

## Isolement de *Lactobacillus pentosus* capable de bioconvertir l'oleuropéine en hydroxytyrosol : application sur les feuilles d'olivier

AOUIDI<sup>1,2</sup> Fathia Isabelle PERRAUD-GAIME<sup>2</sup>, Sevastianos ROUSSOS<sup>2</sup>, Moktar HAMD<sup>1</sup>

### Résumé

Une bactérie lactique, identifiée comme *Lactobacillus pentosus*, a été isolée à partir de saumure d'olive. Elle est capable de produire l'hydroxytyrosol, composé d'intérêt biologique et commercial, sur MRS additionnée de 1g l<sup>-1</sup> d'oleuropéine. Cette souche est également capable de se développer sur un extrait aqueux de feuille d'olivier comme seule source de nutriments et comme source d'oleuropéine. La souche est apte à produire de l'hydroxytyrosol dans ce milieu.

**Mots Clés :** *Lactobacillus pentosus*; Identification microbienne; Valorisation; Feuilles d'olivier; Hydroxytyrosol.

### Isolement of *Lactobacillus pentosus* able to bioconvert oleuropein to hydroxytyrosol: application on olive leaves.

### Abstract

A lactic bacterium, identified as *Lactobacillus pentosus*, was isolated from olive brine. It has been proved able to produce hydroxytyrosol, compound with several interesting biological activity and commercial interest, on the medium MRS supplemented with 1g l<sup>-1</sup> oleuropein. This renewable method (comparing with chemical and enzymatic methods) was tested on an aqueous olive leaf extract, which was used as useful source for oleuropein for biotransformation. *Lactobacillus pentosus* was able to grow on this medium as sole substrate and produce hydroxytyrosol.

**Key Words:** *Lactobacillus pentosus*; Microbial identification; Valorisation; olive leaves; Hydroxytyrosol.

### 1. Introduction

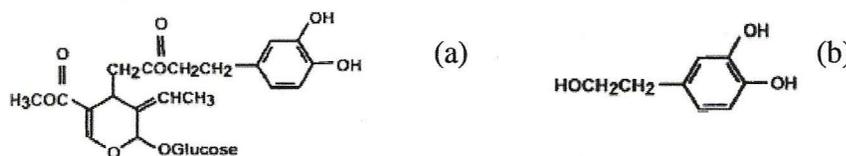
L'industrie oléicole engendre des quantités énormes de rejets, dont les feuilles d'olivier qui sont riches en composés phénoliques (notamment l'Oleuropéine).

L'Hydroxytyrosol, le produit dérivé de la dégradation de l'Oleuropéine (Fig 1), possède des intérêts commerciaux et scientifiques plus importants que ceux de l'Oleuropéine. Il est obtenu par hydrolyse chimique de l'Oleuropéine (Jemaia et al., 2008) ou par synthèse chimique (Capasso et al., 1999). Une technologie douce par utilisation de l'enzyme beta-glucosidase a été aussi proposée (Briante et al., 2004; Jemaia et al., 2008). Cependant, ces procédés sont non renouvelables. Comme alternative à ces procédés, ce travail vise à tester la possibilité de produire l'Hydroxytyrosol par bioconversion microbienne de l'Oleuropéine présente dans les feuilles d'olivier, dans un but de valorisation de cette biomasse végétale pour un développement durable du secteur oléicole tout en respectant l'environnement et en utilisant un procédé renouvelable.

Le choix des bactéries lactiques pour cette bioconversion microbienne est due au fait que ces microorganismes sont impliqués dans la dégradation de l'oleuropéine en produisant l'hydroxytyrosol lors de la désamérisation biologique des olives (Marsilio et al., 1996; Servili et al., 2006; Agusti, J., comm. pers., 2007).

1) INSAT, Centre Urbain Nord, 2 Boulevard de la Terre, B.P. 676, 1080 Tunis, Tunisie.

2) IMEP-IRD, UMR-193, Case 441, FST St Jérôme, Université Paul Cézanne, Avenue Escadrille Normandie-Niemen 13397 Marseille cedex 20, France  
E-mail. aouidifathia@yahoo.fr



**Figure 1:** Structure chimique de l'Oleuropéine (a) et de l'Hydroxytyrosol (b)

## 2. Matériel et Méthodes

Un isolement des souches bactériennes a été réalisé sur MRS à partir de margine et de saumure d'olive. Après s'être assuré de la pureté des souches (par observation microscopique après au moins 3 repiquages successifs), différentes techniques d'identification (profil morphologique, profil biochimique sur galerie API 50CH, profil enzymatique sur galerie API zyme, profil fermentaire) ont été appliquées. Le profil fermentaire a été déterminé par HPLC selon le protocole décrit par Agusti (comm. pers., 2007).

Une culture de la souche sélectionnée SE4 a été effectuée sur MRS additionnée d'oleuropéine à 1 g l<sup>-1</sup> et sur un extrait aqueux de feuille d'olivier à 5% (m/v). L'analyse des phénols a été évaluée, avant et après une culture de 13 jours, par HPLC selon le protocole décrit par Agusti (2007). L'identification des pics a été confirmée par l'analyse des échantillons enrichis avec les standards.

## 3. Résultats et Discussion

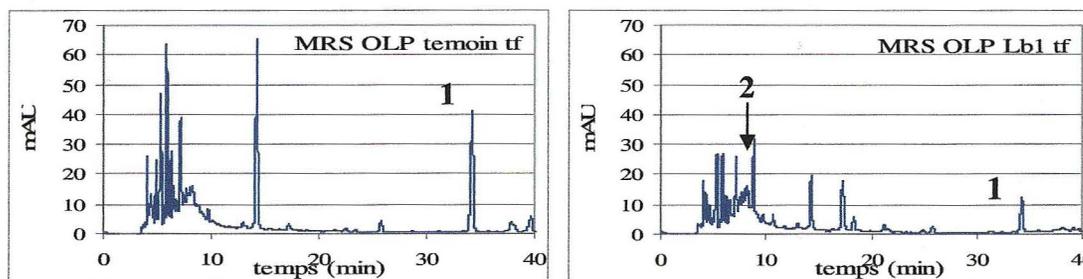
Dix souches de bactéries ont été isolées à partir du biotope olive (margine et saumure d'olive) sur le milieu de culture MRS. Différents tests d'identification microbienne ont été réalisés : observation morphologie, test gram, test catalase, test oxydase, test indole, test mobilité, type respiration, profil fermentaire. Une seule souche parmi les dix souches isolées possède les caractéristiques des bactéries lactiques : gram (+), catalase (-), oxydase (-), indole (-), immobile, respiration anaérobie facultative, production d'acide lactique. La souche lactique est de forme cocobacille de petite taille. L'interprétation des résultats du profil biochimique a permis d'identifier la souche en tant que *Lactobacillus pentosus* avec ID 99,9%.

L'étape suivante a permis de tester la capacité de la souche *Lactobacillus pentosus* à bioconvertir l'oleuropéine en hydroxytyrosol. Pour ce faire, une culture de la souche a été réalisée sur un milieu MRS liquide additionné de 1 g l<sup>-1</sup> d'oleuropéine.

L'analyse par HPLC montre la dégradation de l'oleuropéine et la production de l'hydroxytyrosol suite à l'activité de *Lactobacillus pentosus* (Fig. 2). Ce résultat confirme les travaux de Servili et al., (2006) qui ont utilisé une souche de *Lactobacillus pentosus* pour la désamérisation biologique des olives à l'échelle pilote.

Les *Lactobacillus plantarum* sont plus connues dans la dégradation de l'oleuropéine lors de la fermentation des olives (Marsilio et al., 1996). Ces auteurs ont proposé un modèle de mécanisme de bioconversion biologique de l'oleuropéine en hydroxytyrosol. Ce modèle implique 2 enzymes : le beta-glucosidase et l'estérase.

Le profil enzymatique de la souche *Lactobacillus pentosus* montre la présence d'une activité beta-glucosidase uniquement à 30°C en anaérobiose et en aérobiose. L'activité estérase est absente quelque soit les conditions de culture testées (30°C, 37°C, aérobiose, anaérobiose). Ces résultats peuvent laisser supposer que le mécanisme de bioconversion de l'oleuropéine en hydroxytyrosol est différent selon les espèces de bactéries lactiques.



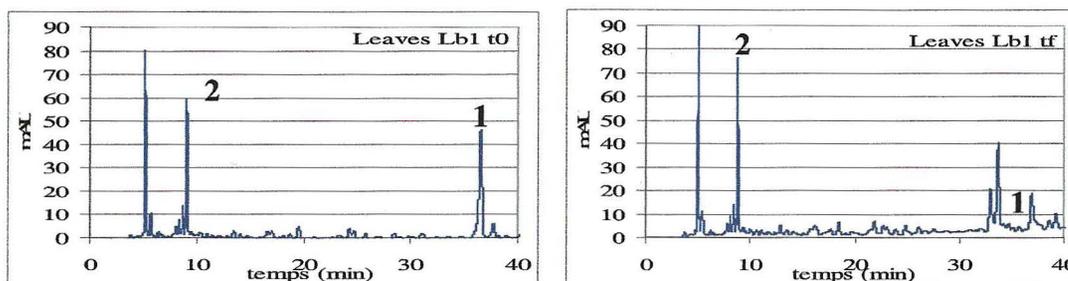
**Figure 2:** Profil HPLC sur milieu MRS contenant 1 g l<sup>-1</sup> d'oleuropéine avant et après bioconversion par la souche lactique *Lactobacillus pentosus*. Identification des pics: 1, Oleuropéine; 2, Hydroxytyrosol.

Les feuilles d'olivier sont connues par leur richesse en oleuropéine. Un extrait aqueux de feuille d'olivier a été utilisé comme seul substrat pour cultiver la souche *Lactobacillus pentosus* dans un objectif de produire l'hydroxytyrosol.

*Lactobacillus Pentosus* est capable de se développer sur ce milieu tout en produisant l'hydroxytyrosol et en dégradant l'oleuropéine (Fig. 3).

#### 4. Conclusions

Une bactérie lactique identifiée comme *Lactobacillus pentosus* est capable de dégrader l'oleuropéine et de produire l'hydroxytyrosol en impliquant l'enzyme beta-glucosidase. Cette souche est également capable de se développer sur un extrait aqueux de feuille d'olivier comme seule source de nutriments. La souche est apte à produire de l'hydroxytyrosol dans ce milieu.



**Figure 3:** Profil HPLC d'un extrait aqueux de feuille d'olivier avant et après bioconversion par la souche lactique *Lactobacillus pentosus*. Identification des pics: 1, Oleuropéine; 2, Hydroxytyrosol.

#### Remerciements

Des remerciements sont adressés à l'équipe Ecologie Microbienne et Biotechnologies de l'IMEP et en particulier Mr. Yoan LABROUSSE Et aussi à Mme Marie-Agnès LHOPITAL du service Applications Bactériologie Médicale de la société Biomérieux.

#### Références

- Agusti J. 2007. Mise au point d'une technique de criblage de bactéries lactiques oleuropéinolytiques en vue d'une valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole. Rapport de stage de fin d'étude. Institut Universitaire Professionnalisé «Biodétection, Biocertification, Biodiversité» Université Montpellier II.
- Briante R., Patumi M., Febbraio F., Nucci R. 2004. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic  $\beta$ -glucosidase. *J Biotechnol*, 111: 67-77.
- Jemaia H., Bouaziza M., Fkia I., El Fekib A., Sayadi S. 2008. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interac*, 176: 88-98.
- Marsilio V., Lanza B., Pozzi N. 1996. Progress in table olive debittering: Degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *J American Oil Chemists Soc*, 73: 593-597.
- Servili M., Settanni L., Veneziani G., Esposto S., Massitti O., Taticchi A., Urbani S., Montedoro G. F., Corsetti A. 2006. The Use of *Lactobacillus pentosus* 1MO To Shorten the Debittering Process Time of Black Table Olives (Cv. *Itrana* and *Leccino*): A Pilot-Scale Application. *J Agric Food Chem*, 54: 3869-3875.

# PROCEEDINGS



**Pour un secteur oléicole rénové, rentable et compétitif en Méditerranée**

\*\*\*\*\*

**For a renovated, profitable and competitive Mediterranean olive growing sector**

Edité par:

B. KARRAY (IO, Tunisie)

J. KHECHAREM (IO, Tunisie)

S. ROUSSOS (IRD, France)



## Présentation

Le premier séminaire sur les Biotechnologies et qualité des produits de l'olivier dans le bassin méditerranéen (Olivebioteq-2004) a eu lieu à Errachidia au Maroc en novembre 2004 ([www.olivebioteq.ird.fr](http://www.olivebioteq.ird.fr)). Le deuxième Olivebioteq a eu lieu à Palermo en Sicile Italie en octobre 2006 et le 3<sup>ème</sup> Olivebioteq aura lieu à Sfax Tunisie. L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et plus particulièrement la Délégation à l'Information et à la Communication (DIC) ont participé à la création et à l'essor de ce séminaire de formation permanente des principaux acteurs méditerranéens en oléiculture.

L'histoire de la culture de l'olivier se confond avec celle de la méditerranée au point que l'olivier est devenu le symbole de cette région dans le monde. La gestion et la mise en valeur de l'espace agricole méditerranéen sont de fait fortement liées à la culture de l'olivier et aux conséquences économiques et sociales de la production, de la transformation et de la commercialisation de l'huile d'olive. L'oléiculture traditionnelle prédomine dans la plupart des pays méditerranéens, malgré l'émergence depuis le début des années 1980 d'une oléiculture moderne conduite en irrigué, en intensif et en hyper intensif.

L'évolution des filières huile d'olive dans les différents pays est liée au progrès technique et les politiques mises en œuvre pour favoriser l'organisation de ces filières afin de tirer le meilleur parti des potentialités des marchés. Elles ont bénéficié durant les dernières décennies de plusieurs types d'innovations technologiques résultant des travaux de recherche et des politiques de promotion, de formation, d'incitation et de vulgarisation. Ces innovations se retrouvent dans les principaux maillons des filières: exploitations agricoles, huileries, usines de conditionnement et circuits de distribution.

Malgré l'adaptation de l'olivier aux conditions naturelles et à l'écologie méditerranéennes et les efforts d'innovation déployés par la plupart des pays producteurs, le devenir de ce secteur reste tributaire notamment de la dynamique du marché mondial, des nouvelles dispositions en matière de politique agricole et commerciale au niveau multilatéral (PAC, Cycle de Doha, Accords de libéralisation bilatéraux et régionaux), ainsi que de la structure et du fonctionnement des systèmes de production et d'exportation des différents pays oléicoles.

La plupart des pays méditerranéens se trouvent actuellement dans un contexte économique incertain au sein duquel la prise de conscience des enjeux d'avenir, la rénovation des systèmes de production et d'exportation et l'identification de nouveaux usages et alternatives de valorisation des produits de l'olivier (nutrition, santé, cosmétique, énergie, environnement...) sont devenues impératives afin de renforcer le rôle économique, social et environnemental et la compétitivité de l'olivier.

Pour enrichir le débat autour de cette problématique, l'Institut de l'Olivier organise la troisième édition d'Olivebioteq sur le thème "**Pour un secteur oléicole rénové, rentable et compétitif en Méditerranée**". L'objectif principal de cette édition est de faire connaître et de discuter les acquis de recherches et d'examiner les alternatives de leur valorisation pour l'innovation de la filière huile d'olive en Méditerranée.

La troisième édition d'Olivebioteq a lieu du **15 au 19 décembre 2009 à Sfax (Tunisie)**. Elle est organisée en collaboration avec des organismes nationaux (l'ONH, AVFA, DGPA, DGPCQA, OTD, UTAP, CC, APIA, API et CEPEX) et internationaux (COI, IRD, FAO, Commission Européenne, CIHEAM, AFIDOL).

---

**Institut de l'Olivier**

Route de l'Aéroport— B.P. 1087-3000 Sfax (Tunisie)  
Tél.: (216) 74 241 240 / 74 241 589—Fax: (+216) 74 241 033  
Mail: bo. [iosfax@iresa.agrinet.tn](mailto:iosfax@iresa.agrinet.tn)  
ISBN: 978-9938-9513-0-1

## Presentation

The first seminar on Biotechnology and olive products quality in the Mediterranean (Olivebioteq-2004) has been celebrated in Errachidia, Morocco in November 2004 ([www.olivebioteq.ird.fr](http://www.olivebioteq.ird.fr)). The second Olivebioteq has been celebrated in Palermo, Italy in October 2006 and the 3<sup>rd</sup> Olivebioteq will take place in Sfax, Tunisia. The IRD and the DIC (Délégation à l'Information et à la Communication) were the main participants in the creation and the design of this olive-growing training seminar of principal Mediterranean actors.

The history of the olive tree can be confused with the Mediterranean one at the point to become the symbol of this region in the world. The management and enhancement of agricultural Mediterranean area are strongly related to olive growing and the economic and social consequences of production, processing and commercialisation of olive oil. Despite the emergence since the early 1980s of modern olive cultivation regimes (intensive and hyper-intensive), traditional olive cultivation continues predominating in most Mediterranean countries.

The evolution of olive oil sector in different countries is basically related to technical progress and policies implemented to promote their organisation and to maximize their potential. In fact, in the recent decades, they have benefited from several types of technological innovations as a result of scientific research and policies of promotion, training, encouragement and technical support. These innovations can be observed in the major segments of the olive sector: farms, mills, packaging factories and distribution channels.

Despite the adaptation of the olive tree to natural conditions of the Mediterranean and despite the innovative efforts made by most producers, the future of this sector is particularly dependent on: i) the dynamics of the world market, ii) the new provisions of multilateral agricultural and trade policies (CAP, the Doha Round, bilateral and regional liberalisation agreements), and iii) the structure and functioning of production and export systems of olive producing countries.

Presently, most Mediterranean countries are in an uncertain economic situation in which the consciousness of future challenges, the renovation of production and export systems, the identification of new uses and the alternatives of olive products valorisation (nutrition, health, cosmetics, energy, environment ...) have become imperative to strengthen the economic, social and environmental performance and the olive competitiveness.

To enrich the debate around these issues, the Olive Tree Institute (Institut de l'Olivier) organizes the third edition of Olivebioteq on the theme "For a renovated profitable and competitive Mediterranean olive growing sector." The main objective of this edition is to expose and discuss the results of scientific research and the way to make them useful for the innovation of the Mediterranean olive oil sector.

The third edition of Olivebioteq will take place from 15 to 19 December 2009 in Sfax (Tunisia). It will be organized in collaboration with national organisations (ONH, AVFA, DGPA, DGPCQPA, OTD, UTAP, CC, APIA, API and CEPEX) and international ones (IOOC, IRD, European Commission, CIHEAM, AFIDOL).

---

### Olive Tree Institute

Route de l'Aéroport- B.P. 1087-3000 Sfax (Tunisie)  
Tél.: (216) 74 241 240 / 74 241 589—Fax: (+216) 74 241 033  
Mail: [bo.iosfax@iresa.agrinet.tn](mailto:bo.iosfax@iresa.agrinet.tn)  
**ISBN: 978-9938-9513-0-1**