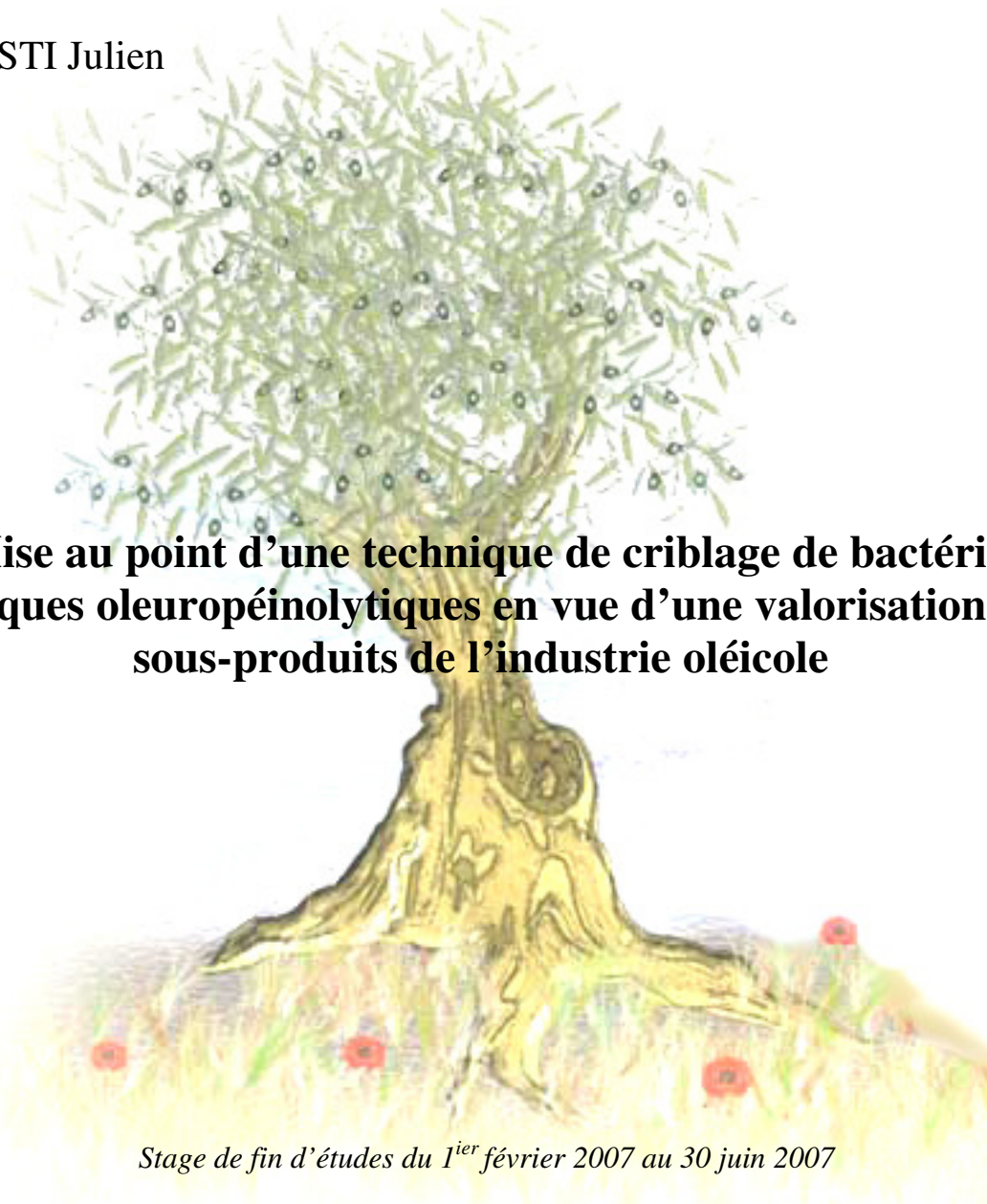


AGUSTI Julien



Mise au point d'une technique de criblage de bactéries lactiques oleuropéinolytiques en vue d'une valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole

Stage de fin d'études du 1^{er} février 2007 au 30 juin 2007

Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur-Maître

*Institut Universitaire Professionnalisé « Biodétection, Biocertification, Biodiversité »
Université Montpellier II*

Directeur de stage : Isabelle Perraud-Gaime

UR 185 IRD Biotrans IMEP
FST St Jérôme - Boîte 441
Université Paul Cézanne
13397 MARSEILLE Cedex 20

Sommaire

▪ INTRODUCTION

- Présentation de l'IRD, de l'Unité BIOTRANS et de l'industrie oléicole *p.1*
- Etat de l'art et problématique *p.2*
- Programme et réalisations *p.3*

▪ MATERIEL ET METHODES

- Origine des sous-produits *p.4*
- Caractérisation biochimique des margions :
 - . Analyse du pH *p.4*
 - . Analyse de l'humidité *p.4*
 - . Analyse RMN *p.4*
- Caractérisation microbiologique des margions :
 - . Analyse de la microflore endogène *p.4*
 - . Activité catalase et coloration de Gram des bactéries *p.5*
 - . Profil fermentaire des bactéries anaérobies *p.5*
 - . Identification des bactéries lactiques *p.6*
 - . Profil enzymatique des bactéries lactiques *p.6*
- Dégradation de l'oleuropéine *p.7*

▪ RESULTATS

- Caractérisation biochimique du substrat *p.8*
- Caractérisation microbiologique du substrat *p.8-9*
- Dégradation de l'oleuropéine *p.9-10*

▪ DISCUSSION

p.12

▪ CONCLUSION

p.14

L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) est un Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST). Depuis 60 ans, il conduit des activités de recherche, d'expertise, de formation en Afrique, en Amérique latine, en Asie et dans l'Outremer tropical français. Les chercheurs de l'IRD se consacrent à l'étude des milieux et de l'environnement, de la gestion durable des ressources vivantes, du développement des sociétés et de la santé, en étroite concertation avec leurs partenaires des pays du Sud [1].

L'Unité de Recherche « Biotrans » est une unité de l'IRD, nouvellement rattachée à l'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléontologie (IMEP). Elle étudie la biodiversité et l'écologie fonctionnelle des microorganismes pour la transformation des composés récalcitrants. Cette unité, basée à la faculté des sciences et techniques de St Jérôme à Marseille, est composée de trois techniciens et de cinq chercheurs de l'IRD qui travaillent en collaboration avec des enseignants chercheurs du laboratoire de l'IMEP de Marseille et avec trois partenaires du Sud : Université Fédérale du Parana (Brésil), Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (Rabat, Maroc) et Université Autonome Métropolitaine d'Iztapalapa (Mexique) [1]. Pour mener à bien toutes ses missions, l'unité Biotrans dispose d'un laboratoire de microbiologie (équipé d'une hotte à flux laminaire et du matériel classique de microbiologie) ainsi que d'un laboratoire de biochimie (équipé d'une plateforme HPLC et du matériel classique de biochimie). Elle dispose d'un budget annuel de 75 000 € TTC, attribué par le Ministère de la Recherche, afin d'assurer son fonctionnement et le renouvellement de son matériel.

Elle constitue un groupe pluridisciplinaire pour étudier différents aspects fondamentaux du point de vue écologique, microbiologique et biochimique, de la transformation de composés récalcitrants (polyphénols, tanins condensés, etc.) présents dans une biomasse agricole actuellement non valorisée et souvent polluante, pour un développement durable. Historiquement, ses travaux se sont portés sur différents sous-produits d'origine agricole : sur les sous-produits de l'industrie du manioc, sur la bagasse (industrie sucrière), sur la pulpe et les coques (industrie caféière) et actuellement, sur les grignons et les margions (industrie oléicole).

L'unité a été amenée à s'intéresser aux sous-produits de l'industrie oléicole car c'est une industrie très importante dans la région méditerranéenne. Avec plus de 4% de croissance annuelle, la production d'huile d'olive et d'olives de table est un des secteurs agro-alimentaires ayant la croissance la plus rapide en Europe. Plus de 12 millions de tonnes d'olives sont produites chaque année dans l'Union Européenne desquelles sont produites environ 2 millions de tonnes d'huile d'olive[2]. Cette croissance est due à l'attrait grandissant des consommateurs pour l'huile d'olive qui est un produit naturel, noble et possédant de nombreuses vertus pour la santé [3].

La fabrication de l'huile d'olive vierge requiert des techniques uniquement mécaniques. L'huile d'olive est contenue dans la vacuole des cellules de l'olive. Pour lyser les parois des cellules et des vacuoles, les olives sont broyées, souvent entières. La pâte obtenue a une consistance plus ou moins liquide en fonction des variétés d'olives et de l'époque de la cueillette. Cependant, pour libérer un maximum d'huile, la pâte est ensuite malaxée. Ces deux étapes, broyage et malaxage, permettent l'obtention d'une pâte composée d'une fraction solide (débris de noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires,...) appelée grignons et d'une fraction liquide (huile et eau de végétation). L'étape suivante (séparation des phases) consiste à séparer ces deux fractions solide et liquide. Enfin, la dernière étape sépare la partie aqueuse (margines) de la partie huileuse, contenues dans la fraction liquide.

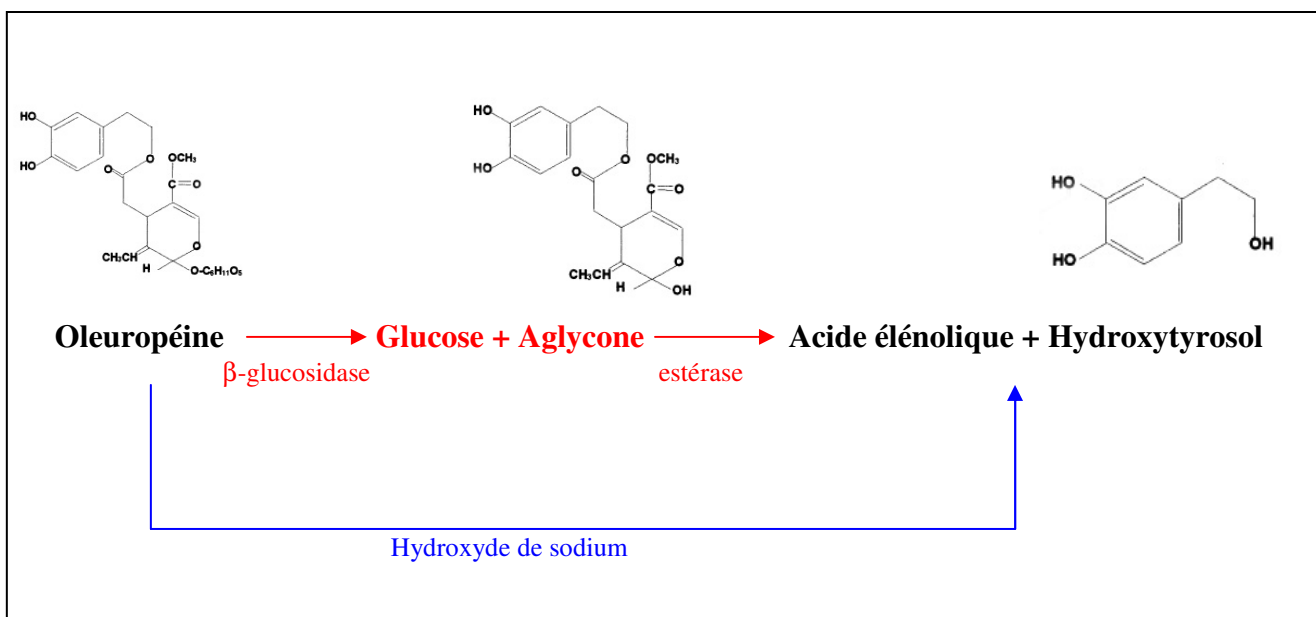


Figure 1 : **Voies d'hydrolyse de l'oleuropéine** [10]

En rouge, hydrolyse enzymatique

En bleu, hydrolyse chimique

Plusieurs procédés peuvent être appliqués pour extraire l'huile contenue dans les olives [4]:

-le procédé discontinu ou « système à presse »

-les procédés continus à deux ou trois phases ou « systèmes à centrifugation ».

Quelque soit le procédé utilisé, la production d'huile d'olive engendre des sous-produits solides et liquides. En effet, l'industrie oléicole européenne génère annuellement 4 600 000 tonnes de sous-produits liquides (margines) et 6 800 000 tonnes de sous-produits solides (grignons) [5]. Ces grignons sont des substances qui sont parfois valorisées thermiquement (brûlées pour obtenir de l'énergie), compostées ou bien servant à l'alimentation animale [6]. Avec l'essor des nouveaux systèmes continus à deux phases est apparu un nouveau type de sous-produit : les « margions » (terme né de la contraction de « margines » et « grignons »). Ces nouveaux sous-produits ont de nouvelles propriétés physico-chimiques comme un taux d'humidité important et une haute teneur en composés phénoliques [7, 8]. Ainsi, ces sous-produits ne peuvent ni être valorisés thermiquement à cause de leur trop forte humidité, ni être utilisés comme fertilisants ou comme aliments pour animaux de part la présence de composés phénoliques phytotoxiques ou amers [9]. Il faut donc développer de nouvelles voies de valorisation de ces sous-produits qui répondent aux contraintes imposées par leurs propriétés.

Un des principaux composés phénoliques contenus dans les olives est l'oleuropéine. Celle-ci est responsable de l'amertume des olives [10, 11]. Cette molécule appartient au groupe très spécifique des secoiridoïdes qui sont très abondants dans les Oleaceas, les Gentianales, les Cornales et bien d'autres plantes [11]. Les secoiridoïdes sont des composés, généralement liés par une liaison glycosidique, produits du métabolisme secondaire des terpènes comme précurseurs de divers alcaloïdes indolés. L'oleuropéine est un ester hétérosidique d'acide élénolique et de 2'-(3',4'-dihydroxyphenyl)ethanol, ou « hydroxytyrosol ». Elle est présente en grande quantité (60-90 mg.g⁻¹ MS) [11] dans les feuilles d'olivier et on en retrouve dans tout l'arbre, incluant tous les constituants du fruit, à savoir, l'épiderme, la pulpe et la graine.

Divers travaux ont été réalisés sur les propriétés de l'oleuropéine et sur la dégradation de cette molécule par des microorganismes comme les bactéries lactiques. Il a été démontré que l'oleuropéine possède des propriétés antimicrobiennes dirigées contre certaines bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteridis*) [11]. D'autre part, Ciafardini *et al* 1994 [12] et Marsilio *et al* 1996 [13] ont montré que l'oleuropéine pouvait être hydrolysée par une souche de *Lactobacillus plantarum* isolée à partir des saumures de fermentation d'olives. En effet, l'oleuropéine peut être hydrolysée (figure 1) par une enzyme, la β -glucosidase, en glucose plus aglycone d'oleuropéine, puis l'aglycone d'oleuropéine est dégradé par une estérase en composés non amers : l'acide élénolique et l'hydroxytyrosol [10, 12].

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram-positif, immobiles, asporulées, catalase (-), anaérobies facultatives, capables de produire de l'acide lactique D(-), L(+) ou DL. Elles ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant des glucides, produit soit exclusivement de l'acide lactique (bactéries homofermentaires ou homolactiques), soit de l'acide lactique, acétique et propionique (bactéries hétérofermentaires ou hétérolactiques facultatives), soit de l'éthanol et du CO₂ en plus des acides cités précédemment (bactéries hétérofermentaires ou hétérolactiques strictes). Les bactéries lactiques exercent une activité inhibitrice sur le développement de microorganismes indésirables et pathogènes grâce à la production d'acides organiques (acide lactique en

particulier), de peroxyde d'hydrogène ou d'inhibiteurs spécifiques telles que les bactériocines [14]. Cette caractéristique est utilisée dans l'ensilage, qui est une méthode de conservation basée sur une fermentation durant laquelle les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique en fermentant les glucides hydrosolubles en conditions anaérobies[15].

En considérant tout ceci, une nouvelle voie de valorisation, grâce aux bactéries lactiques, des sous-produits de l'industrie oléicole pourrait être développée. Les bactéries lactiques pourraient être utilisées pour hydrolyser l'oleuropéine lors d'une fermentation anaérobie ou bien la β -glucosidase pourrait être purifiée et utilisée en bioréacteur enzymatique [16, 17] pour désamériser les sous-produits de l'industrie oléicole. Ceux-ci pourraient ensuite être utilisés en alimentation animale ou humaine (élaboration de « tapenade »). Ces souches de bactéries lactiques oleuropéinolytiques (dégradant l'oleuropéine) pourraient, par la suite, être utilisées dans d'autres procédés agro-alimentaires. Par exemple, cela permettrait d'éviter l'utilisation d'hydroxyde de sodium (soude) pour hydrolyser l'oleuropéine (figure 1) lors de l'élaboration d'olives de table.

Cependant, il ne semble exister à l'heure actuelle que quelques souches de bactéries lactiques publiées capables d'hydrolyser l'oleuropéine (*Lactobacillus plantarum* B17, B20, B21 et ATCC 8014) [12, 13]. Il faut donc rechercher de nouvelles souches ayant une telle propriété.

L'objectif de ce travail est donc, dans un premier temps, de caractériser biochimiquement et microbiologiquement un type de sous-produits de l'industrie oléicole, les margions, et dans un second temps, d'effectuer un criblage de bactéries lactiques oleuropéinolytiques en vue d'une valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole.

La caractérisation biochimique a été effectuée en analysant le pH, l'humidité et la composition chimique des sous-produits. Cette dernière a été déterminée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ces caractérisations biochimiques ont été effectuées afin d'orienter la stratégie sur le criblage de bactéries lactiques oleuropéinolytiques ainsi que pour servir de base de travail à l'unité Biotrans pour effectuer des travaux sur des méthodes de conservation des sous-produits de l'industrie oléicole. La caractérisation microbiologique a été effectuée afin de déterminer, de quantifier et d'identifier la microflore endogène du substrat. Afin d'identifier les bactéries lactiques, ont été réalisés test catalase, coloration de Gram, profils fermentaires et galerie API. Le but est d'isoler des bactéries lactiques endogènes qui semblaient être les plus susceptibles de dégrader l'oleuropéine.

La seconde grande partie de cette étude porte sur le criblage de bactéries lactiques oleuropéinolytiques. Pour ce faire, le profil enzymatique des différentes souches a été déterminé afin de mettre en évidence la présence de la β -glucosidase ainsi que de l'estérase, enzymes impliquées dans le processus d'hydrolyse de l'oleuropéine. Ensuite, un suivi cinétique de la concentration en oleuropéine du milieu de croissance a été analysé par HPLC après inoculation par différentes souches bactériennes afin de tester leur capacité oleuropéinolytique.

MATERIEL ET METHODES

Origine des sous produits

Cette étude porte sur un seul type de sous produits d'industrie oléicole. Il s'agit de margions provenant d'olives d'origine italienne issus de la campagne 2007 et broyées dans un système continu à deux phases.

Caractérisation biochimique du substrat

Analyse du pH

Le pH des sous produits a été mesuré avec un pHmètre CyberScan510 (Eutech Instruments), 5 min après avoir mélangé 1 g de sous produits dans 10 ml d'eau désionisée.

Analyse de l'humidité

La teneur en eau des margions a été déterminée sur différents échantillons en utilisant un analyseur d'humidité MA 45 (Sartorius).

Analyse RMN

Le substrat à étudier (Margions) a été caractérisé par Résonance Magnétique Nucléaire en collaboration avec le Spectropole de Marseille. Pour ce faire, l'échantillon de margions a été tamisé à 1 mm pour éliminer les fragments de noyaux et ne garder que la pulpe d'olive. Celle-ci a ensuite été déshydratée en utilisant un analyseur d'humidité MA 45 (Sartorius). Puis, l'échantillon a été préparé en mélangeant 5 mg de pulpe déshydratée dans 50 μ l d'eau deutérée (D_2O). Cette opération était destinée à réduire les signaux provenant des protons de l'eau ; en effet, le deutérium émet des signaux à une autre fréquence donc n'interfère pas avec les signaux émis par notre échantillon. Un échantillon standard d'oleuropéine a préalablement été analysé. Il était composé de 0,5 mg d'Oleuropéine (ref 0204, Extrasynthèse) en solution dans 100 μ l d'eau deutérée. L'échantillon de pulpe et l'échantillon standard ont été étudiés par la technique RMN de High Resolution Magic Angle Spinning du proton (1H-HRMAS NMR) en utilisant un spectromètre BRUKER Avance WB-400 MHz équipé d'une sonde BRUCKER « HRMAS 400 SB BL4 ». Les échantillons ont été tournés à une vitesse de 3,5 kHz dans un rotor en zirconium dont le volume est de 50 μ l. La durée d'un spectre est de 20 min. Les résultats ont été analysés grâce au logiciel XWIN NMR 3.5.

Caractérisation microbiologique du substrat

Analyse de la microflore endogène

Un échantillon de 10 g de margions a été mélangé, en conditions aseptiques, dans 90 ml d'eau stérile tweenée (Tween 80, Sigma, 1ml.l⁻¹). Cette opération a été réalisée sur deux échantillons de substrat congelé à -20°C et 2 échantillons de substrat conservé à 4°C. Les mélanges ont été agités à l'agitateur magnétique à 850 rpm pendant 10 min pour bien mettre en suspension les microorganismes potentiellement présents. Puis 10 ml de chaque solution ont été prélevés pour être dilués dans 90 ml d'eau stérile tweenée (Tween 80, Sigma, 1ml.l⁻¹) afin d'obtenir une solution diluée à 10⁻¹, elle-même agitée à 850 rpm pendant 10 min. A partir de cette dernière solution, des dilutions de 10⁻² à 10⁻⁵ ont été effectuées pour chaque échantillon. Une goutte de 20 μ l de chaque dilution a été déposée sur une boîte de Pétri,

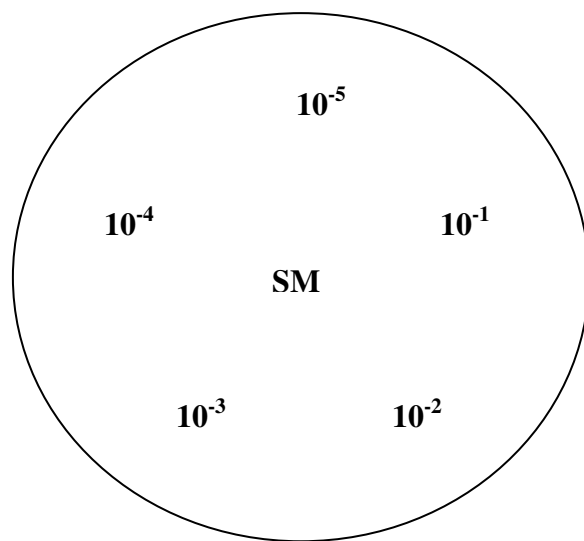


Figure 2 : **Répartition des points sur la boîte de Pétri** [18]

SM : Solution mère
 10^{-n} : dilution au 10^n ième

réalisée en triplica (figure 2). Parallèlement, pour confirmer la technique par point, 200 µl de chaque dilution de l'échantillon de margions frais ont été étalés sur des boîtes de Pétri, en triplica, au moyen de 5 billes de verre stériles de 4 mm de diamètre [18].

Pour chaque échantillon, la microflore totale a été estimée par culture sur milieu PCA (Plate Count Agar, ref 70152, Fluka) à 28°C pendant 48 h en conditions aérobies ; les champignons filamenteux et levures ont été estimés par culture sur milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar, ref P2182, Sigma), auquel a été ajouté un antibactérien (chloramphénicol, ref 23275, Fluka, 0,25 g.l⁻¹), à 28°C pendant 48h en conditions aérobies et les bactéries et levures anaérobies ont été estimées et isolées par culture sur milieu MRS (MRS Agar « De Man, Rogosa, Sharpe », ref 69964, Fluka) à 28°C pendant 48h en conditions anaérobies (jarre anaérobie GasPak + sachet GENbox anaer, ref 96124, Biomérieux).

Les champignons ont été dénombrés grâce à des observations macroscopiques. Les levures et bactéries ont été discriminées et dénombrées grâce à des observations microscopiques (x 400). Les comptages microbiologiques ont été exprimés en Unité Formant Colonie par gramme de Matière Sèche (UFC .g⁻¹ MS) et ont été calculés grâce à la formule suivante [18]:

$$\frac{\text{Nombre de colonies}}{D * P * \% \text{ MS}}$$

Avec *D* : facteur de dilution, *P* : poids de l'échantillon en gramme, %MS : teneur en matière sèche de l'échantillon

Activité catalase et coloration de Gram

Les bactéries anaérobies isolées ont été testées pour l'activité catalase en déposant une colonie dans une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 % (ref 88597, Fluka). La formation immédiate de bulles indique une activité catalase positive des bactéries [19].

Les bactéries catalase négatives ont ensuite été testées pour la coloration de Gram. Pour cela, chaque colonie a été suspendue dans 2 ml d'eau distillée stérile, puis une goutte de cette solution a été déposée sur une lame et fixée à la chaleur. Puis la lame a été colorée 1 minute au violet de gentiane, rincée à l'eau, colorée 30 secondes au lugol, rincée à l'eau, décolorée à l'alcool à 90°, rincée à l'eau et enfin colorée à la safranine 1 minute et rincée à l'eau. Après coloration, la lame a été observée au microscope (x 1000). Les bactéries Gram(+) sont colorées en violet et les bactéries Gram(-) sont colorées en rose [19].

Profil fermentaire

Afin de vérifier la production d'acides organiques (et notamment d'acide lactique), le profil fermentaire des différentes souches de bactéries anaérobies, Gram (+), catalase (-) a été réalisé. Pour ce faire, une préculture de 24 h à 28 °C sur milieu MRS a été réalisée à partir des colonies isolées. Ces précultures ont permis d'inoculer à 10 % les milieux MRS réalisés en duplica et incubés 24h à 28 °C.

Ensuite, 2 ml ont été prélevés dans chaque tube et centrifugés à 14500 rpm pendant 10 min à 4°C dans des tubes Eppendorf. Le surnageant a été filtré à 0,22 µm et analysé par Chromatographie Liquide Haute Performance à l'aide d'une plateforme HPLC-DAD Agilent technologies 1200 Series.

La plateforme HPLC est composée d'un dégazeur (1200 Series Degasser, Agilent technologies), d'une pompe quaternaire (1200 Series Quaternary Pump, Agilent technologies), d'un échantillonneur liquide automatique ou « passeur » (1200 Series Automatic Liquid Sampler, Agilent technologies) et d'un détecteur à barrette de diodes (1200 Series Diode-Array Detector, Agilent technologies). La colonne utilisée est une Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) Biorad gardée à une température constante (température ambiante

de 23°C). La phase mobile est composée d'eau distillée acidifiée à l'acide sulfurique (H₂SO₄) 5 mM et filtrée à 0,45 µm. Le flux de solvant est de 0,6 ml.min⁻¹ et le mode d'élution est isocratique [20]. Le temps d'analyse est de 25 min par échantillon et le volume d'échantillon injecté est de 20 µl. Les différents acides organiques ont été détectés à 210 nm. Des solutions étalons de différents acides organiques (acide lactique, acétique, propionique, citrique, formique, butyrique) à différentes concentrations (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 20 g.l⁻¹) ont été préalablement analysées afin de déterminer les temps de rétention de ces composés et d'établir les courbes de calibration nécessaire à leur quantification.

La plateforme est pilotée par le logiciel ChemStation Agilent technologies et les données traitées par le même logiciel.

Identification des bactéries lactiques

Les différentes souches de bactéries anaérobies, Gram (+), catalase (-) et produisant de l'acide lactique ont été identifiées à l'aide de galeries API 50 CH (ref 50 300, Biomérieux). Une galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrats, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les souches à identifier ont été étalées sur boîte de Pétri contenant un milieu MRS et incubées à 28°C pendant 48 h en conditions anaérobies afin de vérifier leur pureté. Puis une colonie a été mise en suspension dans 2 ml de Suspension Medium (ref 70700, Biomérieux) afin d'obtenir une densité bactérienne égale à 2 Mc Farland. Celle-ci a été contrôlée visuellement en comparant avec les standards Mc Farland (ref 70 900, Biomérieux). Les galeries API 50 CH ont été inoculées avec cette solution bactérienne à raison de 100 µl par puits. Les puits ont ensuite été recouverts de 2 gouttes d'huile de paraffine afin de créer des conditions anaérobies. Les galeries ont été incubées 48 h à 28°C. La fermentation des différents substrats contenus dans les puits a été révélée par un changement de couleur (du bleu au jaune) dû à l'acidification causée par la croissance bactérienne. Puis, les profils obtenus ont été identifiés par le service Applications Bactériologie médicale de la société Biomérieux à l'aide du logiciel APIweb.

Profil enzymatique

Le profil enzymatique des souches de bactéries lactiques a été étudié grâce aux galeries API ZYM (ref 25200, Biomérieux). En effet, la galerie API ZYM est une microméthode semi-quantitative de recherche d'activités enzymatiques. Elle permet d'étudier rapidement et simultanément 19 activités enzymatiques dont celle de la β-glucosidase et de l'estérase, enzymes impliquées dans la dégradation de l'oleuropéine. Pour chaque souche, une suspension bactérienne de densité 5-6 sur l'échelle de Mc Farland a donc été préparée à partir de cultures en bouillon MRS de 24 h. Puis cette suspension a été distribuée dans les 20 puits de la galerie API ZYM à raison de 65 µl par puits. La galerie a ensuite été incubée 5 h à 28 °C. Après incubation, une goutte de réactif ZYM A (ref 70494, Biomérieux) et une goutte de réactif ZYM B (ref 70493, Biomérieux) ont été ajoutées dans chaque puits afin de développer les colorations révélant les activités enzymatiques. Après 10 minutes, la lecture des galeries a pu être effectuée : les activités enzymatiques positives ont été révélées par une coloration violette, orange, bleue ou marron selon les puits.

Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B	Flux (ml.min-1)
0	95	5	0,9
3	85	15	0,9
13	75	25	0,9
25	65	35	0,9
35	55	45	0,9
40	50	50	0,9
45	0	100	0,9
46	95	5	0,9

Tableau 1 : **Gradient appliqué lors du dosage de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol par HPLC**

Dégradation de l'oleuropéine

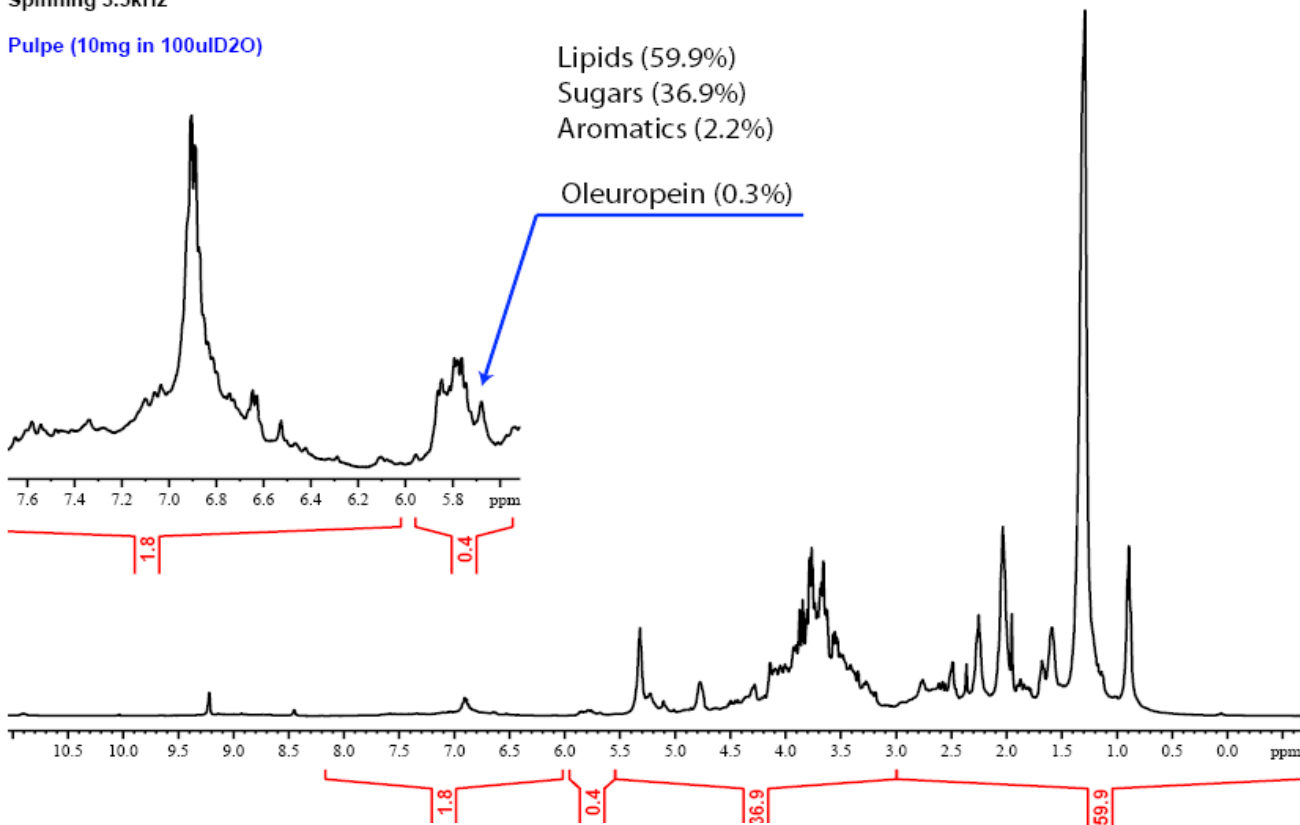
Pour suivre la dégradation de l'oleuropéine par les microorganismes et tester leur capacité oleuropéinolytique, des bactéries lactiques ont été cultivées à 28°C sur milieu MRS liquide inoculé à 10% et additionné d'1 % d'oleuropéine (ref 0204, Extrasynthèse) Les teneurs en oleuropéine et en hydroxytyrosol du milieu de culture ont été analysées sur des prélèvements effectués à 48 h, 72 h, 96 h (4 jours), 144 h (6 jours), 216 h (9 jours), 264 h (11 jours) et 312 h (13 jours).

Pour ce faire, 1 ml du milieu de croissance a été prélevé et centrifugé à 12500 rpm pendant 10 min à 4°C dans un tube Eppendorf. Le surnageant a été filtré à 0,22µm puis analysé par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC-DAD) grâce à la plateforme 1200 Series Agilent technologies décrite précédemment. La colonne utilisée était une Atlantis dC₁₈ (5µm, 4,6 x 250 mm) Waters gardée à une température constante (température ambiante de 23°C). L'élution a été réalisée en mode gradient grâce à un mélange de solvants binaire composé d'eau, acidifiée par 5% d'acide formique (solvant A), et de méthanol à 100 % (solvant B) [21]. Le gradient a été optimisé à partir des conditions de Vinha *et al.* [21] de la façon suivante : 5 % B à 0 min, 15 % B à 3 min, 25 % B à 13 min, 35 % B à 25 min, 45 % B à 35 min, 50 % B à 40 min, 100 % B à 45 min et enfin 5 % B à 46 min (tableau 1). Le temps total d'analyse d'un échantillon est de 50 min. La colonne a été rééquilibrée pendant 4 min entre chaque analyse. Le flux de solvant est de 0,9 ml.min⁻¹ et le volume d'injection de chaque échantillon était de 20 µl. L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol ont été détectés à 280 nm. Des solutions étalons de différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 g.l⁻¹) d'oleuropéine (ref 0204, Extrasynthèse) et de différentes concentrations (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 g.l⁻¹) d'hydroxytyrosol (ref 4986, Extrasynthèse) ont été préalablement analysées afin de déterminer le temps de rétention de ces composés et d'établir les courbes de calibration nécessaire à leur quantification.

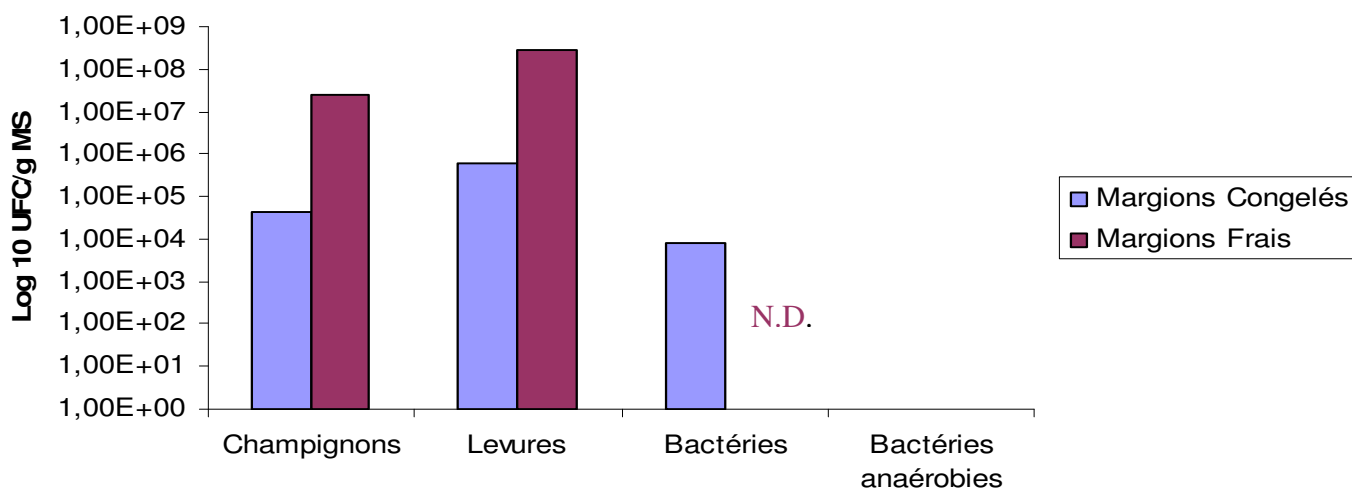
La plateforme HPLC est pilotée par le logiciel Chem Station Agilent technologies et les données traitées par le même logiciel.

1H HRMAS
Spinning 3.5kHz

Pulpe (10mg in 100ulD2O)



Graph 1 : Spectre RMN de la pulpe d'olives contenue dans les margions.



Graph 2 : Microflore des margions frais et congelés
Résultats exprimés en UFC.g⁻¹ MS

Substrat \ Microorganisme	Margions Congelés	Margions Frais
Champignons	4,24E+04	2,56E+07
Levures	6,19E+05	2,77E+08
Bactéries aérobies	8,27E+03	0,00E+00
Bactéries anaérobies	0,00E+00	0,00E+00

Tableau 2 : Dénombrement de la microflore de margions
Résultats exprimés en UFC.g⁻¹ MS

RESULTATS

Caractérisation biochimique du substrat

Analyse du pH et de l'humidité

Les margions ont un pH de $5,40 \pm 0,01$ et un taux d'humidité de $65,07 \% \pm 1,53 \%$.

Analyse RMN

L'analyse RMN HRMAS de la pulpe filtrée des margions a permis de mettre en évidence sa composition biochimique. La lecture des spectres permet d'affirmer que la pulpe est principalement composée de 59,9 % de composés lipidiques, de 36,9 % de composés glucidiques (et notamment de galactose), de 2,2 % de composés aromatiques et de 1 % d'aldéhydes (Graphe 1). Les signaux émis par les différents composés lipidiques sont compris entre 0 et 3 ppm. Ceux émis par les composés glucidiques sont compris entre 3 et 5,6 ppm et en particulier les signaux caractéristiques du galactose sont émis à 4,51 ppm et 5,28 ppm. Les signaux émis par les composés aromatiques sont compris entre 5,6 et 8,2 ppm et enfin ceux des aldéhydes entre 8,2 et 11. Parmi les composés aromatiques de la pulpe, la présence de l'oleuropéine a pu être mise en évidence par comparaison avec le spectre du standard (graphe annexe 1). La quantité d'oleuropéine a été estimée à 15 % des 2,2 % de composés aromatiques, soit 0,3% de la matière sèche totale, soit 3 g par kg de pulpe sèche.

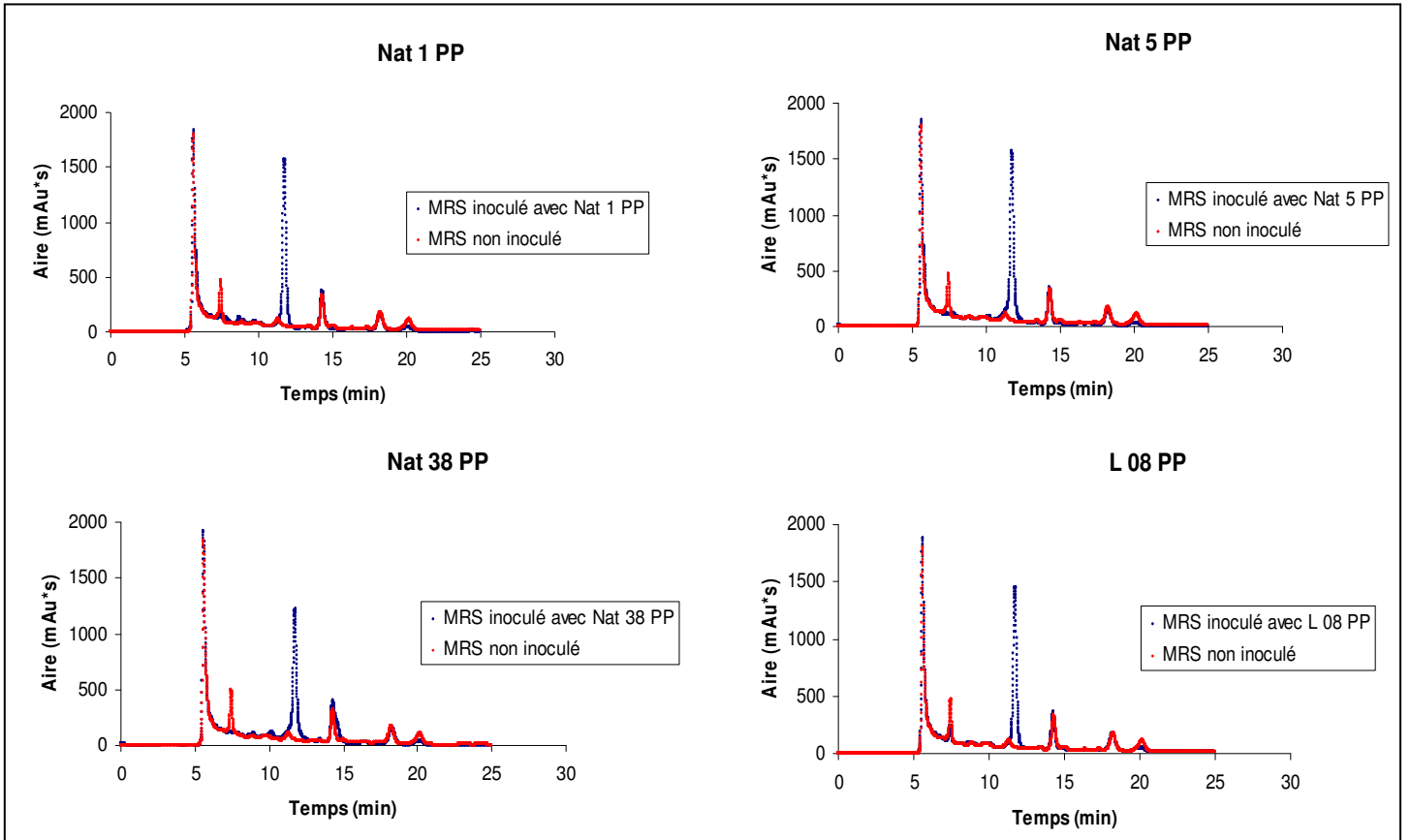
Caractérisation microbiologique du substrat

Analyse de la microflore endogène

L'analyse microbiologique des margions frais et congelés a permis de mettre en exergue une grande hétérogénéité dans la composition de la microflore endogène. En effet, celle-ci est composée de champignons filamenteux, de levures et de bactéries aérobies. Le dénombrement des microorganismes des margions sur les différents milieux révèle que les margions congelés contiennent $4,24E+04$ champignons filamenteux, $6,19E+05$ levures et $8,27E+03$ bactéries aérobies par gramme de substrat sec (tableau 2). Les margions frais, conservés à 4 °C, contiennent $2,56E+07$ champignons filamenteux et $2,77E+08$ levures par gramme de substrat sec. Les bactéries aérobies des microorganismes n'ont pas pu être déterminées du fait de leur faible quantité par rapport aux deux populations microbiennes précédentes.

Il est à noter que la différence du mode de conservation des margions a influencé la composition de la microflore. En effet, les quantités de champignons et de levures sont respectivement 600 et 400 fois plus importante dans les margions frais que dans les margions congelés. Aucune souche de bactéries lactiques n'a pu être isolée des margions.

Afin de pouvoir mettre en place une méthode permettant d'évaluer la capacité oleuropéinolytique de microorganismes, 4 souches de bactéries lactiques ont été sélectionnées au sein de la collection de l'unité Biotrans IRD pour être utilisées comme souches de travail. Il s'agit de L 08 PP, Nat 1 PP, Nat 5 PP et Nat 38 PP. L 08 PP a été isolée à partir d'un ensilage de 1 mois de pulpe de café lyophilisé originaire de Colombie. Cette souche a précédemment été identifiée comme *Lactobacillus plantarum* grâce à la technique Midi System (technique d'identification de bactéries par analyse de la composition des acides gras de la paroi cellulaire). Les souches Nat 1 PP, Nat 5 PP et Nat 38 PP ont été isolées d'un ensilage de 1 mois de pulpe de café fraîche originaire de la région de Xalapa Veracruz au Mexique. La souche Nat 1 PP a été identifiée comme *Weisella confusa* (genre proche de



Graph 3 : Chromatogrammes des profils fermentaires des différentes souches



Figure 3 : Profil des galeries API



Figure 4 : Profil des galeries API ZYM

Lactobacillus plantarum) par le Midi system, la Nat 38 PP comme *Lactobacillus plantarum* et la Nat 5 PP n'a pas pu être identifiée mais apparaît au sein du groupe des *Weissella* dans l'arbre phylogénétique élaboré par Midi system.

Activité catalase et coloration de Gram

Les 4 souches sélectionnées sont toutes catalase (-) et Gram (+). Ceci corrobore leur appartenance au groupe des bactéries lactiques.

Profil fermentaire

La calibration de la plateforme HPLC a permis de déterminer les temps de rétention des différents acides organiques recherchés. Le temps de rétention est donc de 11,75 min pour l'acide lactique ; 14,29 min pour l'acide acétique ; 16,95 min pour l'acide propionique ; 7,45 min pour l'acide citrique ; 13,09 pour l'acide formique et enfin 21,01 min pour l'acide butyrique. Les quantités d'acides organiques produits au cours des fermentations ont pu être déterminées grâce aux courbes étalons (annexe 2).

Les profils fermentaires des 4 souches susnommées ont été réalisés et comparés au profil du milieu MRS non inoculé (graphe 3). Les 4 souches ne produisent que de l'acide lactique en quantité différente en fonction des souches. En effet, la production d'acide lactique à 24 h est de 24,3 g.l⁻¹ pour la souche Nat 5 PP ; de 22,5 g.l⁻¹ pour la souche Nat 1 PP ; de 20,3 g.l⁻¹ pour la souche L 08 PP et enfin de 19,6 g.l⁻¹ pour la souche Nat 38 PP. Au vu de ces valeurs et du fait qu'aucun autre acide organique n'aie été produit, les 4 souches ont été caractérisées comme étant homofermentaires.

Identification des bactéries lactiques

L'identification des souches a été réalisée grâce aux galeries API 50 CH. Les 4 souches ont eu des profils de galerie API différent (Figure 3). Malgré ces différences, les 4 souches ont été identifiées comme *Lactobacillus plantarum*1 par le logiciel APIWeb avec un pourcentage d'identification de 99,9 % et l'identification des souches a été qualifiée d' « excellente » par le logiciel. Ces résultats suggèrent la nécessité de compléments d'identification.

Profil enzymatique

Les galeries API ZYM ont permis d'observer l'activité de 19 enzymes des 4 souches (Figure 4). Les souches Nat 1 PP et L 08 PP ont été caractérisée comme ayant le même profil enzymatique. Pour ces deux souches, 9 activités enzymatiques ont été mises en évidence. La souche Nat 5 PP a un profil semblable aux 2 souches précédentes hormis le fait qu'elle présente une activité estérase et estérase-lipase plus importante. Enfin, la souche Nat 38 PP est celle qui a le profil enzymatique le plus faible. En effet, seules 6 activités enzymatiques ont été mises en évidence et la plus faible intensité dans la coloration des puits indique que ces activités enzymatiques sont moins importantes ou que l'enzyme est présente en plus faible quantité.

Dégradation de l'oleuropéine

Les galeries API ZYM ont pu mettre en évidence les activités β -glucosidase et estérase des souches (Figure 5). Les souches Nat 1 PP et L 08 PP semblent avoir les mêmes activités

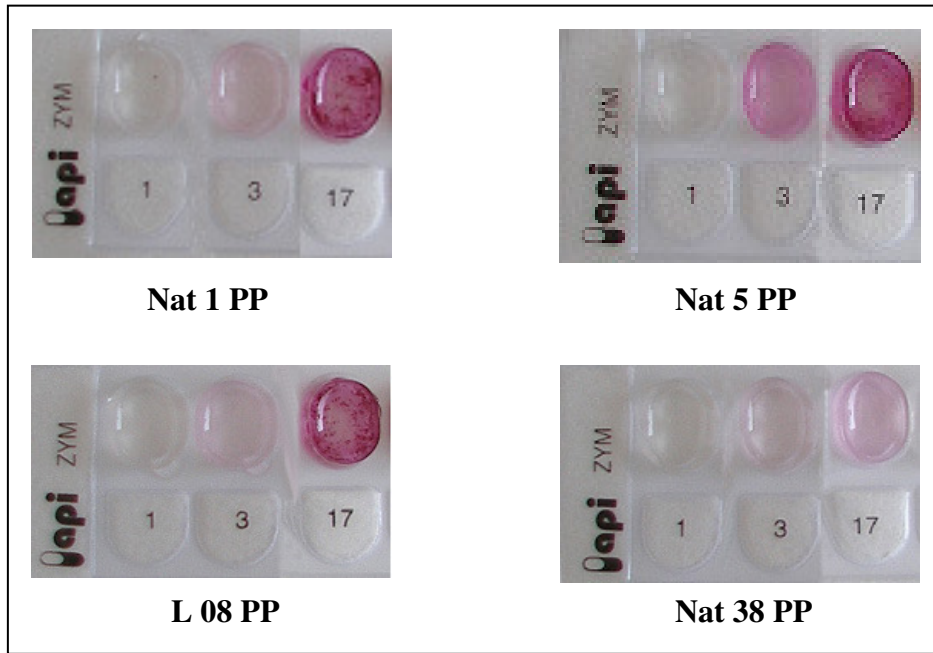
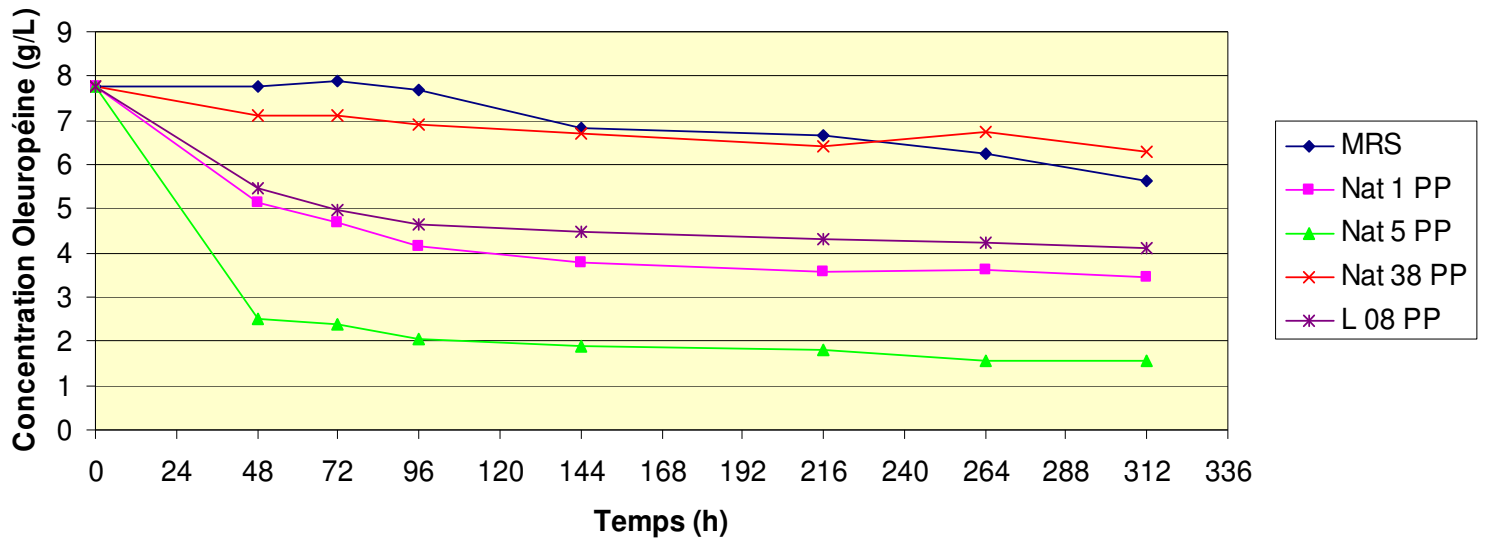
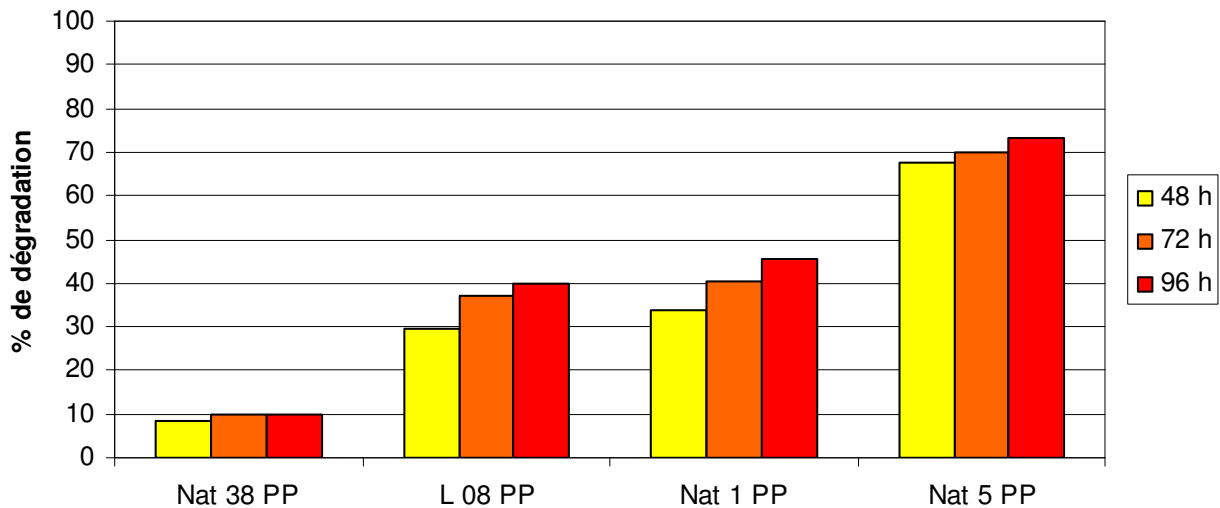


Figure 5 : **Activité des enzymes d'intérêt**
 Cupule 1 : Témoin, Cupule 3 : Estérase
 Cupule 17 : β -glucosidase



Graph 4 : **Cinétique de dégradation de l'Oleuropeine**



Graph 5 : **Pourcentage de dégradation des 4 souches à 48 h, 72 h et 96 h.**

pour ces enzymes. Ces souches ont une forte activité β -glucosidase et une faible activité estérase. La souche Nat 5 PP possède une forte activité β -glucosidase et estérase. Par contre, la souche Nat 38 PP possède une très faible activité β -glucosidase et ne possède pas d'activité estérase.

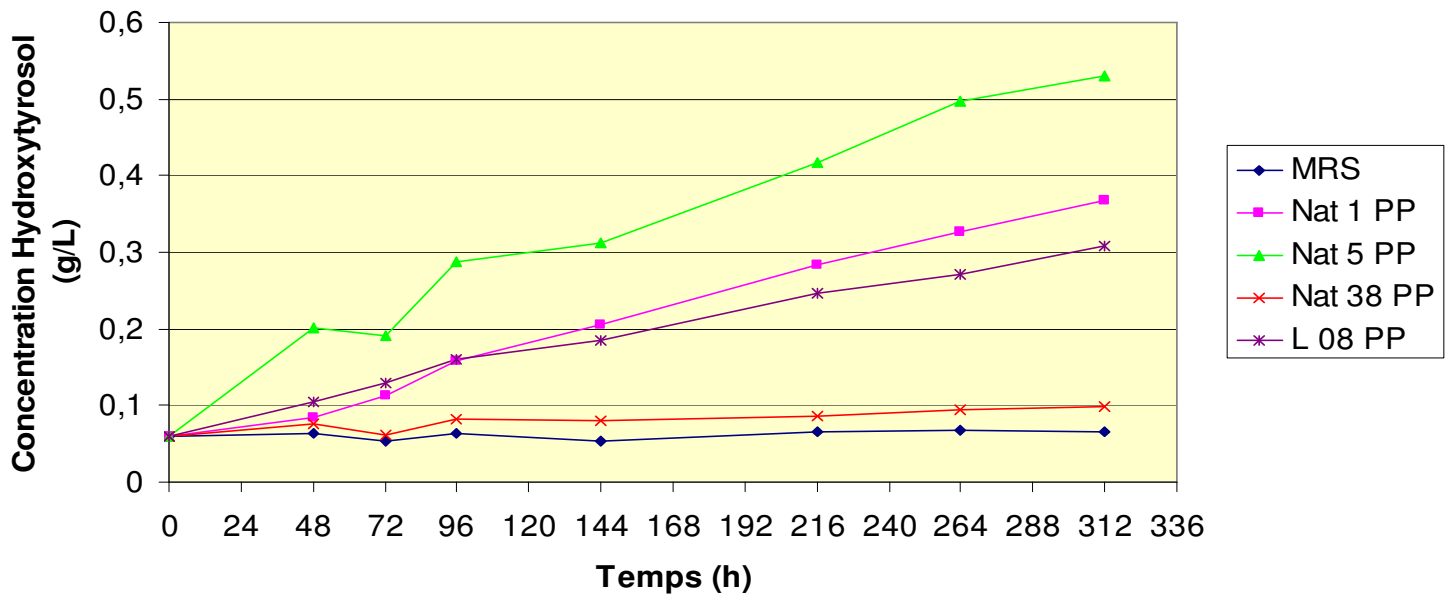
La calibration de la plateforme HPLC a permis de déterminer les temps de rétention de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol qui sont de 33,84 et 8,76 min respectivement. Les concentrations en oleuropéine et en hydroxytyrosol des milieux de cultures ont été calculées grâce aux courbes étalons (Annexe 3).

La concentration en oleuropéine du milieu MRS témoin et inoculé est de $7,75 \text{ g.l}^{-1}$ à 0 h d'incubation au lieu des 10 g.l^{-1} théoriques. La valeur initiale de la concentration en oleuropéine peut être expliquée soit par le fait que l'oleuropéine provenant de la société Extrasynthèse n'était pas totalement pure ; soit par le fait que l'oleuropéine soit légèrement dégradée au cours du traitement thermique imposée lors de l'autoclavage des milieux de culture. Dans ce dernier cas, il faudrait stériliser les milieux de culture par filtration à $0,22\mu\text{m}$. Dans le témoin, cette valeur reste stable jusqu'à 96 h puis diminue progressivement jusqu'à $5,64 \text{ g.l}^{-1}$ à 312 h d'incubation (soit 28 % de pertes).

La cinétique de la concentration en oleuropéine dans les milieux de culture inoculés avec les différentes souches a été réalisée sur 312 h (13 jours) (graphe 4). La diminution de la concentration en oleuropéine dans le milieu de culture de la souche Nat 38 PP a été très faible de 0 à 48 h, la concentration est passée de $7,75 \text{ g.l}^{-1}$ à $7,11 \text{ g.l}^{-1}$ puis à $6,91 \text{ g.l}^{-1}$ à 96 h. Cette dernière valeur a été stable jusqu'à 312 h. En ce qui concerne les souches Nat 1 PP et L 08 PP, cette diminution a été plus importante; la concentration en oleuropéine a diminué, en 48 h, de $7,75 \text{ g.l}^{-1}$ à $5,14$ et $5,44 \text{ g.l}^{-1}$, respectivement puis à $4,16$ et $4,62 \text{ g.l}^{-1}$ en 96 h. Ensuite, ces valeurs se sont progressivement diminuées pour atteindre $3,44$ et $4,10 \text{ g.l}^{-1}$ à 312 h. Il est à noter que ces 2 souches ont eu un profil de dégradation de l'oleuropéine semblable. Ceci peut s'expliquer par leur profil enzymatique similaire. Pour la souche Nat 5 PP, la diminution de la teneur en oleuropéine dans le milieu de culture a été très importante et très rapide. Elle est passée de $7,75 \text{ g.l}^{-1}$ à $2,51 \text{ g.l}^{-1}$ en 48 h et à $2,04 \text{ g.l}^{-1}$ en 96 h ; puis a progressivement diminué pour atteindre $1,55 \text{ g.l}^{-1}$ à 312 h.

Au vu des résultats à 96 h, les 4 souches semblent dégrader l'oleuropéine, mais de manières différentes (graphe 5). La souche Nat 38 PP est celle qui a le moins dégradé l'oleuropéine puisqu'en 96 h, elle a seulement dégradé 9,95 % de l'oleuropéine présente dans le milieu. Ceci est en parfaite adéquation avec son profil enzymatique puisque cette souche ne possède qu'une faible activité β -glucosidase. La souche L 08 PP a moyennement dégradé l'oleuropéine ; en effet, en 96 h, elle a dégradé 39,73 % de l'oleuropéine. De façon similaire, la souche Nat 1 PP a dégradé 45,67 % de l'oleuropéine du milieu en 96 h. La souche Nat 5 PP est la souche qui a eu l'activité oleuropéinolytique la plus importante. Elle a effectivement dégradé 73,36 % de l'oleuropéine contenue dans le milieu MRS en 96 h. Les pourcentages de dégradation des 3 dernières souches s'expliquent par leur forte activité β -glucosidase.

Parallèlement à la cinétique de dégradation de l'oleuropéine a été réalisé la cinétique de production d'hydroxytyrosol dans les surnageants de culture (graphe 6). Dans le milieu MRS témoin, la teneur en hydroxytyrosol est restée constante dans le temps et de l'ordre de $0,06 \text{ g.l}^{-1}$, il n'y a donc pas eu de production d'hydroxytyrosol dans le milieu témoin. Quant à



Graphe 6 : Cinétique de production d'hydroxytyrosol

la souche Nat 38 PP, la production d'hydroxytyrosol a été très faible et n'est pas significative. Ceci peut être expliqué par l'absence d'activité estérase de cette souche.

Par contre, les souches Nat 1 PP et L 08 PP ont eu une production en constante augmentation durant les 312 h d'incubation. La concentration en hydroxytyrosol a augmenté de 0,06 g.l⁻¹ à 0,36 g.l⁻¹ pour la souche Nat 1 PP et de 0,06 g.l⁻¹ à 0,30 g.l⁻¹ pour la souche L 08 PP. Cette légère production d'hydroxytyrosol est due à l'activité estérase que ces souches possèdent. La souche Nat 5 PP est la souche qui a eu la production d'hydroxytyrosol la plus importante.

La teneur en hydroxytyrosol du milieu de culture a augmenté de 0,06 g.l⁻¹ à 0,53 g.l⁻¹. Cette forte production s'explique par l'activité estérase importante de la souche Nat 5 PP qui peut donc dégrader l'aglycone, issu de l'hydrolyse de l'oleuropéine, en hydroxytyrosol et acide élénolique.

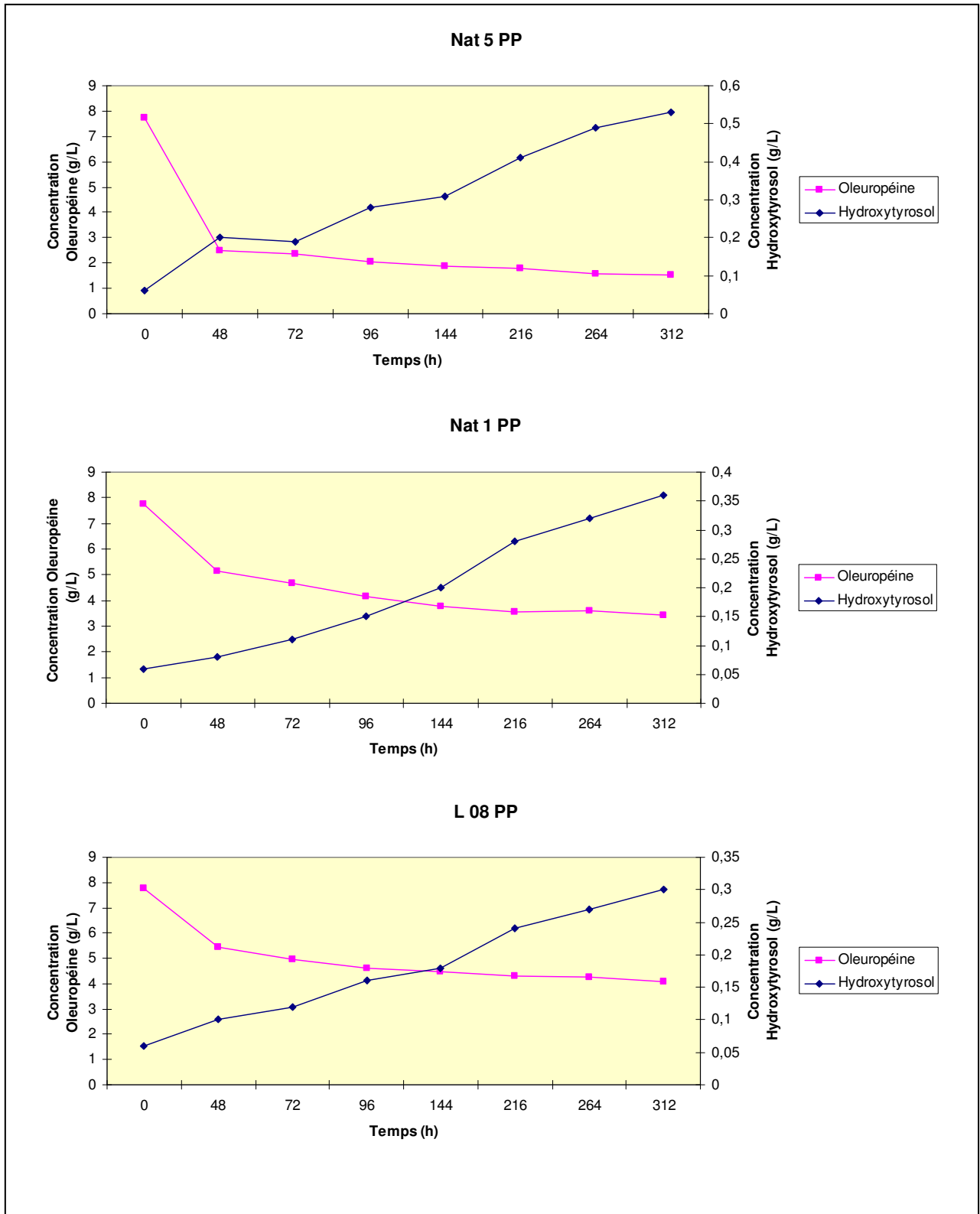
DISCUSSION

La caractérisation biochimique a permis de mieux définir les propriétés physico-chimiques des margions. Il ressort de ce travail que les margions d'olives constitue un substrat acide, à forte humidité, riche en composés lipidiques et glucidiques. Il semble donc que ces résidus d'industries oléicole soient des substrats potentiellement favorables à une fermentation anaérobie conduites par les bactéries lactiques. En effet, l'acidité, le taux d'humidité de 65,07% ainsi que la haute teneur en composés glucidiques sont des caractéristiques qui sont propices à l'ensilage [15, 22]. Par contre, le manque de structure fibreuse nécessitera un mélange des margions à d'autres types de sous-produits comme les résidus de taille ou les noyaux d'olives.

L'étude de la microflore des margions a pu mettre en exergue l'hétérogénéité des populations microbiennes endogènes présentes. Les deux populations prédominantes sont les levures et les champignons filamenteux quantifiées respectivement à $2,77E+08$ UFC.g⁻¹ MS et $2,56E+07$ UFC.g⁻¹ MS dans les margions frais et à $6,19E+05$ UFC.g⁻¹ MS et $4,24E+04$ UFC.g⁻¹ MS respectivement. Le mode de conservation influe donc sur la composition en microorganismes. Afin de déterminer la microflore endogène initiale et la présence ou l'absence de bactéries lactiques, il est donc nécessaire de réaliser les expériences en période de production, sur des margions fraîchement émis des moulins de trituration.

Afin de mettre au point une technique de criblage de bactéries lactiques oleuropéinolytiques en vue d'une valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole, différentes souches ont été sélectionnées au sein de la collection du laboratoire. Ces souches qui avaient précédemment été identifiées comme *L. plantarum*, *Weissella confusa* et *L. hilgardii* par la technique Midi system ont toutes été identifiées à 99,9 % comme *L. plantarum* par les galeries API. Cependant, les 4 souches ont eu des profils de galeries API sensiblement différents. Ceci démontre la complexité de l'identification des bactéries lactiques due uniquement à des caractéristiques biochimiques et physiologiques. L'utilisation des outils de la biologie moléculaire pourrait rendre l'identification de bactéries lactiques plus fiable et plus reproductible. En effet, les bactéries lactiques peuvent être identifiées par amplification PCR spécifique des séquences du gène de l'ARNr 16S, couplée à l'Electrophorèse en Gel de Gradient Dénaturant (PCR-DGGE) ou à l'Electrophorèse en Gel de Gradient de Température (PCR-TGGE)[23-26]. Récemment, le gène *rpoB* codant la sous unité beta de l'ARN polymérase a été utilisé comme alternative du gène de l'ARNr 16S. Cependant, la banque de donnée est moins riche que celle du gène de l'ARNr 16S et par conséquent, chaque bande DGGE ne peut pas être facilement attribuée à une espèce [23].

La sélection des bactéries lactiques oleuropéinolytiques a été réalisée par un suivi cinétique de la concentration en oleuropéine et en hydroxytyrosol dans le milieu de culture. Parmi les 4 souches criblées, la souche Nat 5 PP s'est révélée la plus efficace pour dégrader l'oleuropéine puisqu'elle a dégradé 73,36 % en 96 h (4 jours). Cette souche semble donc avoir une activité oleuropéinolytique plus importante que les souches précédemment étudiées[10]. En effet, celles-ci ont dégradé 60 à 70 % de l'oleuropéine du milieu en 21 jours dans un milieu MRS à 2 % de glucose et additionné de 1 % d'oleuropéine [10]. De plus, la présence de glucose dans le milieu de culture limiterait l'activité de la β -glucosidase [10] donc il serait probable d'augmenter l'activité de la β -glucosidase de la souche Nat 5 PP en diminuant la concentration du glucose dans le milieu de culture.



Graphe 7 : Corrélation entre dégradation de l'oleuropéine et production d'hydroxytyrosol

La dégradation de l'oleuropéine et la production d'hydroxytyrosol sont étroitement liées (Graphe 7). En effet, lors de la dégradation de l'oleuropéine par la β -glucosidase, les concentrations en glucose et en aglycone d'oleuropéine augmentent dans le milieu de culture. Cet aglycone est ensuite dégradé par une estérase en hydroxytyrosol et en acide élénolique. La dégradation de l'oleuropéine favorise donc la production d'hydroxytyrosol. Quelque soit la souche (Nat 5 PP, Nat 1 PP ou L 08 PP), il est important de souligner que ces deux phénomènes ne sont pas inversement proportionnels. En effet, la dégradation de l'oleuropéine s'est produite en deux phases : une première phase où la dégradation a été importante et rapide dans le temps (48h) et une seconde phase plateau où la dégradation a été faible et longue dans le temps (48h-312h). En revanche, la production d'hydroxytyrosol a augmenté de manière constante au cours des 312 h. Les deux enzymes impliquées dans le processus de dégradation de l'oleuropéine semblent donc avoir des vitesses de réactions différentes. D'un point de vue industriel, il est important de rechercher les qualités organoleptiques de l'aglycone d'oleuropéine. En effet, si l'aglycone n'a pas de propriétés préjudiciables (amertume, toxicité), les processus de désamérisation seraient beaucoup plus rapides et plus simples que dans le cas où celui devrait être dégradé en hydroxytyrosol.

CONCLUSION

Ce travail a donc permis de caractériser biochimiquement et microbiologiquement les margions. Ce substrat est un composé acide, humide et riche en composés lipidiques, glucidiques et contenant des composés aromatiques (dont l'oleuropéine).

Sa microflore endogène est principalement composée de levures et de champignons filamenteux ainsi que de bactéries aérobies. Les margions se présentent donc comme un substrat pouvant être fermenté en anaérobiose à conditions qu'ils soient mélangés à d'autres sous-produits fibreux et inoculés par un mélange de bactéries lactiques homo- et hétérofermentaire.

Ce travail a aussi permis de mettre en place une technique de criblage de bactéries lactiques oleuropéinolytiques par dosage HPLC de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol dans le milieu de culture. Cette technique est opérationnelle et a permis le criblage de 4 souches de bactéries lactiques. Les 4 souches ont montré une activité oleuropéinolytique différente. Une souche (Nat 5 PP) a montré une forte capacité oleuropéinolytique puisqu'elle est capable de dégrader plus de 73% de l'oleuropéine du milieu en 4 jours. De plus, cette souche a une très forte production d'acide lactique à 24 h et est homofermentaire. Elle semble donc adaptée pour entrer dans la composition d'un inoculum d'ensilage et pour intervenir dans un procédé de fermentation anaérobie qui permettrait de désamériser les margions.

Maintenant que la technique de dosage de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol est opérationnelle, il est possible d'optimiser la capacité oleuropéinolytique des différentes souches en modifiant la composition du milieu de culture et notamment en variant la teneur en glucose. De plus, pour se rapprocher des conditions réelles, il faudrait cultiver les souches sur un milieu de croissance dont la composition se rapproche de celle des margions (milieu additionné d'extraits de margions).

Une autre technique analytique pourrait être utilisée pour suivre l'évolution de la quantité d'oleuropéine et d'hydroxytyrosol dans le milieu. En effet, la Résonance Magnétique Nucléaire permettrait un suivi « en temps réel » de la teneur en oleuropéine et hydroxytyrosol lors de la croissance bactérienne. Le milieu de culture MRS à 1 % d'oleuropéine serait inoculé et placé dans un rotor de 500 µl fermé afin de créer des conditions anaérobies et conservé à température constante. Les mesures pourraient être réalisées toutes les heures sans modification des conditions de cultures et sans altération de l'échantillon.

Ces travaux ouvrent donc de nouvelles perspectives quant à la valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole par voie microbienne.

BIBLIOGRAPHIE

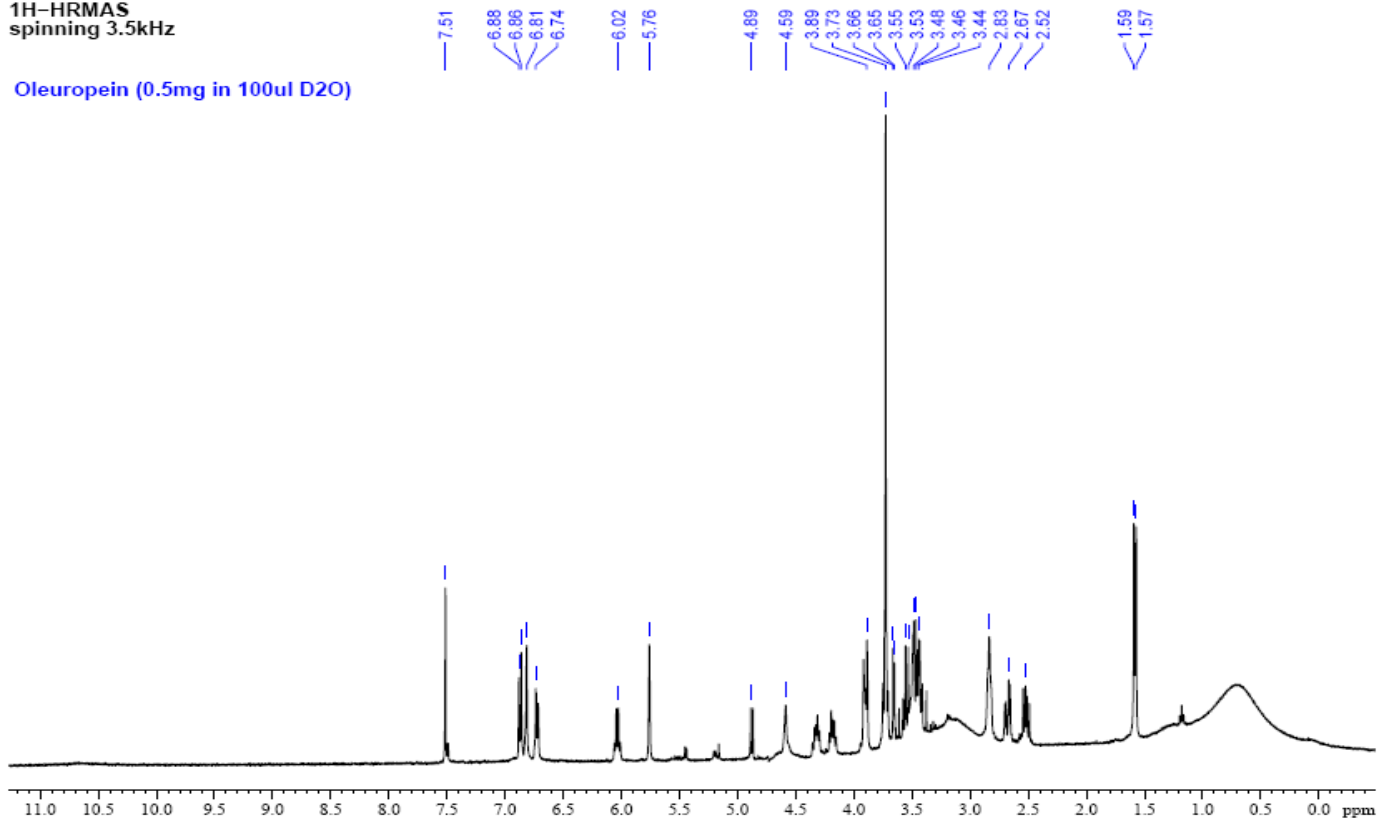
1. Anonyme. Institut de Recherche pour le Développement. www.ird.fr.
2. Anonyme. International Olive Oil Council. www.internationaloliveoil.org.
3. Owen, R.W., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., and Bartsch, H. (2004) Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention* 13, 319-326.
4. Anonyme. Association Française Interprofessionnelle de l'Olive. www.afidol.org.
5. Anonyme. By-product Resusing from olive and olive oil production. Rapport TDC Olive (Technology Dissemination Centres).
6. Alcaide, E.M., and Nefzaoui, A. (1996) Recycling of olive oil by products: Possibilities of utilization in animal nutrition. *Olive Oil Processes and By-Products Recycling* 38, 227-235.
7. Mulinacci, N., Innocenti, M., La Marca, G., Mercalli, E., Giaccherini, C., Romani, A., Erica, S., and Vincieri, F.F. (2005) Solid olive residues: Insight into their phenolic composition. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8963-8969.
8. Alburquerque, J.A., Gonzalez, J., Garcia, D., and Cegarra, J. (2004) Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour. Technol.* 91, 195-200.
9. de Castro, M.D.L., and Japon-Lujan, R. (2006) State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 25, 501-510.
10. Marsilio, V., and Lanza, B. (1998) Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76, 520-524.
11. Soler-Rivas, C., Espin, J.C., and Wichers, H.J. (2000) Review Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1013-1023.
12. Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B., and Pozzi, N. (1994) Hydrolysis of Oleuropein by *Lactobacillus-Plantarum* Strains Associated with Olive Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4142-4147.
13. Marsilio, V., Lanza, B., and Pozzi, N. (1996) Progress in table olive debittering: Degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of the American Oil Chemists Society* 73, 593-597.
14. Perraud-Gaime, I. (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse (Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc).
15. Weinberg, Z.G., and Ashbell, G. (2003) Engineering aspects of ensiling. *Biochem. Eng. J.* 13, 181-188.
16. Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Barone, R., Piccialli, G., Carolla, R., Mainolfi, P., De Napoli, L., Patumi, M., Fontanazza, G., and Nucci, R. (2000) Hydrolysis of oleuropein by recombinant beta-glycosidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* immobilised on chitosan matrix. *Journal of Biotechnology* 77, 275-286.
17. Mazzei, R., Giorno, L., Mazzuca, S., Spadafora, A., and Drioli, E. (2006) beta-Glucosidase separation from *Olea europaea* fruit and its use in membrane bioreactors for hydrolysis of oleuropein. *Desalination* 200, 483-484.
18. Gaime-Perraud, I., Roussos, S., and Martinez-Carrera, D. (1993) Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micologia Neotropical Aplicada* 6, 95-103.
19. Ingraham, J.L., and Ingraham, C.A. (1995) *Introduction to Microbiology*. Wadsworth.

20. Suzuki-Lopez, A. (1999) Isolement et caractérisation de bactéries lactiques pour l'ensilage de la pulpe de café. Master de Biotechnologie. Université Autonome Métropolitaine, Mexico. 105 pages.
21. Vinha, A.F., Ferreres, F., Silva, B.M., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M.B., Seabra, R.M., and Andrade, P.B. (2005) Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry* 89, 561-568.
22. Seale, D.R. (1986) Bacterial inoculants as silage additives. *Journal of applied bacteriology Symposium Supplement* 61, 9S-26S.
23. Spano, G., Lonvaud-Funel, A., Claisse, O., and Massa, S. (2007) In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Current Microbiology* 54, 9-13.
24. Botes, A., Todorov, S.D., von Mollendorff, J.W., Botha, A., and Dicks, L.M.T. (2007) Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. *Process Biochemistry* 42, 267-270.
25. Urso, R., Comi, G., and Coccolin, L. (2006) Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 671-680.
26. Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., and Hugas, M. (2003) Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4583-4594.

ANNEXE 1

1H-HRMAS
spinning 3.5kHz

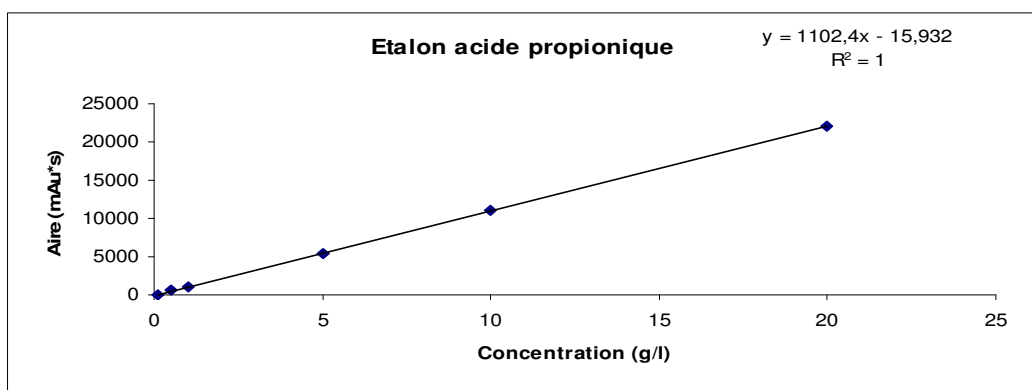
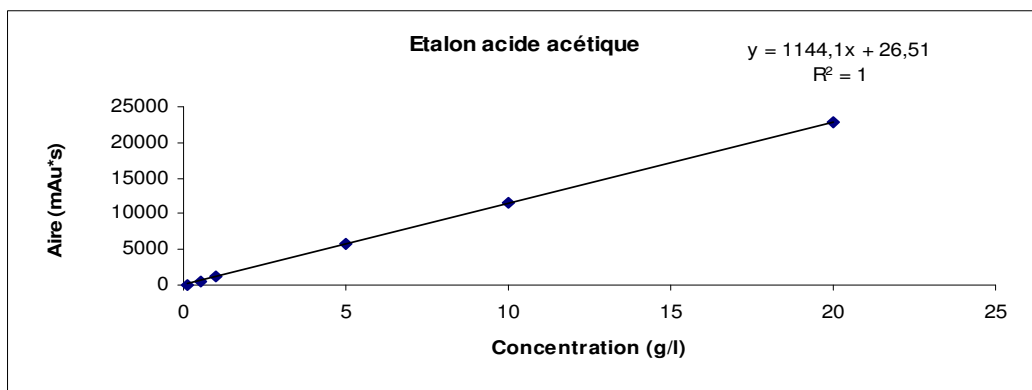
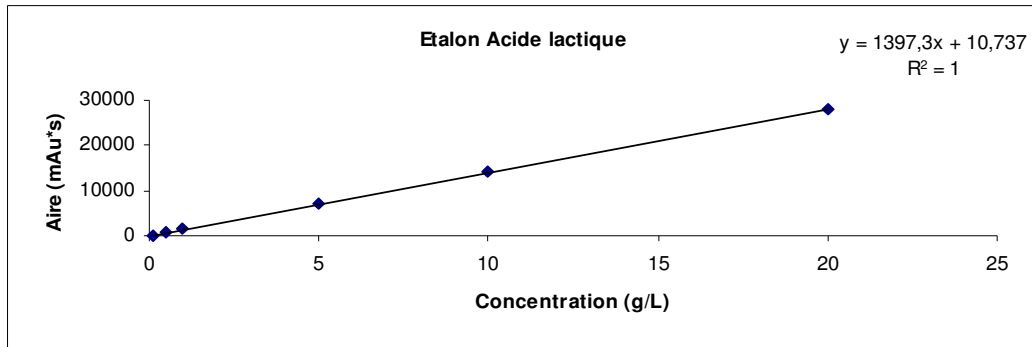
Oleuropein (0.5mg in 100ul D2O)

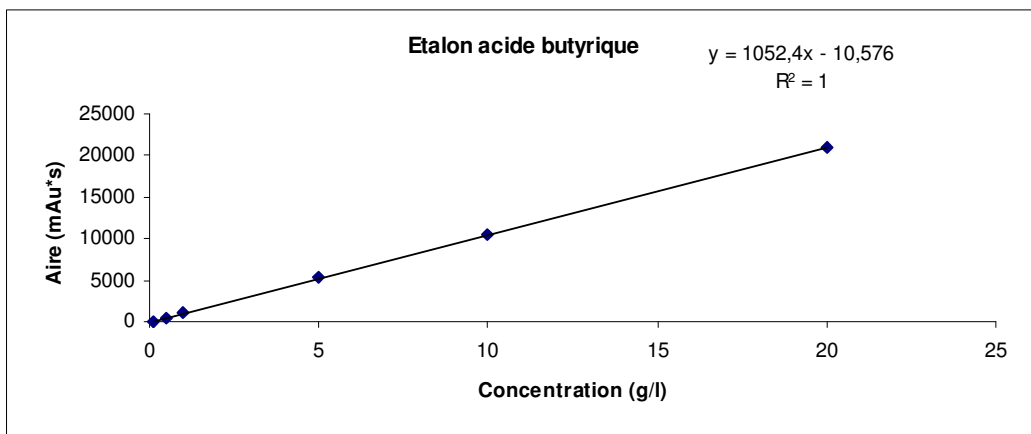
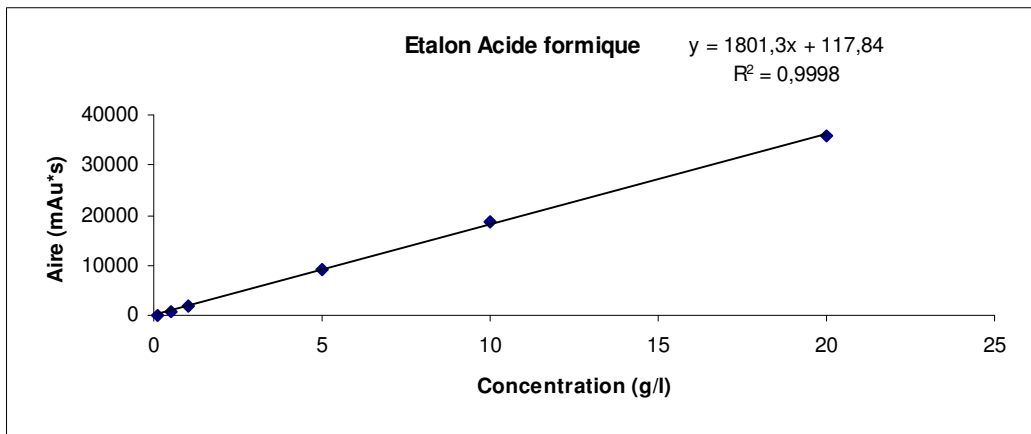
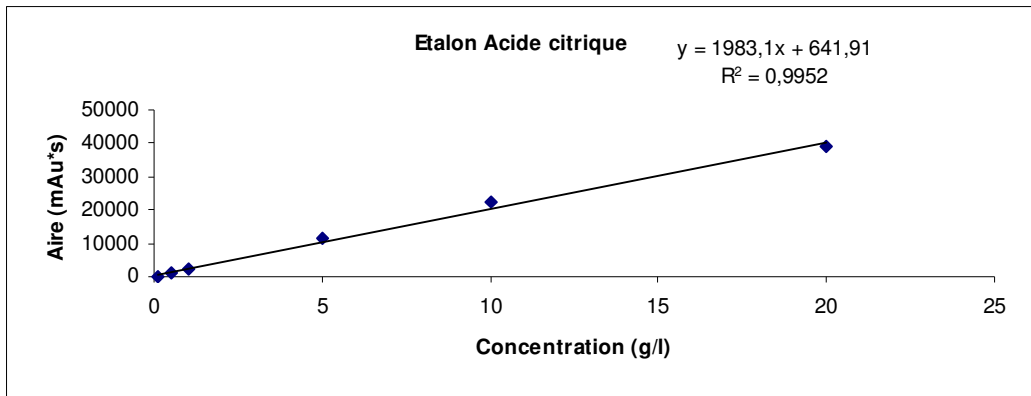


Grphe annexe 1 : Spectre RMN du standard d'oleuropéine

ANNEXE 2

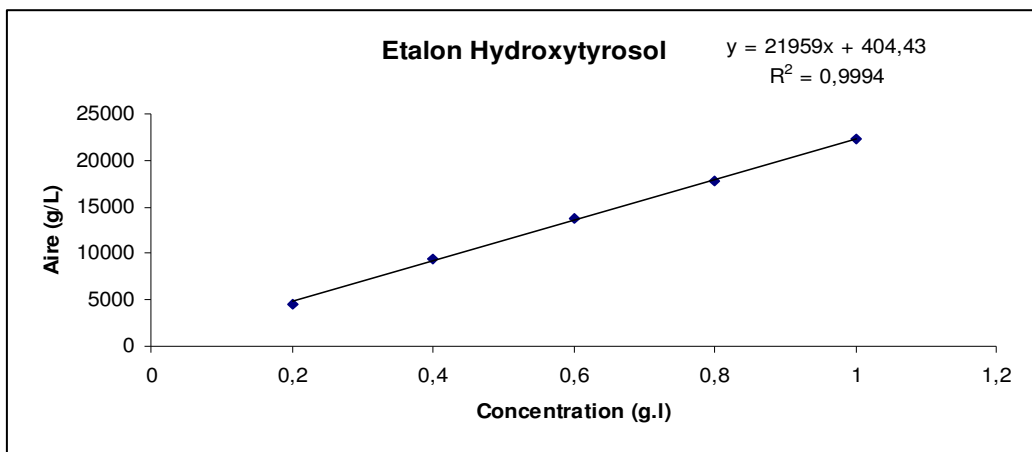
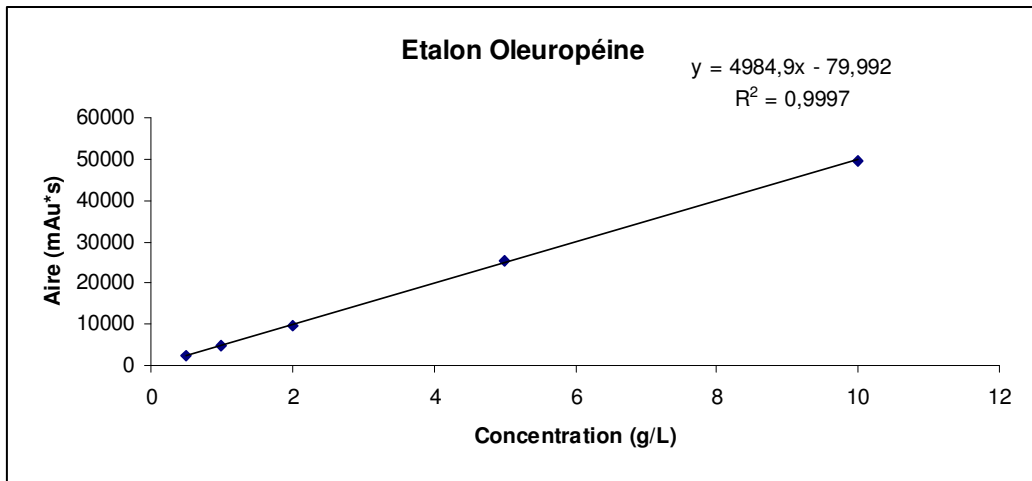
Courbes des standards d'acides organiques





ANNEXE 3

Courbes des standards d'oleuropéine et d'hydroxytyrosol



Remerciements

Je tiens à remercier Dr. ROUSSOS Sévastianos pour m'avoir accueilli dans son unité et pour ses qualités humaines.

Je tiens à remercier Dr. PERRAUD-GAIME Isabelle pour son aide tout au long de mon stage, pour ses attentions, pour sa gentillesse et sa jovialité.

Je voudrais aussi saluer la bonne humeur, la gentillesse, l'aide et l'écoute rencontrées chez tous les membres de l'Unité BIOTRANS, les étudiants et thésards et notamment Roopesh pour son aide spécifique à l'utilisation de l'HPLC.

Enfin, je souhaite remercier Mme LHOPITAL Marie-Agnès du service Applications Bactériologie Médicale de la société Biomérieux, pour les identifications des profils de galeries API, ainsi que Dr. ZIARELLI Fabio du Spectropôle de Marseille pour sa sympathie et son aide apportée dans l'analyse RMN des margions.

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps de caractériser biochimiquement et microbiologiquement les margions (sous-produits d'industrie oléicole) et dans un second temps, de mettre en place une technique de criblage de bactéries lactiques dégradant l'oleuropéine pour les utiliser dans un procédé de valorisation de ces sous-produits.

Les margions ont un pH de 5,4 et un taux d'humidité de 65 %. Ils sont composés de 59,9 % de lipides, de 36,9 % de glucides, de 2,2% de composés aromatiques et de 1 % d'aldéhydes.

Les margions contiennent 0,3% d'oleuropéine, un composé phénolique responsable de l'amertume des margions. La microflore endogène est essentiellement composée de levures, de champignons filamenteux et de bactéries aérobies.

La capacité des bactéries lactiques à dégrader l'oleuropéine a été étudiée par HPLC-DAD sur des souches de collection. Parmi les souches criblées, la souche Nat 5 PP a dégradé 73% de l'oleuropéine présente dans le milieu de culture en 96 h, la souche Nat 1 PP l'a dégradé à 45 % et la souche L 08 PP à 39 %.

Mots-clés : bactéries lactiques, margions, oleuropéine, HPLC-DAD, capacité oleuropéinolytique, valorisation des sous produits oléicoles.

The objectives of the present work are primarily, biochemical and microbiological study of two-phase olive mill waste and secondarily, to set up an oleuropeinolytic lactic acid bacteria screening technique in order to recycle the olive mill waste. Two phase olive mill waste have a pH of 5,4 with humidity of about 65%. They are composed of 59,9 % lipids, 36,9% carbohydrate, 2,2% aromatic compounds and 1% aldehydes. In addition, they contain 0, 3% oleuropein, a phenolic compound that imparts bitter-taste. The dominant microbial populations of two-phase olive mill waste are yeasts, fungi and aerobic bacteria.

The oleuropeinolytic activity of lactic acid bacteria was studied by HPLC-DAD on reference strains obtained from known culture collection. Among the strains screened, the Nat 5 PP strain degraded 73% of oleuropein contained in the growth medium by 96 h; the Nat 1 PP strain degraded 45 % of oleuropein and the L 08 PP strain 39 % respectively.

Key words: Lactic acid bacteria, two-phase olive mill waste, oleuropein, HPLC-DAD, oleuropeinolytic activity, olive mill by-products.