

# Production d'huiles riches en acide gamma linoléinique par diverses souches de Phycomycètes

G. AGGELIS (1), M. PINA (2), R. RATOMAHENINA (1), A. ARNAUD (1), J. GRAILLE (2) (\*), P. GALZY (1), P. MARTIN-PRIVAT (3), J. P. PERRAUD (3)

**Résumé.** — Parallèlement à l'important effort agronomique actuel en vue d'intensifier la production d'huiles riches en acide  $\gamma$ -linoléinique, la recherche de nouvelles sources d'acide  $\gamma$ -linoléinique issu de la croissance de microorganismes a été mise au point par le biais de la biotechnologie. La croissance de diverses souches de Phycomycètes a été testée sur différents milieux de cultures. Une première étape de sélection sur des milieux organiques naturels a permis de mettre en évidence l'aptitude des différentes souches à produire une biomasse riche en huile à teneur élevée en acide  $\gamma$ -linoléinique. La seconde phase de l'étude, effectuée sur un milieu minéral vitaminé, plus conforme aux exigences économiques de rentabilité industrielle, a démontré que les souches de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 et *Mucor circinelloides* CBS 172-27 sont les microorganismes les plus performants. La phase de développement et de production plus intensive pourra être abordée sur ces deux souches.

## INTRODUCTION

L'acide  $\gamma$ -linoléinique (18 : 3, n-6) est un acide gras essentiel de la série (n-6), obtenu par désaturation de l'acide linoléique (18 : 2, n-6), grâce à l'action de la  $\Delta 6$  désaturase. Cette désaturation est une étape indispensable chez l'homme [1, 2] et limitante de toute chaîne anabolique quand cette enzyme est absente ou fonctionne mal. Les acides gras essentiels sont impliqués non seulement dans l'élaboration des membranes cellulaires (synthèse de phospholipides et d'esters de cholestérol) mais aussi en tant que précurseurs des prostanoïdes (prostanoïdes, prostacyclines et thromboxanes) [3, 4]. Ces hormones jouent d'importants rôles régulateurs dans le fonctionnement de tous les organes et assurent notamment la régulation de fonctions vasculaires aussi importantes que la pression artérielle et l'agrégation plaquettaire.

Toutes ces données expliquent l'utilisation de plus en plus fréquente des huiles  $\gamma$ -linoléiniques tant en pharmacie que dans l'industrie des cosmétiques. Cette demande accrue suscite actuellement un important développement expérimental agronomique en vue de sélectionner et d'intensifier la culture des plantes dont l'huile est riche en cet acide gras particulier [5, 6].

Parallèlement à l'effort agronomique, l'une des sources possibles de production d'acide  $\gamma$ -linoléinique pourrait être développée par le biais de la biotechnologie en produisant des huiles de microorganismes, enrichies en cet acide, issues de la culture de diverses souches, et notamment de certains Phycomycètes qui en contiennent souvent des quantités notables [7, 8, 9].

L'objectif du présent travail a été dans un premier temps

d'analyser la composition en acides gras des huiles produites par divers champignons et d'y rechercher la présence d'acide  $\gamma$ -linoléinique. A cette fin, plusieurs milieux de cultures ont été élaborés de manière à mettre en évidence une éventuelle action du milieu, pour favoriser soit la production d'huile, soit la richesse de l'huile en 18 : 3 (n-6). Dans un second temps, la recherche s'est poursuivie en plaçant les souches sélectionnées dans des conditions plus conformes aux exigences industrielles et sur un milieu minéral vitaminé économiquement rentable.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — Matériel biologique.

Toutes les souches utilisées qui proviennent du CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures de Baarn) sont énumérées ci-après : *Absidia blakesleeana* CBS 100-28, *Absidia hyalospora* CBS 173-67, *Absidia ramosa* CBS 582-65, *Mortiriella ramanniana* CBS 112-08, *Mucor circinelloides* CBS 172-27, *Mucor circinelloides* CBS 252-53, *Mucor rouxianus* CBS 120-08, *Rhizopus oryzae* CBS 285-55, *Rhizopus stolonifer* CBS 347-49 et *Zygorhynchus moelleri* CBS 380-29.

Les souches sont conservées à 4 °C sur milieu PDA Difco (Potato Dextrose Agar). Compte tenu du fait que les souches de *Absidia blakesleeana*, *Absidia ramosa* et *Mucor rouxianus* n'étaient pas disponibles au début de l'étude, ces microorganismes n'ont pas été utilisés lors de la première étape de production d'huile.

### 2. — Conditions de culture.

#### a) Milieux de cultures organiques :

Pour la production d'acide  $\gamma$ -linoléinique, les milieux suivants ont été utilisés :

(1) Chaire de Génétique et de Microbiologie, ENSA-INRA, 9, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex (France).

(2) Division Chimie des Corps Gras, IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(3) Laboratoire Pharmaceutique Phytodif, Zone Industrielle, Les Baronnes, 34980 Prades-le-Lez (France)

(\*) A qui toute correspondance doit être adressée.

- PDB-Difco : Potato Dextrose Broth à 24 g/l ;
- YPG Co : extrait de levure à 3 g/l, peptone à 5 g/l, glucose à 10 g/l et huile de colza à 5 g/l ;
- YP Co : extrait de levure à 3 g/l, peptone à 5 g/l et huile de colza à 5 g/l.

L'huile de colza est conservée à 4 °C sous azote et sa composition centésimale en acides gras est la suivante :

Acides

gras : 16 : 0 16 : 1 18 : 0 18 : 1 18 : 2 18 : 3 (n-3) 20 : 1 22 : 1  
% : 4,5 0,6 1,5 60,5 21,3 10,3 0,9 0,2

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 30 minutes.

### b) Milieu minéral vitaminé (MMV).

#### 1) Préparation des solutions stocks.

— Solution de vitamines : pantothénate de calcium : 80 mg ; thiamine : 80 mg ; inositol : 80 mg ; pyridoxine : 80 mg ; acide nicotinique : 20 mg ; biotine : 0,8 mg ; eau distillée q.s.p. : 200 ml.

La stérilisation s'effectue par une ultra-filtration en éliminant les premiers ml.

— Solution d'oligoéléments : acide borique : 500 mg ; sulfate de cuivre : 40 mg ; iodure de potassium : 100 mg ; sulfate de manganèse : 400 mg ; molybdate de sodium : 200 mg ; sulfate de zinc : 400 mg ; eau distillée q.s.p. : 1 000 ml.

La stérilisation se fait en 20 min à 120 °C.

— Solution de chlorure ferrique : solution-mère à 2 g/l. La stérilisation se fait en 20 min à 120 °C.

#### 2) Milieu de base.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 8 g ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> : 6 g ; NaCl : 0,1 g ; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O : 0,5 g ; CaCl<sub>2</sub> : 0,1 g ; glucose : 20 g ; eau distillée q.s.p. : 500 ml.

La stérilisation s'effectue en 20 min à 120 °C.

MMV : Milieu de base : 500 ml ; oligoéléments : 1 ml ; vitamines : 5 ml ; chlorure ferrique : 1 ml ; eau distillée q.s.p. : 1 000 ml.

Le chlorure ferrique doit être ajouté en dernier lieu.

### c) Techniques de culture.

Pour cette étude, deux techniques de culture ont été réalisées.

#### — Culture dite « agitée » (CA).

La culture est réalisée dans des erlenmeyers de 5 l, remplis au 1/10<sup>e</sup> de leur volume ; pour assurer une agitation et une aération convenables, ces erlenmeyers sont soumis à un mouvement de va-et-vient d'une amplitude de 7 cm et d'une fréquence de 80 oscillations par minute.

#### — Culture non agitée (CNA).

Une telle culture est réalisée dans des fioles de Roux, flacons spéciaux présentant une importante surface de contact avec l'atmosphère. Ces fioles sont remplies aussi au 1/10<sup>e</sup> de leur volume.

Les deux types de fioles sont placés dans une pièce thermostatée à 28 °C.

#### — Récolte de la biomasse.

A la fin de la culture (en moyenne 4 jours), celle-ci est centrifugée ou filtrée et le mycélium est lavé soit à l'eau, soit à l'hexane pour éliminer les résidus lipidiques dans le

cas des cellules ayant poussé sur milieu contenant du colza. Cette biomasse humide est congelée, puis est lyophilisée avant d'être broyée mécaniquement et mise sous forme pulvérulente. L'extraction des lipides est effectuée sur la poudre ainsi obtenue.

## 3. — Techniques analytiques.

### a) Détermination de la matière sèche.

Après lyophilisation, la détermination de l'humidité résiduelle de la poudre microbienne se fait de la façon suivante : dans un cristalliseur on pèse une aliquote avec précision (200 mg de poudre environ). L'échantillon est séché à l'étuve à 103 °C ± 2 °C jusqu'à poids constant. La perte de poids correspond au départ de l'eau et des matières volatiles.

### b) Etude des lipides.

#### — Extraction de l'huile.

L'extraction de l'huile est réalisée avec un appareil Soxhlet. On effectue une extraction au reflux de l'hexane pendant 5 heures. Le mélange hexane-huile est recueilli, puis le solvant est éliminé par évaporation rotative sous pression réduite d'azote afin d'éviter les phénomènes d'oxydation.

#### — Dosage des acides gras.

Les triglycérides et les acides gras libres sont transformés en esters méthyliques par le méthylate de sodium et le méthanol chlorhydrique selon la norme AFNOR [10]. Les esters méthyliques sont repris par un volume connu d'hexane tel qu'on ait des solutions à 1 %. Un microlitre de solution est injecté dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG).

#### • Conditions de CPG :

Les solutions sont analysées sur un appareil Carlo Erba 4160 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et relié à un intégrateur Delsi Enica 10. La séparation des constituants s'effectue à l'aide d'une colonne capillaire de silice fondue DB Wax 30W (J et W) dont les caractéristiques sont les suivantes : longueur = 30 m ; diamètre interne = 0,3 mm ; épaisseur du film = 0,25 µm.

Les conditions expérimentales sont les suivantes : températures — injecteur-diviseur = 250 °C ; détecteur = 275 °C ; four = 190 °C — gaz vecteur = hélium ; débit = 3 ml/min ; rapport de division = 1/50.

L'identification a été effectuée sur la base des longueurs de chaînes équivalentes avec des esters méthyliques d'acides gras standards.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1. — Etude de la croissance sur les milieux organiques naturels (PDB, YPG Co, YP Co).

Les souches testées sur ces milieux sont : *Zygorhynchus moelleri* CBS 380-29, *Rhizopus stolonifer* CBS 347-49, *Rhizopus oryzae* CBS 285-55, *Absidia hyalospora* CBS 173-67, *Mortierella ramanniana* CBS 112-08, *Mucor circinelloides* 172-27 et *M. circinelloides* 252-53.

L'objectif de cette première étude est de mettre en évidence la possibilité d'obtenir des huiles contenant de l'acide  $\gamma$ -linoléique à partir de ces Phycomycètes. Les

récoltes des souches sur les milieux de cultures exprimées en g de matière sèche par l de culture sont données dans le tableau I. Pour chacune des 7 souches étudiées, les compositions centésimales en acides gras des huiles extraites sont données pour les 6 conditions de culture différentes, à savoir 3 milieux en culture agitée et non agitée (Tabl. II à VIII).

L'examen du tableau I concernant les différentes récoltes permet de faire les commentaires suivants :

Pour les 7 souches, les productions avec le milieu PDB sont du même ordre de grandeur que la culture soit agitée ou non. Par contre, pour le milieu YPG Co et YP Co, les écarts de production entre les cultures agitées et non agitées deviennent importants, notamment en ce qui concerne *Mucor circinelloides* 172-27 et *Mortiriella ramanniana* cultivés sur YPG Co.

*Zygorhynchus moelleri* et *Rhizopus stolonifer* sont les souches qui présentent la croissance la plus faible quel que soit le milieu de culture utilisé. De plus, leur croissance sur YP Co est pratiquement nulle.

Les récoltes les plus importantes sont obtenues avec le milieu YPG Co en culture agitée avec les souches d'*Absidia hyalospora*, *Mortiriella ramanniana* et *Mucor circinelloides* 172-27 (respectivement 7,9 g ; 7,0 g et 10,5 g de matière sèche/l de culture).

Il faut signaler que les cultures non agitées ont des productions de biomasse trop faibles pour permettre, après extraction de la matière grasse, d'établir des bilans pondéraux compte tenu des limites des techniques analytiques ; toutefois les quantités sont suffisantes pour déterminer la composition en acides gras. C'est la raison pour laquelle les résultats du tableau IX sur les bilans de production ne concernent seulement que les récoltes obtenues à partir de cultures agitées sur milieu PDB. Les bilans de productions des cultures agitées sur milieu contenant de l'huile de colza n'ont pas été effectués.

Les compositions centésimales en acides gras des huiles extraites des différentes biomasses récoltées (Tabl. II à VIII) appellent un certain nombre de remarques générales :

Ce qui ressort en premier lieu, c'est la grande variété d'acides gras sur un large domaine de condensation en carbone (10 à 24 C) alors que dans la plupart des huiles végétales ce domaine est plus restreint : toutefois, du fait que pour la majorité des huiles végétales, hormis les huiles lauriques, la somme des constituants à 16 et 18 atomes de carbone représente environ 90 % des acides gras constitutifs, les acides gras mineurs ( $\leq 1$  %) ne seront pas discutés. Ces derniers sont essentiellement les acides gras à chaînes courtes et moyennes ( $\leq 15$  C) et les acides dont la condensation en carbone est  $\geq 20$  C.

Les Phycomycètes étudiés ici présentent quelques caractéristiques essentielles visibles en culture sur le milieu PDB :

- richesse relative en acide  $\gamma$ -linoléique et absence d'acide  $\alpha$ -linoléique ;
- richesse en acides gras saturés : palmitique (20,6 à 31,0 %) et stéarique (6,4 à 18,0 %) ;
- présence d'acides gras à courte chaîne C 10 à C 15 et d'acides gras à longue chaîne C 20 à C 24.

La composition des triglycérides observée après culture sur PDB correspond aux caractéristiques naturelles des champignons de ce groupe.

Après culture en présence d'huile de colza, on observe en général une baisse relative de la teneur en acide  $\gamma$ -linoléique et en acides saturés dans les triglycérides

extraits des mycélium. Par contre, les triglycérides présentent une teneur plus élevée en acide oléique et linoléique ; de plus, il apparaît des quantités non négligeables d'acide  $\alpha$ -linoléique. Il semble qu'une partie des acides gras de l'huile de colza soit directement incorporée dans le mycélium à la place des acides gras habituels de l'espèce.

Cette présence peut être considérée comme un inconvénient très important pour la réalisation de concentrats en acide  $\gamma$ -linoléique. Mais cette même présence pourrait être d'autre part considérée comme un avantage en ce sens qu'en plus du 18 : 3 (n-6), ces huiles pourraient apporter des quantités non négligeables d'acides gras essentiels de la série (n-3). A ce propos, il faut remarquer que le rapport 18 : 2/18 : 3 (n-3), souvent de l'ordre de 5 dans les huiles produites, se trouve pratiquement dans la fourchette recommandée sur le plan nutritionnel par Beare-Rogers [11] et Helme [12].

Toutefois, dans cette étude, priorité a été donnée aux huiles ne contenant que l'isomère (n-6). La présence de l'isomère (n-3) ne doit pourtant pas surprendre si l'on se réfère à l'huile de colza de départ qui contient 10,3 % de cet acide. L'huile de colza avait été choisie comme source de carbone à cause de sa teneur relativement importante (21,3 %) en acide linoléique.

Cet acide aurait dû induire la synthèse de l'acide  $\gamma$ -linoléique par un mécanisme de  $\Delta$  6 désaturation. Mais compte tenu que l'isomère 18 : 3 (n-3) est probablement un inhibiteur de cette enzyme, il n'est pas étonnant que cette induction ne soit pas effectuée convenablement.

Pour pallier cet inconvénient et étudier l'induction de la  $\Delta$  6 désaturase par le 18 : 2, il conviendrait d'effectuer des cultures sur des milieux de croissance à base d'huiles riches en acide linoléique et exemptes de 18 : 3 (n-3), type huile de tournesol, voire trilinoléine.

#### Etude des différentes souches :

Les remarques particulières sur la croissance des microorganismes et les productions de biomasse concernent le tableau I. Les commentaires sur les huiles produites concernent essentiellement les productions obtenues sur cultures agitées sauf indication, car les cultures non agitées ne présentent pas d'intérêt sur le plan industriel et parce que les deux types de culture (CA et CNA) donnent des huiles relativement proches pour un même milieu.

#### — *Zygorhynchus moelleri* CBS 380-29 (Tabl. II).

Cette souche donne des croissances particulièrement faibles et ne pousse d'ailleurs pas sur le milieu YP Co (CNA). Ce fait est d'autant plus regrettable que l'huile extraite sur milieu PDB est celle dont le taux d'acide  $\gamma$ -linoléique est le plus élevé de toutes les souches étudiées (12,3 %) sans présence de l'isomère (n-3) ; par contre la souche cultivée sur le milieu contenant de l'huile de colza produit une huile beaucoup plus pauvre en isomère (n-6) surtout dans le cas du milieu YP Co (0,4 %) et donc la teneur en isomère (n-3) atteint dans le cas d'une croissance sur YPG Co et YP Co respectivement 8,9 et 3,7 %.

#### — *Rhizopus stolonifer* CBS 347-49 (Tabl. III).

Les productions de biomasse obtenues avec ce microorganisme sont particulièrement faibles surtout dans le cas des cultures agitées. C'est la seule souche avec laquelle ce phénomène est observé indépendamment du milieu de culture. Cela est probablement dû à la capacité importante de sporulation de cette souche en culture non agitée.

L'huile extraite après culture sur milieu PDB en culture agitée a un taux d'acide  $\gamma$ -linoléique acceptable (6,9 %) mais il faut remarquer que c'est l'un des rares cas où la



culture non agitée permet d'obtenir une huile plus riche en cet acide (8,1 %).

— *Rhizopus oryzae* CBS 285-55 (Tabl. IV).

Sans être très importantes, les récoltes obtenues à partir de ce champignon sont supérieures à celles des 2 souches précédentes. Mais dans le cas des milieux de culture PDB, les valeurs de l'ordre de 1 g et 1,5 g de matière sèche/l de culture sont encore insuffisantes.

En ce qui concerne les huiles obtenues, il faut noter que l'acide  $\gamma$ -linoléique est pratiquement absent des souches ayant poussé sur des milieux de culture contenant de l'huile de colza (0,9 et 0,6 % respectivement pour YPG Co et YP Co). Avec le PDB, comme milieu de culture, l'huile obtenue présente une teneur en acide  $\gamma$ -linoléique très moyenne (5,4 %) ; toutefois, sur milieu de culture PDB qui ne favorise généralement pas la synthèse d'huiles riches en acide linoléique, *Rhizopus oryzae* est la seule souche avec laquelle l'huile obtenue présente une teneur en cet acide supérieure à 15 %.

— *Absidia hyalospora* CBS 173-67 (Tabl. V).

C'est la souche qui présente globalement les meilleurs rendements de récolte. Peu dépendante de la richesse en éléments biotiques des milieux de culture, la biomasse récoltée est toujours importante en culture agitée. Cette

potentialité pourrait la rendre particulièrement avantageuse dans l'éventualité d'une production industrielle.

Les huiles extraites ne présentent pas de particularités notables.

— *Mortierella ramanniana* CBS 112-08 (Tabl. VI).

Ce microorganisme donne de faibles rendements de croissance quand elle s'effectue sur un milieu autre que de YPG Co. Par contre, avec ce dernier milieu la récolte de biomasse est excellente (7 g de matière sèche/l de culture). Cette particularité semble indiquer que *M. ramanniana* a des exigences nutritionnelles, aspect qui demanderait par ailleurs à être approfondi. Compte tenu de cet aspect, il n'est pas permis d'espérer qu'avec ce microorganisme, on puisse produire des quantités importantes d'huile riche en acide  $\gamma$ -linoléique à l'échelle industrielle. Quant à l'huile obtenue avec le milieu de culture PDB, la teneur en acide  $\gamma$ -linoléique est très acceptable (7 %).

— *Mucor circinelloides* CBS 252-53 (Tabl. VII).

Comme dans le cas précédent, c'est sur le milieu YPG Co que la production de biomasse est la meilleure, mais sans atteindre la récolte obtenue avec *Mortierella ramanniana*. La croissance est améliorée par l'agitation. L'huile obtenue à partir du milieu de culture PDB est convenablement pourvue en acide  $\gamma$ -linoléique (6,2 %).

TABLEAU V. — Composition centésimale en acides gras des huiles produites par *Absidia hyalospora* CBS 173-67

		10 : 0	12 : 0	14 : 0	15 : 0	16 : 0	16 : 1	17 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	18 : 3	20	20	20	22	22	24	24	Autres
												(n-6)	(n-3)								
PDB	CA	—	—	0,6	—	28,8	0,6	—	13,0	41,2	8,1	3,9	—	1,0	0,2	1,0	0,1	0,9	0,1	0,5	
	CNA	—	0,1	0,7	0,1	31,0	0,7	0,1	12,8	41,6	5,6	3,7	—	0,9	0,2	0,6	0,1	0,7	0,1	1,0	
YPG Co	CA	—	—	0,2	0,1	7,4	0,3	0,1	3,7	55,4	20,2	1,4	6,2	0,7	1,2	0,4	0,4	0,4	0,2	1,7	
	CNA	—	0,1	0,5	0,3	16,8	1,7	0,2	7,2	47,2	11,2	7,2	1,1	0,7	0,8	0,8	0,3	1,0	0,3	2,6	
YP Co	CA	—	—	0,1	0,1	5,1	1,3	0,1	2,3	57,8	17,8	2,1	4,4	0,7	1,8	0,4	0,5	0,2	0,2	5,1	
	CNA	—	0,2	0,4	0,2	11,3	1,7	0,2	3,9	53,9	16,5	2,8	3,5	0,5	1,0	0,4	0,4	0,5	0,4	2,2	

TABLEAU VI. — Composition centésimale en acides gras des huiles produites par *Mortierella ramanniana* CBS 112-08

		10 : 0	12 : 0	14 : 0	15 : 0	16 : 0	16 : 1	17 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	18 : 3	20	20	20	22	22	24	24	Autres
												(n-6)	(n-3)								
PDB	CA	0,1	0,1	1,1	0,3	25,7	0,7	0,3	6,8	46,1	8,1	7,0	—	1,2	0,6	0,5	—	0,8	—	0,6	
	CNA	0,1	0,1	1,5	0,5	28,1	1,1	0,5	6,4	45,9	5,6	4,8	—	0,7	0,6	0,4	—	0,7	—	3,0	
YPG Co	CA	—	0,1	0,4	0,2	9,8	1,4	0,1	3,1	53,5	17,8	3,3	4,8	0,6	1,1	0,4	0,3	0,5	0,1	2,5	
	CNA	0,1	0,2	0,7	0,4	11,8	0,7	0,2	2,8	51,3	16,7	4,7	4,8	0,6	1,1	0,5	0,7	0,4	—	2,3	
YP Co	CA	—	—	0,3	0,2	7,5	0,9	0,1	2,8	56,4	19,5	1,6	6,1	0,6	1,1	—	0,4	0,4	0,1	2,0	
	CNA	—	0,1	0,5	0,2	9,4	1,0	—	2,6	54,3	18,7	2,2	5,7	0,6	1,1	0,4	0,4	0,5	0,1	2,2	

TABLEAU VII. — Composition centésimale en acides gras des huiles produites par *Mucor circinelloides* CBS 252-53

		10 : 0	12 : 0	14 : 0	15 : 0	16 : 0	16 : 1	17 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	18 : 3	20	20	20	22	22	24	24	Autres
												(n-6)	(n-3)								
PDB	CA	1,0	0,7	2,3	0,2	26,3	2,8	0,2	9,3	38,4	8,7	6,2	—	0,5	0,6	0,5	—	0,9	0,2	1,2	
	CNA	1,8	1,5	2,8	0,3	23,2	3,5	0,3	9,0	37,1	7,2	6,5	—	0,4	0,4	0,6	—	1,1	0,6	3,7	
YPG Co	CA	—	0,2	1,6	0,2	19,8	1,4	0,3	3,9	36,8	14,9	8,6	6,4	0,2	0,5	0,3	0,1	0,7	0,1	4,0	
	CNA	0,1	0,2	0,7	0,1	7,9	1,4	0,1	2,0	54,0	18,9	4,1	5,1	0,4	1,1	0,4	0,3	0,5	0,4	2,3	
YP Co	CA	—	—	0,4	0,1	7,2	3,4	0,3	1,9	57,0	18,0	4,4	3,1	0,5	1,3	0,4	0,4	0,3	—	1,3	
	CNA	0,1	0,3	1,2	0,5	12,8	1,7	0,8	2,9	44,2	17,8	5,3	5,6	0,5	1,0	0,4	0,2	0,3	—	4,4	

— *Mucor circinelloides* CBS 172-27 (Tabl. VIII).

Cette souche a un bon comportement à l'agitation et donne la meilleure récolte de biomasse de tous les milieux de culture testés quand elle pousse sur YPG Co en culture agitée (10,5 % g de matière sèche/g de culture).

Les huiles extraites ne présentent pas de caractéristiques particulières et le taux d'acide  $\gamma$ -linoléique obtenu sur le milieu PDB agité est acceptable (5,8 %).

#### Bilans.

Les proportions d'huile et d'acide  $\gamma$ -linoléique par rapport à la matière sèche concernant les cultures sur milieu PDB agitées sont regroupées dans le tableau IX. *Mortiriella ramanniana* et les *Mucor circinelloides* présentent une matière vivante riche en triglycérides et en acide  $\gamma$ -linoléique. Mais si on exprime les résultats par rapport à la quantité d'acide  $\gamma$ -linoléique produite par litre de cul-

TABLEAU VIII. — Composition centésimale en acides gras des huiles produites par *Mucor circinelloides* CBS 172-27

		10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3 (n-6)	18:3 (n-3)	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1	Autres
PDB	CA	1,3	5,8	3,8	0,2	24,6	2,4	0,1	8,0	35,6	10,2	5,8	—	0,4	0,3	0,5	—	0,7	—	0,3
	CNA	3,5	2,6	4,0	0,1	26,3	4,3	0,1	9,8	34,1	6,1	5,2	—	0,4	0,3	0,4	—	0,9	0,6	1,3
YPG Co	CA	0,1	0,1	0,7	0,3	9,9	2,6	0,2	2,4	51,6	18,0	4,3	4,1	0,7	1,4	0,6	0,5	0,7	—	1,8
	CNA	0,1	0,3	1,1	0,4	12,2	1,4	0,2	2,9	46,2	17,4	6,5	4,9	1,0	1,0	0,4	0,3	0,7	0,4	2,6
YP Co	CA	0,1	—	0,4	0,3	6,5	2,0	0,2	2,3	56,4	16,5	5,0	2,8	0,8	1,7	0,8	0,7	0,8	0,2	2,5
	CNA	—	—	0,4	0,1	7,1	0,9	—	1,8	55,4	20,1	3,6	5,1	0,4	1,3	0,3	0,3	0,2	—	3,0

TABLEAU IX. — Acide  $\gamma$ -linoléique des huiles obtenues sur milieu PDB agité — Bilans pondéraux

		Récoltes de biomasse (1)	% Huiles dans la biomasse sèche	% 18:3 (n-6) dans l'huile	% 18:3 (n-6) dans la biomasse sèche	Production estimée 18:3 (n-6) (2)
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	CBS 380-29	1,1	11	12,3	1,4	15
<i>Rhizopus stolonifer</i>	CBS 347-49	0,8	15	6,9	1,0	8
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 285-55	1,5	15	5,4	0,8	12
<i>Absidia hyalospora</i>	CBS 137-67	6,1	29	3,9	1,1	67
<i>Mortiriella ramanniana</i>	CBS 112-08	1,7	33	7,0	2,3	39
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 252-53	1,6	38	6,2	2,0	32
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 172-27	1,8	43	5,8	2,5	45

(1) — exprimées en g de matière sèche/l de culture.

(2) — exprimées en mg de 18:3 (n-6)/l de culture.

TABLEAU X. — Composition centésimale en acides gras des huiles obtenues avec le milieu MMV

		10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3 (n-6)	18:3 (n-3)	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1	Autres
<i>Absidia blakesleeana</i>	CBS 100-28	—	—	0,4	0,2	28,7	0,4	0,2	16,9	39,0	6,3	4,1	—	1,0	0,2	0,7	0,1	1,2	0,1	0,5
	CBS 173-67	—	0,3	1,4	0,3	26,9	0,7	0,8	15,7	31,5	9,8	8,8	—	0,7	0,2	0,4	—	0,7	—	1,8
<i>Absidia ramosa</i>	CBS 582-65	—	—	0,6	0,2	27,0	0,7	0,2	16,0	31,2	14,9	6,3	—	0,5	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2	1,2
	CBS 112-08	—	0,1	1,6	0,4	25,7	0,5	0,4	21,1	35,0	5,6	2,7	—	1,0	0,3	0,6	0,1	0,9	0,1	3,9
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 172-27	0,2	0,4	3,1	0,5	29,8	2,1	0,7	6,0	38,8	10,1	5,7	—	0,5	0,3	0,4	0,1	0,5	0,1	0,7
	CBS 252-53	0,7	1,1	3,2	1,1	20,7	2,5	1,3	6,3	36,7	12,6	7,9	—	0,4	0,6	0,5	0,2	1,7	0,2	2,3
<i>Mucor rouxianus</i>	CBS 120-08	0,1	0,4	2,0	0,8	22,1	1,0	2,3	7,4	25,6	14,4	16,7	—	0,3	0,3	0,3	0,1	0,8	0,2	5,2
	CBS 285-55	—	—	0,3	0,3	18,5	0,6	0,2	22,3	30,5	17,2	3,6	—	1,3	0,2	1,2	0,1	2,4	0,1	1,2
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	CBS 380-29	0,1	0,2	1,8	0,4	23,7	1,8	0,2	8,5	29,4	7,7	16,1	—	0,3	0,3	1,6	0,3	3,0	0,3	4,3

ture, *Absidia hyalospora* est la souche qui est la plus productive avec 67 mg d'acide pour 1 l de milieu de culture. Toutefois, si l'on considère qu'il est pour un microorganisme techniquement beaucoup plus facile de faire produire de la biomasse ou accumuler de la matière grasse que de provoquer des modifications importantes de sa composition en acides gras, le faible pourcentage d'acide  $\gamma$ -linoléique d'*Absidia hyalospora* est un handicap non négligeable pour cette souche pour les études ultérieures.

## 2. — Etude de la croissance sur milieu minéral vitaminé (MMV).

Afin de se placer dans des conditions plus appropriées avec les exigences industrielles, un milieu minéral vitaminé, compatible avec les impératifs de rentabilité économique, a été mis au point.

*Absidia blakesleeana*, *Absidia ramosa* et *Mucor rouxianus* ont été testés sur ce milieu agité ainsi que les souches précédemment étudiées. *Rhizopus stolonifer* n'a pas poussé sur ce milieu. La composition centésimale en acides gras des huiles obtenues est donnée dans le tableau X. Il faut observer une absence totale d'acide  $\alpha$ -linoléique, une relative pauvreté en acide linoléique (moins de 15 % sauf pour *Rhizopus oryzae*), une proportion importante de l'ordre de 30 à 50 % d'acides gras saturés (acides palmitique et stéarique). L'acide oléique est systématiquement l'acide gras prépondérant. Comme prévu, ces résultats sont proches de ceux obtenus sur PDB.

Pour ce qui est de l'acide  $\gamma$ -linoléique, la teneur dans les huiles est très variable, allant de 2,7 % dans le cas le plus défavorable de *Mortiriella ramanniana* à 16,7 % pour *Mucor rouxianus*, ce qui est excellent et supérieur à ce que l'on trouve dans la plupart des huiles végétales  $\gamma$ -linoléiques. Toutefois, du strict point de vue de la recherche d'une source d'acide  $\gamma$ -linoléique, *Zygorhynchus moelleri* avec 16,1 % permet d'obtenir une huile remarquable. *Absidia hyalospora* et *Mucor circinelloides* 252-53 avec des teneurs respectives en acide  $\gamma$ -linoléique de 8,8 et 7,9 % produisent des huiles tout à fait acceptables.

### Bilans.

Les résultats généraux concernant les croissances et les

bilans de l'acide  $\gamma$ -linoléique sont contenus dans le tableau XI. *Mortiriella ramanniana* et *Zygorhynchus moelleri* ont donné une mauvaise croissance. Les échantillons d'huiles obtenus pour ces deux souches sont trop faibles pour que les résultats d'analyses soient d'une précision convenable. Les deux *Mucor circinelloides* ont donné les meilleurs rendements de croissance. Pour ce qui est de la richesse en huile de la biomasse, *Mucor circinelloides* 172-27 donne le meilleur résultat (25 %).

En combinant les quantités de biomasse récoltées, leurs richesses en matière grasse, la teneur en acide  $\gamma$ -linoléique des huiles produites, la quantité produite d'acide  $\gamma$ -linoléique peut être estimée par litre de milieu de culture. C'est le paramètre le plus significatif de la production recherchée et les résultats montrent que *Mucor rouxianus* 120-08 et *Mucor circinelloides* 172-27 sont nettement, dans ces conditions de cultures, les souches les plus performantes.

## CONCLUSION

Le travail met en évidence la possibilité de produire des huiles  $\gamma$ -linoléiques à partir de souches de Phycomycètes se développant sur des milieux organiques et en culture agitée. Les mêmes souches testées sur un milieu minéral vitaminé, plus en rapport avec les exigences de rentabilité industrielle, ont également permis d'obtenir des résultats très encourageants : *Mucor rouxianus* CBS 120-08 et *M. circinelloides* 172-27 sont les deux microorganismes les plus aptes à produire de l'acide  $\gamma$ -linoléique.

La suite de l'étude sera logiquement une optimisation des conditions de culture avec les souches sélectionnées, puis le passage à un stade de production plus intensif.

Cependant un choix devra être fait. Il est en effet possible de viser une production importante d'acide  $\gamma$ -linoléique en sacrifiant éventuellement la richesse de la matière grasse en cet acide gras ou de viser la production de triglycérides riches en acide  $\gamma$ -linoléique, quitte à accepter une productivité plus faible des cultures. Même s'il n'est pas inconcevable de viser les deux objectifs simultanément, il nous paraît probable que le premier objectif est plus facile à atteindre que le second.

TABLEAU XI. — Acide  $\gamma$ -linoléique des huiles obtenues sur milieu MMV — Bilans pondéraux

		Récoltes de biomasse (1)	% Huiles dans la biomasse sèche	% 18 : 3 (n-6) dans l'huile	% 18 : 3 (n-6) dans la biomasse sèche	Production estimée 18 : 3 (n-6) (2)
<i>Absidia blakesleeana</i>	CBS 100-28	2,2	15	4,1	0,6	13
<i>Absidia hyalospora</i>	CBS 137-67	2,2	14	8,8	1,2	26
<i>Absidia ramosa</i>	CBS 582-65	2,0	6	6,3	0,4	8
<i>Mortiriella ramanniana</i>	CBS 112-08	0,1	27	2,7	0,7	1
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 252-53	3,2	8	7,9	0,6	19
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 172-27	3,3	25	5,7	1,4	46
<i>Mucor rouxianus</i>	CBS 120-28	2,8	9	16,7	1,5	42
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 285-55	2,9	15	3,6	0,5	15
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	CBS 380-29	0,7	11	16,1	1,8	13

(1) — exprimées en g de matière sèche/l de culture.

(2) — exprimées en mg de 18 : 3 (n-6)/l de culture.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRENNER R. R. (1980). — Golden Jubilee International Congress on essential fatty acids and prostaglandins. Univ. of Minnesota, Minneapolis. *Abstract*, N° 6, p. 18.
- [2] MEAD J. P. and FULCO A. J. (1976). — *The unsaturated and polyunsaturated fatty acids in health and disease*. Springfield, ed. Charles Thomas.
- [3] EULER U. S. Von (1935). — *Klin. Wochschr.*, 14, 1182; and (1936) — *C. A.* 30, p. 3040.
- [4] DORP D. A. Van (1970). — Am. Oil Chem. Intern. Soc. Fat. Res. World Congress, Chicago, *Abstract* N° 122.
- [5] PINA M., GRAILLE J., GRIGNAC P., LACOMBE A., QUENOT O et GARNIER P. (1984). — *Oléagineux*, 39, N° 12, p. 593-596.
- [6] LACOMBE A., QUENOT O, GRIGNAC P., GRAILLE J., PINA M et GARNIER P. (1985). — *Oléagineux*, 40, N° 1, p. 35-40.
- [7] SUMMER J. L. and MORGAN E. D. (1969). — *J. Gen. Microbiol.*, 59, p. 25.
- [8] BOWMAN R. D. and MUMMA R. O. (1967). — *Biophys. Biochem. Acta*, 7, p. 227.
- [9] SHAW R. (1966). — *Comparative Biochem. and Physiol.*, 18, p. 325.
- [10] AFNOR (1984). — *Recueil de Normes Françaises des corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés*. 3° éd., NF T 60-233, p. 95.
- [11] BEARE-ROGERS J. L. (1985). — *Rev. Fr. Corps Gras*, 32, p. 3.
- [12] HELME J. P. (1986). — *Rev. Fr. Corps Gras*, 33, p. 103.

## SUMMARY

**Production of oils rich in gamma linolenic acid through various strains of Phycomycetes.**

G. AGGELIS, M. PINA, R. RATOMAHENINA, A. ARNAUD, J. GRAILLE, P. GALZY, P. MARTIN-PRIVAT and J. P. PERRAUD, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 10, p. 379-386.

Concurrently with the considerable agronomical effort being made to intensify production of oils rich in  $\gamma$ -linolenic acid, research into new sources of  $\gamma$ -linolenic acid from the growth of micro-organisms has been developed through biotechnological channels. The growth of certain strains of Phycomycetes has been tested on different culture media. An initial selection stage on natural organic media has made it possible to determine the ability of different strains to produce a biomass rich in oil with a high  $\gamma$ -linolenic acid content. The second phase of the study, carried out on a vitamin enriched mineral medium which is more in accordance with economic and industrial cost-effectiveness constraints, has shown that the strains of *Mucor rouxianus* CBS 120-08 and *Mucor circinelloides* CBS 172-27 are the micro-organisms which give the best results. The development and more intensive production phase can be proceeded with using these two strains.

## RESUMEN

**Producción de aceites que contienen mucho ácido gamma linolénico por diversas cepas de Ficomicetos.**

G. AGGELIS, M. PINA, R. RATOMAHENINA, A. ARNAUD, J. GRAILLE, P. GALZY, P. MARTIN-PRIVAT y J. P. PERRAUD, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 10, p. 379-386.

Paralelamente al importante esfuerzo que se está realizando con miras a intensificar la producción de aceites que contengan mucho ácido  $\gamma$ -linolénico, se ha desarrollado a través de la biotecnología la investigación de nuevas fuentes de ácido  $\gamma$ -linolénico producido por el crecimiento de microorganismos. El crecimiento de varias cepas de Ficomicetos ha sido probado en diversos medios de cultivo. Una primera etapa de selección en medios orgánicos naturales permitió que fuera evidenciada la habilidad de las diversas cepas para producir una biomasa que contiene mucho aceite de alto contenido de ácido  $\gamma$ -linolénico. La segunda etapa del estudio, realizada en un medio mineral vitaminado más conforme con los requerimientos de rentabilidad industrial desde el punto de vista económico, ha mostrado que las cepas de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 y *Mucor circinelloides* CBS 172-27 son los microorganismos de mayor rendimiento. Sobre estas dos cepas podrá iniciarse la etapa de desarrollo y de producción más intensiva.

## Stages, Formations

L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE CHIMIE DE MARSEILLE propose les stages de formation suivants :

**Chimie fine/Chimie analytique.**

- 1) Bioconversions : les 10, 11, 12 février 1988 ;
- 2) Chromatographie en phase liquide : les 4, 5, 6 mai 1988 ;
- 3) Analyse de traces métalliques : les 12, 13, 14 octobre 1988 ;

**Informatique appliquée à la chimie.**

- 4) Chimie et micro-informatique : les 9, 13 mai 1988 ;
- 5) Analyse de données multidimensionnelles en chimie : les 8, 9, 10 juin 1988 ;

**Génie chimique.**

- 6) Rhéologie appliquée aux fluides non newtoniens : les 27, 28, 29 avril 1988 ;
- 7) Transfert de chaleur dans les procédés industriels : les 14, 15, 16 mars 1988 ;
- 8) Automatisation des procédés continus et discontinus : les 10, 11 mars 1988.

*Renseignements et inscription* : École Supérieure de Chimie de Marseille, Service Formation Continue, Av. Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 13 (Tél. : 91.98.39.01).