



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Potential interference of fungal endophytes in *Vanilla planifolia* on vanilla flavor compounds biosynthesis

Khoyratty, S.

Citation

Khoyratty, S. (2020, October 27). *Potential interference of fungal endophytes in *Vanilla planifolia* on vanilla flavor compounds biosynthesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137981>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/137981>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137981> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Khoyratty, S.

Title: Potential interference of fungal endophytes in *Vanilla planifolia* on vanilla flavor compounds biosynthesis

Issue Date: 2020-10-27

Résumé

Un aperçu général de la vanille et de la vanilline est présenté dans le **Chapitre 1**. La saveur de vanille est l'une des plus recherchées dans le monde. L'arôme naturel de la vanille est plus complexe que celui de la vanilline synthétique (utilisée depuis les années 1920), ce qui explique que les arômes naturels soient plus prisés par les consommateurs contemporains. En conséquence, la demande d'arôme naturel de vanille a augmenté. Avant 1520, *Vanilla planifolia* était la seule source végétale d'arôme naturel de vanille. A partir de 1970, de la vanilline "naturelle" fut synthétisée à partir de micro-organismes. La diversité phytochimique est l'aspect le plus important de la saveur et de l'arôme de la vanille dans les gousses de vanille séchées provenant des différentes régions où elles sont cultivées. La quantité des divers métabolites associés à la saveur de vanille dans les gousses séchées, affectent la saveur (métabolites non volatils) et l'arôme (métabolites volatils). La pénurie d'extraits naturels de vanille de haute qualité sur le marché international, a encouragé les recherches pour améliorer la quantité de vanilline, produite dans les plantes de vanille. De plus, cela a aussi développé une recherche pour trouver d'autres alternatives à la production de la vanilline ayant un label 'naturelle'. Cette démarche a entraîné le développement de divers procédés biotechnologiques. Par exemple, la conversion de l'acide férulique en vanilline par différents microorganismes. D'autres procédés incluent l'introduction d'une voie de biosynthèse de la vanilline dans la levure. En dépit d'un grand nombre de recherches conduites sur la biosynthèse de la vanilline, beaucoup de questions subsistent toujours dans la plante où cette voie de biosynthèse n'est pas encore totalement élucidée. De plus, aucun élément n'est encore connu sur le rôle possible des microorganismes, tels que les endophytes fongiques, dans la production de vanilline et de composés à saveur de vanille dans les gousses de vanille de la plante. Peu de choses sont connues sur le rôle possible des microorganismes pendant le processus de séchage de la gousse. A la lumière de ces faits, l'objectif suivant a été formulé pour ce travail de thèse : démontrer la présence d'endophytes dans la vanille et étudier leur capacité de transformation chimique des composés aromatiques de la vanille (composés de la voie de biosynthèse de la vanilline et autres métabolites aromatiques).

Une revue des découvertes, publiées jusqu'à présent, sur la vanilline et les composés aromatiques est présentée dans le **chapitre 2**. Une revue des données sur la biosynthèse de la vanilline et d'autres composés aromatiques de la vanille, montre qu'elle n'est pas encore complètement comprise. En élucidant les voies biosynthétiques et leur régulation, on peut trouver des moyens de mieux contrôler la production de l'arôme et ainsi augmenter la valeur commerciale des gousses. L'arôme naturel de vanille est composé de plus de 250 composants mais la vanilline est le composé présent en plus grande quantité dans les gousses. La vanilline synthétique pure ne possède pas de notes aromatiques complexes. Donc, elle ne peut remplacer la vanille dans les produits de haute qualité. Les consommateurs ont tendance à exiger des arômes naturels. Cependant l'extrait naturel de vanille est environ 200 fois plus cher que la vanilline synthétique. Pour produire de la vanille « naturelle », des champignons peuvent être utilisés pour la biotransformation des précurseurs de la vanilline, en vanilline. Les champignons endophytes sont présents dans toutes les plantes et n'y causent pas de maladies. Les espèces d'endophytes fongiques sont, quelque fois, associées à des espèces de plantes spécifiques. Cela peut jouer un rôle dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Dans certain cas les métabolites secondaires issus de la plante proviennent des endophytes et non de la plante elle-même. Ce genre d'organismes pourrait donc aussi jouer un rôle dans la biosynthèse de la vanilline et des composés aromatiques de la vanille dans la plante. Il peut s'agir des voies complètes ou de quelques parties de la voie de biosynthèse de la vanilline, en interaction avec la biosynthèse des composés aromatiques de la vanille, par la plante. Des études sur le rôle possible des endophytes pourraient ainsi apporter un nouvel éclairage sur certaines parties de la voie de biosynthèse de la vanilline qui sont toujours en cours de discussion. Les effets du terroir sur la saveur, tels qu'observés pour les gousses de vanille, peuvent être dus à la présence de microorganismes dans la rhizosphère ou dans la plante elle-même. Cela a abouti à l'étude de la présence d'endophytes dans la plante de vanille afin de tester ces endophytes pour leur capacité de produire de la vanilline et l'arôme de vanille.

Le **chapitre 3** décrit une étude sur l'implication potentielle des endophytes fongiques de la vanille sur la formation de la saveur de vanille, dans les gousses. Les endophytes ont été isolés à partir des feuilles de vanille d'âges différentes et des isolements ont été effectués à partir de gousses provenant de différentes régions où la vanille est cultivée à l'île de la Réunion. Les isolements ont été faits par des méthodes microbiologiques. Grâce aux outils moléculaires, les espèces de champignons ont pu être identifiées. Vingt-trois espèces d'endophytes fongiques ont été isolées à partir de plantes de vanille, à l'aide d'une gélose aqueuse et, d'une gélose dextrosée de pomme de terre. Ces espèces ont été identifiées comme différentes unités taxonomiques opérationnelle moléculaires (MOTUs). Parmi toutes les souches isolées, 57% proviennent des gousses, et le restant provient des feuilles. Les endophytes isolés ont été cultivés chacun sur un milieu contenant de gousses vertes. Après croissance des champignons, les milieux ont été analysés par spectrométrie ¹HRMN. Le résultat d'analyse en composantes principales (ACP) montre une séparation nette entre les milieux utilisés par les endophytes et les témoins non utilisés. Dans tous les cas, les taux de glucovanilline ont été réduits à un niveau très bas ou n'ont pas pu être détectés. L'hydrolyse de la glucovanilline produit de la vanilline. Celle-ci peut être métabolisée en l'alcool vanillique correspondant, qui a effectivement été retrouvé bien qu'à des niveaux différents dans les différents milieux. Presque toute la vanilline, ses glucosides et l'alcool vanillique ont été catabolisés par le pathogène *Fusarium oxysporum*. L'endophyte *Pestalotiopsis microspora* a transformé la plus grande partie de la vanilline en alcool vanillique. Ce composé est connu pour avoir une saveur balsamique, comme on en trouve généralement dans les gousses de vanille de type bourbon. Le milieu restant, après la culture de *Diaporthe phaseolorum*, contenait, à la fois, de la vanilline et son alcool à des taux assez élevés. Les métabolites détectés dans le milieu contenant de la gousse verte, à cause de l'interaction des différents espèces d'endophytes avec ce même milieu, diffèrent des métabolites produits par ces endophytes seuls. La gousse verte est, au niveau de l'espèce, pratiquement la même dans les différentes régions de la Réunion. Ainsi, une différence aromatique est probablement due aux variations des espèces d'endophyte, selon la zone de culture de la vanille. De ce fait, les endophytes pourraient contribuer à l'effet terroir.

Les endophytes qui ont le plus augmenté la teneur de vanilline dans les milieux de culture (**chapitre 3**) ont été retenus pour le **chapitre 4**. Ainsi, ces endophytes ont ensuite été étudiés au niveau de leur contribution possible à l'arôme de vanille, et en particulier aux composés volatils. Deux endophytes, *Diaporthe phaseolorum* et *Pestalotiopsis microspora*, précédemment (**chapitre 3**) isolés à partir de gousses de vanille verte, et un champignon

nouvellement isolé à partir des gousses après échaudage, *Hypoxylon investiens*, ont été cultivés sur différents milieux. Les champignons ont ensuite été cultivés sur un milieu de gélose de dextrose de pomme de terre, dans le but de vérifier la production des composés volatils associés à l'arôme de vanille, due à ces mêmes champignons. Les milieux gélose de dextrose de pomme de terre après culture des champignons ont été comparés, aux milieux contenant des gousses de vanille verte broyées, et aux milieux contenant des déchets de gousses de vanille, tous deux après croissance des micro-organismes. Les déchets de gousses de vanille, ont été obtenus après extraction avec 40% d'éthanol. Une analyse chromatographique en phase gazeuse avec un échantillonnage à espace de tête statique a été effectuée sur le milieu, après culture des champignons. Des composés volatils associés à l'arôme de vanille ont été détectés dans le milieu : *p*-xylène, α -phellandrene, 3-carène, α -terpinéol, *p*-hydroxybenzaldéhyde, α -cubébène, β -caryophyllène, vanilline et alcool vanillylique. Ces composés volatils ont été identifiés dans les milieux contenant de la vanille, après culture des champignons, à des niveaux plus élevés que dans les milieux témoins (sans croissance fongique). Les composés α -phellandrene, α -terpineol, *p*-hydroxybenzaldéhyde, α -cubebene, β -caryophyllene, vanilline, alcool vanillylique étaient absents du milieu de dextrose de pomme de terre après la croissance fongique. Le type de milieu et les espèces fongiques utilisées déterminent le type et l'abondance des composés volatils obtenus, alors que la période de croissance n'a eu aucun effet sur ces mêmes composés. La production de ces composés volatils pourrait être due à la biosynthèse *de novo* par les endophytes, ou à la biotransformation des précurseurs présents dans les milieux contenant de la gousse de vanille. Le champignon *Hypoxylon investiens* récupéré après l'échaudage des gousses, semble prometteur pour la réutilisation des gousses traitées extraites. Il semble que ce champignon puisse transformer l'acide férulique en vanilline. Les résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les endophytes jouent un rôle dans la biosynthèse des métabolites des arômes de vanille. La biosynthèse de la vanilline et des composés aromatiques de vanille dans les plantes de *Vanilla planifolia* ne sont pas encore complètement élucidées. Divers champignons endophytes se trouvent dans les gousses de vanille, là où les composés associés à la saveur de la vanille s'accumulent. D'après la littérature, plusieurs champignons sont capables de produire de la vanilline à partir de l'acide férulique. D'où la question de savoir si les champignons endophytes pourraient jouer un rôle dans la production de vanilline et de composés associés à la saveur de la vanille, et spécifiquement en ce qui concerne les composés non-volatils. Apporter des éléments de réponse à cette question est l'objectif du **chapitre 5**. Les endophytes *Hypoxylon investiens*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pestalotiopsis microspora* et le champignon pathogène de la vanille *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* ont été cultivés sur des milieux contenant des feuilles de vanille, afin de détecter si la biosynthèse *de novo* de la vanilline a eu lieu.

De plus, les intermédiaires les plus probables de la voie de biosynthèse de la vanilline ont été ensuite ajoutés au même milieu, sur lesquels les champignons ont été cultivés : acide *p*-coumarique, acide *p*-hydroxybenzoïque, aldéhyde protocatéchoïque, acide férulique et vanilline. Après la croissance fongique, les milieux ont été analysés par spectroscopie ¹HRMN. La tyrosine et le glucose, deux précurseurs précoces de la vanilline, sont présents dans le milieu de gélose enrichi aux feuilles de vanille. En dépit de cela, aucune production *de novo* de la vanilline n'a été observée après la croissance fongique sur ce milieu. Tous les endophytes testés démontrent une capacité d'effectuer la conversion de la vanilline en alcool vanillylique. La vanilline et l'alcool vanillylique sont présents dans les milieux contenant de l'acide férulique, après la croissance de *H. investiens* alors que l'acide *p*-coumarique n'a pas subi de biotransformation par le même champignon. Ce résultat indique

une conversion spécifique de l'acide férulique. Après la synthèse de l'acide *p*-coumarique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque a été produit par *D. phaseolorum*. Néanmoins, ce champignon n'a pas effectué de réaction similaire après culture sur un milieu contenant de l'acide férulique. Aucun des champignons n'était capable d'effectuer la biosynthèse complète *de novo* de la vanilline, bien qu'ils soient capables de participer à quelques étapes de cette même voie. Pour aucun des champignons, la formation de la substitution 3-méthoxy,4-hydroxy de la structure cyclique aromatique n'a été possible. Etant donné que la souche *H. investiens* a été prélevée sur des gousses après échaudage, il serait intéressant de continuer à explorer la production biotechnologique de vanilline à partir de cette souche.

Dans les chapitres précédents, l'isolement des endophytes, à partir des plantes de vanille a été décrit. Leur capacité à effectuer une ou plusieurs étapes de la biosynthèse de la vanilline a également été démontrée *in vitro* mais cela n'a pas encore été démontré *in vivo*. Dans le **chapitre 6** l'interaction des champignons endophytes utilisés dans les chapitres précédents, avec le matériel végétal de vanille *in vivo* a été caractérisée. Afin de mesurer l'effet de chaque endophyte sur la vanille, des plantes de vanille axéniques et des cultures de cals de différents âges ont été produites et infectées par les champignons endophytes *Diaporthe phaseolorum*, *Pestalotiopsis microspora*, ou *Hypoxylon investiens*, ainsi que par le pathogène de la vanille, *Fusarium oxysporum*. Afin de déterminer la méthode optimale d'infection le matériel de vanille pour les expériences, le mode de transmission des endophyte dans la plante *in situ* fut étudié. La transmission horizontale des endophytes est la plus probable étant donné que ces derniers ont été isolés uniquement à partir de fleurs ouvertes, mais pas à partir de bourgeons fermés. En conséquence, l'infection fongique a été réalisée en immergeant le matériel végétal dans une suspension de spores fongiques, pour les expériences de co-culture. À l'aide d'analyses histologiques, morphologiques et métaboliques basées sur des analyses ¹HRMN, deux stades différents du développement des cals ont été caractérisés (15 et 30 jours sous culture). Les teneurs les plus élevées d'alcool *p*-hydroxybenzylrique et d'acide *p*-coumarique ont été obtenues dans les cals type 30 jours en co-culture, pendant une période de 5 jours, avec *Fusarium oxysporum* et *Hypoxylon investiens* respectivement. En général, il semble que le pathogène fongique *F. oxysporum* ne diffère pas significativement des endophytes, par ses effets sur les plantes et les cals. Apparemment, les différents matériaux végétaux donnent une réponse différente à la co-culture avec un même endophyte. Parmi les endophytes testés, *Hypoxylon investiens* et *Pestalotiopsis microspora* ont induit les plus hautes teneurs de métabolites associés aux étapes des voies métaboliques phénoliques, liées à la biosynthèse de la vanilline dans la plante. Cependant, comme la vanilline est produite dans les gousses, et non dans la plante elle-même, d'autres études sont nécessaires afin de conclure, sur les effets des endophytes sur la biosynthèse de la vanilline.

Le **chapitre 7** consiste en une brève évaluation des travaux de la thèse, par rapport au but et aux objectifs initiaux et comprend quelques perspectives pour les travaux futurs. En tenant compte de l'objectif décrit dans le **chapitre 1**, il est maintenant possible de conclure que les feuilles et gousses de *Vanilla planifolia* contiennent différents endophytes fongiques et que, les espèces isolées diffèrent pour les gousses et les feuilles. Des différences régionales sont aussi à noter. Les endophytes isolés ont été sondés pour la production de tout intermédiaire du réseau biosynthétique de la vanilline. Trois d'entre eux semblaient capables de réaliser quelques étapes de ce réseau, pendant la culture sur un milieu contenant du matériel provenant des gousses vertes. D'autres tests ont montré que ces endophytes produisent divers composés présents dans l'arôme complexe de vanille. La biosynthèse complète *de*

novo de la vanilline à partir des précurseurs précoces n'a pas pu être détectée, mais *Hypoxylon investiens*, un endophyte isolé des gousses traitées, a réussi à biotransformer l'acide férulique en vanilline. Ceci fait d'*Hypoxylon investiens*, un candidat intéressant pour des études ultérieures, car il peut augmenter la teneur de vanilline pendant le traitement des gousses. Des études sur le matériel végétal vivant, sous forme de cals ou de plantes axéniques, infectées avec un endophyte pour chaque expérience, ont démontré que les trois endophytes modifient le métabolisme phénolique. Afin de prouver avec certitude que les endophytes jouent vraiment un rôle dans la biosynthèse de la vanilline, il sera nécessaire d'utiliser des plantes axéniques qui ont fleuri et commencé à produire des gousses. Cependant, de telles expériences prennent du temps et ne pourraient être faites dans le délai de cette thèse. De la maturation de la plante à l'obtention des gousses, cela prend en effet au moins 4 ans. Le but et les objectifs du projet ont donc été atteints. Mais pour une preuve complète de l'implication des endophytes dans la biosynthèse de la vanilline, d'autres expériences *in vivo* seront nécessaires. Le plus important est que ce travail, appuie l'hypothèse selon laquelle les effets sur le terroir pourraient être liés à la diversité des endophytes et que les endophytes pourraient jouer un rôle dans la formation d'intermédiaires des voies de la biosynthèse de la vanilline, pendant le développement des gousses et pendant le processus de maturation de celles-ci.