

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

AOUIDI^{1,2} Fathia Isabelle PERRAUD-GAIME², Sevastianos ROUSSOS², Moktar HAMD¹

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⁻¹ 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⁻¹ 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

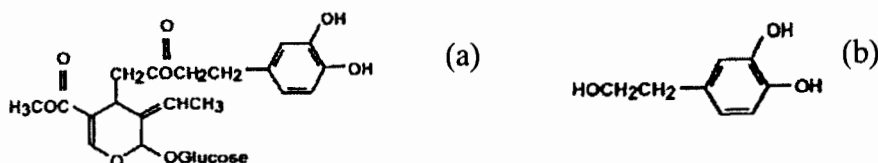


Figure 1: Structure chimique de l'Oleuropéine (a) et de l'Hydroxytyrosol (b)

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⁻¹ 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⁻¹ 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 aérobie. L'activité estérase est absente quelque soit les conditions de culture testées (30°C, 37°C, aérobie, anaérobiose). Ces résultats peuvent laisser supposer que le mécanisme de bioconversion de l'oleuropéine en hydroxytyrosol est différent selon les espèces de bactéries lactiques.

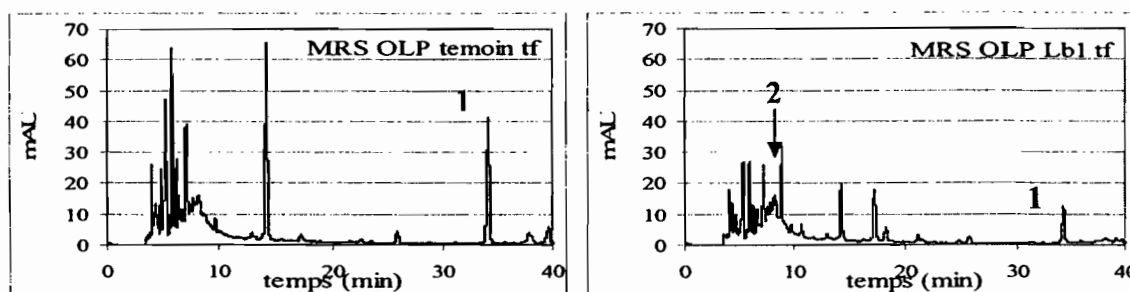


Figure 2: Profil HPLC sur milieu MRS contenant 1 g l⁻¹ d'oleuropéine avant et après bioconversion par la souche lactique *Lactobacillus pentosus*. Identification des pics: 1, Oleuropéine; 2, Hydroxytyrosol.

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.

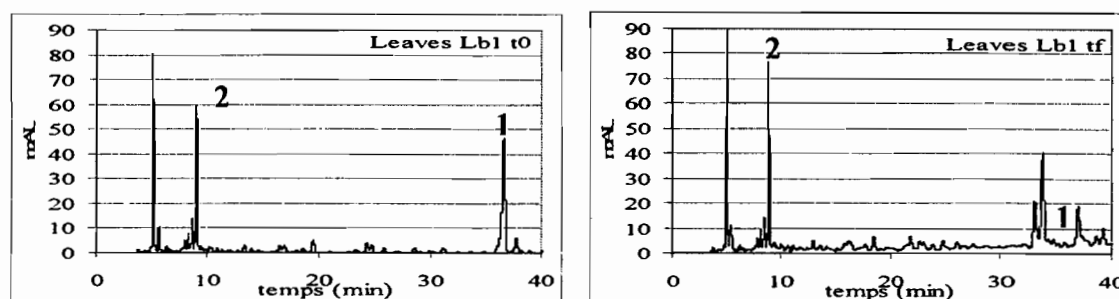


Figure 3: Profil HPLC d'un extrait aqueux de feuille d'olivier avant et après bioconversion par la souche lactique *Lactobacillus pentosus*. Identification des pics: 1, Oleuropéine; 2, Hydroxytyrosol.

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 β -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., Esposito 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.

Aouidi F., Perraud-Gaime Isabelle, Roussos Sevastianos,
Hamdi M. (2009)

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

In : Karray B. (ed.), Khecharem J. (ed.), Roussos Sevastianos
(ed.). Pour un secteur oléicole rénové, rentable et compétitif
en Méditerranée = For a renovated, profitable and
competitive Mediterranean olive growing sector :
proceedings Olivebioteq 2009. Sfax : Institut de l'Olivier, 616-
618.

Séminaire Olivebioteq 2009 : Pour un Secteur Oléicole
Rénové, Rentable et Compétitif en Méditerranée = Seminar
Olivebioteq 2009 : For a renovated, Profitable and
Competitive Mediterranean Olive Growing Sector, 3.,
Sfax (TUN), 2009/12/15-19. ISBN 978-9938-9513-0-1