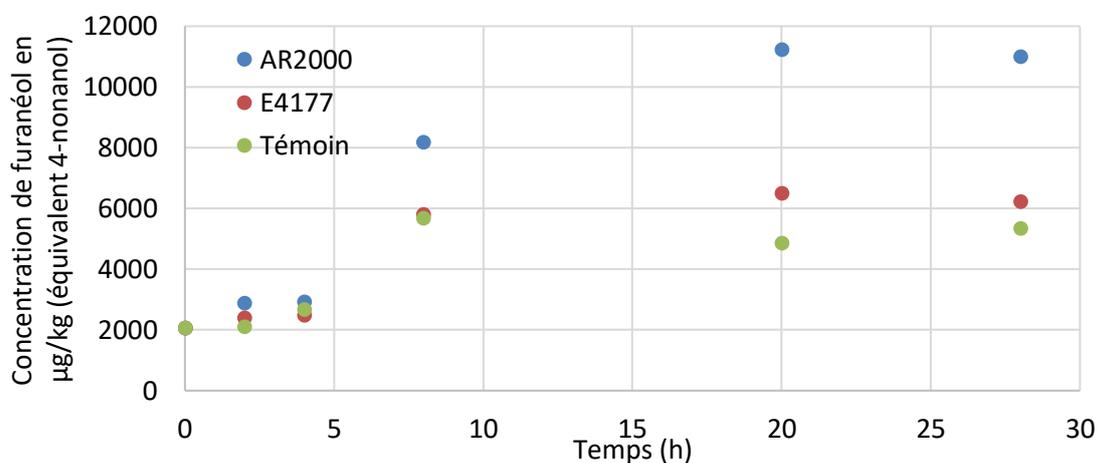


Figure 76 : Cinétique du furanéol pour un enzymage à 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177 d'une purée de fraise (n=1)

Cette cinétique sur la fraise fait le lien entre les bons résultats des caractérisations qui se faisaient sur 20 heures d'incubation (partie 4.1.2.4) et l'absence de déglycosylation suffisamment significative durant les procédés au roboQbo (partie 4.3.2.1) pour avoir un impact sur l'arôme. Une

nouvelle cinétique est également réalisée en partie 4.3.4.3 pour savoir si une augmentation de l'activité enzymatique pourrait diminuer le temps de latence observé avec la fraise.

#### 4.3.3.2 Etude de paramètres pouvant influencer l'incomplétude de la libération de la réserve de furanéol

L'hypothèse de l'impact de l'hydrolyse des pectines sur la diminution de la rétention des composés volatils a été étudiée. Cette dernière cinétique a été réalisée avec un traitement par l'E4177 à 10 mL/kg couplée à des pectinases pour vérifier si le faible maximum de libération de furanéol de cette enzyme est dû à la disponibilité du substrat. Les profils cinétiques de cette expérience (Figure 77) sont très similaires à ceux du traitement par E4177 à 10 mL/kg sans ajout de pectinase avec un temps de latence d'environ 4 heures et un grand écart pour la concentration finale de furanéol (4955  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de matière fraîche avec E4177 contre 7091  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour l'AR2000). L'écart entre les deux enzymes n'est donc pas expliqué par une différence de disponibilité du substrat.

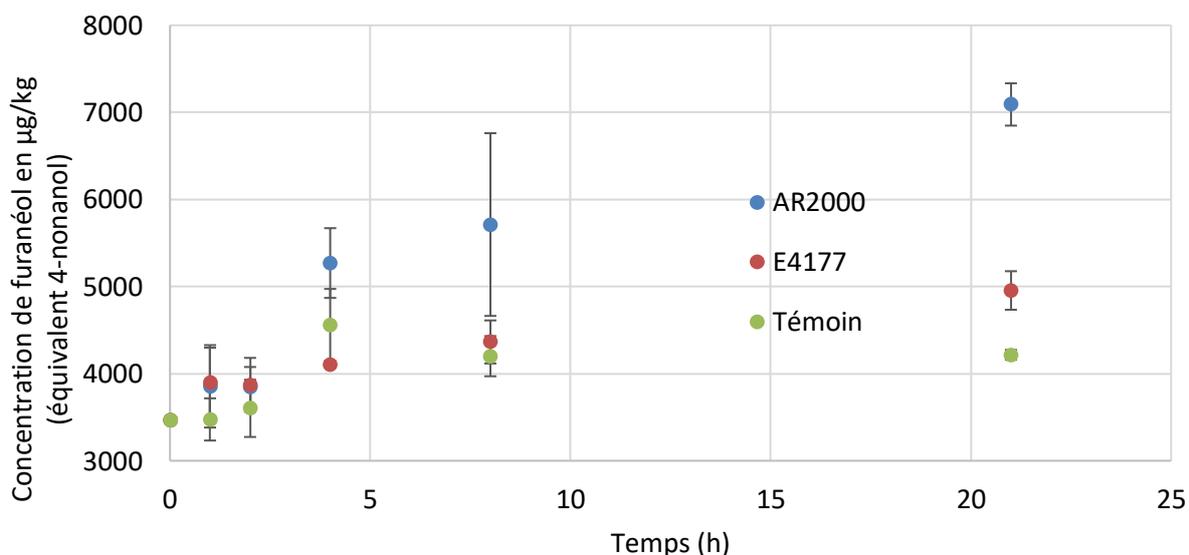


Figure 77 : Cinétique du furanéol pour un enzymage à 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177+pectinases d'une purée de fraise (n=2)

La déglycosylation limitée du glucoside de furanéol par E4177 comparé à l'AR2000 est problématique pour l'application des glucosidases sur la fraise. Cette différence ne semble pas liée à la présence de pectinases dans l'AR2000. Cette préparation est un cocktail enzymatique contenant de nombreuses activités, (dont des activités arabinase, apiosidase et rhamnosidase (Pogorzelski & Wilkowska, 2007), qui pourraient permettre à l'AR2000 de libérer tout le furanéol (Figure 78). Il existerait peut-être d'autres formes de glycoside de furanéol que le glucoside et le malonylglucoside qui ont été identifiés (Raab, 2006). Bien qu'aucune étude n'étaye cette hypothèse cette dernière sera testée avec une injection en HPLC-MS d'un jus de fraise brut pour déterminer si le furanéol y est présent sous forme de diglycoside.

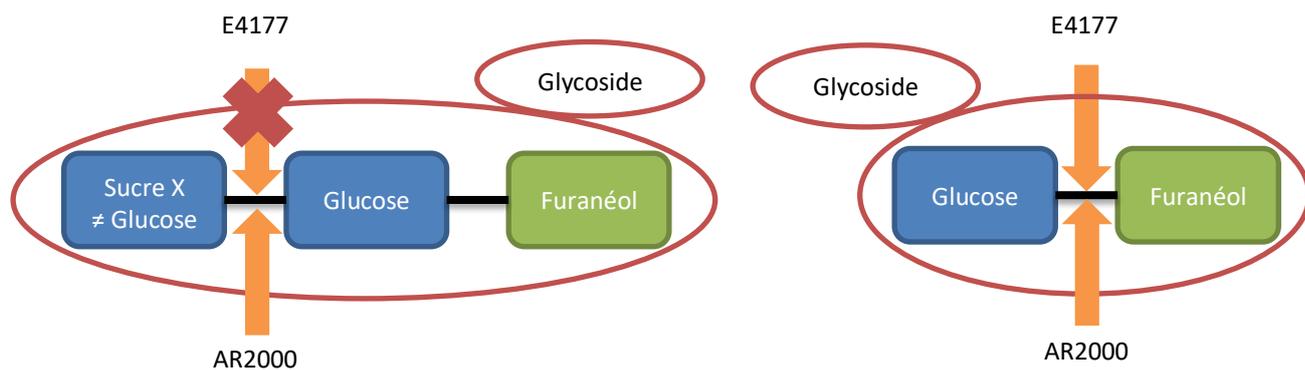


Figure 78 : Schéma de l'action de l'AR2000 et de la E4177 sur un di- ou un mono-glycoside

#### 4.3.3.3 Etude de paramètres pouvant influencer le retard de la libération de la réserve de composés volatils

Dans une autre cinétique, les purées de fraises ont été enzymées à 10 g/kg d'AR2000 ou équivalent. Cette fois-ci aucun temps de latence n'a été observé, comme c'est le cas pour le coumarone (Figure 79) et le furanéol (Figure 80), et le maximum de libération est atteint entre 4 et 8 heures. Ainsi le problème du temps de latence peut être contourné en augmentant la quantité d'activité inoculée.

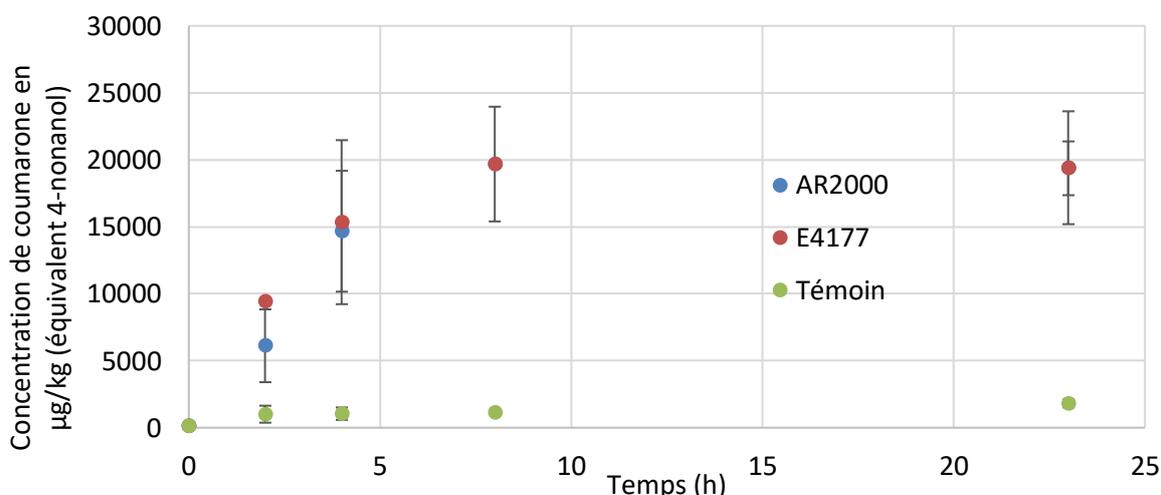


Figure 79 : Cinétique du coumarone pour un enzymage à 10 g/kg d'AR2000 ou 100 mL/kg de E4177 d'une purée de fraise (n=2)

Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse d'une affinité supérieure des glucosidases à un autre substrat. Bien que l'écart entre les maximums de libération du furanéol avec l'AR2000 et la E4177 se soit réduit, il reste présent (Figure 80). Cela pourrait s'expliquer par une activité partielle sur un autre sucre. En effet, la glucosidase de *Pyrococcus furiosus* maintient 34% de son activité sur des galactosides et 9 % d'activité sur des xylosides (Kengen et al., 1993). Il est donc possible la E4177 ait une activité partielle sur d'autres sucres. Ainsi avoir renforcé l'activité total de cette enzyme aurait facilité une hydrolyse sur un autre sucre. Ce résultat tendrait à confirmer l'hypothèse

de la présence de plusieurs types de glycoside de furanéol dans la fraise, ce qui reste à vérifier par analyse HPLC-MS

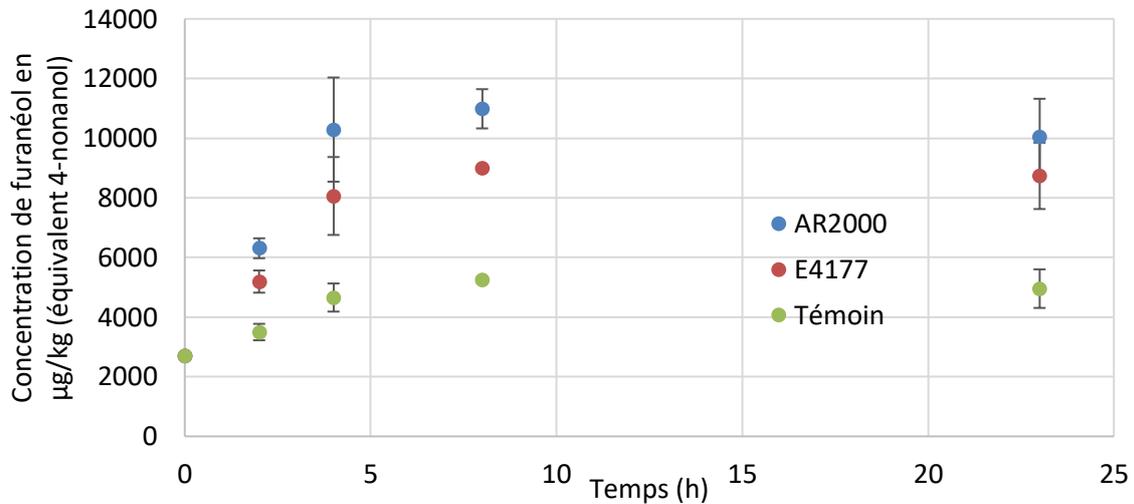


Figure 80 : Cinétique du furanéol pour un traitement par 10 g/kg d'AR2000 ou 100 mL/kg de E4177 d'une purée de fraise (n=2)

#### 4.3.3.4 Evolution des composés volatils de l'abricot par traitement enzymatique

La seconde expérience a été un traitement enzymatique à 10 g/kg de purée d'abricots. La majorité des composés suivent le même modèle de déglycosylation sans temps de latence pour une libération maximale comprise entre 4 et 8 heures (Figure 81 et 82). Cela peut expliquer pourquoi les résultats en partie 4.3.2.4 étaient meilleurs avec l'abricot qu'avec la fraise. Cependant, pour le benzaldéhyde (Figure 81), le rendement au bout de 2 heures est 5 à 6 fois plus faible que la quantité potentiellement libérable ce qui montre que les paramètres actuels des procédés utilisés avec le roboQbo ne sont pas adaptés pour exploiter au maximum la réserve des fruits, le temps d'incubation étant trop court. Pour améliorer ce résultat il faut travailler soit sur le temps d'incubation, soit sur la quantité d'activité enzymatique inoculée, piste qui sera privilégiée.

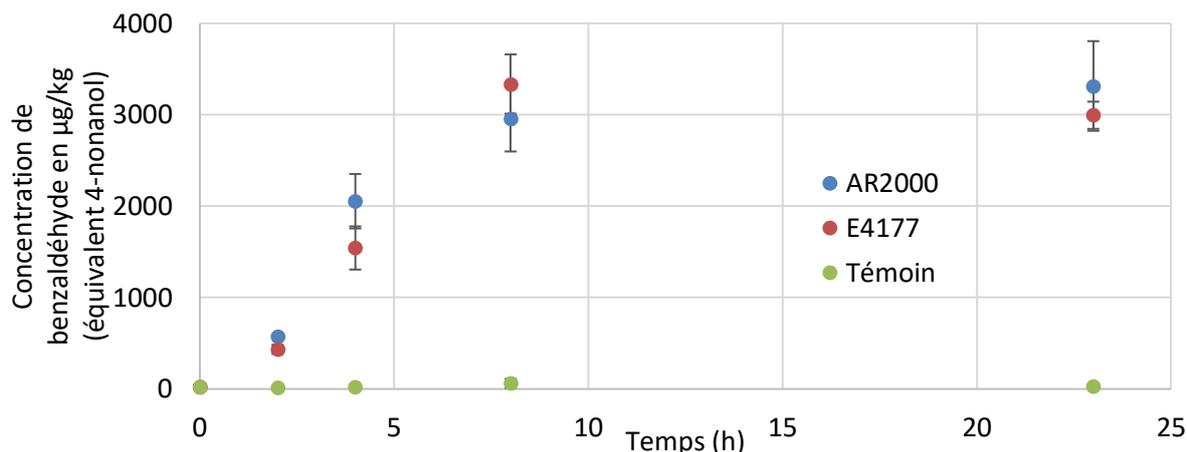


Figure 81 : Cinétique de libération du benzaldéhyde pour un traitement par 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177 d'une purée d'abricots (n=2)

Bien qu'ils ne puissent être sous forme de glycosides, les teneurs de certains terpènes augmentent après ajout de glucosidases comme c'est le cas pour le  $\beta$ -myrcène (Figure 82). Ces terpènes commencent à augmenter après 4 heures d'incubation. Les terpènes sont des composés volatils formés lors de la dégradation des tissus végétaux (Köllner et al., 2013). Le broyage de l'abricot a activé la formation des terpènes mais l'ajout de glucosidase a dû apporter un élément supplémentaire pour renforcer cette synthèse.

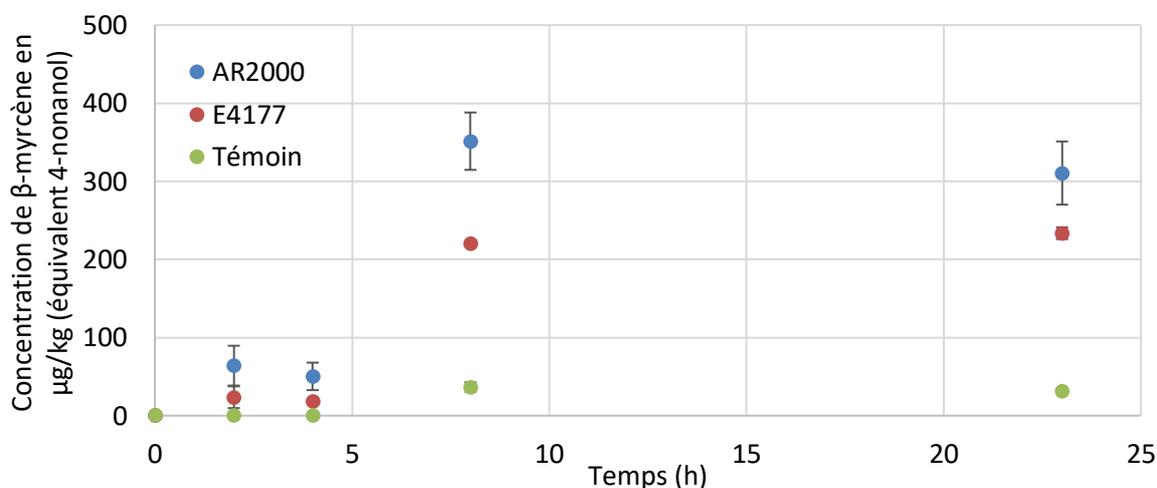


Figure 82 : Cinétique du  $\beta$ -myrcène pour un enzymage à 1 g/kg d'AR2000 ou 10 mL/kg de E4177 d'une purée d'abricots (n=2)

Au vu des résultats du traitement de purées d'abricot par E4177 à 10 mL/kg, il semble que ce fruit soit plus adapté à l'utilisation des glucosidases. En effet les résultats obtenus sont similaires à ceux de l'AR2000 sans la liquéfaction apportée par les pectinases. Cette enzyme pourra donc être utilisée sur la purée et les cubes d'abricots avec la même efficacité que l'AR2000 en termes de révélation d'arôme et sans risque de déstructuration.

Les études cinétiques ont pu mettre en lumière plusieurs points qui permettront de retravailler l'optimisation du procédé de traitement enzymatique avec de meilleures conditions notamment par rapport au temps de latence.

Ce dernier, ayant été observé lors des cinétiques, explique les résultats observés lors des essais dans le roboQbo. Ce temps de latence peut être éliminé par une augmentation de l'activité inoculée dans le fruit. Cependant, pour des raisons de coût et de dilution du produit, la quantité maximale d'enzyme ajoutée doit rester inférieure à 10 g de préparation par kilogramme de fruits traités. Pour augmenter l'activité sans changer le volume il faudra augmenter la concentration en enzyme de la solution enzymatique.

#### 4.3.4 Imprégnation sous vide

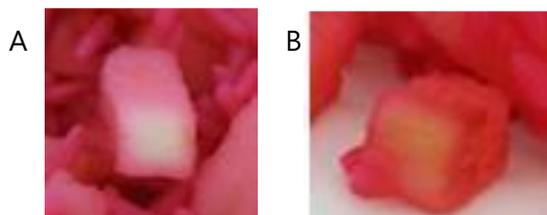
L'objectif de la thèse est d'optimiser la libération de la réserve de la fraise et de l'abricot et cela pour toutes les formes utilisées par les partenaires industriels du projet Natarôme+, y compris les cubes de fruit. La diffusion des enzymes au cœur du cube de fruit sera l'axe principalement étudié pour ce format. Comme décrit en 1.3.2.5, l'imprégnation sous-vide est déjà utilisée sur les fruits pour incorporer des solutions de PME afin d'améliorer la texture dans les cubes de fruits. Cette méthode semble la meilleure option pour infuser une solution de glycosidase au cœur du cube.

##### 4.3.4.1 Les contraintes du traitement enzymatique sur cubes de fruits

Travailler sur un procédé élaboré avec des cubes de fruits a demandé de faire attention à divers paramètres pour qu'ils puissent toujours être utilisables dans des yaourts avec morceaux de fruits. Conserver la texture des cubes ainsi que leur couleur est primordiale. De plus, avant d'imprégner les cubes de fruits par des glycosidases, il fallait s'assurer que l'enzyme pouvait atteindre le cœur du cube et rester fonctionnelle après le traitement d'imprégnation. Des contraintes de coût pour les industrielles s'ajoutent à ce verrou. Le traitement enzymatique coutant cher, l'imprégnation doit être réalisée avec, au maximum 1% de solution enzymatique (10 mL de solution pour 1 kg de cubes de fruit). Afin de comprendre et de valider l'imprégnation des enzymes, il est nécessaire de vérifier l'homogénéisation et l'imprégnation, de vérifier la conservation de la texture et enfin de vérifier l'amélioration de l'arôme. La faisabilité de l'imprégnation a tout d'abord été testé avec un colorant alimentaire et une appréciation visuelle sur des cubes de pomme de l'homogénéité de la coloration. Ces colorants ont l'avantage d'être très visibles mais ne sont pas représentatifs de l'imprégnation d'une enzyme en terme de poids moléculaire (351 Da pour la safranine contre 185 kDa pour une glucosidase d'*Aspergillus* (K. Suzuki et al., 2013)). Une fois les paramètres de l'imprégnation optimisés sur colorant, une deuxième étape sera de les valider en utilisant une protéine colorée qui sera plus proche de l'encombrement des glucosidases. La dernière étape de validation concerne l'efficacité de la déglycosylation.

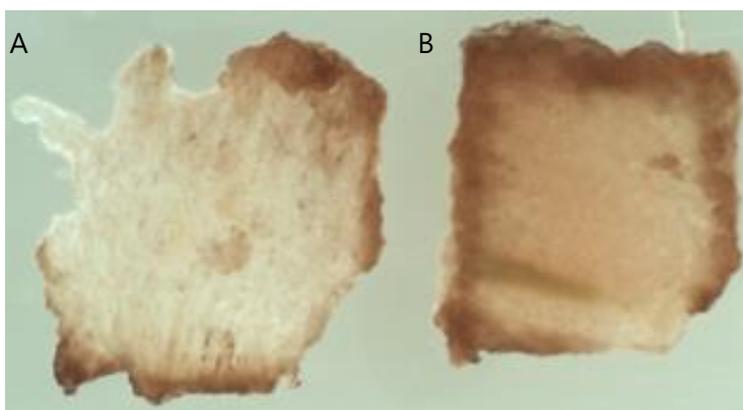
#### 4.3.4.2 Choix du colorant pour l'optimisation visuelles de l'imprégnation

Lors d'essais préliminaires l'imprégnation sous-vide a été testée avec des frites de pommes et de la safranine. Sur les images de la Figure 83 la frite ayant subi une imprégnation sous vide est plus colorée que celle ayant été seulement en contact avec la safranine.



**Figure 83 : Coupe de frites de pommes après mise en contact avec de la safranine à pression atmosphérique (A) et sous-vide (B)**

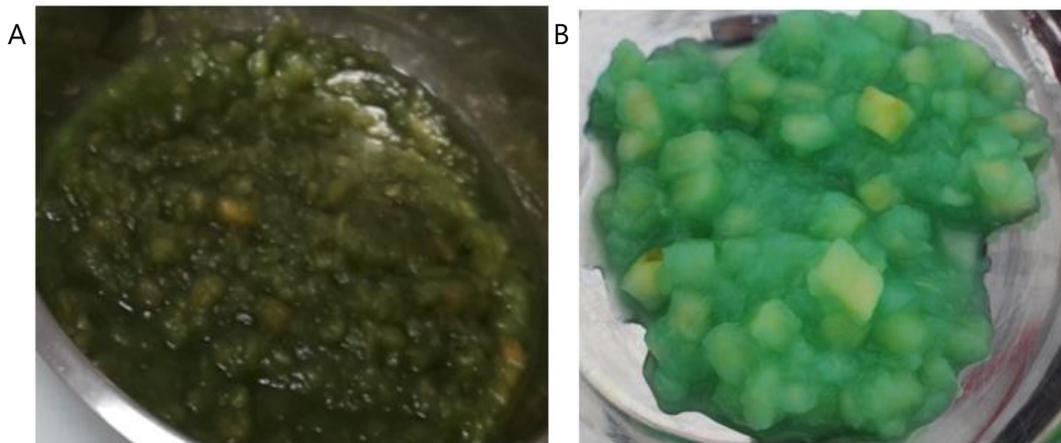
Cependant, une coloration orangée à brun des cubes est apparue, possiblement due au brunissement enzymatique et à l'action d'une PPO (cf partie 1.3.3.1). Cette couleur interférait avec la détection de la safranine (rouge). Un essai avec l'hémoglobine, une protéine rouge qui avait été choisie pour sa disponibilité, a confirmé cette gêne. La Figure 84 montre en effet une coloration proche de l'oxydation par imprégnation avec l'hémoglobine.



**Figure 84 : Coupes de cubes de pommes décongelé (A) et imprégnés sous-vide avec de l'hémoglobine (B)**

Ces résultats ont conduit à utiliser des colorants appartenant à un autre spectre de couleur. Ainsi le colorant alimentaire bleu brillant FCF (E133) et la phycocyanine, une protéine bleue, ont été choisis pour les essais visuels.

#### 4.3.4.3 Imprégnation sous-vide de cubes de fruits avec du colorant alimentaire



**Figure 85 : apparence du lot de cube de pommes après imprégnation sous vide, précédée d'une homogénéisation à pression atmosphérique (A) ou sous-vide (B)**

Les deux procédés décrits en partie IV.11.2.2, avec une homogénéisation de 15 min à pression atmosphérique pour le premier et à 50 hPa pour le second et 5 minutes à 50 hPa pour l'imprégnation à 30°C, ont été testé avec les cubes de pomme et le colorant E133. Le premier procédé réalise l'homogénéisation à pression atmosphérique alors que le second la réalise sous-vide. Etant donné l'apparence générale des cubes (Figure 85), l'homogénéisation semble correcte. En revanche le procédé 1 a déstructuré les cubes de pomme en plus de leur donner un aspect oxydé (ratio cube/purée (g:g) : 57%/43%).



**Figure 86 : Cubes prélevé du lot ayant subi le procédé 1 (A) ou le procédé 2 (B)**

Pour chacun des deux procédés, un échantillonnage de 40 cubes intacts a été réalisé pour quantifier l'efficacité de l'imprégnation sous-vide. Le procédé 2 (20 min sous-vide) donne de meilleurs résultats (Tableau XLII et Figure 86), autant au niveau de l'aspect des cubes qu'au niveau de la proportion de cubes imprégnés avec 95% des cubes colorés à cœur ou en surface contre 73% pour le procédé 1 (15 min à pression atmosphérique + 5 min sous-vide).

**Tableau XLII : Rendements de l'imprégnation sous-vide par comptage de cubes de pommes (n=2)**

	Nombre de cubes échantillonnés	Cubes colorés à cœur	Ratio de cubes colorés à cœur	Cubes colorés en surface	Ratio de cubes colorés en surface
Procédé 1	40	9±2	23%	20±4	50%
Procédé 2	40	14±1	35%	24±4	60%

L'observation macroscopique (Figure 87) montre une structure riche en bulle d'air pour le cube congelé. La quantité de bulles d'air diminue avec le procédé 1 et elles disparaissent avec le procédé 2. Le principe de l'imprégnation sous vide est de remplacer l'air des espaces vides des fruits par du liquide. Ainsi le procédé 2 semble être le procédé le plus efficace étant donné l'apparente disparition totale des bulles d'air. La seule différence entre le procédé 1 et le procédé 2 étant la durée que les cubes ont passé sous-vide (5 min pour le 1 contre 20 min pour le 2), il est probable que la qualité de l'imprégnation soit directement liée à la durée de mise sous vide. Cette hypothèse est concordante avec (Javeri et al., 1991), qui montrent une amélioration de la qualité de l'imprégnation avec l'augmentation du temps d'infusion d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  dans des pêches. La fermeté des pêches a été multipliée par 1,5 avec une infusion de 2 heures au lieu de 30 min.

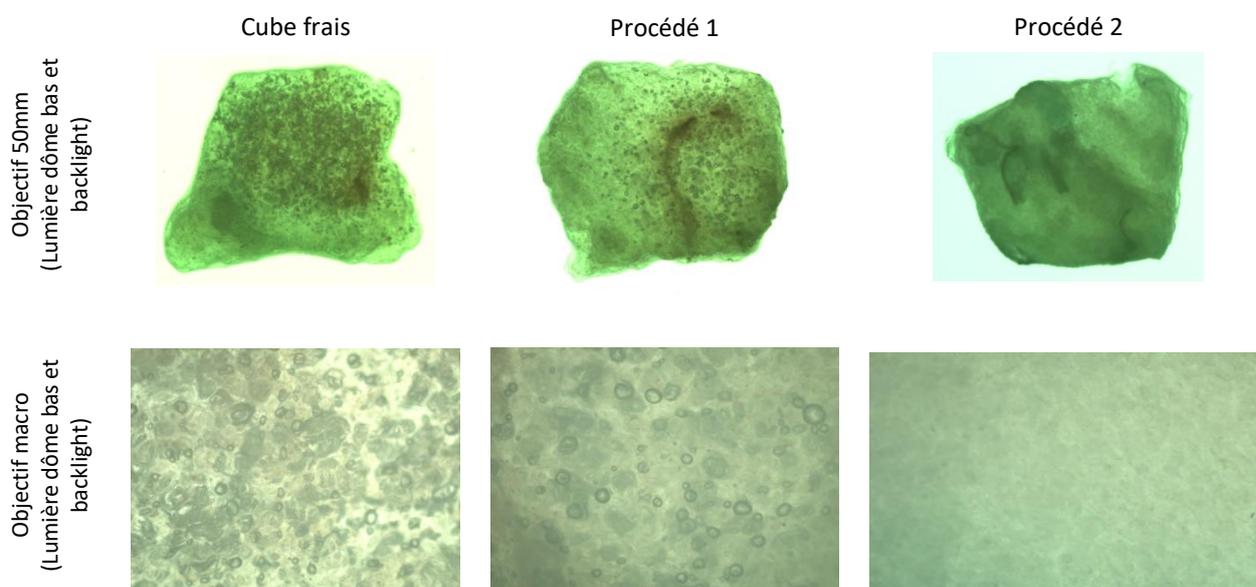


Figure 87 : Image sous différents objectifs de coupes de cubes de pomme frais ou ayant subi un procédé

Le procédé 2 a donc été retenu pour l'imprégnation sous-vide. Différentes agitations ont ensuite été testées pour réduire la déstructuration des cubes tout en conservant une bonne homogénéisation du colorant. L'agitation continue initiale a été comparée à des agitations discontinues par cycle de 10 s, 5 s d'agitation et 5 s de repos pour la première et 2 s d'agitation et 8 s de repos pour la seconde. Avec des ratios cube/jus (g:g) respectifs de 67%/33%, 73%/27% et

81%/19%, l'agitation discontinue (8 s de repos/2 seconde d'agitation) a été retenue pour la suite des essais d'imprégnation car elle permet de conserver plus de cubes intact sans modifier significativement l'homogénéisation du colorant alimentaire.

#### 4.3.4.4 Imprégnation sous-vide de cubes de fruits avec des protéines colorées

Un essai a été effectué avec des cubes de fraises et des cubes d'abricots. Bien que la coloration soit visible, la texture des cubes a été fortement détériorée (ratio cubes/purée (g:g) : 39%/61%). L'objectif est de pouvoir utiliser ces cubes de fraises dans des yaourts aux fruits avec morceaux. La déstructuration des cubes est donc trop importante pour être rentable économiquement rendant ce procédé inadapté pour les industriels (Figure 88).



Figure 88 : Lot d'1 kg de cubes de fraise ayant subi le procédé 2 avec 1 ml de phycocyanine

#### 4.3.5 Synthèse de chapitre

##### L'imprégnation sous-vide

L'un des verrous technologiques de la thèse est l'application des glucosidases sur des fraises et abricots coupés en cubes. L'imprégnation sous-vide a du être étudiée pour tenter d'incorporer des glucosidases à l'intérieur des dés de fruits afin d'avoir une augmentation des arômes à cœur. Le procédé a pu être optimisé pour obtenir la meilleure homogénéisation et imprégnation pour un volume de 1 à 10 mL pour 1 kg de cubes. Les premiers essais ayant été réalisés sur des cubes de pomme ont montré peu de déstructuration avec le procédé optimisé, mais lors des essais sur cubes de fraises et d'abricots la déstructuration était trop importante pour envisager une imprégnation avec de petit volume. Il a donc été décidé de prévoir des imprégnations avec des volumes plus important en utilisant du jus de fraises ou abricots ayant déjà subi l'action des glucosidases.

##### L'échelle pilote de laboratoire

Les premiers essais sur purée de fraises à l'échelle pilote de laboratoire avec le roboQbo étaient analytiquement peu satisfaisants et cela a été confirmé par les analyses sensorielles

réalisées par la société Jean Niel. Comme les glucosidases avaient déjà été sélectionnées pour une utilisation optimale sur fraises et abricots, une approche sur le traitement de la matière première avant incubation a été envisagée avec des étapes de lavage, blanchiment et ajustement du pH de la fraise à 5,5. Ces modifications n'ont apporté aucune amélioration. Pour comprendre ce manque de résultats, un retour à l'échelle laboratoire a été amorcé avec des études cinétiques sur purée de fruits. Ces études ont montré un temps de latence de 4 heures avant que les glycosidases ne commencent à agir sur les glycosides de fraises, ce qui explique qu'il n'y avait que très peu de déglycosylation durant les essais à l'échelle pilote. Par la suite, il a été montré qu'un enzymage à 10% au lieu de 1% permettait d'éliminer ce temps de latence. Un travail sur la concentration des enzymes est donc envisageable pour augmenter l'activité utilisée dans la purée de fraises sans changer la masse de solution enzymatique ajoutée.

---

# Conclusion générale et perspectives

---

Le projet Natarôme+ a été créé pour améliorer l'arôme des produits à base de fruit sans arôme ajouté. Les travaux de thèse s'inscrivent dans ce projet avec comme focus l'optimisation de la libération de la réserve glycosidique durant les procédés de transformation de la fraise et de l'abricot en utilisant les glucosidases comme auxiliaire technologique. L'objectif est d'obtenir par évolution dirigée de nouvelles enzymes adaptées à l'utilisation sur fraises et abricots afin de transposer ce nouveau procédé aux autres fruits du projet.

Pour atteindre cet objectif, une première étape de caractérisation du profil aromatique et de la réserve glycosidique des fraises et abricots utilisés par les industries de transformation partenaires du projet a été réalisée. Cela a demandé la mise au point d'une nouvelle méthode de quantification par hydrolyse directe de la réserve glycosidique afin de pouvoir comparer les quantités de composés volatils libres et liés.

La seconde étape a été le développement de nouvelles enzymes adaptées à l'utilisation sur fraise et abricot par évolution dirigée avec la méthode de L-Shuffling<sup>TM</sup> de la société Protéus. Des caractérisations ont été réalisées sur des glucosidases pour choisir la E4103 comme principal parent durant le L-Shuffling<sup>TM</sup>. La société Protéus a présélectionné 5 mutants. Ils ont été caractérisés sur milieu modèle et sur la fraise pour choisir la E4177 et la E4179 pour l'application de glucosidases sur fraises et abricots. De plus, l'activité de ces enzymes a été modélisée en fonction des triades température/pH/Brix et fructose/glucose/saccharose afin de créer un outil prédictif permettant de faciliter l'application des glucosidases dans d'autres fruits que la fraise et l'abricot.

La dernière étape est l'application des enzymes dans un procédé à l'échelle de pilote de laboratoire (2 kg) en prévision d'une augmentation d'échelle pour l'application industrielle des glucosidases. Cette partie s'est divisée entre l'étude de l'imprégnation sous-vide pour l'application des enzymes sur cubes de fraises et d'abricots et l'optimisation de l'application des glucosidases sur purée de fraises à l'échelle pilote de laboratoire. La fin de cette partie s'est portée sur la résolution des problèmes lors du passage à l'échelle pilote de laboratoire par des études cinétiques.

## **Mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse permettent de comparer la réserve glycosidique au profil aromatique initial d'un fruit.**

Une nouvelle méthode par hydrolyse directe a été mise au point pour comparer la quantité de glycosides et la quantité de composés volatils libres. En effet, l'analyse traditionnelle se base sur un mécanisme d'affinité pour isoler les glycosides puis les quantifier par chromatographie gazeuses après hydrolyse (Cristina Ubeda et al., 2012). Cela crée un biais durant l'extraction qui empêche de comparer de manière fiable les quantités de composés volatils initiaux avec les quantités de glycosides mesurées. En effet la thèse de (Voirin, 1990) montre un rendement de 15% de l'extraction par SPE sur de glycosides avec des aglycones phénoliques et un rendement allant de 70% à 100% pour l'extraction de glycosides avec des aglycones terpéniques. La quantification par la méthode d'hydrolyse directe se base sur la différence en teneur de composé aromatique avant et après traitement enzymatique. Les échantillons témoins et ceux traités avec des enzymes sont ensuite extraits avec la même méthode d'extraction ce qui rend leur quantification comparable. Cette nouvelle méthode va permettre de mieux jauger le ratio forme liée/forme libre des composés volatils dans les fruits et ainsi de mieux appréhender le potentiel d'augmentation de leur arôme.

## **Comparaison des profils aromatiques et des réserves glycosidiques entre les fraises de bouche et les fraises destinées à la transformation.**

La comparaison des profils aromatiques des fraises de bouches et des fraises destinées à la transformation a montré une nette séparation entre ces deux types de fraises. Une analyse par composants principaux a été utilisée sur les profils aromatiques de 14 lots de fraises (9 destinés de la transformation et 5 destinés au marché frais). Les fraises de bouche ont une forte teneur en esters et les fraises destinées à la transformation ont une forte teneur en alcools et lactones, c'est ce qui différencierait ces deux types de fraises.

En revanche, du point de vue réserve, les fraises destinées à la transformation montrent un intérêt à libérer leur réserve glycosidique avec une augmentation moyenne de 50% de leur teneur en composés volatils après traitement avec l'AR2000. Cette amélioration est meilleure qu'avec les fraises de bouche qui ont une augmentation moyenne de leur teneur en composés volatil de 6%. Cela confirme l'intérêt de travailler sur la libération de la réserve des fruits destinés à la transformation.

## **Développement de nouvelles glucosidases adaptées au milieu fraise/abricot.**

L'évolution dirigée par L-Shuffling<sup>TM</sup> a permis de développer 2 nouvelles glucosidases adaptées à une application sur fraises et abricots : E4177 et E4179. Ces deux enzymes viennent des mêmes parents et leur efficacité porte sur deux éléments différents : la E4177 pour sa tolérance aux sucres 3 fois supérieure à celle des autres glucosidases testées, dont l'AR2000, et la E4179 pour

son activité en conditions standards 2 fois supérieures à celle de l'AR2000. De plus, l'absence d'activité pectinase fait de ces enzymes de bonnes alternatives aux préparations commerciales, comme l'AR2000, qui liquéfient les fruits auxquels elles sont appliquées. Ainsi ces nouvelles enzymes peuvent être appliquées sur des purées ou des cubes de fruits sans déstructuration. Pour finir, le fait d'avoir deux enzymes utilisables dans les fraises et abricots va permettre de créer une « boîte noire » pour éviter la reproduction des enzymes par les sociétés concurrentes.

### **Création d'un outil prédictif par modélisation de l'activité de la E4177 et E4179.**

L'activité des glucosidases E4177 et E4179 a été modélisée mathématiquement en fonction de la température, du pH, du Brix et de la teneur en glucose, fructose et saccharose. L'impact de ces paramètres sur l'activité des enzymes E4177 et E4179 peut ainsi être mieux appréhendé pour leurs futures applications. Les plans d'expérience ont permis de mettre en évidence l'inhibition des glucosidases par le glucose et de voir une interdépendance du pH et du Brix dans l'activité des deux mutant E4177 et E4179. Cette modélisation a permis de mettre au point un outil prédictif indiquant si l'enzyme est adaptée ou non à l'utilisation sur une nouvelle matrice par simple connaissance de son pH, de son Brix, de sa concentration en sucres et de la température d'incubation souhaitée sans avoir besoin, dans un premier temps de l'analyse complète du profil de la réserve.

### **Mise en évidence d'un temps de latence dans l'action des enzymes sur la fraise.**

Des études cinétiques ont montré un temps de latence de 4 heures avant que les glycosidases ne commencent à agir sur les glycosides de composés volatils de fraises. Ce résultat explique qu'il n'y avait que très peu de déglycosylation durant les essais dans le pilote de laboratoire dont les essais duraient 2 heures. Ce temps de latence peut être le signe d'une hydrolyse préférentielle d'autres glycosides. Par la suite il a été montré qu'un enzymage à 10% au lieu de 1% permettait d'éliminer ce temps de latence. Un travail sur la concentration des enzymes est donc envisageable pour augmenter l'activité utilisée dans la purée de fraises sans changer la masse de solution enzymatique ajoutée.

La libération du furanéol par E4177 est limitée comparée à l'AR2000. L'hypothèse la plus probable est qu'il existerait d'autres formes de glycoside de furanéol que le glucoside et le malonylglucoside qui ont été identifiés dans la fraise (Raab, 2006). Bien qu'aucune étude n'étaye cette hypothèse, cette dernière sera testée avec une injection en HPLC-MS d'un jus de fraise brut pour déterminer si le furanéol y est présent sous forme de diglycoside.

La biotechnologie qui est développée durant cette thèse est à mettre en regard des autres biotechnologies qui modifient l'arôme dans les fruits. Parmi elles, la fermentation sur milieu solide est capable de synthétiser des composés volatils à partir de leur précurseur. Par exemple, l'ajout de *Pycnopus cinnabarinus* dans un fruit riche en acide férulique produira de la vanilline (Oddou, Stentelaire, Lesage-Meessen, Asther, & Colonna Ceccaldi, 1999) et l'ajout de *Tyromyces*

*sambuceus* en présence d'acide ricinoléique produira de la  $\gamma$ -décalactone (Kapfer, Berger, & Drawert, 1989).

Cette biotechnologie ne peut s'appliquer que pour des produits finis fermentés car ces microorganismes ajoutent d'autres composés modifiant l'arôme du fruit comme c'est le cas lors de la fermentation du raisin où l'arôme final du vin est composé de molécules venant du fruit mais également venant de la levure comme l'acide acétique, l'acide tridécanoïque ou encore l'acide isovalérique (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Une autre biotechnologie est l'ingénierie métabolique afin de moduler de manière intrinsèque l'activité d'une enzyme changeant la composition en composés volatils dans un fruit. Ainsi (Dandekari et al., 2004) ont pu réduire la production d'esters en rendant silencieuse l'expression de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS) dans une pomme *Greensleeves* transgénique. L'absence de cette enzyme a fait chuter la production d'éthylène ce qui a réduit l'expression des AAT responsables de la production des esters dans la pomme (enzyme éthylène-dépendante, cf partie II.1.3.1).

Comme détaillé dans la partie II.3.5 les glucosidases sont déjà utilisées en industrie mais dans le vin ce qui contourne un des plus grands obstacles à l'application de ces enzymes dans les fruits : l'inhibition par effet produit à cause du glucose. De plus le vin étant un liquide, l'activité pectinase présente dans les préparations de glucosidases commerciales n'a pas d'impact sur la texture du produit, ce qui n'est pas le cas des purées de fruits sur lesquelles ces préparations sont inutilisables si la texture doit être conservée.

L'ajout de glucosidases exempt d'activité pectinase directement au contact du fruit semble être le meilleur compromis parmi les biotechnologies déjà existantes modifiant l'arôme des fruits avec une absence des réactions parasites de la fermentation, avec une action plus large que l'ingénierie métabolique du fruit et avec une synthèse *in vivo* des composés volatils contrairement à d'autres enzymes productrices d'arômes comme les estérases.

Le passage à l'échelle pilote de laboratoire a montré des résultats insatisfaisants sur la fraise au niveau des analyses sensorielles réalisées par la société partenaire Jean Niel. Cependant sur l'abricot des résultats équivalents à l'AR2000 ont été trouvés sans la liquéfaction rendant ainsi possible l'application des glucosidases sur purée et cubes d'abricots sans risque de déstructuration. De plus la découverte du temps de latence lors de l'étude cinétique encourage à poursuivre l'optimisation du procédé en jouant en même temps sur la concentration des préparations de glucosidase et sur le temps d'incubation pour trouver le meilleur compromis entre coût et efficacité.

Durant l'étude de l'imprégnation de glucosidases dans des cubes de fraises, une forte déstructuration a été observée à cause du peu de volume de solution enzymatique qui peut être ajouté. Cette déstructuration avancée pousserait à réorienter l'objectif de cette partie vers une

imprégnation d'un jus traité avec les glucosidases plutôt que d'une solution enzymatique. Dans ce cas, les cubes de fruits seraient submergés par le jus. L'agitation pour homogénéiser ne serait donc plus nécessaire ce qui limiterait la déstructuration mécanique

Un autre axe d'ouverture de cette étude serait d'étendre l'application des glucosidases à d'autres fruits, ce qui est déjà prévu dans le projet Natarome+, mais également aux légumes qui possèdent également des glycosides de composés volatils comme c'est le cas pour l'ail (Blažević & Mastelić, 2008), la tomate (Birtić, Ginies, Causse, Renard, & Page, 2009) ou encore les champignons. Un dernier axe d'ouverture serait l'étude de l'application de l'augmentation des arômes de fruits via les glucosidases pour les produits allégés en sucres. En effet une étude de (Valentin, Chrea, & Nguyen, 2006) a montré que la présence de vanilline dans une solution sucrée accentue la sensation de sucré et il est possible que le furanéol avec sa note « caramel » puissent avoir le même effet.



---

# Références Bibliographiques

---

- Adami, M., De Franceschi, P., Brandi, F., Liverani, A., Giovannini, D., Rosati, C., ... Tartarini, S. (2013). Identifying A Carotenoid Cleavage Dioxygenase (Ccd4) Gene Controlling Yellow/White Fruit Flesh Color Of Peach. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(5), 1166–1175. <https://doi.org/10.1007/S11105-013-0628-6>
- Additifs Alimentaires - Webadditifs. (N.D.). Retrieved February 7, 2019, From <https://www.les-additifs-alimentaires.com/>
- Agro Media. (2012, October 2). Une Nouvelle Liste D'arômes Pour L'ue Grâce Aux Evaluations Réalisées Par L'efsa. Retrieved December 29, 2018, From <http://www.agro-media.fr/actualite/une-nouvelle-liste-dearomes-pour-leue-grace-aux-evaluations-realisees-8304.html>
- Agro Media. (2017, April 4). Tribune : « Agroalimentaire Et Biens De Grande Consommation : Les Tendances Pour 2017 ». Retrieved December 29, 2018, From <http://www.agro-media.fr/actualite/tribune-agroalimentaire-biens-de-grande-consommation-tendances-2017-24415.html>
- Agro Media. (2018a, February 26). [2018] CFIA / Concentrés Aromatiques : Epi Ingrédients Présente Sa Nouvelle Gamme D'ingrédients Laitiers Innovants. Retrieved December 29, 2018, From <http://www.agro-media.fr/actualite/2018-cfia-concentres-aromatiques-epi-ingredients-presente-nouvelle-gamme-dingrédients-laitiers-innovants-27723.html>
- Agro Media. (2018b, May 24). Les Industriels A Nouveau Appelés A Renoncer Au Dioxyde De Titane. Retrieved December 29, 2018, From <http://www.agro-media.fr/actualite/les-industriels-a-nouveau-appelés-a-renoncer-au-dioxyde-de-titane-29133.html>
- Agro Media. (2018c, June). Ingrédients, Vers Des Etiquettes Propres [Dossier Complet]. Retrieved December 29, 2018, From <http://www.agro-media.fr/ingredient-etiquette>
- Aguilar-Rosas, S. F., Ballinas-Casarrubias, M. L., Nevarez-Moorillon, G. V., Martin-Belloso, O., & Ortega-Rivas, E. (2007). Thermal And Pulsed Electric Fields Pasteurization Of Apple Juice: Effects On Physicochemical Properties And Flavour Compounds. *Journal Of Food Engineering*, 83(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/J.Jfoodeng.2006.12.011>
- Aharoni, A. (2000). Identification Of The SAAT Gene Involved In Strawberry Flavor Biogenesis By Use Of DNA Microarrays. *The Plant Cell Online*, 12(5), 647–662. <https://doi.org/10.1105/TPC.12.5.647>
- Aharoni, A. (2004). Gain And Loss Of Fruit Flavor Compounds Produced By Wild And Cultivated Strawberry Species. *The Plant Cell Online*, 16(11), 3110–3131. <https://doi.org/10.1105/TPC.104.023895>
- Ajisaka, K., Nishida, H., & Fujimoto, H. (1987). The Synthesis Of Oligosaccharides By The Reversed Hydrolysis Reaction Of  $\beta$ -Glucosidase At High Substrate Concentration And At High Temperature. *Biotechnology Letters*, 9(4), 243–248. <https://doi.org/10.1007/BF01027157>

- Alexandre, E. M. C., Santos-Pedro, D. M., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2011). Study On Thermosonication And Ultraviolet Radiation Processes As An Alternative To Blanching For Some Fruits And Vegetables. *Food And Bioprocess Technology*, *4*(6), 1012–1019. <https://doi.org/10.1007/S11947-011-0540-8>
- Aloulou, A., Rodriguez, J. A., Puccinelli, D., Mouz, N., Leclaire, J., Leblond, Y., & Carrière, F. (2007). Purification And Biochemical Characterization Of The LIP2 Lipase From *Yarrowia Lipolytica*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular And Cell Biology Of Lipids*, *1771*(2), 228–237. <https://doi.org/10.1016/J.Bbalip.2006.12.006>
- Aubert, C., Bony, P., Chalot, G., & Hero, V. (2010). Changes In Physicochemical Characteristics And Volatile Compounds Of Apricot (*Prunus Armeniaca* L. Cv. Bergeron) During Storage And Post-Harvest Maturation. *Food Chemistry*, *119*(4), 1386–1398. <https://doi.org/10.1016/J.Foodchem.2009.09.018>
- Ayrinhac, C., Margeot, A., Ferreira, N. L., Chaabane, F. B., Monot, F., Ravot, G., ... Fourage, L. (2011). Improved Saccharification Of Wheat Straw For Biofuel Production Using An Engineered Secretome Of *Trichoderma Reesei*. *Organic Process Research & Development*, *15*(1), 275–278. <https://doi.org/10.1021/Op100218a>
- Baek, H. H., & Cadwallader, K. R. (1999a). Contribution Of Free And Glycosidically Bound Volatile Compounds To The Aroma Of Muscadine Grape Juice. *Journal Of Food Science*, *64*(3), 441–444. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1999.Tb15059.X>
- Baek, H. H., & Cadwallader, K. R. (1999b). Contribution Of Free And Glycosidically Bound Volatile Compounds To The Aroma Of Muscadine Grape Juice. *Journal Of Food Science*, *64*(3), 441–444. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1999.Tb15059.X>
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L., & Servillo, L. (1990). A Glycoprotein Inhibitor Of Pectin Methyltransferase In Kiwi Fruit (*Actinidia Chinensis*). *European Journal Of Biochemistry*, *193*(1), 183–187. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1990.Tb19321.X>
- Bayonove, C., Günata, Z., & Cordonnier, R. (1984). Mise En Evidence De L'intervention Des Enzymes Dans Le Développement De L'arôme Du Jus De Muscat Avant Fermentation: La Production Des Terpénols. *Bull. OIV*, *57*(643–644), 740–758.
- Beaulieu, J., & Baldwin, E. (2002). Flavor And Aroma Of Fresh-Cut Fruits And Vegetables. In O. Lamikanra (Ed.), *Fresh-Cut Fruits And Vegetables*. CRC Press. Retrieved From <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420031874.ch12>
- Bednarek, P., Pislewski-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubisky, J., Mansurova, M., ... Schulze-Lefert, P. (2009). A Glucosinolate Metabolism Pathway In Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science (New York, N.Y.)*, *323*(5910), 101–106. <https://doi.org/10.1126/Science.1163732>
- Beekwilder, J. (2004). Functional Characterization Of Enzymes Forming Volatile Esters From Strawberry And Banana. *PLANT PHYSIOLOGY*, *135*(4), 1865–1878. <https://doi.org/10.1104/Pp.104.042580>
- Bellary, A. N., & Rastogi, N. K. (2016). Ways And Means For The Infusion Of Bioactive Constituents In Solid Foods. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, *56*(7), 1126–1145. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.757545>
- Berrin, J.-G., Mclauchlan, W. R., Needs, P., Williamson, G., Puigserver, A., Kroon, P. A., & Juge, N. (2002). Functional Expression Of Human Liver Cytosolic Beta-Glucosidase In *Pichia Pastoris*. Insights Into Its Role In The Metabolism Of Dietary Glucosides. *European Journal Of Biochemistry*, *269*(1), 249–258.

- Bhat, R., Geppert, J., Funken, E., & Stamminger, R. (2015). Consumers Perceptions And Preference For Strawberries—A Case Study From Germany. *International Journal Of Fruit Science*, 15(4), 405–424. <https://doi.org/10.1080/15538362.2015.1021408>
- Bianchi, G., Lovazzano, A., Lanubile, A., & Marocco, A. (2014). Aroma Quality Of Fruits Of Wild And Cultivated Strawberry (*Fragaria Spp.*) In Relation To The Flavour-Related Gene Expression. *Journal Of Horticultural Research*, 22(1). <https://doi.org/10.2478/Johr-2014-0009>
- Birtić, S., Ginies, C., Causse, M., Renard, C. M. G. C., & Page, D. (2009). Changes In Volatiles And Glycosides During Fruit Maturation Of Two Contrasted Tomato (*Solanum Lycopersicum*) Lines. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 57(2), 591–598. <https://doi.org/10.1021/Jf8023062>
- Blažević, I., & Mastelić, J. (2008). Free And Bound Volatiles Of Garlic Mustard (*Alliaria Petiolata*). *Croatica Chemica Acta*, 81(4), 607–613.
- Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A., & Galzy, P. (1983). Purification And Properties Of The  $\beta$ -Glucosidase Of A Yeast Capable Of Fermenting Cellobiose To Ethanol: Dekkera Intermedia Van Der Walt. *European Journal Of Applied Microbiology And Biotechnology*, 17(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF00510563>
- Bonnin, E., Garnier, C., & Ralet, M.-C. (2014). Pectin-Modifying Enzymes And Pectin-Derived Materials: Applications And Impacts. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 98(2), 519–532. <https://doi.org/10.1007/S00253-013-5388-6>
- Borejsza-Wysocki, W., & Hrazdina, G. (1994). Biosynthesis Of P-Hydroxyphenylbutan-2-One In Raspberry Fruits And Tissue Cultures. *Phytochemistry*, 35(3), 623–628. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90575-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90575-2)
- Bortiri, E., Oh, S.-H., Jiang, J., Baggett, S., Granger, A., Weeks, C., ... Parfitt, D. E. (2001). Phylogeny And Systematics Of Prunus (Rosaceae) As Determined By Sequence Analysis Of ITS And The Chloroplast TrnL-TrnF Spacer DNA. *Systematic Botany*, 26(4), 797–808. <https://doi.org/10.1043/0363-6445-26.4.797>
- Bourne, Y., & Henrissat, B. (2001). Glycoside Hydrolases And Glycosyltransferases: Families And Functional Modules. *Current Opinion In Structural Biology*, 11(5), 593–600.
- Bramley, P. M. (2002). Regulation Of Carotenoid Formation During Tomato Fruit Ripening And Development. *Journal Of Experimental Botany*, 53(377), 2107–2113. <https://doi.org/10.1093/Jxb/Erf026>
- Brecht, J. K. (1995). Physiology Of Lightly Processed Fruits And Vegetables, 30, 5.
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release Of Active Cytokinin By A Beta-Glucosidase Localized To The Maize Root Meristem. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5136), 1051–1054.
- Burdock, G. A., & Fenaroli, G. (2010). *Fenaroli's Handbook Of Flavor Ingredients* (6th Ed). Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Buren, J. P., Moyer, J. C., & Robinson, W. B. (1962). Pectin Methylesterase In Snap Beans<sup>B</sup>. *Journal Of Food Science*, 27(3), 291–294. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1962.Tb00095.X>
- Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., & Henrissat, B. (2000). High Resolution X-Ray Crystallography Shows That Ascorbate Is A Cofactor For Myrosinase And Substitutes For The Function Of The Catalytic Base. *The Journal Of Biological Chemistry*, 275(50), 39385–39393. <https://doi.org/10.1074/Jbc.M006796200>

- Burton, R., & Lloyd, J. B. (1976). Latency Of Some Glycosidases Of Rat Liver Lysosomes. *Biochemical Journal*, *160*(3), 631–638. <https://doi.org/10.1042/Bj1600631>
- Butters, T. D. (2007). Gaucher Disease. *Current Opinion In Chemical Biology*, *11*(4), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.035>
- Carreño-Olejua, R., Hofacker, W. C., & Hensel, O. (2010). High-Pressure Water-Jet Technology As A Method Of Improving The Quality Of Post-Harvest Processing. *Food And Bioprocess Technology*, *3*(6), 853–860. <https://doi.org/10.1007/S11947-010-0428-Z>
- Carrín, M. (2004). Characterization Of Starch In Apple Juice And Its Degradation By Amylases. *Food Chemistry*, *87*(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.032>
- Carvalho, A. L., Dias, F. M. V., Nagy, T., Prates, J. A. M., Proctor, M. R., Smith, N., ... Gilbert, H. J. (2007). Evidence For A Dual Binding Mode Of Dockerin Modules To Cohesins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, *104*(9), 3089–3094. <https://doi.org/10.1073/Pnas.0611173104>
- Cautela, D., Castaldo, D., Servillo, L., & Giovane, A. (2010). Enzymes In Citrus Juice Processing. In *Enzymes In Fruit And Vegetable Processing* (Pp. 197–214).
- Cazy - GH. (N.D.). Retrieved January 27, 2019, From <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>
- Ceci, L., & Lozano, J. (1998). Determination Of Enzymatic Activities Of Commercial Pectinases For The Clarification Of Apple Juice. *Food Chemistry*, *61*(1–2), 237–241. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00088-5)
- Ceci, L. N., & Lozano, J. E. (2002). Amylase For Apple Juice Processing: Effects Of Ph, Heat, And Ca<sup>2+</sup> Ions. *Food Technology And Biotechnology*, *40*(1), 33–38.
- Chang, Q., Hoefs, S., Van Der Kemp, A. W., Topala, C. N., Bindels, R. J., & Hoenderop, J. G. (2005). The Beta-Glucuronidase Klotho Hydrolyzes And Activates The TRPV5 Channel. *Science (New York, N.Y.)*, *310*(5747), 490–493. <https://doi.org/10.1126/Science.1114245>
- Chi, Y. I., Martinez-Cruz, L. A., Jancarik, J., Swanson, R. V., Robertson, D. E., & Kim, S. H. (1999). Crystal Structure Of The Beta-Glycosidase From The Hyperthermophile Thermosphaera Aggregans: Insights Into Its Activity And Thermostability. *FEBS Letters*, *445*(2–3), 375–383.
- Chodorge, M., Fourage, L., Ravot, G., Jermutus, L., & Minter, R. (2008). In Vitro DNA Recombination By L-Shuffling During Ribosome Display Affinity Maturation Of An Anti-Fas Antibody Increases The Population Of Improved Variants. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, *21*(5), 343–351. <https://doi.org/10.1093/Protein/Gzn013>
- Cicek, M., Blanchard, D., Bevan, D. R., & Esen, A. (2000). The Aglycone Specificity-Determining Sites Are Different In 2, 4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-One (DIMBOA)-Glucosidase (Maize Beta -Glucosidase) And Dhurrinase (Sorghum Beta -Glucosidase). *The Journal Of Biological Chemistry*, *275*(26), 20002–20011. <https://doi.org/10.1074/Jbc.M001609200>
- COUNCIL DIRECTIVE 2001/112/EC. (2001). *AGRI Ange Bleu*, 13.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry And Molecular Biology Of Plants*, *24*, 1250–1319.
- Cumplido-Laso, G., Medina-Puche, L., Moyano, E., Hoffmann, T., Sinz, Q., Ring, L., ... Blanco-Portales, R. (2012). The Fruit Ripening-Related Gene Faaat2 Encodes An Acyl Transferase Involved In Strawberry Aroma Biogenesis. *Journal Of Experimental Botany*, *63*(11), 4275–4290. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers120>

- Czichi, U., & Kindl, H. (1975). Formation Of P-Coumaric Acid And O-Coumaric Acid From L-Phenylalanine By Microsomal Membrane Fractions From Potato: Evidence Of Membrane-Bound Enzyme Complexes. *Planta*, *125*(2), 115–125.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D. R., Henrissat, B., & Esen, A. (2000). The Mechanism Of Substrate (Aglycone) Specificity In Beta -Glucosidases Is Revealed By Crystal Structures Of Mutant Maize Beta -Glucosidase-DIMBOA, -Dimboaglc, And -Dhurrin Complexes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, *97*(25), 13555–13560. <https://doi.org/10.1073/Pnas.97.25.13555>
- Da Silva, F. L., Escribano-Bailón, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin Pigments In Strawberry. *LWT - Food Science And Technology*, *40*(2), 374–382. <https://doi.org/10.1016/J.Lwt.2005.09.018>
- Daily, R. (2018, November 14). A Flavor Of The Future: Technology And Trends At Flavorcon 2018 Day 1. Retrieved December 29, 2018, From <https://www.perfumerflavorist.com/events/coverage/a-flavor-of-the-future-technology-trends-at-flavorcon-2018-day-1-500405162.html>
- Dandekari, A. M., Teo, G., Defilippi, B. G., Uratsu, S. L., Passey, A. J., Kader, A. A., ... James, D. J. (2004). Effect Of Down-Regulation Of Ethylene Biosynthesis On Fruit Flavor Complex In Apple Fruit. *Transgenic Research*, *13*(4), 373–384.
- Darbellay, C., Luisier, J.-L., Villettaz, J.-C., Amadö, R., & Azodanlou, R. (2004). Changes In Flavour And Texture During The Ripening Of Strawberries. *European Food Research And Technology*, *218*(2), 167–172. <https://doi.org/10.1007/S00217-003-0822-0>
- Davidovich-Rikanati, R., Sitrit, Y., Tadmor, Y., Iijima, Y., Bilenko, N., Bar, E., ... Others. (2007). Enrichment Of Tomato Flavor By Diversion Of The Early Plastidial Terpenoid Pathway. *Nature Biotechnology*, *25*(8), 899–902.
- Daviet, L., & Schalk, M. (2010). Biotechnology In Plant Essential Oil Production: Progress And Perspective In Metabolic Engineering Of The Terpene Pathway. *Flavour And Fragrance Journal*, *25*(3), 123–127. <https://doi.org/10.1002/Ffj.1981>
- Day, A. J., Dupont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., & Williamson, G. (1998). Deglycosylation Of Flavonoid And Isoflavonoid Glycosides By Human Small Intestine And Liver Beta-Glucosidase Activity. *FEBS Letters*, *436*(1), 71–75.
- Dea, S., Ghidelli, C., Pérez-Gago, M., & Poltto, A. (2011). Coatings For Minimally Processed Fruits And Vegetable. In *Edible Coatings And Films To Improve Food Quality* (Bai J, Pp. 244–276).
- Degraeve, P., Saurel, R., & Coutel, Y. (2003). Vacuum Impregnation Pretreatment With Pectinmethylesterase To Improve Firmness Of Pasteurized Fruits. *Journal Of Food Science*, *68*(2), 716–721. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2003.Tb05738.X>
- Deineka, V. I., Sorokopudov, V. N., Deineka, L. A., Shaposhnik, E. I., & Kol'tsov, S. V. (2005). Anthocyanins From Fruit Of Some Plants Of The Caprifoliaceae Family. *Chemistry Of Natural Compounds*, *41*(2), 162–164. <https://doi.org/10.1007/S10600-005-0102-2>
- Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C. M. G. C., Péan, C., & Drilleau, J.-F. (2000). Different Action Patterns For Apple Pectin Methyltransferase At Ph 7.0 And 4.5. *Carbohydrate Research*, *327*(4), 385–393. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00070-7)

- Deshpande, V., Eriksson, K.-E., & Pettersson, B. (1978). Production, Purification And Partial Characterization Of 1,4-B-Glucosidase Enzymes From *Sporotrichum Pulverulentum*. *European Journal Of Biochemistry*, *90*(1), 191–198. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1978.Tb12590.X>
- Doi, R. H., & Kosugi, A. (2004). Cellulosomes: Plant-Cell-Wall-Degrading Enzyme Complexes. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(7), 541–551. <https://doi.org/10.1038/Nrmicro925>
- Dorantes-Alvarez, L., & Chiralt, A. (2000). Color Of Minimally Processed Fruits And Vegetables As Affected By Some Chemical And Biochemical Changes. In *Minimally Processed Fruits And Vegetables* (Aspen, Pp. 111–126). Gaithersburg, MD.
- Du, X., Plotto, A., Baldwin, E., & Rouseff, R. (2011). Evaluation Of Volatiles From Two Subtropical Strawberry Cultivars Using GC–Olfactometry, GC–MS Odor Activity Values, And Sensory Analysis. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *59*(23), 12569–12577. <https://doi.org/10.1021/Jf2030924>
- Dupret, D., Lefevre, F., & Masson, J. (2003). *US20030092023A1*. United States. Retrieved From <https://patents.google.com/patent/US20030092023/en>
- Dupret, D., Lefevre, F., & Masson, J.-M. (2005). *EP1104457B1*. European Union. Retrieved From <https://patents.google.com/patent/EP1104457B1/fr>
- Dziadas, M., & Jeleń, H. H. (2010). Analysis Of Terpenes In White Wines Using SPE–SPME–GC/MS Approach. *Analytica Chimica Acta*, *677*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/J.Aca.2010.06.035>
- Fachin, D., Van Loey, A. M., Ly Nguyen, B., Verlent, I., Indrawati, & Hendrickx, M. E. (2002). Comparative Study Of The Inactivation Kinetics Of Pectinmethylesterase In Tomato Juice And Purified Form. *Biotechnology Progress*, *18*(4), 739–744. <https://doi.org/10.1021/Bp0155080>
- Feng, H.-Y., Drone, J., Hoffmann, L., Tran, V., Tellier, C., Rabiller, C., & Dion, M. (2005). Converting A B-Glycosidase Into A B-Transglycosidase By Directed Evolution. *Journal Of Biological Chemistry*, *280*(44), 37088–37097. <https://doi.org/10.1074/Jbc.M502873200>
- Feng, J., Xi, W., Li, W., Liu, H., Liu, X., & Lu, X. (2015). Volatile Characterization Of Major Apricot Cultivars Of Southern Xinjiang Region Of China. *Journal Of The American Society For Horticultural Science*, *140*(5), 466–471.
- Fickers, P., Marty, A., & Nicaud, J. M. (2011). The Lipases From *Yarrowia Lipolytica*: Genetics, Production, Regulation, Biochemical Characterization And Biotechnological Applications. *Biotechnology Advances*, *29*(6), 632–644. <https://doi.org/10.1016/J.Biotechadv.2011.04.005>
- Fito, P., Chiralt, A., Betoret, N., Gras, M., Cháfer, M., Martí nez-Monzó, J., ... Vidal, D. (2001). Vacuum Impregnation And Osmotic Dehydration In Matrix Engineering: Application In Functional Fresh Food Development. *Journal Of Food Engineering*, *49*(2), 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00220-X)
- Forney, C. F., Kalt, W., & Jordan, M. A. (2000). The Composition Of Strawberry Aroma Is Influenced By Cultivar, Maturity, And Storage. *Hortscience*, *35*(6), 1022–1026.
- Fourage, L., Sonet, J.-M., Monot, F., Ravot, G., & Margeot, A. (2013). How Molecular Evolution Technologies Can Provide Bespoke Industrial Enzymes: Application To Biofuels. *Oil & Gas Science And Technology – Revue D'ifp Energies Nouvelles*, *68*(4), 681–691. <https://doi.org/10.2516/Ogst/2012098>
- Gaborieau, S., Cendrès, A., Page, D., Ginies, C., & Renard, C. M. G. C. (2018). Variability Of Free And Glycosylated Volatiles From Strawberries Destined For The Fresh Market And For Processing,

- Assessed Using Direct Enzymatic Hydrolysis. *LWT*, 98, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.026>
- Garcia, C., & Renard, C. (2014). Validation Des Dosages Enzymatiques Des Sucres (Glucose, Fructose, Saccharose) Et Acides (Acide Citrique Et Malique) Par Un Spectrophotomètre Avec Lecteur De Microplaques. *Cahier Des Techniques De L'inra*, 81(1), 18.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014). Eugenol-Loaded Antimicrobial Nanoemulsion Preserves Fruit Juice Against Microbial Spoilage. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.034>
- Golding, J. B., Shearer, D., Mcglasson, W. B., & Wyllie, S. G. (1999). Relationships Between Respiration, Ethylene, And Aroma Production In Ripening Banana. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 47(4), 1646–1651. <https://doi.org/10.1021/jf980906c>
- Goliáš, J., Létal, J., Kožíšková, J., & Dokoupil, L. (2013). Formation Of Volatiles In Apricot (*Prunus Armeniaca* L.) Fruit During Post-Harvest Ripening. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe Und Wein, Obstbau Und Früchteverwertung*, 63(2), 96–107.
- Gomez, E., Ledbetter, C. A., & Hartsell, P. L. (1993). Volatile Compounds In Apricot, Plum, And Their Interspecific Hybrids. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 41(10), 1669–1676. <https://doi.org/10.1021/jf00034a029>
- Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A. A., ... Lewinsohn, E. (2010). Branched-Chain And Aromatic Amino Acid Catabolism Into Aroma Volatiles In Cucumis Melo L. Fruit. *Journal Of Experimental Botany*, 61(4), 1111–1123. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp390>
- González-Agüero, M., Troncoso, S., Gudenschwager, O., Campos-Vargas, R., Moya-León, M. A., & Defilippi, B. G. (2009). Differential Expression Levels Of Aroma-Related Genes During Ripening Of Apricot (*Prunus Armeniaca* L.). *Plant Physiology And Biochemistry*, 47(5), 435–440. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.002>
- Grokore, Y. K. (2016). *Caratérisation De La B-Glycosidase De La Blatte Periplaneta Americana : Application A La Valorisation Des Glycoalcaloïdes De La Pomme De Terre En Décomposition*. Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques Et Bioingénieries De Toulouse, France.
- Groyne, J., Lognay, G., & Marlier, M. (1999). Accumulation Of Glycosidically Bound Compounds In *Fragaria\* Ananassa* Cv. Elsanta Fruits At Various Developmental Stages. *Biotechnologie, Agronomie, Société Et Environnement= Biotechnology, Agronomy, Society And Environment [= BASE]*, 3(1), 5–9.
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Janbon, G., Arnaud, A., & Galzy, P. (1996). A Very Efficient B-Glucosidase Catalyst For The Hydrolysis Of Flavor Precursors Of Wines And Fruit Juices. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 44(8), 2336–2340. <https://doi.org/10.1021/jf950360j>
- Guichard, E. (1996). Interactions Between Pectins And Flavor Compounds In Strawberry Jam. Retrieved From <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordid=US9634947>
- Guichard, E., Schlich, P., & Issanchou, S. (1990). Composition Of Apricot Aroma: Correlations Between Sensory And Instrumental Data. *Journal Of Food Science*, 55(3), 735–738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb05218.x>
- Guillaume, J. (2014). *Ils Ont Domestiqué Plantes Et Animaux Prélude A La Civilisation*. Versailles: Éditions Quae.

- Günata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1985). The Aroma Of Grapes I. Extraction And Determination Of Free And Glycosidically Bound Fractions Of Some Grape Aroma Components. *Journal Of Chromatography A*, *331*, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)
- Günata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., & Cordonnier, R. (1988). Sequential Enzymic Hydrolysis Of Potentially Aromatic Glycosides From Grape. *Carbohydrate Research*, *184*, 139–149. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80012-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80012-0)
- Günata, Z., & Vallier, M.-J. (1999). Production Of A Highly Glucose-Tolerant Extracellular B-Glucosidase By Three Aspergillus Strains, 5.
- Guyot, S., Vercauteren, J., & Cheynier, V. (1996). Structural Determination Of Colourless And Yellow Dimers Resulting From (+)-Catechin Coupling Catalysed By Grape Polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, *42*(5), 1279–1288. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00127-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00127-6)
- Hampel, D., Robinson, A. L., Johnson, A. J., & Ebeler, S. E. (2014). Direct Hydrolysis And Analysis Of Glycosidically Bound Aroma Compounds In Grapes And Wines: Comparison Of Hydrolysis Conditions And Sample Preparation Methods: Glycoside Analysis. *Australian Journal Of Grape And Wine Research*, *20*(3), 361–377. <https://doi.org/10.1111/Ajgw.12087>
- Hansen, K., & Poll, L. (1993). Conversion Of L-Isoleucine Into 2-Methylbut-2-Enyl Esters In Apples. *LWT - Food Science And Technology*, *26*(2), 178–180. <https://doi.org/10.1006/Fstl.1993.1036>
- Harayama, S. (1998). Artificial Evolution By DNA Shuffling. *Trends In Biotechnology*, *16*(2), 76–82. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01158-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01158-X)
- Harvey, A. J., Hrmova, M., De Gori, R., Varghese, J. N., & Fincher, G. B. (2000). Comparative Modeling Of The Three-Dimensional Structures Of Family 3 Glycoside Hydrolases. *Proteins*, *41*(2), 257–269.
- Heldman, D. R., & Hartel, R. W. (1997). Freezing And Frozen-Food Storage. In D. R. Heldman & R. W. Hartel (Eds.), *Principles Of Food Processing* (Pp. 113–137). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6093-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6093-7_6)
- Helferich, B., & Kleinschmidt, T. (1967). Information On Sweet Almond Emulsin. Crystallization Of Component B. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, *348*(7), 753–758.
- Hernandez, L. (2003).  $\beta$ -Glucosidase Activity In A Saccharomyces Cerevisiae Wine Strain. *International Journal Of Food Microbiology*, *80*(2), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00149-6)
- Hoffmann, T., Kurtzer, R., Skowranek, K., Kiebling, P., Fridman, E., Pichersky, E., & Schwab, W. (2011). Metabolic Engineering In Strawberry Fruit Uncovers A Dormant Biosynthetic Pathway. *Metabolic Engineering*, *13*(5), 527–531. <https://doi.org/10.1016/J.Ymben.2011.06.002>
- Hosel, W., Surholt, E., & Borgmann, E. (1978). Characterization Of Beta-Glucosidase Isoenzymes Possibly Involved In Lignification From Chick Pea (Cicer Arietinum L.) Cell Suspension Cultures. *European Journal Of Biochemistry*, *84*(2), 487–492. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1978.Tb12190.X>
- Hrmova, M., Varghese, J. N., De Gori, R., Smith, B. J., Driguez, H., & Fincher, G. B. (2001). Catalytic Mechanisms And Reaction Intermediates Along The Hydrolytic Pathway Of A Plant Beta-D-Glucan Glucohydrolase. *Structure (London, England: 1993)*, *9*(11), 1005–1016.
- Hydrocyanic Acid, Liquefied | Cameo Chemicals | Noaa. (N.D.). Retrieved February 5, 2019, From <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/3599>

- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., ... Katzir, N. (2006). Functional Characterization Of Cmccd1, A Carotenoid Cleavage Dioxygenase From Melon. *Phytochemistry*, *67*(15), 1579–1589. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.009>
- Imahori, Y., Matushita, K., Kota, M., Ueda, Y., Ishimaru, M., & Chachin, K. (2003). Regulation Of Fermentative Metabolism In Tomato Fruit Under Low Oxygen Stress. *The Journal Of Horticultural Science And Biotechnology*, *78*(3), 386–393. <https://doi.org/10.1080/14620316.2003.11511636>
- Imrak, B., Kuden, A., Yurtkulu, V., Kafkas, S., Zarifikhosroshahi, M., Ercisli, S., & Kafkas, E. (2016). Volatile Compounds Of New Promising Dried Apricot ( *Prunus Armeniaca* L.) Genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *44*(2), 568–572. <https://doi.org/10.15835/Nbha44210451>
- Javeri, H., Toledo, R., & Wicker, L. (1991). Vacuum Infusion Of Citrus Pectinmethylesterase And Calcium Effects On Firmness Of Peaches. *Journal Of Food Science*, *56*(3), 739–742. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05371.x>
- Jenkins, J., Lo Leggio, L., Harris, G., & Pickersgill, R. (1995). Beta-Glucosidase, Beta-Galactosidase, Family A Cellulases, Family F Xylanases And Two Barley Glycanases Form A Superfamily Of Enzymes With 8-Fold Beta/Alpha Architecture And With Two Conserved Glutamates Near The Carboxy-Terminal Ends Of Beta-Strands Four And Seven. *FEBS Letters*, *362*(3), 281–285.
- Jermine, M., Conedera, M., Sieber, T. N., Sassella, A., Schärer, H., Jelmini, G., & Höhn, E. (2006). Influence Of Fruit Treatments On Perishability During Cold Storage Of Sweet Chestnuts. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, *86*(6), 877–885. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2428>
- Jimenez-Aleman, G. H., Scholz, S. S., Heyer, M., Reichelt, M., Mithöfer, A., & Boland, W. (2015). Synthesis, Metabolism And Systemic Transport Of A Fluorinated Mimic Of The Endogenous Jasmonate Precursor OPC-8:0. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular And Cell Biology Of Lipids*, *1851*(12), 1545–1553. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.09.002>
- Kaper, T., Brouns, S. J. J., Geerling, A. C. M., Vos, W. M. D., & Oost, J. V. Der. (2002). DNA Family Shuffling Of Hyperthermostable B-Glycosidases. *Biochemical Journal*, *368*(2), 461–470. <https://doi.org/10.1042/bj20020726>
- Kapfer, G.-F., Berger, R. G., & Drawert, F. (1989). Production Of 4-Decanolide By Semicontinuous Fermentation Of *Tyromyces Sambucus*. *Biotechnology Letters*, *11*(8), 561–566. <https://doi.org/10.1007/BF01040036>
- Karabulut, I., Gokbulut, I., Bilenler, T., Sislioglu, K., Ozdemir, I. S., Bahar, B., ... Seyhan, F. (2018). Effect Of Fruit Maturity Level On Quality, Sensory Properties And Volatile Composition Of Two Common Apricot (*Prunus Armeniaca* L.) Varieties. *Journal Of Food Science And Technology*, *55*(7), 2671–2678. <https://doi.org/10.1007/S13197-018-3189-8>
- Kårlund, A., Moor, U., Mcdougall, G., Lehtonen, M., Karjalainen, R. O., & Hanhineva, K. (2016). Metabolic Profiling Discriminates Between Strawberry ( *Fragaria* × *Ananassa* Duch.) Cultivars Grown In Finland Or Estonia. *Food Research International*, *89*, 647–653. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.013>
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications Of Pectinases In The Commercial Sector: A Review. *Bioresource Technology*, *77*(3), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)

- Kengen, S. W., Luesink, E. J., Stams, A. J., & Zehnder, A. J. (1993). Purification And Characterization Of An Extremely Thermostable Beta-Glucosidase From The Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus*. *European Journal Of Biochemistry*, *213*(1), 305–312.
- Keppler, K., & Humpf, H.-U. (2005). Metabolism Of Anthocyanins And Their Phenolic Degradation Products By The Intestinal Microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *13*(17), 5195–5205. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.003>
- Ketudat Cairns, J. R., & Esen, A. (2010). B-Glucosidases. *Cellular And Molecular Life Sciences*, *67*(20), 3389–3405. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>
- Kis, P., Potocká, E., Mastihuba, V., & Mastihubová, M. (2016). Efficient Chemoenzymatic Synthesis Of 4-Nitrophenyl B-D-Apiofuranoside And Its Use In Screening Of B-D-Apiofuranosidases. *Carbohydrate Research*, *430*, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.04.030>
- Kobata, A. (2013). Exo- And Endoglycosidases Revisited. *Proceedings Of The Japan Academy, Series B*, *89*(3), 97–117. <https://doi.org/10.2183/pjab.89.97>
- Köllner, T. G., Lenk, C., Schnee, C., Köpke, S., Lindemann, P., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2013). Localization Of Sesquiterpene Formation And Emission In Maize Leaves After Herbivore Damage. *BMC Plant Biology*, *13*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-15>
- Kotseridis, Y., Razungles, A., Bertrand, A., & Baumes, R. (2000). Differentiation Of The Aromas Of Merlot And Cabernet Sauvignon Wines Using Sensory And Instrumental Analysis. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *48*(11), 5383–5388. <https://doi.org/10.1021/jf000401y>
- Krammer, G., Winterhalter, P., Schwab, M., & Schreier, P. (1991). Glycosidically Bound Aroma Compounds In The Fruits Of Prunus Species: Apricot (*P. Armeniaca*, L.), Peach (*P. Persica*, L.), Yellow Plum (*P. Domestica*, L. Ssp. *Syriaca*). *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *39*(4), 778–781. <https://doi.org/10.1021/jf00004a032>
- Kunert, J., & Meyners, M. (1999). On The Triangle Test With Replications. *Food Quality And Preference*, *10*(6), 477–482. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(99\)00047-6](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(99)00047-6)
- Kuro-O, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., ... Nabeshima, Y. I. (1997). Mutation Of The Mouse *Klotho* Gene Leads To A Syndrome Resembling Ageing. *Nature*, *390*(6655), 45–51. <https://doi.org/10.1038/36285>
- Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., & Bouvier, J.-M. (1999). Changes In Aromatic Volatile Composition Of Strawberry After High Pressure Treatment. *Food Chemistry*, *67*(1), 7–16. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00084-9)
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast And Its Importance To Wine Aroma - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, *21*, 34.
- Lamikanra, O. (Ed.). (2002). *Fresh-Cut Fruits And Vegetables: Science, Technology, And Market*. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Larsen, M., Poll, L., & Olsen, C. E. (1992). Evaluation Of The Aroma Composition Of Some Strawberry (*Fragaria Ananassa* Duch) Cultivars By Use Of Odour Threshold Values. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, *195*(6), 536–539. <https://doi.org/10.1007/BF01204558>
- Le Traon-Masson, M.-P., & Pellerin, P. (1998). Purification And Characterization Of Two B-D-Glucosidases From An *Aspergillus Niger* Enzyme Preparation: Affinity And Specificity Toward Glucosylated

- Compounds Characteristic Of The Processing Of Fruits. *Enzyme And Microbial Technology*, 22(5), 374–382. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00206-8)
- Lebbink, J. H. G., Kaper, T., Bron, P., Van Der Oost, J., & De Vos, W. M. (2000). Improving Low-Temperature Catalysis In The Hyperthermostable *Pyrococcus Furiosus* B-Glucosidase Celb By Directed Evolution. *Biochemistry*, 39(13), 3656–3665. <https://doi.org/10.1021/Bi991483q>
- Lecas, M., Günata, Z. Y., Sapis, J.-C., & Bayonove, C. L. (1991). Purification And Partial Characterization Of B-Glucosidase From Grape. *Phytochemistry*, 30(2), 451–454. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83702-M](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83702-M)
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H.-Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., ... Hwang, I. (2006). Activation Of Glucosidase Via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools Of Abscisic Acid. *Cell*, 126(6), 1109–1120. <https://doi.org/10.1016/J.Cell.2006.07.034>
- Leizeron, S., & Shimoni, E. (2005). Stability And Sensory Shelf Life Of Orange Juice Pasteurized By Continuous Ohmic Heating. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53(10), 4012–4018. <https://doi.org/10.1021/Jf047857q>
- Liang, H., Yuan, Q., & Xiao, Q. (2006). Effects Of Metal Ions On Myrosinase Activity And The Formation Of Sulforaphane In Broccoli Seed. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1–4), 19–22. <https://doi.org/10.1016/J.Molcatb.2006.03.008>
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., ... Schulze-Lefert, P. (2005). Pre- And Postinvasion Defenses Both Contribute To Nonhost Resistance In Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), 1180–1183. <https://doi.org/10.1126/Science.1119409>
- López-Aranda, J. M., Soria, C., Santos, B. M., Miranda, L., Domínguez, P., & Medina-Mínguez, J. J. (2011). Strawberry Production In Mild Climates Of The World: A Review Of Current Cultivar Use. *International Journal Of Fruit Science*, 11(3), 232–244. <https://doi.org/10.1080/15538362.2011.608294>
- Ludikhuyze, L., Indrawati, Van Den Broeck, I., Weemaes, C., & Hendrickx, M. (1998). Effect Of Combined Pressure And Temperature On Soybean Lipoxygenase. 1. Influence Of Extrinsic And Intrinsic Factors On Isobaric-Isothermal Inactivation Kinetics. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 46(10), 4074–4080. <https://doi.org/10.1021/Jf980256c>
- Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Indrawati, Smout, C., & Hendrickx, M. (2003). Effects Of Combined Pressure And Temperature On Enzymes Related To Quality Of Fruits And Vegetables: From Kinetic Information To Process Engineering Aspects. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 43(5), 527–586. <https://doi.org/10.1080/10408690390246350>
- Lunkenbein, S., Bellido, M., Aharoni, A., Salentijn, E. M. J., Kaldenhoff, R., Coiner, H. A., ... Schwab, W. (2006). Cinnamate Metabolism In Ripening Fruit. Characterization Of A UDP-Glucose: Cinnamate Glucosyltransferase From Strawberry. *PLANT PHYSIOLOGY*, 140(3), 1047–1058. <https://doi.org/10.1104/Pp.105.074955>
- Lymar, E. S., Li, B., & Renganathan, V. (1995). Purification And Characterization Of A Cellulose-Binding (Beta)-Glucosidase From Cellulose-Degrading Cultures Of Phanerochaete Chrysosporium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(8), 2976–2980.
- Ma, J., Li, J., Zhao, J., Zhou, H., Ren, F., Wang, L., ... Han, Y. (2014). Inactivation Of A Gene Encoding Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD4) Leads To Carotenoid-Based Yellow Coloration Of Fruit Flesh And Leaf

- Midvein In Peach. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(1), 246–257. <https://doi.org/10.1007/S11105-013-0650-8>
- Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D. R., Schieber, A., & Carle, R. (2008). Optimization Of A Process For Enzyme-Assisted Pigment Extraction From Grape (*Vitis Vinifera* L.) Pomace. *European Food Research And Technology*, 227(1), 267–275. <https://doi.org/10.1007/S00217-007-0720-Y>
- Maldonado, M. C., Belfiore, C., & Navarro, A. R. (2008). Temperature, Soluble Solids And Ph Effect On Alicyclobacillus Acidoterrestris Viability In Lemon Juice Concentrate. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(2), 141–144. <https://doi.org/10.1007/S10295-007-0276-7>
- Mallidis, C. G., & Katsaboxakis, C. (2002). Effect Of Thermal Processing On The Texture Of Canned Apricots. *International Journal Of Food Science & Technology*, 37(5), 569–572. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2621.2002.00587.X>
- Marlatt, C., Ho, C. T., & Chien, M. (1992). Studies Of Aroma Constituents Bound As Glycosides In Tomato. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 40(2), 249–252. <https://doi.org/10.1021/Jf00014a016>
- Marszałek, K., Mitek, M., & Skąpska, S. (2015). Effect Of Continuous Flow Microwave And Conventional Heating On The Bioactive Compounds, Colour, Enzymes Activity, Microbial And Sensory Quality Of Strawberry Purée. *Food And Bioprocess Technology*, 8(9), 1864–1876. <https://doi.org/10.1007/S11947-015-1543-7>
- Mateo, J. J., & Di Stefano, R. (1997). Description Of Theβ-Glucosidase Activity Of Wine Yeasts. *Food Microbiology*, 14(6), 583–591. <https://doi.org/10.1006/Fmic.1997.0122>
- Matern, H., Boermans, H., Lottspeich, F., & Matern, S. (2001). Molecular Cloning And Expression Of Human Bile Acid Beta-Glucosidase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276(41), 37929–37933. <https://doi.org/10.1074/Jbc.M104290200>
- Matsui, K. (2006). Green Leaf Volatiles: Hydroperoxide Lyase Pathway Of Oxylinin Metabolism. *Current Opinion In Plant Biology*, 9(3), 274–280. <https://doi.org/10.1016/J.Pbi.2006.03.002>
- Mattiacci, L., Dicke, M., & Posthumus, M. A. (1995). Beta-Glucosidase: An Elicitor Of Herbivore-Induced Plant Odor That Attracts Host-Searching Parasitic Wasps. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 92(6), 2036–2040.
- Mayer, C., Jakeman, D. L., Mah, M., Karjala, G., Gal, L., Warren, R. A. J., & Withers, S. G. (2001). Directed Evolution Of New Glycosynthases From Agrobacterium B-Glucosidase: A General Screen To Detect Enzymes For Oligosaccharide Synthesis. *Chemistry & Biology*, 8(5), 437–443. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00022-9)
- Mccarter, J. D., & Withers, S. G. (1994). Mechanisms Of Enzymatic Glycoside Hydrolysis. *Current Opinion In Structural Biology*, 4(6), 885–892.
- Ménager, I., Jost, M., & Aubert, C. (2004). Changes In Physicochemical Characteristics And Volatile Constituents Of Strawberry (Cv. Cigaline) During Maturation. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 52(5), 1248–1254. <https://doi.org/10.1021/Jf0350919>
- Miekisch, W., Schubert, J. K., & Noeldge-Schomburg, G. F. . (2004). Diagnostic Potential Of Breath Analysis—Focus On Volatile Organic Compounds. *Clinica Chimica Acta*, 347(1–2), 25–39. <https://doi.org/10.1016/J.Cccn.2004.04.023>

- Mishra, B. B., Gautam, S., & Sharma, A. (2012). Browning Of Fresh-Cut Eggplant: Impact Of Cutting And Storage. *Postharvest Biology And Technology*, *67*, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.12.009>
- Miszczak, A., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1995). Development Of Aroma Volatiles And Color During Postharvest Ripening Of "Kent" Strawberries. *Journal Of The American Society For Horticultural Science*, *120*(4), 650–655.
- Morant, A. V., Bjarnholt, N., Kragh, M. E., Kjaergaard, C. H., Jørgensen, K., Paquette, S. M., ... Bak, S. (2008). The -Glucosidases Responsible For Bioactivation Of Hydroxynitrile Glucosides In Lotus Japonicus. *PLANT PHYSIOLOGY*, *147*(3), 1072–1091. <https://doi.org/10.1104/pp.107.109512>
- Morant, Anne Vinther, Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B. L., & Bak, S. (2008). Beta-Glucosidases As Detonators Of Plant Chemical Defense. *Phytochemistry*, *69*(9), 1795–1813. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.006>
- Moreno, J., Chiralt, A., Escriche, I., & Serra, J. A. (2000). Effect Of Blanching/Osmotic Dehydration Combined Methods On Quality And Stability Of Minimally Processed Strawberries. *Food Research International*, *33*(7), 609–616.
- Muñoz, C., Sánchez-Sevilla, J. F., Botella, M. A., Hoffmann, T., Schwab, W., & Valpuesta, V. (2011). Polyphenol Composition In The Ripe Fruits Of Fragaria Species And Transcriptional Analyses Of Key Genes In The Pathway. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *59*(23), 12598–12604. <https://doi.org/10.1021/jf203965j>
- Nabeshima, Y., & Imura, H. (2008). Alpha-Klotho: A Regulator That Integrates Calcium Homeostasis. *American Journal Of Nephrology*, *28*(3), 455–464. <https://doi.org/10.1159/000112824>
- Nielsen, T., & Leufven, A. (2008). The Effect Of Modified Atmosphere Packaging On The Quality Of Honeoye And Korona Strawberries. *Food Chemistry*, *107*(3), 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.025>
- Niemeyer, H. M. (1988). Hydroxamic Acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-Ones), Defence Chemicals In The Gramineae. *Phytochemistry*, *27*(11), 3349–3358. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80731-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80731-3)
- Nuzzi, M., Lo Scalzo, R., Testoni, A., & Rizzolo, A. (2008). Evaluation Of Fruit Aroma Quality: Comparison Between Gas Chromatography–Olfactometry (GC–O) And Odour Activity Value (OAV) Aroma Patterns Of Strawberries. *Food Analytical Methods*, *1*(4), 270–282. <https://doi.org/10.1007/S12161-008-9039-Y>
- Oddou, J., Stentelaire, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., & Colonna Ceccaldi, B. (1999). Improvement Of Ferulic Acid Bioconversion Into Vanillin By Use Of High-Density Cultures Of Pycnoporus Cinnabarinus. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *53*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/S002530051605>
- Pabst, A., Barron, D., Etievant, P., & Schreier, P. (1991). Studies On The Enzymic Hydrolysis Of Bound Aroma Constituents From Raspberry Fruit Pulp. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *39*(1), 173–175. <https://doi.org/10.1021/jf00001a034>
- Pacheco-Palencia, L. A., Duncan, C. E., & Talcott, S. T. (2009). Phytochemical Composition And Thermal Stability Of Two Commercial Açai Species, Euterpe Oleracea And Euterpe Precatoria. *Food Chemistry*, *115*(4), 1199–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.034>

- Palomo, E., Hidalgo, M., Gonzalezvinas, M., & Perezcoello, M. (2005). Aroma Enhancement In Wines From Different Grape Varieties Using Exogenous Glycosidases. *Food Chemistry*, *92*(4), 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.025>
- Pederson, C. S., & Tressler, D. K. (1938). Flash Pasteurization Of Apple Juice. *Industrial & Engineering Chemistry*, *30*(8), 954–959.
- Pelayo-Zaldívar, C., Ebeler, S. E., & Kader, A. A. (2005). Cultivar And Harvest Date Effects On Flavor And Other Quality Attributes Of California Strawberries. *Journal Of Food Quality*, *28*(1), 78–97. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00005.x>
- Pérez, A. G., Cert, A., Ríos, J. J., & Olías, J. M. (1997). Free And Glycosidically Bound Volatile Compounds From Two Banana Cultivars: Valery And Pequeña Enana. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *45*(11), 4393–4397. <https://doi.org/10.1021/jf9704524>
- Pérez, A. G., Olías, R., Luaces, P., & Sanz, C. (2002). Biosynthesis Of Strawberry Aroma Compounds Through Amino Acid Metabolism. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *50*(14), 4037–4042. <https://doi.org/10.1021/jf011465r>
- Perez, A. G., Rios, J. J., Sanz, C., & Olias, J. M. (1992). Aroma Components And Free Amino Acids In Strawberry Variety Chandler During Ripening. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *40*(11), 2232–2235. <https://doi.org/10.1021/jf00023a036>
- Perez, A. G., Sanz, C., & Olias, J. M. (1993). Partial Purification And Some Properties Of Alcohol Acyltransferase From Strawberry Fruits. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *41*(9), 1462–1466. <https://doi.org/10.1021/jf00033a021>
- Pérez, A. G., Sanz, C., Olías, R., & Olías, J. M. (1999). Lipoxygenase And Hydroperoxide Lyase Activities In Ripening Strawberry Fruits. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *47*(1), 249–253. <https://doi.org/10.1021/jf9807519>
- Pino, J. A., Panadés, G., Fito, P., Chiralt, A., & Ortega, A. (2008). Influence Of Osmotic Dehydration On The Volatile Profile Of Guava Fruits. *Journal Of Food Quality*, *31*(3), 281–294. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00200.x>
- Pogorzelski, E., & Wilkowska, A. (2007). Flavour Enhancement Through The Enzymatic Hydrolysis Of Glycosidic Aroma Precursors In Juices And Wine Beverages: A Review. *Flavour And Fragrance Journal*, *22*(4), 251–254. <https://doi.org/10.1002/ffj.1784>
- Pollard, A., & Kieser, M. E. (1959). Pectin Changes In Cider Fermentations. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, *10*(5), 253–260. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100501>
- Ponappa, T., Scheerens, J. C., & Miller, A. R. (1993). Vacuum Infiltration Of Polyamines Increases Firmness Of Strawberry Slices Under Various Storage Conditions. *Journal Of Food Science*, *58*(2), 361–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04275.x>
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., ... Campbell, C. S. (2007). Phylogeny And Classification Of Rosaceae. *Plant Systematics And Evolution*, *266*(1), 5–43. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0539-9>
- Poulton, J. E. (1990). Cyanogenesis In Plants. *Plant Physiology*, *94*(2), 401–405.
- Pukszta, T., & Palich, P. (2007). The Effect Of Freezing Conditions Of Strawberry Storage On The Level Of Thawing Drip Loss, 6.

- Qi, M., Jun, H.-S., & Forsberg, C. W. (2008). Cel9D, An Atypical 1,4-Beta-D-Glucan Glucohydrolase From *Fibrobacter Succinogenes*: Characteristics, Catalytic Residues, And Synergistic Interactions With Other Cellulases. *Journal Of Bacteriology*, *190*(6), 1976–1984. <https://doi.org/10.1128/JB.01667-07>
- Raab, T. (2006). Faqr, Required For The Biosynthesis Of The Strawberry Flavor Compound 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone, Encodes An Enone Oxidoreductase. *The Plant Cell Online*, *18*(4), 1023–1037. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039784>
- Radziejewska-Kubzdela, E., Biegańska-Marecik, R., & Kidoń, M. (2014). Applicability Of Vacuum Impregnation To Modify Physico-Chemical, Sensory And Nutritive Characteristics Of Plant Origin Products—A Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, *15*(9), 16577–16610. <https://doi.org/10.3390/ijms150916577>
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., & Brunton, N. (2011). Effect Of Thermal And Non Thermal Processing Technologies On The Bioactive Content Of Exotic Fruits And Their Products: Review Of Recent Advances. *Food Research International*, *44*(7), 1875–1887. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.053>
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2013). Concentrations Of Aroma Compounds And Odor Activity Values Of Odorant Series In Different Olive Cultivars And Their Oils. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *61*(22), 5252–5259. <https://doi.org/10.1021/jf400804m>
- Repčák, M., & Krausová, T. (2009). Phenolic Glucosides In The Course Of Ligulate Flower Development In Diploid And Tetraploid *Matricaria Chamomilla*. *Food Chemistry*, *116*(1), 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.085>
- Reuveni, M., Sagi, Z., Eynor, D., & Hetzroni, A. (1999). B-Glucosidase Activity Is Involved In Scent Production In *Narcissus* Flowers. *Plant Science*, *147*(1), 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00097-7)
- Riou, C., Salmon, J. M., Vallier, M. J., Günata, Z., & Barre, P. (1998). Purification, Characterization, And Substrate Specificity Of A Novel Highly Glucose-Tolerant Beta-Glucosidase From *Aspergillus Oryzae*. *Applied And Environmental Microbiology*, *64*(10), 3607–3614.
- Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2005). Assessment Of The Volatile Composition Of Juices Of Apricot, Peach, And Pear According To Two Pectolytic Treatments. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *53*(20), 7837–7843. <https://doi.org/10.1021/jf051397z>
- Rodrigo, D., Jolie, R., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2006). Combined Thermal And High Pressure Inactivation Kinetics Of Tomato Lipoxigenase. *European Food Research And Technology*, *222*(5–6), 636–642. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0128-5>
- Roscher, R., Koch, H., Herderich, M., Schreier, P., & Schwab, W. (1997). Identification Of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3[2H]-Furanone B-D-Glucuronide As The Major Metabolite Of A Strawberry Flavour Constituent In Humans. *Food And Chemical Toxicology*, *35*(8), 777–782. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00055-0)
- Roscher, René, Herderich, M., Steffen, J.-P., Schreier, P., & Schwab, W. (1996). 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3[2H]-Furanone 6'-O-Malonyl-B-D-Glucopyranoside In Strawberry Fruits. *Phytochemistry*, *43*(1), 155–159. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00216-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00216-6)

- Rousseau-Gueutin, M., Lerceteau-Kohler, E., Barrot, L., Sargent, D. J., Monfort, A., Simpson, D., ... Denoyes-Rothan, B. (2008). Comparative Genetic Mapping Between Octoploid And Diploid *Fragaria* Species Reveals A High Level Of Colinearity Between Their Genomes And The Essentially Disomic Behavior Of The Cultivated Octoploid Strawberry. *Genetics*, *179*(4), 2045–2060. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.083840>
- Sabatini, N., Perri, E., & Marsilio, V. (2009). An Investigation On Molecular Partition Of Aroma Compounds In Fruit Matrix And Brine Medium Of Fermented Table Olives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *10*(4), 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.001>
- Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1996). Production, Purification, And Characterization Of A Highly Glucose-Tolerant Novel Beta-Glucosidase From *Candida Peltata*. *Applied And Environmental Microbiology*, *62*(9), 3165–3170.
- Salles, C., Jallageas, J. C., Fournier, F., Tabet, J. C., & Crouzet, J. C. (1991). Apricot Glycosidically Bound Volatile Components. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *39*(11), 1979–1983. <https://doi.org/10.1021/jf00011a019>
- Sánchez-Sevilla, J. F., Cruz-Rus, E., Valpuesta, V., Botella, M. A., & Amaya, I. (2014). Deciphering Gamma-Decalactone Biosynthesis In Strawberry Fruit Using A Combination Of Genetic Mapping, RNA-Seq And EqtL Analyses. *BMC Genomics*, *15*(1), 1.
- Sarry, J., & Günata, Z. (2004). Plant And Microbial Glycoside Hydrolases: Volatile Release From Glycosidic Aroma Precursors. *Food Chemistry*, *87*(4), 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.003>
- Schaller, F., Schaller, A., & Stintzi, A. (2004). Biosynthesis And Metabolism Of Jasmonates. *Journal Of Plant Growth Regulation*, *23*(3), 179–199. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0047-x>
- Schliemann, W. (1984). Hydrolysis Of Conjugated Gibberellins By B-Glucosidases From Dwarf Rice (*Oryza Sativa* L. Cv. «Tan-Ginbozu»). *Journal Of Plant Physiology*, *116*(2), 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(84\)80069-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(84)80069-3)
- Schwab, W. (1998). Application Of Stable Isotope Ratio Analysis Explaining The Bioformation Of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2 H)-Furanone In Plants By A Biological Maillard Reaction. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *46*(6), 2266–2269. <https://doi.org/10.1021/jf9710037>
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis Of Plant-Derived Flavor Compounds. *The Plant Journal*, *54*(4), 712–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2008.03446.x>
- Schwieterman, M. L., Colquhoun, T. A., Jaworski, E. A., Bartoshuk, L. M., Gilbert, J. L., Tieman, D. M., ... Clark, D. G. (2014). Strawberry Flavor: Diverse Chemical Compositions, A Seasonal Influence, And Effects On Sensory Perception. *Plos ONE*, *9*(2), E88446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088446>
- Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V. M., Nitz, I., ... Oelmüller, R. (2008). PYK10, A Beta-Glucosidase Located In The Endoplasmatic Reticulum, Is Crucial For The Beneficial Interaction Between *Arabidopsis Thaliana* And The Endophytic Fungus *Piriformospora Indica*. *The Plant Journal: For Cell And Molecular Biology*, *54*(3), 428–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2008.03424.x>
- Shim, J.-H., Chen, H.-M., Rich, J. R., Goddard-Borger, E. D., & Withers, S. G. (2012). Directed Evolution Of A B-Glucosidase From *Agrobacterium* Sp. To Enhance Its Glycosynthase Activity Toward C3-Modified Donor Sugars. *Protein Engineering, Design And Selection*, *25*(9), 465–472. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs045>

- Sian, N. K., & Ishak, S. (1991). Carotenoid And Anthocyanin Contents Of Papaya And Pineapple: Influence Of Blanching And Predrying Treatments. *Food Chemistry*, *39*(2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(91\)90158-K](https://doi.org/10.1016/0308-8146(91)90158-K)
- Sinnott, M. L. (1990). Catalytic Mechanism Of Enzymic Glycosyl Transfer. *Chemical Reviews*, *90*(7), 1171–1202. <https://doi.org/10.1021/Cr00105a006>
- Sirijariyawat, A., Charoenrein, S., & Barrett, D. M. (2012). Texture Improvement Of Fresh And Frozen Mangoes With Pectin Methyltransferase And Calcium Infusion. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, *92*(13), 2581–2586. <https://doi.org/10.1002/Jsfa.5791>
- Smith, M. H., & Gold, M. H. (1979). Phanerochaete Chrysosporium B-Glucosidases: Induction, Cellular Localization, And Physical Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, *37*(5), 938–942.
- SNIAA. (2018, November 16). Le SNIAA - Les Tendances De 2018 Illustrées Au SIAL Et Au Flavorcon. Retrieved December 29, 2018, From <http://www.sniaa.org/article/les-tendances-de-2018-illustrées-au-sial-et-au-flavorcon>
- Solís-Solís, H. M., Calderón-Santoyo, M., Schorr-Galindo, S., Luna-Solano, G., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2007). Characterization Of Aroma Potential Of Apricot Varieties Using Different Extraction Techniques. *Food Chemistry*, *105*(2), 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.061>
- Solvent Properties. (2003). In *Burdick & Jackson Solvent Guide* (Honeywell International, Pp. 156–157). Japan.
- Song, Jun. (2010). Major Enzymes Of Flavor Volatiles Production And Regulation In Fresh Fruit And Vegetable. In *Enzymes In Fruit And Vegetable Processing: Chemistry And Engineering Applications* (Pp. 45–71). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Speirs, J., Lee, E., Holt, K., Yong-Duk, K., Steele Scott, N., Loveys, B., & Schuch, W. (1998). Genetic Manipulation Of Alcohol Dehydrogenase Levels In Ripening Tomato Fruit Affects The Balance Of Some Flavor Aldehydes And Alcohols. *Plant Physiology*, *117*(3), 1047–1058. <https://doi.org/10.1104/Pp.117.3.1047>
- Stahl-Biskup, E., Intert, F., Holthuijzen, J., Stengele, M., & Schulz, G. (1993). Glycosidically Bound Volatiles—A Review 1986–1991. *Flavour And Fragrance Journal*, *8*(2), 61–80. <https://doi.org/10.1002/Ffj.2730080202>
- Sturm, K., Koron, D., & Stampar, F. (2003). The Composition Of Fruit Of Different Strawberry Varieties Depending On Maturity Stage. *Food Chemistry*, *83*(3), 417–422. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00124-9)
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The Production Of Ethylphenols In Wine By Yeasts Of The Genera *Brettanomyces* And *Dekkera*: A Review. *Food Chemistry*, *102*(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>
- Sugimoto, N., Forsline, P., & Beaudry, R. (2015). Volatile Profiles Of Members Of The USDA Geneva *Malus* Core Collection: Utility In Evaluation Of A Hypothesized Biosynthetic Pathway For Esters Derived From 2-Methylbutanoate And 2-Methylbutan-1-ol. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *63*(7), 2106–2116. <https://doi.org/10.1021/Jf505523m>
- Suzuki, H., Nishino, T., & Nakayama, T. (2007). Anthocyanin Acyltransferase Engineered For The Synthesis Of A Novel Polyacylated Anthocyanin. *Plant Biotechnology*, *24*(5), 495–501. <https://doi.org/10.5511/Plantbiotechnology.24.495>

- Suzuki, K., Sumitani, J., Nam, Y. W., Nishimaki, T., Tani, S., Wakagi, T., ... Fushinobu, S. (2013). Crystal Structures Of Glycoside Hydrolase Family 3 Beta-Glucosidase 1 From *Aspergillus Aculeatus*. *Biochem.J.*, *452*, 211–221. <https://doi.org/10.2210/Pdb4iib/Pdb>
- Takeoka, G. R., Flath, R. A., Mon, T. R., Teranishi, R., & Guentert, M. (1990). Volatile Constituents Of Apricot (*Prunus Armeniaca*). *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *38*(2), 471–477. <https://doi.org/10.1021/Jf00092a031>
- Temiz, A., & Ayhan, D. K. (2017). Enzymes In Minimally Processed Fruits And Vegetables. In *Minimally Processed Refrigerated Fruits And Vegetables* (Pp. 93–151).
- Terefe, N. S., Buckow, R., & Versteeg, C. (2014). Quality-Related Enzymes In Fruit And Vegetable Products: Effects Of Novel Food Processing Technologies, Part 1: High-Pressure Processing. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, *54*(1), 24–63. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.566946>
- Teze, D., Hendrickx, J., Czjzek, M., Ropartz, D., Sanejouand, Y.-H., Tran, V., ... Dion, M. (2014). Semi-Rational Approach For Converting A GH1 B-Glycosidase Into A B-Transglycosidase. *Protein Engineering, Design And Selection*, *27*(1), 13–19. <https://doi.org/10.1093/Protein/Gzt057>
- The Good Scents Company - Flavor, Fragrance, Food And Cosmetics Ingredients Information. (N.D.). Retrieved January 5, 2019, From <http://www.thegoodscentscompany.com/>
- Thomas, D. W., Smythe, C. V., & Labbee, M. D. (1958). ENZYMATIC HYDROLYSIS OF NARINGIN, THE BITTER PRINCIPLE OF Grapefruita. *Journal Of Food Science*, *23*(6), 591–598. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1958.tb17609.x>
- Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2001). Phenolic Compounds And Related Enzymes As Determinants Of Quality In Fruits And Vegetables: Phenolics And Food Quality. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, *81*(9), 853–876. <https://doi.org/10.1002/Jsfa.885>
- Tribolo, S., Berrin, J.-G., Kroon, P. A., Czjzek, M., & Juge, N. (2007). The Crystal Structure Of Human Cytosolic Beta-Glucosidase Unravels The Substrate Aglycone Specificity Of A Family 1 Glycoside Hydrolase. *Journal Of Molecular Biology*, *370*(5), 964–975. <https://doi.org/10.1016/J.Jmb.2007.05.034>
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E. E., Froehlich, J. E., & Croteau, R. (1999). Limonene Synthase, The Enzyme Responsible For Monoterpene Biosynthesis In Peppermint, Is Localized To Leucoplasts Of Oil Gland Secretory Cells. *Plant Physiology*, *120*(3), 879–886.
- Ubeda, C., Callejón, R. M., Troncoso, A. M., Morales, M. L., & Garcia-Parrilla, M. C. (2014). Influence Of The Production Process Of Strawberry Industrial Purees On Free And Glycosidically Bound Aroma Compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *26*, 381–388. <https://doi.org/10.1016/J.Ifset.2014.02.015>
- Ubeda, Cristina, San-Juan, F., Concejero, B., Callejón, R. M., Troncoso, A. M., Morales, M. L., ... Hernández-Orte, P. (2012). Glycosidically Bound Aroma Compounds And Impact Odorants Of Four Strawberry Varieties. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *60*(24), 6095–6102. <https://doi.org/10.1021/Jf301141f>
- Uçan, F., Akyildiz, A., & Ağçam, E. (2014). Effects Of Different Enzymes And Concentrations In The Production Of Clarified Lemon Juice [Research Article]. <https://doi.org/10.1155/2014/215854>
- Ulrich, D., Hoberg, E., Rapp, A., & Kecke, S. (1997). Analysis Of Strawberry Flavour - Discrimination Of Aroma Types By Quantification Of Volatile Compounds. *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*, *205*(3), 218–223. <https://doi.org/10.1007/S002170050154>

- Valentin, D., Chrea, C., & Nguyen, D. H. (2006). Taste-Odour Interactions In Sweet Taste Perception. *Optimising Sweet Taste In Foods*, 66–84.
- Van Buggenhout, S., Messagie, I., Maes, V., Duvetter, T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2006). Minimizing Texture Loss Of Frozen Strawberries: Effect Of Infusion With Pectinmethylesterase And Calcium Combined With Different Freezing Conditions And Effect Of Subsequent Storage/Thawing Conditions. *European Food Research And Technology*, 223(3), 395–404. <https://doi.org/10.1007/S00217-005-0218-4>
- Velickova, E., Tylewicz, U., Dalla Rosa, M., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., & Gómez Galindo, F. (2013). Effect Of Vacuum Infused Cryoprotectants On The Freezing Tolerance Of Strawberry Tissues. *LWT - Food Science And Technology*, 52(2), 146–150. <https://doi.org/10.1016/J.Lwt.2011.09.013>
- Velickova, E., Tylewicz, U., Dalla Rosa, M., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., & Romani, S. (2018). Effect Of Pulsed Electric Field Coupled With Vacuum Infusion On Quality Parameters Of Frozen/Thawed Strawberries. *Journal Of Food Engineering*, 233, 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.Jfoodeng.2018.03.030>
- Verdoucq, L., Morinière, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B., & Czjze, M. (2004). Structural Determinants Of Substrate Specificity In Family 1 Beta-Glucosidases: Novel Insights From The Crystal Structure Of Sorghum Dhurrinase-1, A Plant Beta-Glucosidase With Strict Specificity, In Complex With Its Natural Substrate. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(30), 31796–31803. <https://doi.org/10.1074/Jbc.M402918200>
- Voirin, S. (1990). *Connaissance De L'arôme Du Raisin : Analyses Et Synthèses De Précurseurs Hétérosidiques* (Thèse En Doctorat De Biochimie. Biologie Moléculaire Et Cellulaire). Montpellier 2, Montpellier. Retrieved From <http://www.theses.fr/1990MON20074>
- Waché, Y., Aguedo, M., Ledall, M.-T., Nicaud, J.-M., & Belin, J.-M. (2002). Optimization Of *Yarrowia Lipolytica*'s B-Oxidation Pathway For  $\Gamma$ -Decalactone Production. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20, 347–351. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00185-6)
- Wang, Q., & Fan, W. (2009). Cloning, Expression Analysis And Sequence Characterization Of A Monoterpene Synthase Gene, Palis, From Apricot (*Prunus Armeniaca*). In *2009 3rd International Conference On Bioinformatics And Biomedical Engineering* (Pp. 1–4). <https://doi.org/10.1109/ICBBE.2009.5162516>
- Warriner, K., & Zivanovic, S. (2005). Microbial Metabolites In Fruits And Vegetables. In D. Ukuku, S. Imam, & O. Lamikanra (Eds.), *Produce Degradation* (Pp. 505–528). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039610.Ch17>
- Wein, M., Lavid, N., Lunkenbein, S., Lewinsohn, E., Schwab, W., & Kaldenhoff, R. (2002). Isolation, Cloning And Expression Of A Multifunctional O-Methyltransferase Capable Of Forming 2,5-Dimethyl-4-Methoxy-3(2H)-Furanone, One Of The Key Aroma Compounds In Strawberry Fruits. *The Plant Journal*, 31(6), 755–765. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01396.X>
- Wen, Y.-Q., He, F., Zhu, B.-Q., Lan, Y.-B., Pan, Q.-H., Li, C.-Y., ... Wang, J. (2014). Free And Glycosidically Bound Aroma Compounds In Cherry (*Prunus Avium* L.). *Food Chemistry*, 152, 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.Foodchem.2013.11.092>
- Will, F., Bauckhage, K., & Dietrich, H. (2000). Apple Pomace Liquefaction With Pectinases And Cellulases: Analytical Data Of The Corresponding Juices. *European Food Research And Technology*, 211(4), 291–297. <https://doi.org/10.1007/S002170000171>

- Winterhalter, P., & Skouroumounis, G. K. (1997). Glycoconjugated Aroma Compounds: Occurrence, Role And Biotechnological Transformation. In R. G. Berger, W. Babel, H. W. Blanch, C. L. Cooney, S.-O. Enfors, K.-E. L. Eriksson, ... C. Wandrey (Eds.), *Biotechnology Of Aroma Compounds* (Vol. 55, Pp. 73–105). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved From [Http://Link.Springer.Com/10.1007/Bfb0102063](http://Link.Springer.Com/10.1007/Bfb0102063)
- Wintoch, H., Krammer, G., & Schreier, P. (1991). Glycosidically Bound Aroma Compounds From Two Strawberry Fruit Species, *Fragaria Vesca* F. *Semperflorens* And *Fragaria X Ananassa*, Cv. Korona. *Flavour And Fragrance Journal*, *6*(3), 209–215. <https://doi.org/10.1002/Ffj.2730060309>
- Withers, S. G., & Aebersold, R. (1995). Approaches To Labeling And Identification Of Active Site Residues In Glycosidases. *Protein Science: A Publication Of The Protein Society*, *4*(3), 361–372. <https://doi.org/10.1002/Pro.5560040302>
- Xie, J., & Zhao, Y. (2004). Use Of Vacuum Impregnation To Develop High Quality And Nutritionally Fortified Frozen Strawberries. *Journal Of Food Processing And Preservation*, *28*(2), 117–132. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4549.2004.Tb00815.X>
- Xu, Z., Escamilla-Treviño, L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D., Winkel, B., ... Esen, A. (2004). Functional Genomic Analysis Of *Arabidopsis Thaliana* Glycoside Hydrolase Family 1. *Plant Molecular Biology*, *55*(3), 343–367. <https://doi.org/10.1007/S11103-004-0790-1>
- Xu, Z.-Y., Lee, K. H., Dong, T., Jeong, J. C., Jin, J. B., Kanno, Y., ... Hwang, I. (2012). A Vacuolar -Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscisic Acid Hydrolyzing Activity Plays An Important Role In Osmotic Stress Responses In *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(5), 2184–2199. <https://doi.org/10.1105/Tpc.112.095935>
- Yabumoto, K., Yamaguchi, M., & Jennings, W. G. (1977). Biosynthesis Of Some Volatiles Constituents Of Muskmelon, *Cucumis Melo*. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, *5*, 53–56.
- Yabumoto, K., Yamaguchi, M., & Jennings, W. G. (1978). Production Of Volatile Compounds By Muskmelon, *Cucumis Melo*. *Food Chemistry*, *3*(1), 7–16. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(78\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(78)90042-0)
- Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Pectin Lyase: A Review. *Process Biochemistry*, *44*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.Procbio.2008.09.012>
- Yan, J., Ban, Z., Lu, H., Li, D., Poverenov, E., Luo, Z., & Li, L. (2018). The Aroma Volatile Repertoire In Strawberry Fruit: A Review. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, *98*(12), 4395–4402. <https://doi.org/10.1002/Jsfa.9039>
- Yan, T. R., & Lin, C. L. (1997). Purification And Characterization Of A Glucose-Tolerant Beta-Glucosidase From *Aspergillus Niger* CCRC 31494. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, *61*(6), 965–970.
- Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J. C., Warren, R. L., Ramirez, D. M. O., ... Russell, D. W. (2006). Mutation Of B-Glucosidase 2 Causes Glycolipid Storage Disease And Impaired Male Fertility. *Journal Of Clinical Investigation*, *116*(11), 2985–2994. <https://doi.org/10.1172/JCI29224>
- Yoon, S.-H., Lee, S.-H., Das, A., Ryu, H.-K., Jang, H.-J., Kim, J.-Y., ... Kim, S.-W. (2009). Combinatorial Expression Of Bacterial Whole Mevalonate Pathway For The Production Of B-Carotene In *E. Coli*. *Journal Of Biotechnology*, *140*(3–4), 218–226. <https://doi.org/10.1016/J.Jbiotec.2009.01.008>
- Young, H., & Paterson, V. J. (1995). Characterisation Of Bound Flavour Components In Kiwifruit. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, *68*(2), 257–260.

- Zhang, B., Yin, X., Li, X., Yang, S., Ferguson, I. B., & Chen, K. (2009). Lipoxygenase Gene Expression In Ripening Kiwifruit In Relation To Ethylene And Aroma Production. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *57*(7), 2875–2881. <https://doi.org/10.1021/jf9000378>
- Zhang, J., Wang, X., Yu, O., Tang, J., Gu, X., Wan, X., & Fang, C. (2011). Metabolic Profiling Of Strawberry (*Fragaria*×*Ananassa* Duch.) During Fruit Development And Maturation. *Journal Of Experimental Botany*, *62*(3), 1103–1118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq343>
- Zobel, H. F. (1984). Gelatinization Of Starch And Mechanical Properties Of Starch Pastes. In *Starch: Chemistry And Technology* (Pp. 285–309). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746270-7.50015-X>
- Zollner, H. (1999). Handbook Of Enzyme Inhibitors (3., Rev. And Enlarged Ed, Pp. 94–95). Weinheim: Wiley-VCH.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Rambla, J.-L., Cabeza, A., Medina, J. J., Sanchez-Sevilla, J. F., Valpuesta, V., ... Amaya, I. (2012). Genetic Analysis Of Strawberry Fruit Aroma And Identification Of O-Methyltransferase Faomt As The Locus Controlling Natural Variation In Mesifurane Content. *Plant Physiology*, *159*(2), 851–870. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188318>

---

## Annexes et compléments

---

Equation des activités de AR2000, E4078, E4079, E4103, E4177 et E4179 en fonction de la triade température/Brix/pH :

AR2000: Activity(nkat/mg of protein) =  $-9.99e-02 \cdot \ln(\text{Brix}) + 3.00e-03 \cdot \text{Temperature} + 0.189$  ( $R^2 = 0.81$ )

P5: Activity (nkat/mg of protein) =  $0.127 \cdot \text{pH} + 6.61e-03 \cdot \text{Temperature} - 0.553$  ( $R^2 = 0.83$ )

P6: Activity (nkat/mg of protein) =  $0.171 \cdot \text{pH} + 4.84e-03 \cdot \text{Temperature} - 0.631$  ( $R^2 = 0.90$ )

P7: Activity (nkat/mg of protein) =  $-6.08e-02 \cdot \ln(\text{Brix}) + 1.61e-02 \cdot \text{pH} + 0.123$  ( $R^2 = 0.60$ )

F1: Activity (nkat/mg of protein) =  $52.1 \cdot \text{pH} + 44.6 \cdot \ln(\text{Brix}) - 16.8 \cdot \text{pH} \cdot \ln(\text{Brix}) - 136$  ( $R^2 = 0,83$ )

F2: Activity (nkat/mg of protein) =  $22.43 \cdot \ln(\text{pH}) + 6.35 \cdot \ln(\text{Brix}) - 7.52 \cdot \ln(\text{pH}) \cdot \ln(\text{Brix}) - 18.0$  ( $R^2 = 0,83$ )

Equation des activités de AR2000, E4078, E4079, E4103, E4177 et E4179 en fonction de la triade concentration en glucose/fructose/saccharose :

AR2000: Activity (nkat/mg of protein) =  $-4.61e-02 \cdot \ln([\text{glucose}]) - 4.24e-04 \cdot [\text{fructose}] + 0.236$  ( $R^2 = 0,93$ )

P5: Activity (nkat/mg of protein) =  $-7.46e-04 \cdot [\text{glucose}] + 7.20e-05 \cdot [\text{fructose}] + 0.191$  ( $R^2 = 0,85$ )

P6: Activity (nkat/mg of protein) =  $-4.67e-04 \cdot [\text{glucose}] + 9.01e-05 \cdot [\text{sucrose}] + 0.0799$  ( $R^2 = 0,83$ )

F1: Activity (nkat/mg of protein) =  $-6.21 \cdot \ln([\text{glucose}]) - 0.0226 \cdot [\text{fructose}] + 30.8$  ( $R^2 = 0,93$ )

F2: Activity (nkat/mg of protein) =  $-1.96 \cdot \ln([\text{glucose}]) - 0.0109 \cdot [\text{fructose}] + 9.53$  ( $R^2 = 0,87$ )



## **Optimiser la libération de la réserve aromatique glycosylée des fruits par voie enzymatique pour un procédé adapté à la transformation de la fraise et de l'abricot**

### **Résumé :**

Une nouvelle méthode a été mise au point pour quantifier et comparer les composés volatils initiaux et la réserve aromatique de la fraise ainsi que de l'abricot. Les fraises utilisées en industrie ont une réserve plus importante que les fraises de bouches.

Après sélection de glucosidases parents pour l'évolution dirigée par L-Shuffling™, 5 mutants ont été présélectionnés et caractérisés pour déterminer ceux qui sont les plus adaptés à une application sur fraise et abricot. Deux enzymes ont été sélectionnées : E4177 pour sa tolérance aux sucres supérieure à celle de la glucosidase commerciale AR2000 et E4179 pour son activité spécifique en milieu fraise supérieure à celle de l'AR2000.

Deux plans d'expérience ont été élaborés pour identifier les interactions entre pH, Brix et température et entre les concentrations en glucose, fructose et saccharose. L'exploitation quantitative de ces plans d'expérience indique si l'enzyme modélisée est adaptée pour l'utilisation avec un autre fruit de pH, Brix et composition en sucres connus, et de la température d'incubation souhaitée.

Les premiers essais sur purée de fraises à l'échelle pilote de laboratoire n'étaient pas satisfaisants. Des études cinétiques ont montré un temps de latence avant le début de l'hydrolyse des glycosides de composés volatils de fraises. Un traitement enzymatique à 10 g/kg au lieu de 1 g/kg permettait d'éliminer ce temps de latence. Un travail sur la concentration des enzymes est donc envisageable pour augmenter l'activité utilisée sans changer la masse de solution enzymatique ajoutée.

*Mots clés :* glucosidase, arôme, GC-MS, *Fragaria x ananassa*, *Prunus armeniaca* L., évolution dirigée, L-Shuffling™, glycoconjugué, procédé industriel, imprégnation sous-vide

## **Optimization of the release of the glycosylated reserve of aroma from fruits by enzymatic treatment for a process adapted to the processing of strawberry and apricot**

### **Abstract:**

A new method has been developed to quantify and compare the initial volatile compounds and the aromatic reserve of strawberry and apricot. Strawberries used in industry have a higher reserve than other strawberries.

After a selection of parent glucosidases for directed evolution by L-Shuffling™, 5 mutants were preselected and characterized to determine which ones are most suitable for application on strawberry and apricot. Two enzymes were selected for use in the process: E4177 for its higher tolerance to sugars than commercial glucosidase AR2000 and E4179 for its higher specific activity in strawberry than that of AR2000.

Two experimental designs were used to quantify the interactions between pH, Brix and temperature and between glucose, fructose and sucrose concentrations. A predictive tool was created indicating if modeled enzyme is adapted for the use on a new fruit by simple measures of its pH, Brix, concentration in sugars and the desired temperature of incubation.

The first pilot-scale strawberry puree trials were not satisfactory. Kinetic studies have shown a latency before the start of release of volatile compounds from strawberry glycosides. An enzyme treatment at 10 g / kg instead of 1 g / kg eliminated this latency. Work on the concentration of enzymes is therefore possible to increase the activity used without changing the mass of enzymatic solution added.

*Keywords:* glucosidase, aroma, GC-MS, *Fragaria x ananassa*, *Prunus armeniaca* L., directed evolution, L-Shuffling™, glycoconjugate, industrial process, vacuum impregnation