

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE

INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES
AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)



N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de magister en sciences alimentaires

Option : Biotechnologie et génie des industries Alimentaires.

Thème

**Isolement de souches microbiennes à partir de biotopes
algérien et mise en évidence de la production de
pigments caroténoïdes**

Présenté par : M^{elle}. BOUTANA Wissem

Soutenu le :

Devant le Jury composé de :

Président : M^{me}. BARKAT Malika

Professeur I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.

Rapporteur : M^{me}. BEKHOUCHE Farida

Professeur I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.

Examineurs : M^{me}. BECILA Samira

MCA.I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.

M^{me}. BENATALLAH Leila

MCA.I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier DIEU tout puissant pour la volonté, la santé et le courage qu'il m'a donné pour suivre mes études et pour réaliser ce travail.

Mes remerciement les plus vifs s'adressent à mon encadreur Madame BEKHOUCHE Farida Professeur à l'INATAA, qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, je lui exprime mes sentiments de reconnaissances les plus sincères pour sa précieuse aide, et de m'avoir accordé sa confiance et me guidé dans ce travail tout au long de cette année.

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à Madame BERKAT Malika professeur à l'INATAA, pour l'honneur qu'elle m'a fait en présidant le jury et mes reconnaissances les plus sincères pour ses encouragements et ses conseils.

J'exprime mes remerciements à Madame BECILA Samira maitre de conférences « A » à l'INATAA d'avoir accepter d'examiner ce travail, un merci particulier pour son accompagnement et son soutien tout au long de cette formation.

Je tiens à remercier aussi Madame BENATALLAH Laila maitre de conférences « A » à l'INATAA d'avoir accepter d'examiner ce travail, qu'elle trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Je remercie en particulier Monsieur ELHADEF EL-OKKI Mohammed avec ma reconnaissance pour nous avoir transmis son savoir surtout son aide précieux dans le domaine des statistiques.

J'adresse encore mes remerciements à tous les membres des équipes du laboratoire BioQual ainsi que les responsables des laboratoires pédagogiques de l'INATAA, pour leurs aides, en particulier Madame TRAD-KHOUDJA qu'elle trouve ici mes expressions les plus respectueuses.

Je remercie vivement Rania, Oulaya, Soued et Aicha qui ont toujours exprimé leur plaisir à contribuer dans les travaux de la recherche scientifique.

Je remercie l'esprit du groupe des collègues de la promotion magister 2014-2015 : Nora, Ibtissem, Ghania, Houria et Biya.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de ce modeste travail, Sans oublier de remercier tous les enseignants de l'INATAA qui ont contribué à notre formation magister.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon très cher père

Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, son encouragement. Que ce travail soit pour toi un humble témoignage de ma profonde affection et tendresse. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tous aléas de la vie.

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. En ce jour mémorable, pour toi ainsi que pour moi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profonde estime. Puisse le puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A ma très chère sœur Mounira

Pour toute l'ambiance et l'amour dont elle m'a entouré, pour toute sa spontanéité et son élan, pour sa patience, son aide précieux et ses encouragements durant toutes les phases de mes études. Dieu te garde et te montre le droit chemin.

A ma chère grand-mère

Qui m'a toujours aimé et comblé par ses bénédictions, que DIEU le tout puissant te garde ma très chère mîmî.

A toute ma famille et à tous ceux qui m'aiment.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1: Matière première

1. Lactosérum	3
1.1. Composition chimique	4
1.2. Intérêt industriel	5
2. Mélasse	6
2.1. Composition chimique	6
2.2. Intérêt industriel	8
3. Olives.....	9
3.1. Composition chimique	9
4. Margines.....	10
4.1. Composition chimique	11
4.1.1. Fraction minérale.....	11
4.1.2. Fraction organique.....	11
4.2. Intérêt industriel	12

Chapitre 2 : Pigments

1. Introduction	13
2. Origine de la couleur des pigments	13
3. Pigments d'origine microbienne	14
3.1. Rôle et utilisation des pigments.....	15
3.2. Exemples de pigments synthétisés par les micro-organismes.....	17
4. Caroténoïdes	20
4.1. Introduction	20
4.2. Structure chimique	20
4.3. Origines	21
4.4. Biosynthèse	21
4.5. Propriétés physico-chimiques et biologiques	23
4.6. Facteurs influençant la production des caroténoïdes par voie microbienne.....	23
4.6.1. Influence des paramètres physico-chimiques.....	24

4.6.2. Composition du milieu de culture	24
4.7. Extraction des caroténoïdes	25
Matériel et méthodes	
1. Méthodologie expérimentale	27
2. Matériaux d'isolements	27
3. Etude microbiologique	28
3.1. Milieux de culture	28
3.2. Préparation des échantillons	29
3.3. Dénombrement de la flore microbienne totale et la flore productrice de pigments ...	29
3.4. Isolement et conservation des micro-organismes pigmentés	30
3.5. Caractérisation des Isolats bactériens	30
3.5.1. Caractères morphologiques	31
3.5.2. Caractères biochimiques	31
3.6. Caractérisation des isolats des levures	32
3.7. Caractérisation des isolats de moisissures	33
4. Mise en évidence de la production de pigments	33
4.1. Codification des isolats sélectionnés	34
4.2. Préparation des milieux de culture	34
4.3. Pré-culture	34
4.4. Culture	34
4.5. Détermination du pH du milieu	35
4.6. Détermination de la quantité de biomasse	35
4.7. Evaluation des pigments caroténoïdes (figure 16)	36
4.7.1. Extraction des caroténoïdes	36
4.7.2. Dosage des pigments caroténoïdes	37
4.7.3. Préparation de la gamme d'étalonnage	37
5. Analyse statistique et traitement des résultats	40
Résultats et discussion	
1. Résultats	41
1.1. Etude microbiologique	41
1.1.1. Flore totale et flore productrice de pigments	41
1.1.2. Aspect morphologique des isolats pigmentés	43
1.1.3. Aspect biochimique de la flore pigmentée	47
1.2. Isolats pigmentés sélectionnés	51

1.2.1. Isolats bactériens	51
1.2.2. Isolats de levures	55
1.3. Production de pigments par les isolats sélectionnés.....	57
1.3.1. pH.....	57
1.3.2. Quantification de la biomasse	58
1.3.3. Estimation des pigments caroténoïdes	60
1.4. Analyse statistique.....	61
2. Discussion	65
Conclusion générale	69
Références bibliographiques	71
Annexes	
Communications	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition chimique du lactosérum en (g/l) (Morr et Ha, 1993).....	5
Tableau 2. Composition chimique de la mélasse de canne à sucre (exprimées en % de MH) (Steg et Van Der Meer, 1985).	8
Tableau 3. Principaux fractions du fruit d'olive (Ghedira, 2008).	10
Tableau 4. Pigments microbiens et leurs utilisations comme colorants naturels dans les aliments (Venil <i>et al.</i> , 2013).	17
Tableau 5. Milieux de culture utilisés pour la recherche des micro-organismes pigmentés. ...	28
Tableau 6. Gamme d'étalonnage des solutions de β -carotène utilisées.	37
Tableau 7. Effectif de la flore pigmentée par rapport à la flore totale ($\times 10^2$ UFC/ml).	42
Tableau 8. Morphologie des souches bactériennes isolées de mélasse.	44
Tableau 9. Morphologie des souches bactériennes isolées des margines.	45
Tableau 10. Morphologie des souches bactériennes isolées du lactosérum.	45
Tableau 11. Morphologie des souches de levures isolées des quatre échantillons.	46
Tableau 12. Tests biochimiques effectués pour la flore pigmentée (bactéries).	49
Tableau 13. Tests biochimiques effectués pour la flore pigmentée (Levures).	50
Tableau 14. Représentation photographique de l'aspect des 27 isolats bactériens.	52
Tableau 15. Tests biochimiques sur les isolats bactériens	54
Tableau 16. Représentation photographique de l'aspect des 13 isolats de levures.	55
Tableau 17. Caractère culturaux et type de reproduction des isolats de levures.	56
Tableau 18. Détermination du pH avant et après mise en culture.	58
Tableau 19. Détermination de la biomasse exprimée en g de poids sec par litre de culture. ...	59
Tableau 20. Quantité de pigments exprimée en mg équivalent de β -carotène par g de matière sèche.	60

Liste des figures

Figure 1. Voies technologiques des principaux types de lactosérums issus de la transformation du lait (Alais, 1984).....	4
Figure 2. Diagramme de l'obtention de la mélasse (Fechter <i>et al.</i> , 2001)	7
Figure 3. Schéma de l'industrie oléicole avec le système de presse (Hamdi, 1991).	11
Figure 4. Courbe de transmission de lumière selon la présence de double liaison dans les pigments (De Carvalho <i>et al.</i> , 2014).	14
Figure 5. Structure fondamentale de quelques pigments microbiens (Dufossé, 2006).	15
Figure 6. Colonies de <i>Monascus</i> sur gélose YM (De Carvalho <i>et al.</i> , 2014).	17
Figure 7. Pigment jaune synthétisé par <i>Micrococcus spp</i> (Bhat <i>et al.</i> , 2013).	18
Figure 8. Morphologie des colonies d' <i>Epicoccum nigrum</i> sur boîte de Pétri (Bleoju et González Sanjosé, 2007).	19
Figure 9. Structure générale des caroténoïdes (Britton <i>et al.</i> , 2008).	21
Figure 10. Voie de biosynthèse des caroténoïdes (Vandamme, 1989).	22
Figure 11. Structure chimique des caroténoïdes d'origine microbienne (Mata-Gómez <i>et al.</i> , 2014).	23
Figure 12. Techniques de désintégration de la paroi des microorganismes, d'après la proposition modifiée d'Edebo et Magnusson (2008).	25
Figure 13. Méthodologie expérimentale de notre étude.	27
Figure 14. Echantillons issus de la production 2016, utilisés pour la recherche des microorganismes pigmentés.	28
Figure 15. Etapas de la mise en culture.	35
Figure 16. Protocole d'extraction et de dosage des caroténoïdes.	39
Figure 17. Effectif de la flore pigmentée dans les différents milieux.	42
Figure 18. Répartition des groupes d'isolats dans les échantillons.	48
Figure 19. Pigmentation des souches sélectionnées.	51
Figure 20. Production de pigment à la fin de la culture sur milieu liquide.	57
Figure 21. Type de corrélation entre les paramètres mesurés en fin de culture.	61
Figure 22. Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des 40 souches sur la base de leur potentiel de production de caroténoïdes (-carotène).....	62
Figure 23. Présentation de l'analyse en composantes principales	63
Figure 24. Bi-plot de l'analyse en composante principale discriminant les 3 groupes issus des 40 souches sélectionnées.	64

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

BHT : Butyle Hydroxyle Toluène

BHA : Butyle Hydroxyle Anisole

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

DBO : Demande Biologique en Oxygen

DMSO : DiMéthyl SulfOxide

GGPP : PyroPhosphate de GéranylGéranyle

MM : Matière Minérale

MS : Matière Sèche

MG : Matière Grasse

MAT : Matière Azotée Totale

Na₂SO₃ : Sulfate de sodium

nm : Nanomètre

OGA(B) : Oxytétracycline Glucose Agar (Bouillon)

ppm : partie par million

SDA(B) : Sabouraud Dextrose Agar (Bouillon)

TSA(B) : Tryptone Soja Agar (Bouillon)

TSAS : Tryptone Soja Agar Sel

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra Violet

YMA(B) : Yeast Malt Agar (Bouillon)

Introduction générale

A l'exigence du consommateur face à l'apparence du produit, l'industriel répond par un effort de contrôle de ces paramètres. Pour ce faire, certains aliments sont enrichis par des molécules colorantes telles que les caroténoïdes.

De nombreux colorants synthétiques artificiels qui ont été largement utilisés dans les procédés alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques présentent divers effets dangereux. D'où l'intérêt mondial pour le développement de procédés pour la production de pigments provenant de sources naturelles (Bhat *et al.*, 2013). L'utilisation de pigments naturels dans l'industrie alimentaire a connu une nette progression ces dernières années. Elles peuvent être d'origine végétale (Mizukami *et al.*, 1978) ou microbienne (Ryu-Beung *et al.* 1989).

Les microorganismes produisent une grande diversité de pigment qui peuvent être destinés à l'industrie alimentaire et jouent ainsi un rôle important dans l'amélioration de la qualité organoleptique (Dufossé 2006; Bhat *et al.* 2013), Plusieurs caroténoïdes tels que le - carotène, l'astaxanthine, la lutéine, la canthaxanthine et le lycopène sont utilisés dans l'industrie comme des suppléments nutritifs, ou comme colorants alimentaires et additifs pour l'alimentation animale (Meléndez-Martínez *et al.* 2007).

Parmi tous les pigments naturels, Les caroténoïdes ne jouent pas seulement le rôle de colorants naturel mais possèdent aussi des propriétés très particulières et remarquables que d'autres groupes de substances. Ils forment la base de leurs nombreuses fonctions et actions variées dans tous les types d'organismes vivants (Britton, 1995).

Les caroténoïdes représentent une grande famille de pigments naturels très répandus dans la nature, plus de 700 ont été isolés et caractérisés, se trouvant en multiples nuances de jaune, d'orange ou rouge (Oliver et Palou, 2000). Présents dans les végétaux, les algues, les microorganismes ; bactéries, levures et champignons filamenteux, ils sont employés en tant qu'additifs dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Albrecht *et al.*, 1999). Ils suscitent un intérêt grandissant grâce à leurs propriétés pro-vitaminique (vitamine A), antioxydants et anti-radicalaire (LiShuang *et al.*, 2007).

Les caroténoïdes de certaines levures colorées comme *Rhodotorula*, *Phaffia rhodozyma* suscitent un intérêt commercial en tant que pigment naturel pour les aliments (Latha et Jeevaratnam, 2010). L'astaxanthine a été identifiée comme étant le principal caroténoïde dans plusieurs espèces de *Pseudomonas* (Johnson et Schroeder, 1996).

La conduite pour la recherche de microorganismes pour la production de caroténoïdes, comme une alternative a montré des rendements meilleurs (Mata-Gómez *et al.*, 2014). En outre, la production microbienne de caroténoïdes par la recherche d'alternatives comme l'utilisation de déchets agro-industriels pourrait être une meilleure option sur les coûts de la production, les déchets agro-industriels fournissent la source de carbone et d'azote nécessaire ainsi que d'autres éléments pour favoriser le métabolisme microbien et éviter la pollution de l'environnement par ces déchets agro-industriels (Mantzouridou *et al.*, 2006).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail et pour cela nous nous sommes intéressés à la mise en évidence de souches productrices de pigment caroténoïdes, et dans un autre volet écologique de valorisation des sous produits de l'industrie agro-alimentaire nous avons choisis les matières suivantes : lactosérum, mélasse, margine. Une autre matière qui porte notre intérêt est l'olive. Nous estimons que ces produits sont très riches en nutriment ce qui favorise une population microbienne conséquente.

Les objectifs de ce travail sont :

- Valorisation des sources utilisées et qui sont considérés comme déchets industriel.
- Isolement et caractérisation de souches non pathogènes et qui peuvent intervenir dans des procédés technologiques.
- Production de pigment naturel à intérêt industriel.
- Et l'utilisation de méthode simple pour l'extraction et le dosage des pigments caroténoïdes.

Ce travail est subdivisé en trois parties en plus de l'introduction et de la conclusion générale avec les perspectives :

- La première partie consiste en une synthèse bibliographique donnant des aperçus sur les sous produits utilisés comme source d'isolement, les pigments et les caroténoïdes entre autres ceux d'origine microbienne.
- La deuxième partie est l'étude expérimentale décrivant le matériel ainsi que les méthodes et les protocoles utilisés pour la préparation des échantillons, l'isolement et la caractérisation des souches pigmentées d'une part ainsi que la mise en évidence de la production et la quantification de pigment caroténoïdes d'autre part.
- La troisième partie englobe les résultats obtenus et la discussion.

Synthèse bibliographique

1. Lactosérum

Le lactosérum est le liquide jaune pâle qui reste après la coagulation de lait lors de la fabrication du fromage ou de la caséine ; où l'on retrouve la majeure partie de l'eau avec toutes les substances du lait. Sa principale caractéristique est qu'il contient beaucoup de lactose, ce sucre représente une principale source de carbone pour les microorganismes qui intéressent l'industrie agroalimentaire (Jouan, 2002).

Le lactosérum contient également des protéines solubles ou protéines sériques qui restent en solution quand on précipite le lait, avec en plus des substances azotées non protéiques résultant de l'action des enzymes coagulantes ou du métabolisme des bactéries qui se développent dans le lait ou dans le coagulant. Aussi il contient des sels minéraux tels que : Ca^{2+} , P, Na^{+} , Cl^{-} , K^{+} . Ces composants constituent un milieu favorable pour le développement des microorganismes (Bendimerad, 2013).

Selon l'acidité Dornic ($1^{\circ}\text{D} = 0,1$ g d'acide lactique par litre de produit) inférieure ou supérieure à 1.8 g d'acide lactique par litre (Kosseva *et al.*, 2007). On peut distinguer deux types de sérum :

- **Lactosérum doux** : pH environ de 6,5 à 6,7 (l'acidité est inférieure à 18°D), issu de la fabrication de fromage à pâte pressée ou à pâte cuite.
- **Lactosérum acide** : pH environ de 4,5 à 5 (l'acidité est supérieure à 18°D), provient des caséineries ou des fromageries fabriquant des pâtes fraîches ou des pâtes molles (Adrian *et al.*, 1980).

Les deux principales voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum, sont la beurrerie et la fromagerie (Figure 1).

- **La beurrerie** : l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait nature. Après écrémage de ce dernier suivi d'une extraction de la caséine par précipitation on obtient du « lactosérum écrémé ».
- **La fromagerie** : l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait nature, ce dernier subit les processus de coagulation et de synérèse, aboutissant d'une part à une phase solide le « fromage » et d'autre part à une phase liquide «le lactosérum». (Benaouida, 2008).

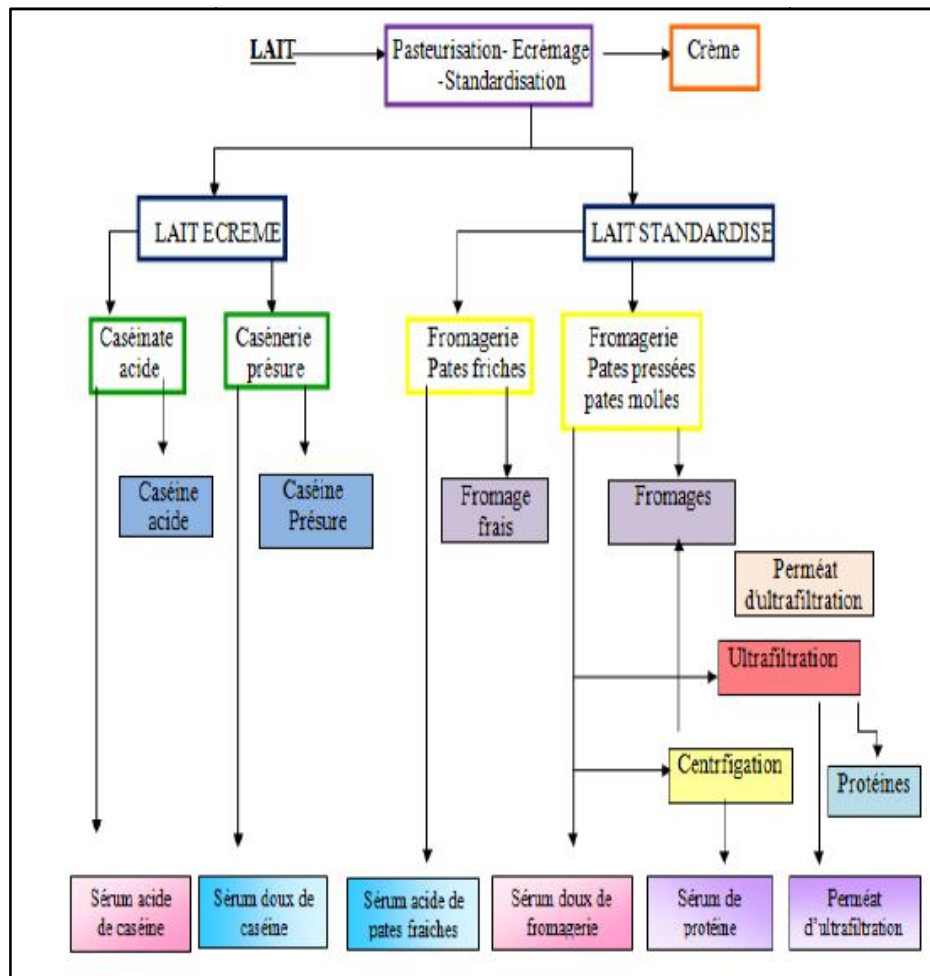


Figure 1. Voies technologiques des principaux types de lactosérums issus de la transformation du lait (Alais, 1984).

1.1. Composition chimique

La composition chimique du lactosérum varie considérablement selon la source du lait, les différents traitements et les procédés de fabrication pour le transformer en produits consommables (Fisgativa *et al.*, 2016).

Les nutriments du lactosérum les plus abondants sont le lactose, les protéines solubles, et les sels minéraux (Tableau 1). Les sels du lactosérum sont composés de NaCl et KCl (plus de 50%), sels de calcium (phosphate principalement) (Shang *et al.*, 1994 ; Gonzfilez, 1996) et autres minéraux, en plus faibles teneurs. Le lactosérum contient aussi d'autres composants, tels que l'acide lactique (0,05%) et citrique, des matières azotées non protéiques (urée et acide urique), et des vitamines du groupe B (Gonzfilez, 1996).

Tableau 1. Composition chimique du lactosérum en (g/l) (Morr et Ha, 1993)

Composition chimique	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Matière sèche (MS)	55 - 75	55 - 65
Lactose	40 - 57	40 - 50
Lipides (MG)	0 - 5	0 - 2
Matière azotée totale (MAT)	7 - 11	4,8 - 10,5
Cendres (MM)	4 - 6	6 - 8
Calcium	0,4 - 0,6	1,2 - 1,4
Phosphore	0,4 - 0,7	0,5 - 0,8
Potassium	1,4 - 1,6	1,4 - 1,6
Chlorure	2,0 - 2,2	2,0 - 2,2
Acide lactique	0 - 0,3	7 - 8

1.2. Intérêt industriel

Les recherches effectuées par la plupart des pays laitiers ont mis en évidence sa valeur nutritionnelle, ainsi que les possibilités de son utilisation en alimentation de bétail, comme engrais, comme milieu de fermentation pour la production par voie microbienne de l'acide lactique, des vitamines (B₂, B₁₂), d'enzymes (protéase, amylase, pectinases, galactosidase et cellulase) et de matière grasse (Woo, 2002). L'utilisation du lactosérum s'étale sur différents domaines en particulier le domaine alimentaire, le domaine médical et le domaine biotechnologique.

➤ **Intérêt alimentaire:** Une quantité considérable de lactosérum est utilisée dans l'alimentation animale. De plus, son utilisation pour enrichir les aliments ou les régimes pauvres en protéines. En pathologie, il est utilisé pour l'alimentation des diabétiques, ou des sujets souffrant de mal nutrition, et en alimentation de soutien, pour les sportifs et les personnes âgées (Woo, 2002).

➤ **Intérêt médical :** Actuellement, les scientifiques évaluent les effets bénéfiques des fractions de protéines de lactosérum. L'utilisation de ces fractions est efficace contre les maladies du cœur (réduction du cholestérol et de la tension artérielle), les ulcères, les cancers, etc (Berry et Paterson, 1990).

➤ **Intérêt biotechnologique :** En biotechnologie, le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation

pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie (Alais, 1984). Il s'agit des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir* et *Kluyveromyces fragilis*, cette dernière est cultivée sur le lactosérum doux déprotéiné et enrichi par des facteurs pour la croissance de la biomasse (Kebbouche-Gana et Touzi, 2001 ; Longhi *et al.*, 2004). Le lactosérum déprotéiné a servi comme milieu de base pour la production de la cellulase par la moisissure *Aspergillus niger* (Reboux *et al.*, 2006) et pour la production de l' α -amylase par la moisissure *Rhizopus oryzae* (Ray, 2004). D'autres moisissures tels que *Penicillium camemberti* comme producteur de protéases (Mechakra *et al.*, 1999), *Mucor miehei* et *Endothia parasitica* produisant des acidoprotéases (Seker *et al.*, 1999). L'utilisation de *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus lactis* pour la production d'acide lactique (Mehaia et Cheryan, 1986).

2. Mélasse

La canne à sucre, principale culture dans quelque pays en voie de développement, représenté » avec une production annuelle de 693.10^6 tonnes, une importante ressource alimentaire. Le traitement de la plante fournit en effet 70 millions de tonnes de sucre et plusieurs sous-produits, parmi lesquels la mélasse finale (environ 18.10^6 tonnes) est le plus intéressant (Christon et Le Dividich, 1978).

Le terme « mélasse finale », plus généralement appelé « mélasse », désigne les résidus du jus de canne obtenus après sa clarification et extraction du sucre (Figure 2). Une partie de la mélasse est transformée, par fermentation et distillation, en alcool ; une autre partie sert de substrat pour la culture de levures. Son utilisation extensive dans l'alimentation animale et notamment dans celle des ruminants et des chevaux, en mélange avec de la paille ou d'autres aliments celluloseux tels que le son, ou comme liant dans les rations complètes ou encore pour favoriser l'ingestion d'aliments peu appétent (Cartier *et al.*, 1999).

2.1. Composition chimique

La mélasse est une substance brunâtre, visqueuse, dont la teneur en eau varie habituellement entre 15 et 25 %. Sa densité s'élève à 1,35 environ et son pH est légèrement acide. Selon quelques auteurs, notamment (Pejin *et al.*, 1996), elle contient 5 à 6 % d'acides organiques, dont la moitié sous forme combinée à l'état de sels ou d'esters. L'acide aconitique est quantitativement le plus important (5 à 6 % dans certaines mélasses). De plus, on y trouve, en faible quantité, des acides minéraux tels que l'acide nitrique (0,15 %). L'énergie brute de

la mélasse est d'une valeur moyennes de 3791 (Kcal/ matière sèches). Sa couleur sombre est due à l'action de la chaleur sur les protéines, en présence de glucides réducteurs.

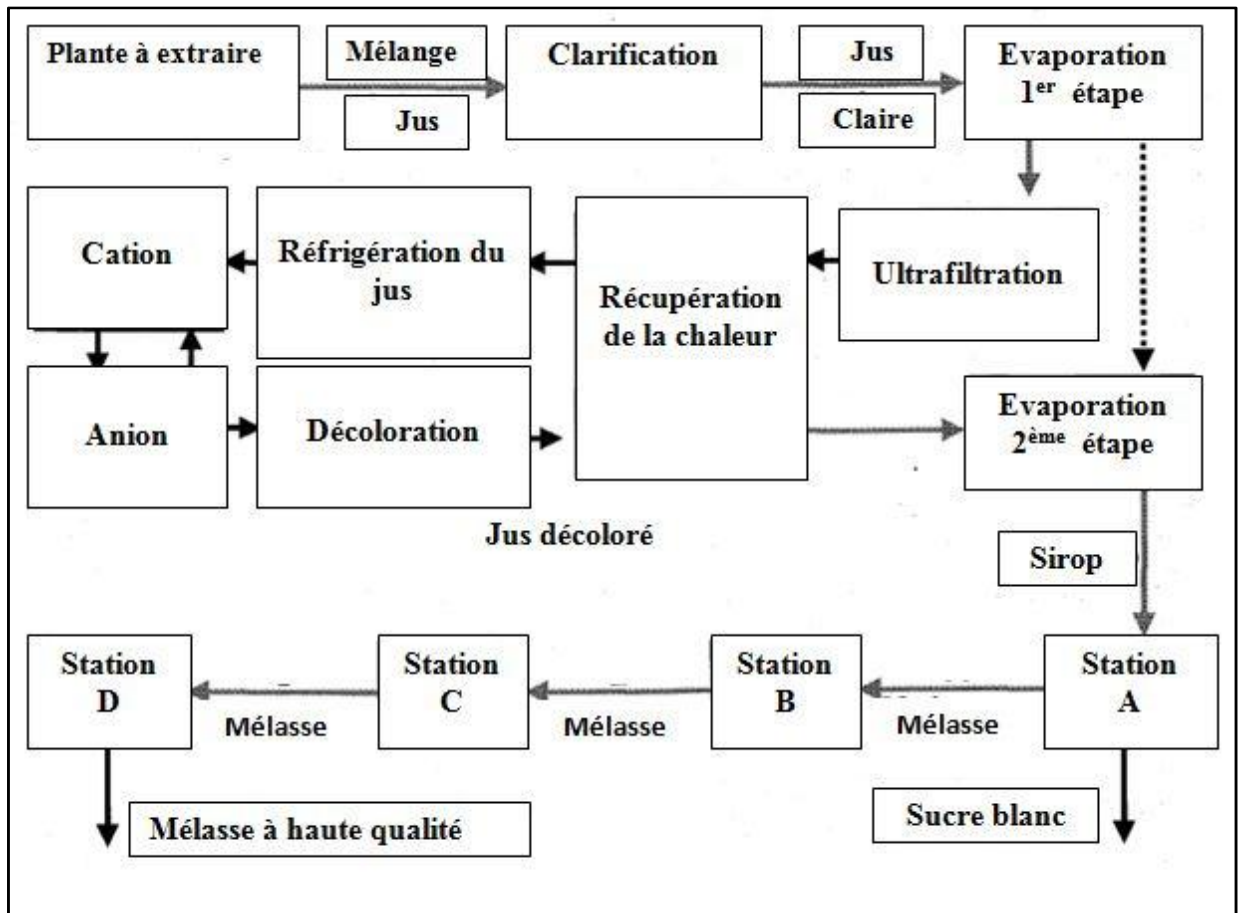


Figure 2. Diagramme de l'obtention de la mélasse (Fechter *et al.*, 2001)

Tableau 2. Composition chimique de la mélasse de canne à sucre (exprimées en % de MH)
(Steg et Van Der Meer, 1985).

Composition (p. cent)	Moyenne	Valeurs extrêmes
Matière sèche	76,8	71,0 – 80,0
Cendres	8,4	5,5 – 11,3
Matière grasses	0,1	0,0 – 0,3
Extrait non azoté	64,6	51,7 – 69,0
Glucides solubles	58,7	50,0 – 69,7
Saccharose	34,6	29,6 – 37,8
Glucides réducteurs	16,2	13,9 – 17,0
Glucose	8,6	5,5 – 14,0
Fructose	9,9	1,3 – 16,0
Protéines	3,6	1,5 – 10,2

2.2. Intérêt industriel

La mélasse est généralement utilisée pour l'alimentation des animaux mélangée ou simplement épandue sur le fourrage, outre le fait qu'elles accroissent l'appétibilité, les mélasses se substituent à d'autres glucides plus coûteux. Leurs propriétés laxatives constituent, dans de nombreux cas, un avantage supplémentaire (Fechter 2001).

Les mélasses ont une composition complexe ce qui fait d'elles un milieu de culture adéquat pour la production de levures et de certaines métabolites (bioéthanol) (Siqueira *et al.*, 2008).

Les mélasses de betterave et de cannes à sucre permettent d'obtenir des biomasses protéiques ou des levures pour la panification ; les deux espèces les plus cultivées sur ces substrats sont *saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis* (Chavez-lópez *et al.*, 2014).

3. Olives

Le patrimoine oléicole mondial compte actuellement environ 750 millions d'oliviers cultivés sur une superficie de 9,23 millions d'hectares. Les pays méditerranéens comptent 715 millions d'oliviers sur une superficie d'environ 8.16 millions d'hectares, soit 95% du patrimoine oléicole mondial (Fiorentino *et al.*, 2003).

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est de plus propice à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive (Tsagaraki *et al.*, 2007). Le patrimoine oléicole algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. La production annuelle en huile a atteint 35.000 tonnes et celle de l'olive de table 80.000 tonnes (Hadjou *et al.*, 2013).

L'olive, fruit de l'olivier est une drupe à mésocarpe charnu, indéhiscente (ne s'ouvrant pas), à noyau. Sa forme est ovoïde ou ellipsoïde. Ses dimensions sont très variables suivant les variétés (Aparicio et Harwood, 2013; Murphy, 2014).

La paroi de ce fruit est constituée :

- D'épicarpe (épiderme ou peau) solidement attaché à la pulpe. A maturation, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre (olive verte), à la couleur violette ou rouge (olive tournante) puis à la coloration noirâtre (olive noire).
- De mésocarpe (pulpe ou chair), charnu, riche en huile.
- De l'endocarpe (noyau), se compose d'une enveloppe boisée renfermant un ou, rarement deux graines.

Les olives vertes : Fruits de couleur vert franc à vert - jaune, brillant ou pruiné, récoltés au moment où ils ont atteint leur développement complet mais nettement avant la véraison (Jimenez *et al.*, 1995).

3.1. Composition chimique

La composition chimique de l'olive (Tableau.3) est fonction de plusieurs paramètres dont la variété, le climat et les conditions culturales.

L'olive est riche en eau (40-45%), glucides (10-20%) et en lipides qui représentent environ 30 % du fruit mûr (environ 50% du péricarpe et 35-40% de l'amande qui représente 15% du poids du noyau).

Tableau 3. Principaux fractions du fruit d'olive (Ghedira, 2008).

Fraction chimique	
Fraction saponifiable	Fraction insaponifiable (teneur/100g)
Acide palmitique 7.5-20 %	Hydrocarbures dont le squalène : 300-700 mg
Acide palmitoléique 0.3 – 3.5	Stérols dont le β -sitostérol : 70-90 mg
Acide stéarique 0.5 – 5.0 %	Alcools triterpéniques : 100-300 mg
Acide oléique 55 – 83 %	-tocophérols : 4-13 mg
Acide linoléique 3.5 – 21.0 %	-tocophérols : 1-2 mg
Acide α -linoléique > 0.9%	Composés phénoliques : 50 mg dont l'hydroxytyrosol 0.01–1 mg.

4. Margines

Dans les huileries fonctionnant avec le système de presse, les olives sont broyées et malaxées à l'aide de broyeurs comportant une ou deux meules qui tournent avec une énergie électrique (Francesco, 1993). La pâte d'olive obtenue est répartie manuellement dans des sacs ou scourtins qui sont ensuite empilés sous des presses hydrauliques. Il en résulte, après pression, un résidu solide appelé grignon brut et un moût huileux constitué de l'eau de végétation (les margines) et de l'huile d'olive (Morillo *et al.*, 2009). La récupération de l'huile est obtenue après décantation accompagnée d'une séparation par une centrifugation (Figure 3).

➤ Margines ou eaux de végétation : sont des effluents liquides, Le pressage de 1 tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes (Torrecilla *et al.*, 2008).

Les margines à l'origine, se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre, qui se transforme en margine de couleur noir, nauséabond, d'aspect trouble et une odeur spécifique d'huile d'olive. Sa couleur noire résulte de la présence de polyphénols.

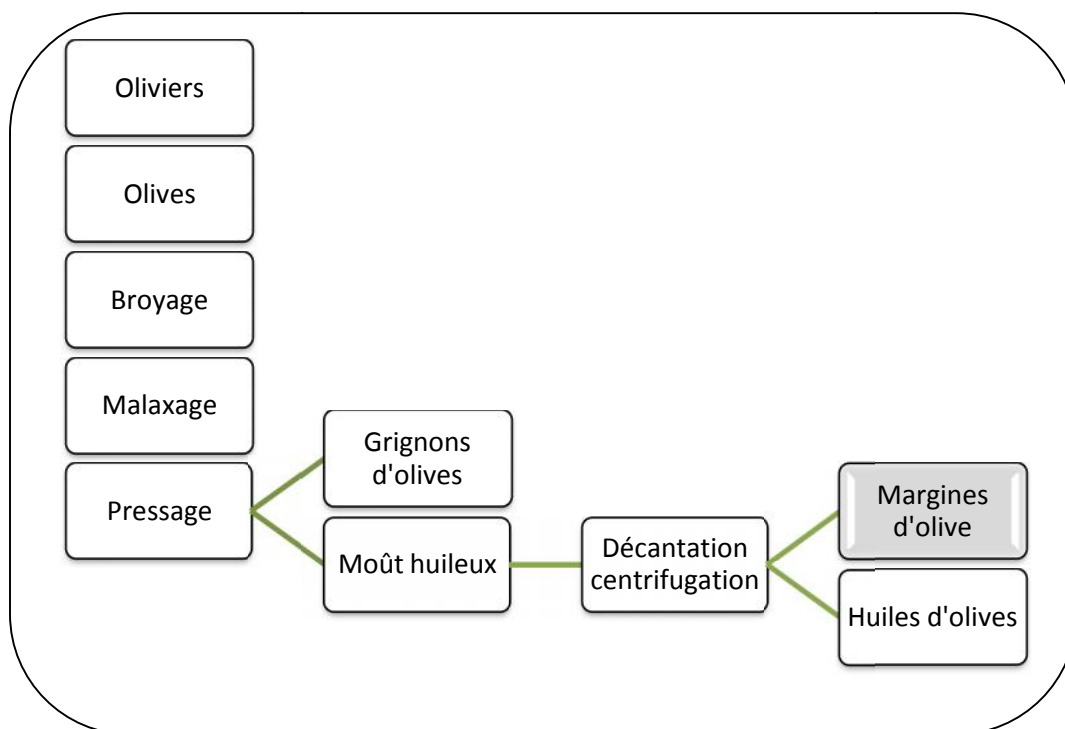


Figure 3. Schéma de l'industrie oléicole avec le système de presse (Hamdi, 1991).

La caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes d'extraction de l'huile d'olives, elle diffère d'un pays à l'autre. En général, les margines sont caractérisées par un pH acide de 4 à 5 et une très grande conductivité électrique due surtout aux ions potassium, chlorure, calcium et magnésium. En générale elles contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes (Galanakis *et al.*, 2010).

4.1. Composition chimique

4.1.1. Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives de sels minéraux (Ranalli, 1991), dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) (Fiestas Ros de Ursinos et Borja Padilla, 1992).

4.1.2. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques : une fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives qui représente la matière en suspension et colloïdale (Hamdi, 1991) et une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient les sucres, les

lipides, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les composés phénoliques (Obied *et al.*, 2005).

Les glucides sont essentiellement représentés par les composants pariétaux, en particulier la cellulose et les pectines, ces dernières jouent un rôle important dans la texture des olives où ils représentent environ 0,6 % du poids de la pulpe fraîche (Galanakis *et al.*, 2010). De nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples (Fezzani et Cheikh, 2009). Les sucres simples les plus fréquents dans les margines sont, en particulier, le raffinose, le saccharose, l'arabinose, le xylose, le glucose, le mannose, le fructose (Garcia-Castello *et al.*, 2010).

4.2. Intérêt industriel

Les dix dernières années ont vu se multiplier le nombre de chercheurs qui travaillent sur l'utilisation des margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie et de l'agriculture (Dourou *et al.*, 2016).

La valorisation des margines par récupération de quelques composants en particulier des composants aromatiques et phénoliques et des solutions de glucides. ces extraits phénoliques obtenus ont été comparés aux antioxydants de synthèse les plus connus (BHA, BHT), dans des essais de résistance à l'oxydation (Dourou *et al.*, 2016).

L'obtention des protéines unicellulaires se traduit par une diminution de la DBO (60 à 70%) et l'obtention de 13 kg de levures par mètre cube de margines. De plus, les cellules de levure absorbent le colorant brun des margines qui empêche l'épuration parfaite des eaux polluées (Rawat *et al.*, 2011). La croissance de *Cryptococcus albidus* sur margines durant 48 h élimine environ 75 % de la DBO tout en produisant de la biomasse et des enzymes (13 U/ml). Ces enzymes ont été testés pour l'amélioration du système d'extraction d'huile d'olive (Aissam *et al.*, 2002). Les margines sont utilisés aussi comme fertilisant, de part leur teneur élevée en minéraux (Levi-Minzi *et al.*, 1995).

1. Introduction

Les pigments naturels sont issus de végétaux et d'animaux, dans certains cas, à partir de déchets agro-industriels comme la tomate (lycopène), le raisin (anthocyanes) et le palme (caroténoïdes). Cependant, la variabilité de la source et la présence à faible concentration de pigment dans ces fruits cibles nécessitent un traitement de grandes quantités de déchets agro-industriel (Rao et Rao, 2007).

Il existe trois principales sources de colorant comme additifs pour les aliments, les médicaments et en cosmétiques: les colorants synthétiques, les pigments dérivés de plantes, et les pigments microbiens. En chimie, les substances colorées sont des colorants solubles et ceux insolubles dans l'eau sont des pigments; Toutefois, dans un contexte biologique, les substances colorées sont des pigments appelés, indépendamment de leur solubilité. Bien que le terme "biopigment" est utilisé pour désigner des pigments d'origine naturelle (De Carvalho *et al.*, 2014).

2. Origine de la couleur des pigments

Lorsque la lumière interagit avec la matière, il peut y avoir absorption, réflexion, réfraction, et même réémission en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente, la composition chimique et la structure physique de la matière donnant lieu à la multitude de couleurs que nous voyons (Young et Britton, 2012). Un matériau peut absorber la lumière incidente non spécifique ou sélective : si l'absorption est non spécifique, la couleur de la matière est observée en tant que blanc, gris ou noir, tandis que si l'absorption d'une ou plusieurs longueurs d'onde est plus prononcée, nous percevons le matériau qui possède la couleur complémentaire de celle absorbée (Vachali *et al.*, 2012).

La figure 4 illustre la relation entre la structure et la couleur: les substances avec des doubles liaisons conjuguées absorbent et réémettent la lumière dans le visible.

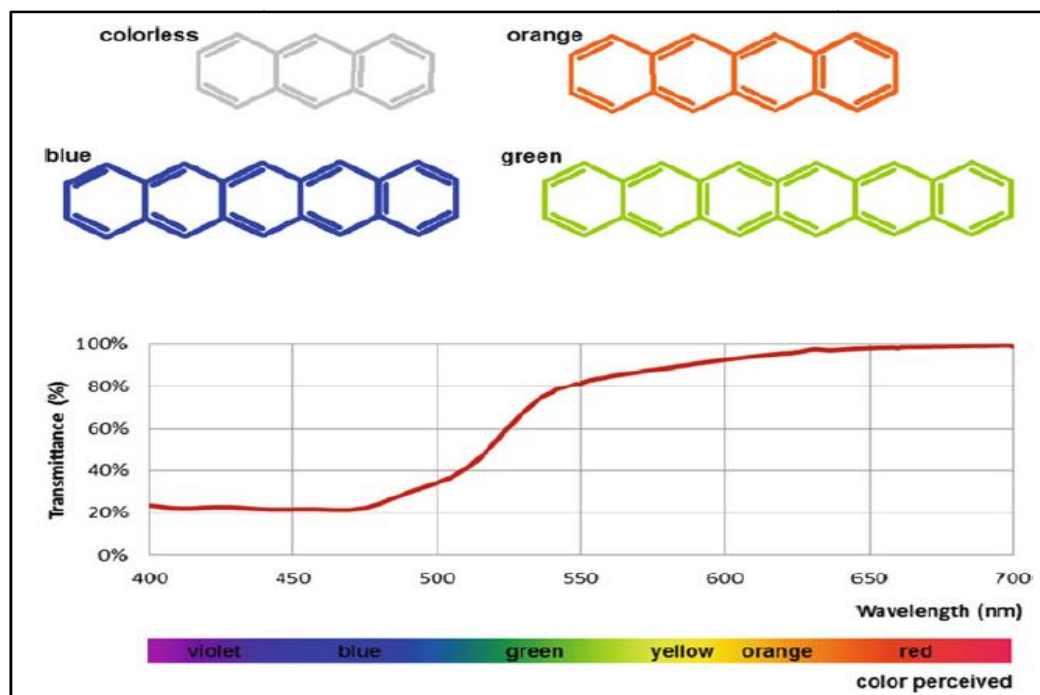


Figure 4. Courbe de transmission de lumière selon la présence de double liaison dans les pigments (De Carvalho *et al.*, 2014).

3. Pigments d'origine microbienne

L'utilisation de micro-organismes sélectionnés qui sont capables de synthétiser des pigments spécifiques présente les avantages de lots homogènes et de haute concentration et de qualité (Venil *et al.*, 2013).

Les pigments microbiens ou biopigments possèdent une multitude de structures chimiques capables d'absorber la lumière dans le visible (400-700 nm) (Bhat *et al.*, 2013). En dépit de la grande variété des bio-pigments, certaines structures récurrentes apparaissent dans la nature et sont illustrés sur la figure 5. Il y a un nombre croissant de biopigments. Ces molécules peuvent posséder d'autres propriétés, qui peuvent ou être compatibles avec l'utilisation industrielle: les vitamines riboflavine ou β -carotène (Vachali *et al.*, 2012), des antioxydants comme la plupart des caroténoïdes et des xanthophylles et de l'activité antimicrobienne de certains polycétides fongiques (Malik *et al.*, 2012).

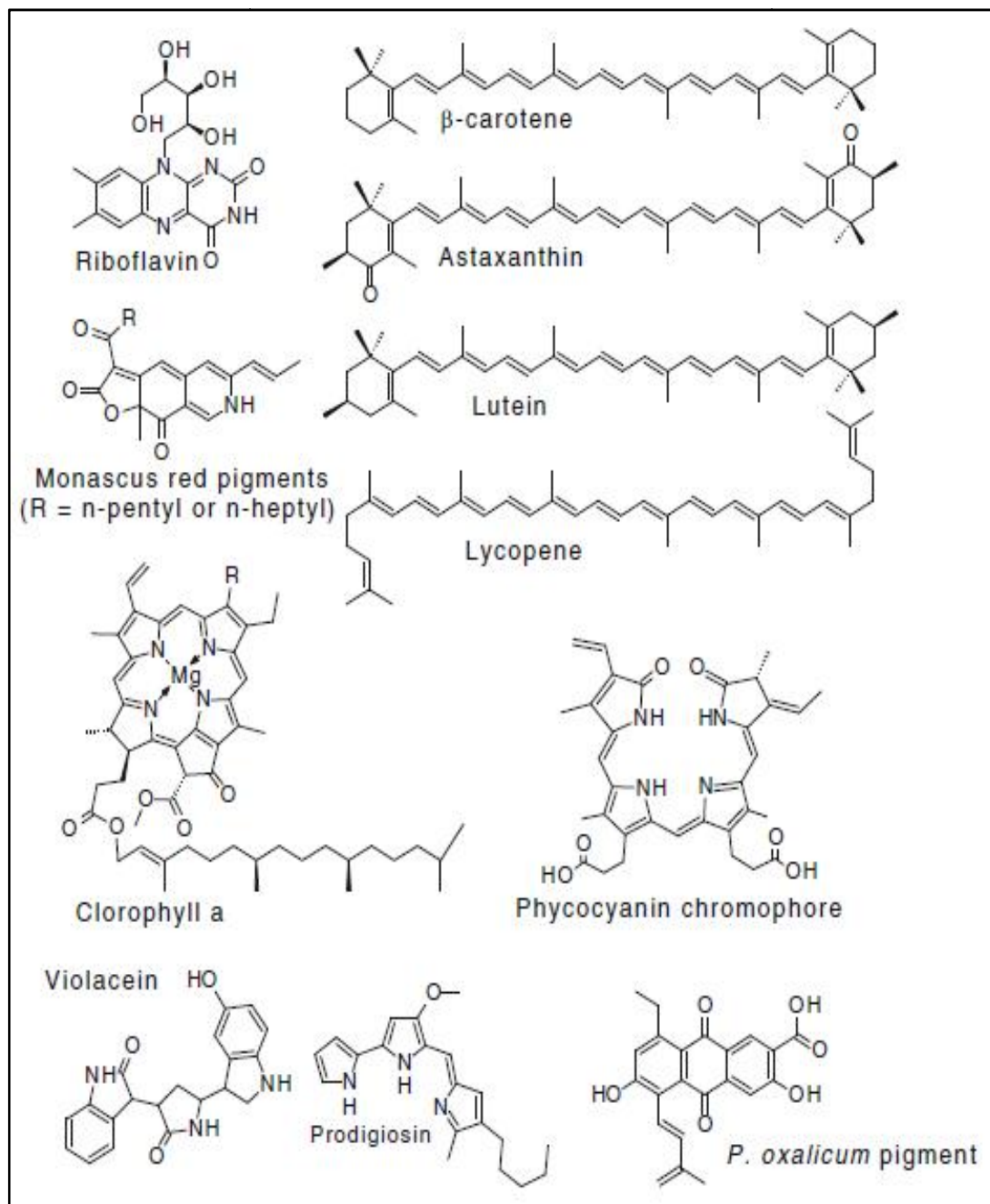


Figure 5. Structure fondamentale de quelques pigments microbiens (Dufossé, 2006).

3.1. Rôle et utilisation des pigments

Parmi les nombreux rôles biologiques de ces molécules, les plus importants étant : leur nature antioxydant, leur utilisation comme lien pour l'absorption d'énergie, et les substances de réserve (Malik *et al.*, 2012).

Plusieurs pigments microbiens sont des antioxydants puissants parce que leurs systèmes conjugués sont sensibles à une addition électrophile. Tel est le cas pour les caroténoïdes et

les xanthophylles (Stahl et Sies, 2003), qui sont généralement plusieurs fois plus efficaces que l'acide ascorbique ou le butyle hydroxyle toluène (BHT) en tant qu'antioxydants.

Les substances colorées peuvent également agir en tant qu'une protection solaire, en préservant la cellule par l'absorption du rayonnement UV et en réduisant ainsi la formation de radicaux libres endommageant l'ADN (Vachali *et al.*, 2012).

les micro-organismes photosynthétiques tels que les cyanobactéries et les algues microscopiques synthétisent des pigments tels que les chlorophylles et les phycobilines pour transférer l'énergie lumineuse aux électrons qui seront utilisés pour la réduction du carbone dans la photosynthèse, un mécanisme qui produit l'oxygène contenu dans l'atmosphère et est à la base de presque toutes les chaînes alimentaires (Venil *et al.*, 2013).

Certains biopigments tels que les phycobilines, la chlorophylle, et la prodigiosine peuvent également agir en tant que réserve de l'azote dans les micro-organismes.

La plupart des pigments naturels sont facilement oxydés (Les caroténoïdes), hydrolysés (les phycobilines) ou excrétés en raison de leurs solubilité dans l'eau (la riboflavine) (Dufossé, 2006).

Certains pigments tels que l'astaxanthine sont bénéfiques pour la santé, d'autres comme celles à activité provitaminique A (-carotène et -cryptoxanthine) sont en fait essentiels pour la nutrition humaine (Dufossé *et al.*, 2005).

Ces colorants naturels (Tableau 4) sont utilisés dans les aliments pour bébés, les céréales, les pâtes, les sauces, les fromages fondus, les boissons aux fruits, les produits laitiers enrichis en vitamines et certaines boissons énergisantes. Ainsi, les biopigments peuvent également servir le double intérêt de couleurs visuellement attrayantes et de probiotiques dans les produits alimentaires (Malik *et al.*, 2012).

Tableau 4. Pigments microbiens et leurs utilisations comme colorants naturels dans les aliments (Venil *et al.*, 2013).

Molécule (couleur)	Microorganisme	Rôle métabolique
Lutéine (jaune)	<i>Spongiococcum excentricum</i>	Antioxydant
Ankaflavine (jaune).	<i>Monascus</i> sp	Antimicrobien
Anthraquinone (rouge)	<i>Penicillium oxalicum</i>	
Astaxanthine (Saumon)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Antioxydant
	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	
	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	
-carotène (orange)	<i>Blakeslea trispora</i>	Activité provitaminique-A,
	<i>Dunaliella salina</i>	Antioxydant
Monascorubramine (rouge).	<i>Monascus</i> sp	Antimicrobien
Phycocyanine (bleu)	<i>Arthrospira platensis</i>	Antioxydant
Riboflavine (jaune)	<i>Ashbya gossypii</i>	Vitamine B2
Rubropunctatine (orange).	<i>Monascus</i> sp	Antimicrobien
Lycopène (jaune)	<i>Blakeslea trispora</i>	Antioxydant

3.2. Exemples de pigments synthétisés par les micro-organismes

Les critères de sélection des micro-organismes produisant des pigments sont :

- L'observation des colonies sur des boîtes de Pétri sur milieu gélosé
- La formation d'halo de diffusion, si le pigment est libéré dans le milieu et est au moins partiellement soluble dans l'eau (Figure 6).



Figure 6. Colonies de *Monascus* sur gélose YM (De Carvalho *et al.*, 2014).

Les levures dont le genre *Rhodotorula* synthétisent des pigments caroténoïdes. Plusieurs recherches se concentrent sur les espèces *Rhodotorula glutinis*, d'autres traitent des espèces telles que *R. gracilis*, *R. rubra*, et *R. graminis* (Tinoi *et al.*, 2005). Les principaux composés produits par ces levures rouges sont le torulène et la torularhodine, avec une quantité minimale de β -carotène (Perrier *et al.*, 1995 ; Tinoi *et al.*, 2005).

D'autres levures comme *Sporobolomyces roseus*, *Sporobolomyces salmonicolor* et *Sporobolomyces patagonicus* sont des producteurs de caroténoïdes. Ces levures sont connues comme les plus productrices de β -carotène et donc les plus étudiées. Outre le β -carotène, ces levures produisent d'autres caroténoïdes identifiés comme Torulène, Torularodine et β -carotène (Goodwin, 1980 ; Maldonade *et al.*, 2008).

La riboflavine est une vitamine jaune hydrosoluble produite par de nombreux micro-organismes. La synthèse chimique traditionnelle de la riboflavine est maintenant remplacée par des procédés biotechnologiques commercialement compétitifs utilisant des levures tel que *Ashbya gossypii* et *Candida famata* (Stahmann *et al.*, 2000).

Parmi les bactéries producteurs de caroténoïdes les plus étudiés, sont *Corynebacterium michiganense*, *Micrococcus spp* (Figure7), *Brevibacterium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Gordonia jacobaea* et *Dietzia natronolimnaea* (Nasrabadi et Razavi, 2010).



Figure 7. Pigment jaune synthétisé par *Micrococcus spp* (Bhat *et al.*, 2013).

Les Prodigiosines sont une classe de pigments antibiotiques tripyrrole produits par plusieurs micro-organismes tels que *Serratia marcescens* et *Hahella chejuensis*. Ces substances ont reçu une attention renouvelée récemment en raison de ses propriétés immunosuppresseurs et anticancéreux (Williamson *et al.*, 2006 ; Gulani *et al.*, 2012) et implication potentielle dans la réduction de la prolifération des algues (Kwon *et al.*, 2010).

Les cultures de *Serratia* produisent près de 500 mg/l de prodigiosine en 2 jours, à 30° C. Giri *et al.* (2004) ont obtenu une bonne production dans un bouillon de graines d'arachide

(38,75 g/l), ils ont indiqué que l'arachide (et le soja) résidus de traitement pourrait être un substrat adéquat pour le pigment. *Paracoccus carotinifaciens* est une bactérie qui accumule un mélange de caroténoïdes (Nishioka *et al.*, 2011).

Les champignons de *Monascus* produisant des pigments rouges ont été longtemps utilisés dans la production d'aliments traditionnels de l'est d'Asie tels que le vin de riz rouge et le caillé d'haricot rouge (Malik *et al.*, 2012). *Phycomyces* et *Mucor circinelloides* sont une source potentielle de β -carotène. Une autre espèce fongique *Blakeslea trispora* est connue aussi par la production de β -carotène. (Muthezhilan *et al.*, 2014).

Un complexe de pigment jaunâtre orangé, riche en caroténoïdes et flavonoïdes, synthétisé par la souche sélectionnée d'*Epicoccum nigrum*, a été étudié par Bleoju et González Sanjosé (2007) (Figure 8).



Figure 8. Morphologie des colonies d'*Epicoccum nigrum* sur boîte de Pétri (Bleoju et González Sanjosé, 2007).

4. Caroténoïdes

4.1. Introduction

Les caroténoïdes sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes représentant une grande classe de composés à fonctions très variées. L'appartenance à cette catégorie est établie sur les critères de structure et de biosynthèse (Morin-Savy, 2005).

La couleur est l'élément caractéristique de ces molécules, elle peut varier du jaune au rouge (Dufossé, 2013). Ces molécules doivent leurs couleurs à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde (Vachali *et al.*, 2012).

La production des caroténoïdes est dominée par la synthèse chimique et l'extraction à partir des plantes (Bhat *et al.*, 2013). La production à partir de la biosynthèse microbienne n'est pas très importante par rapport aux autres types d'obtention. Cependant, la recherche pour la réduction des coûts de production des colorants naturels issus de micro-organisme est en expansion (Panesar *et al.*, 2013). Ces recherches visent à découvrir des souches microbiennes sauvages nouvelles qui favoriseraient le développement de procédés d'obtention des colorants au label « naturel » par rapport à ceux obtenus par synthèse chimique ou même par extraction à partir des plantes (Dufossé, 2006).

4.2. Structure chimique

Les caroténoïdes constituent une classe de composés chimiques comprenant les carotènes et les xanthophylles. Les caroténoïdes ont généralement une structure chimique de quarante carbones composés de huit unités isopréniques (à 5C) organisées en un hydrocarbure acyclique. Ils font partie d'une grande classe de composés caractérisés par la présence d'un enchaînement de 8 unités isopréniques (C_5H_8) qui forment ainsi la structure de base ($C_{40}H_{56}$), représentée dans la figure 9. La structure des caroténoïdes est linéaire et symétrique, mais une cyclisation d'une des extrémités ou des deux est possible. D'autres transformations de la structure comme l'hydrogénation, la déshydrogénation, la cyclisation ou l'oxydation sont responsables de la grande variété des caroténoïdes connues (Morais *et al.*, 2002). Les doubles liaisons confèrent à la molécule un caractère chromophore et sont ainsi responsables de la coloration des caroténoïdes (Britton *et al.*, 2008).

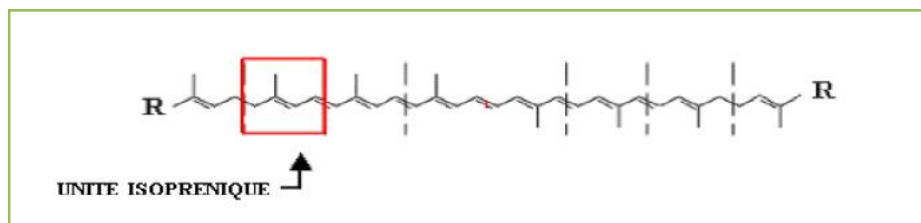


Figure 9. Structure générale des caroténoïdes (Britton *et al.*, 2008).

4.3. Origines

Les caroténoïdes sont présents dans les végétaux, les algues (Phadwal et Singh, 2003), les micro-organismes - bactéries (Sandmann *et al.*, 1999), levures et champignons filamenteux (Herz *et al.*, 2007). De nombreuses souches sauvages ou génétiquement modifiées, principalement issues des genres *Rhodotorula* (Aksu et Eren, 2005 ; Park *et al.*, 2007), *Phaffia* et *Sporobolomyces* (Razavi *et al.*, 2006) sont connues pour produire des caroténoïdes. La nature et la concentration des caroténoïdes produits sont dépendantes de l'espèce du microorganisme et des conditions de culture. Le genre *Rhodotorula* produit principalement le β -carotène et le torulène (Bhosale et Gadre, 2001) et l'espèce *Phaffia rhodozyma*, produit l'astaxanthine (Vázquez *et al.*, 1997).

Les caroténoïdes sont également produits par des bactéries et levures naturellement non productrices de caroténoïdes, en utilisant des techniques de recombinaison de l'ADN, par l'intégration de gènes pour la production de caroténoïdes comme le lycopène, le β -carotène et la zéaxanthine par *Escherichia coli* (Sandmann *et al.*, 1999).

4.4. Biosynthèse

La biosynthèse des caroténoïdes (Figure 10) commence par l'acide mévalonique qui par des réactions différentes (étapes initiales) produit le pyrophosphate de géranylgeranyle (GGPP). Deux molécules de GGPP sont condensées pour synthétiser le phytoène, qui se transforme en lycopène par quelques étapes de désaturation. Le β -carotène est finalement formé à partir du lycopène par cyclisation. L'oxygénation des caroténoïdes donne les xanthophylles telles que l'astaxanthine (Wang *et al.*, 2007).

Généralement, les caroténoïdes sont dénommés selon des variations structurelles des groupements latéraux, en particulier la position de double liaison (Mata-Gómez *et al.*, 2014).

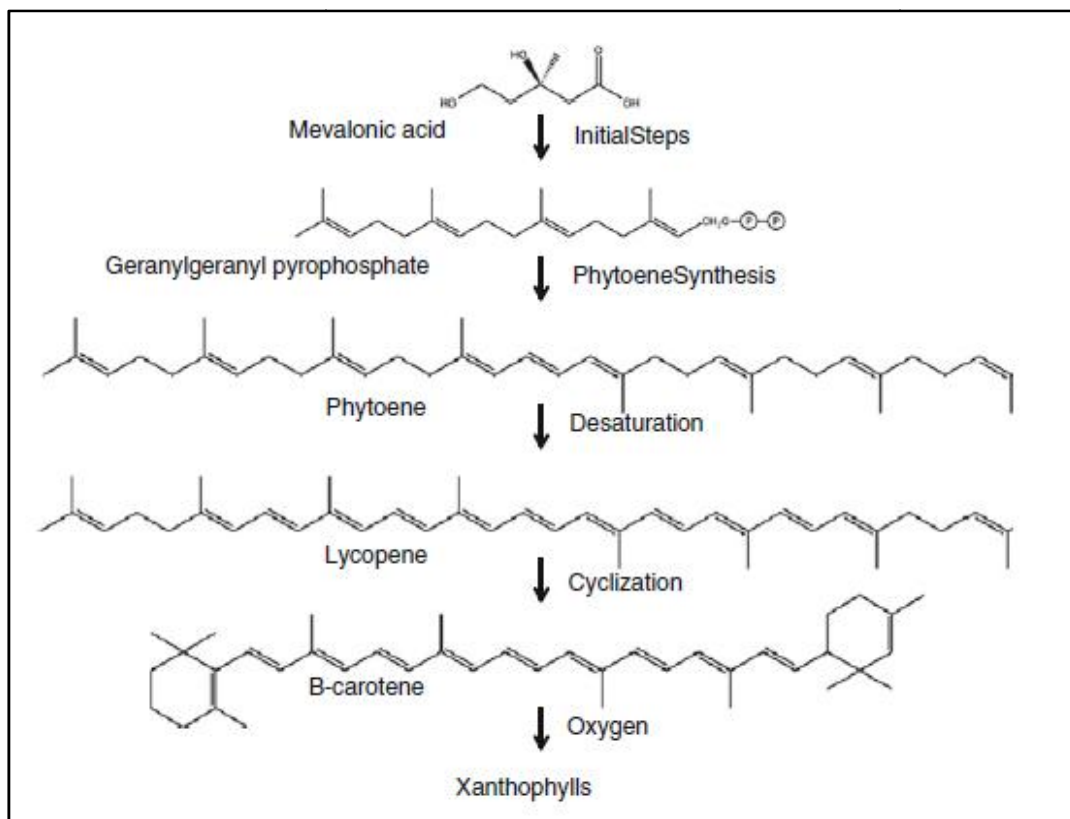


Figure 10. Voie de biosynthèse des caroténoïdes (Vandamme, 1989).

Parmi les caroténoïdes microbiens nous citons :

➤ Le β -carotène (β -carotène) (Figure 11a) est utilisé comme colorant alimentaire ou comme complément alimentaire agissant comme provitamine A, dans une concentration comprise entre 2 et 50 ppm. Il est également ajouté aux formulations de jus et de boissons (matrices hydrophiles) et autres (matrices lipophiles) comme le beurre, la margarine et le fromage (Britton *et al.*, 1995).

➤ Le torulène (3',4'-didéhydro- β -carotène) (Figure 11b) possède 13 doubles liaisons conjuguées et présente une couleur attrayante. Les propriétés antioxydantes du torulène sont attribuées à son système de double liaison conjuguée; En fait le torulène possède plus d'efficacité antioxydante que le β -carotène (Sakaki *et al.*, 2001 ; Sakaki *et al.*, 2002).

➤ L'astaxanthine (3,3'-dihydroxy- β -carotène-4,4'-dione) (Figure 11c) est un pigment rouge qui provoque la coloration chez les invertébrés marins, les poissons et les oiseaux. De même, les carotènes décrits avant son application comme colorant confèrent la couleur rosé-rouge typique du saumon d'élevage, de la truite et de la crevette (Johnson et Lewis, 1979 ; Reynders *et al.*, 1996).

➤ La cantaxanthine (β -carotène-4,4'-dione) (Figure 11d) est un céto-carotène cosmopolite qui présente un intérêt pour les industries alimentaires et cosmétiques (Hannibal *et al.*, 2000).

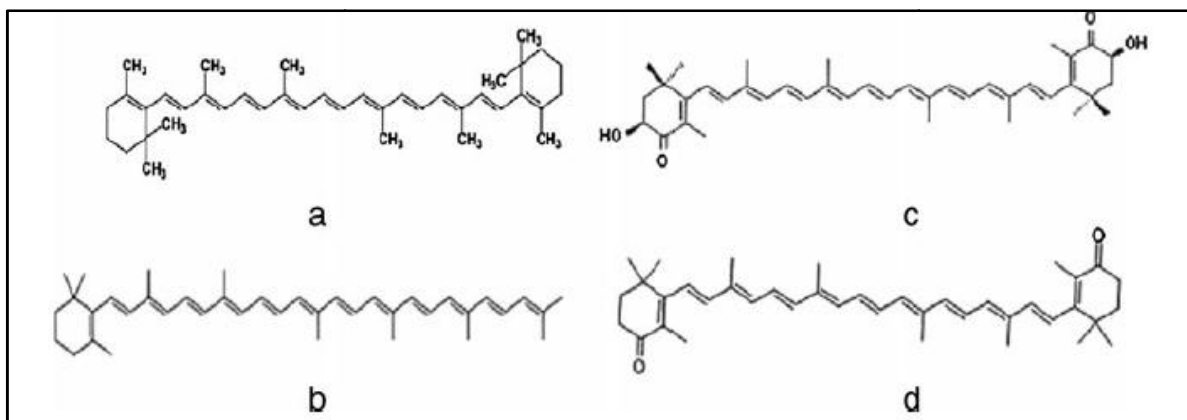


Figure 11. Structure chimique des caroténoïdes d'origine microbienne (Mata-Gómez *et al.*, 2014).

4.5. Propriétés physico-chimiques et biologiques

Les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants apolaires et également dans les graisses alimentaires. Le spectre d'un caroténoïde possède trois maxima, dont les longueurs d'onde dépendent du nombre de liaisons doubles conjuguées. Les longueurs d'onde d'absorption des caroténoïdes colorés sont comprises entre 400-700 nm, dans le spectre de lumière visible (Frigaard *et al.*, 2004).

Les caroténoïdes sont employés dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique en tant qu'additifs, pour leurs caractéristiques biologiques et colorantes (Sandmann *et al.*, 1999). ils sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (Palozza *et al.*, 1996), activité anti-radicalaire et activité pro-vitaminique A (Fontana *et al.*, 1996). Les avantages des caroténoïdes en tant que colorants sont leur stabilité aux différents pH (4,0-7,0) des nombreux aliments (Dufossé, 2006) et le fait que l'addition des différents additifs, comme l'acide ascorbique, n'affecte pas leur structure.

4.6. Facteurs influençant la production des caroténoïdes par voie microbienne

La production des caroténoïdes par voie biotechnologique suscite un grand intérêt ; de nombreuses études sont réalisées dans l'objectif d'optimiser le procédé d'obtention des produits d'origine naturelle à l'échelle industrielle (Dufossé, 2006). De nos jours, la production industrielle des caroténoïdes microbiens est limitée par la faible production des

caroténoïdes par les souches sauvages connues et par le manque d'informations du mécanisme pigmentaire des micro-organismes (Buzzini, 2001).

Ces difficultés ont conduit à la recherche de nouvelles sources ou l'amélioration génétique des espèces déjà connues. L'utilisation d'un milieu de culture moins coûteux est aussi essentielle pour l'optimisation du procédé biotechnologique. De nouvelles sources carbonées et azotées, obtenues notamment à partir de coproduits agricoles ou industriels, sont indispensables pour la réduction de ces coûts de production (Buzzini, 2001 ; Aksu et Eren, 2005).

4.6.1. Influence des paramètres physico-chimiques

Les paramètres comme le pH et la température jouent un rôle primordial sur la croissance et la production de métabolites chez les micro-organismes (Mata-Gómez *et al.*, 2014). Simpson (1983) a observé que la quantité de caroténoïdes totaux et la nature des caroténoïdes produits peuvent subir une forte variation, dépendant du micro-organisme utilisé.

Plusieurs études ont été effectuées sur le genre *Rhodotorula* à différentes températures 4°C à 35°C, et que la température de culture recommandée est 30°C (Bhosale et Gadre, 2002 ; Hayman *et al.*, 1974). Frengova *et al.* (1994) ont étudié l'effet de la température sur la nature des caroténoïdes produits chez *R. glutinis* et ont montré qu'une température entre 20°C et 25°C a une influence favorable pour la synthèse du β -carotène. A 35°C, la production de la torularhodine correspond à 78 % de caroténoïdes synthétisés avec la diminution du torulène et du β -carotène. A 5°C, la concentration du β -carotène est égale à 64 % des caroténoïdes totaux.

L'influence du pH sur la croissance cellulaire et la production des caroténoïdes chez *Phaffia rhodozyma* a été étudiée par Meyer et Du Preez (1994). Ils ont rapporté que la gamme de pH 3,8-7,5 du milieu n'affectait que légèrement la croissance. À pH 5,8, la vitesse de croissance la plus rapide a été atteinte alors que l'accumulation maximale d'astaxanthine est atteinte à pH 5,0.

4.6.2. Composition du milieu de culture

La disponibilité de carbone et d'azote dans le milieu de culture est importante pour la croissance et la caroténogénèse des micro-organismes. Les études des dix dernières années ont été focalisées sur la production des caroténoïdes par voie biotechnologique en utilisant des sources carbonées issues de coproduits agricoles ou industriels (Machado et de Medeiros Burkert, 2015 ; Mateo et Maicas 2015 ; Tsakona *et al.*, 2016).

L'influence de la source azotée a été également étudiée. Une grande variété de sources d'azote a été testée pour l'optimisation de la production de caroténoïdes avec diverses espèces de micro-organismes. Les sources les plus utilisées sont l'ammonium, la glutamine et l'asparagine

4.7. Extraction des caroténoïdes

Les pigments microbiens sont synthétisés à l'intérieur de la cellule, au niveau de la paroi. Ainsi, pour la récupération des colorants, il est nécessaire de faire une extraction en cassant la paroi de la cellule. Plusieurs techniques, de type chimique, mécanique ou physique, ont été étudiées dans la littérature (Middelberg, 1995). La plupart des caroténoïdes peuvent être extraits par l'utilisation de solvants (Figure 12). Le choix de la méthode d'extraction est très important, parce que l'intégrité du produit d'intérêt en dépend.

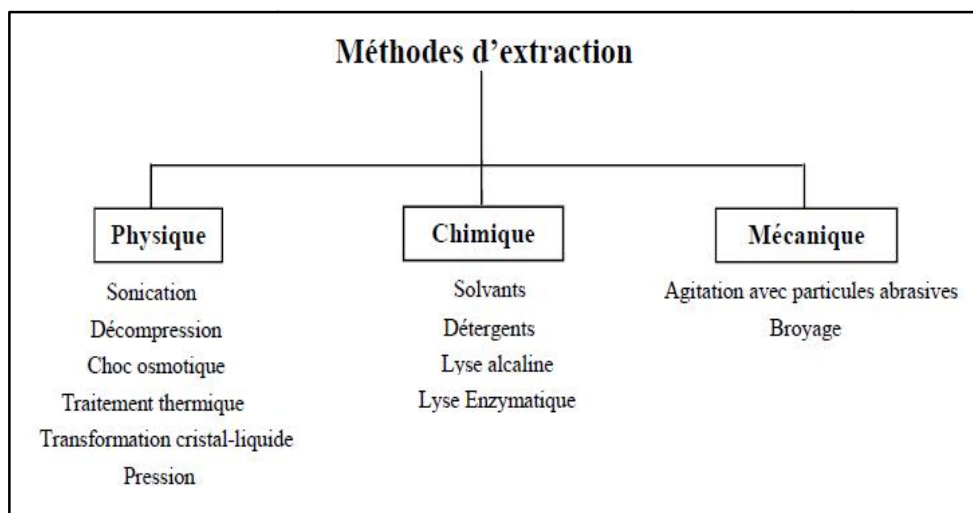


Figure 12. Techniques de désintégration de la paroi des microorganismes, d'après la proposition modifiée d'Edebo et Magnusson (2008).

Johnson *et al.* (1979) ont mis en évidence une méthode pour l'extraction de l'astaxanthine en utilisant l'enzyme extracellulaire de *Bacillus circulans* WL-12, qui peut digérer la paroi cellulaire. Cette méthode est intéressante cependant elle possède un désavantage important : le coût de l'enzyme et la difficulté du procédé d'extraction (Middelberg, 1995)

L'utilisation du diméthyl-sulfoxyde (DMSO), est la méthode chimique la plus utilisée dans la littérature (Vazques *et al.*, 1997 ; Park *et al.*, 2007) pour la désintégration des cellules. Cette méthode est efficace, toutefois elle présente des inconvénients comme le coût et la nocivité du solvant. En plus, pour augmenter l'efficacité de la désintégration des cellules, le

DMSO doit être préchauffé ($> 55^{\circ}\text{C}$) ; cependant, la combinaison d'un solvant organique fort à la chaleur peut induire la dégradation des caroténoïdes (Razavi, 2004).

La presse de French est une méthode physique très efficace pour l'extraction des caroténoïdes. Le système de désintégration consiste en un passage des cellules à l'aide d'un piston par une valve étroite par haute pression ; après ce passage la solution revient à la pression atmosphérique qui induit la désintégration des cellules (Middelberg, 1995).

Matériel et méthodes

Cet étude a été réalisée du 02 février au 08 août 2016, dans le laboratoire de recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BioQual) et dans les laboratoires pédagogiques de l'Institut de Nutrition d'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A)- Université des frères Mentouri 1 – Constantine.

1. Méthodologie expérimentale

Notre travail vise la recherche de souches microbiennes productrices de pigments caroténoïdes à partir de biotopes algériens d'origine agro-alimentaire. Cette recherche se situe dans le cadre de la valorisation de sous-produits issus de différentes industries agro-alimentaires et l'utilisation d'une matière végétale, en vue d'une exploitation en industrie agro-alimentaire (Figure 13).

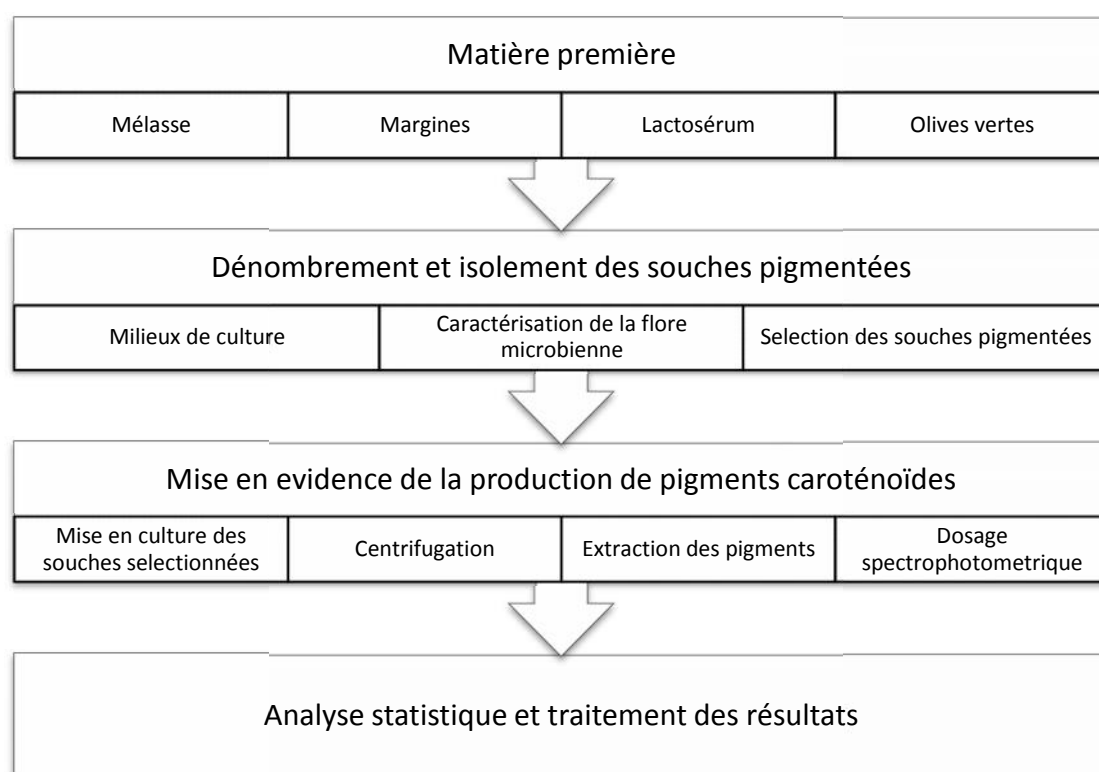


Figure 13. Méthodologie expérimentale de notre étude.

2. Matériaux d'isollements

Les échantillons utilisés ont été prélevés dans des bocaux en plastique stériles, prélevés directement de l'installation de production au niveau de l'usine pour les margines, la mélasses et le lactosérum, pour les olives vertes ont été récoltées directement du champ de culture, puis transportés vers le laboratoire et réfrigérés à 4°C jusqu'au moment d'entamer le travail expérimental (Figure 14).



Figure 14. Echantillons issus de la production 2016, utilisés pour la recherche des micro-organismes pigmentés.

3. Etude microbiologique

Notre travail commence par une recherche de la flore totale contenu dans les échantillons de margines, mélasse, lactosérum et olives vertes en utilisant des milieux de culture spécifique qui peuvent être susceptible de favoriser le développement de micro-organismes pigmentés.

3. 1. Milieux de culture

Pour la mise en évidence de micro-organismes pigmentés nous avons utilisés des milieux de culture sélectifs (Valduga *et al.*, 2008) et qui vont nous permettre d’isoler les trois groupes de micro-organismes (Tableau 5) (Guiraud, 2003).

Tableau 5. Milieux de culture utilisés pour la recherche des micro-organismes pigmentés.

Milieux*	Références
Tryptone soja gélosé (TSA)	(Collins, 2006)
Tryptone soja agar sel (TSAS)	(Galaup <i>et al.</i> , 2015)
Extrait de levure extrait de malt glucosé (YMA)	(Joshi <i>et al.</i> , 2013)
Oxytetracycline glucosé gélosé (OGA)	(Marquina <i>et al.</i> , 1992)
Sabouraud dextrose gélosé (SD)	(Maldonade <i>et al.</i> , 2007)

* : La composition des milieux de culture figure dans l’annexe 1.

3. 2. Préparation des échantillons

Les échantillons fournis au laboratoire consistent en deux produits liquides (les margines, le lactosérum), un produit solide (les olives vertes) et un dernier visqueux (la mélasse).

L'analyse a été effectuée à partir d'une suspension liquide, la préparation de l'échantillon nécessite l'ouverture aseptique des récipients fermés et l'homogénéisation et la fluidisation des produits liquides. Pour les produits solides l'opération de broyage a été nécessaire.

La préparation de la solution mère à une concentration de 1% a été comme suit : 10g d'échantillon solide broyé à l'aide d'un mortier stérile ou 10 ml d'échantillon liquide ont été mélangés avec 90 ml d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation, la solution à 10^{-1} a servi pour la préparation des dilutions suivantes.

Deux séries de dilutions 10^{-2} et 10^{-3} ont été préparés en prélevant à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de la solution mère et l'introduire dans un nouveau tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile ainsi s'obtenait la dilution 10^{-2} . La dilution 10^{-3} a été obtenue de la même manière.

3. 3. Dénombrement de la flore microbienne totale et la flore productrice de pigments

Le dénombrement a été effectué sur les différents milieux de culture cités auparavant selon la méthode de (Guiraud 2003b).

Deux boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé ont étéensemencées en surface par transfert et étalement de 0.1ml de chaque dilution.

Les milieux de culture ont été incubés dans une étuve (Memmert) à 30°C, pendant 24h à 120 h (Joshi *et al.*, 2013).

La méthode de numération sur milieu solide été utilisée pour le dénombrement de la flore totale ainsi que pour le dénombrement de la flore particulière ou pigmentée (Guiraud, 2003a).

Le nombre des colonies totales a été effectué à l'aide d'un compteur de colonies (BioBlock-5097) et ensuite a été évalué en UFC (unité formant colonie) par millilitre ou par gramme d'échantillon analysé, les deux estimations de la flore totale et de la flore pigmentée ont été calculées selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) \times d}$$

Avec :

N : Nombre d'unité formant colonie par grammes de produit initial.

c : Nombre de colonies comptées par boîte de Pétri.

n1, n2 : Nombre de boîtes de Pétri.

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

3. 4. Isolement et conservation des micro-organismes pigmentés

Les colonies pigmentées observées ont fait l'objet d'un isolement par touche sur les mêmes milieux de culture. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 24 à 72 h. Des séries de repiquages ont été renouvelées jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté a été estimée par observation microscopique (Bhat *et al.*, 2013).

Les photographies des pigmentation des colonies ont été réalisées par un appareil photo (SONY Cyber-shot7,2 Mégapixels).

Toutes les souches isolées ont été conservées et entretenues dans leurs milieux d'origines. La conservation des isolats purifiés a été réalisée selon deux méthodes. La première à court terme par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 30°C, les tubes ont été conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures se fait toutes les quatre semaines. La deuxième méthode, à long terme. Les isolats ont été cultivés sur leurs milieux de culture liquides (annexe 1) jusqu'à développement (formation de dépôt) puis addition de glycérol à 20 % dans des tubes eppendorfs et conservation à - 20 °C (Spencer et de Spencer, 2001).

3. 5. Caractérisation des Isolats bactériens

La caractérisation des souches a été réalisée selon les clefs de détermination de Vos *et al.* (2011) et Bergey (1934) et cela par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques et biochimiques (Guiraud, 2003a).

3.5.1. Caractères morphologiques

Afin de déterminer leurs caractères culturels (couleur, disposition forme et aspect), les colonies obtenues ont été observées à la loupe binoculaire (Motic S10). Après la coloration de Gram, les cellules ont été examinées au microscope optique (x100) (Motic) (Prescott, 2002).

3.5.2. Caractères biochimiques

Selon Guiraud (2003b), la caractérisation préliminaire des microorganismes peut se faire à partir de certains tests biochimiques, nous avons procédé comme suit :

➤ Coloration de Gram

Cette technique constitue un critère systématique important pour la classification des bactéries. Après coloration (Annexe 2), les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose.

➤ Test de la catalase

La catalase est l'enzyme qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène (O_2) et eau (H_2O). Cette enzyme existe chez les micro-organismes aérobies chez lesquels elle participe à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène.

Le test consiste à verser une goutte de peroxyde d'hydrogène dilué au dixième, sur une lame de verre et d'y ajouter, à l'aide d'une pipette pasteur, une colonie développée sur milieu gélosé, s'il y a effervescence l'activité de l'enzyme catalase est positive (Cat+). Le contraire est négatif (Bailey et Scott, 1994).

➤ Mannitol-mobilité

Le milieu mannitol-mobilité (annexe 2) permet la mise en évidence de la dégradation du mannitol par un changement de couleur de milieu contenant un indicateur coloré (virage du rouge au jaune) et aussi la possibilité de mettre en évidence la mobilité du germe étudié. L'ensemencement a été fait par piqure centrale avec un fil de platine. Après incubation à 30°C pendant 48 h, la mobilité du germe se traduit par l'envahissement plus ou moins grand de la totalité du milieu à partir de la piqure de l'inoculation (Guiraud, 2003b).

➤ **Aptitude à la sporulation**

Le but de la technique est la différenciation et la mise en évidence d'isolat possédant des spores. Les souches ont été cultivées sur le bouillon nutritif ordinaire (Annexe 2) contenant 0,004 % de sulfate de manganèse (agent favorable à la sporulation) en tube à essai. Après 3 à 10 jours d'incubation à 30°C, les cultures ont été chauffées à 80 °C durant 10 min, repiquées sur un milieu neuf et incubées à nouveau à la même température pendant 3 jours ou plus.

La coloration de Bartholomew et Mittwer met en évidence la présence et la position de la spore (centrale ou terminale) dans la cellule. Le frottis, a été fixé à la flamme, coloré pendant 10 minutes à l'aide d'une solution aqueuse saturée de vert malachite, lavé à l'eau froide, recoloré avec de la safranine (à 0,25 % dans H₂O) durant 15 secondes, lavé à l'eau, séché et observé au microscope. Les spores apparaissent colorées en vert et le corps bactérien en rouge (Guiraud, 2003b).

3.6. Caractérisation des isolats des levures

La caractérisation des souches de levures a été réalisée selon les clefs de détermination de : Harrigan (1998) et Kurtmann *et al.*, (2011).

➤ **Etude des caractères cultureux**

Les caractères cultureux ont été étudiés sur le milieu à l'extrait de levure glucosé (Annexe 2). Il est utilisé à l'état liquide ou gélosé (avec 2 % d'agar). Le bouillon à l'extrait de levure glucosé permet d'observer la sédimentation des cellules, la présence d'une pellicule en surface et la formation de gaz. Le milieu à l'extrait de levure glucosé gélosé permet de définir la taille des colonies, leur forme (contour net ou irrégulier, convexe ou concave), leur aspect (mat ou brillant) et leur pigmentation. Les cultures ont été incubées pendant trois jours à 28°C, examinées à la loupe binoculaire puis laissées quatre semaines à la température du laboratoire et réexaminées (Arroyo-López *et al.*, 2006).

➤ **Etude des caractères morphologique et cellulaire**

Les caractères ont été étudiés par des préparations microscopiques (objectif x40 puis x 100), effectuées entre lame et lamelle à l'état frais et en utilisant un colorant (le bleu de méthylène). La Morphologie cellulaire et le mode de multiplication végétative ont été étudiés sur les cultures ayant permis l'étude des caractères cultureux. L'étude microscopique permet

de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules (Maldonado *et al.*, 2007).

3.7. Caractérisation des isolats de moisissures

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux et à la morphologie, rarement à des propriétés biochimiques. Elle nécessite souvent l'utilisation de milieux standards favorisant la croissance ou la reproduction et permettant ainsi une expression correcte des caractères à étudier (Botton *et al.*, 1990).

➤ Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies : les colonies peuvent être duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies : les colonies peuvent avoir un aspect plat ou plissé et la consistance des colonies est variable (molle, friable, élastique ou dure) envahissantes.

La couleur des colonies est un élément très important d'identification; les colonies peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, brune allant jusqu'au noir. Les pigments localisés au niveau du mycélium (Diguta, 2010).

➤ Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à identifier. Les observations microscopiques permettant l'identification des moisissures sont fondées sur le type de spores. La plupart des organismes ne produisent que des spores asexuées, l'identification est fondée sur l'examen de ces dernières (Botton *et al.* 1990).

4. Mise en évidence de la production de pigments

Pour évaluer le potentiel de production de pigment pour cette étude, nous avons sélectionnés les isolats selon leur aptitude à la pigmentation (jaune, orange, rose) et l'intensité de la couleur (claire, foncé) (Bhat *et al.*, 2013).

4.1. Codification des isolats sélectionnés

Après la sélection, les isolats ont été codifiés pour pouvoir les distinguer lors de la mise en culture comme suit :

Trois lettres ont été utilisées pour la codification dont la première lettre a représenté le groupe microbien (B : bactérie ; L : Levure, M : Moisissure), la deuxième lettre a été attribuée à l'échantillon (Ma : Margine ; M : Mélasse ; La : Lactosérum ; O : Olive) et enfin la troisième lettre a été dédiée au type de milieu de culture utilisé pour l'isolement (T : TSA ; Y : YMA ; O : OGA ; S : SDA). Le chiffre a représenté le numéro de la souche attribué lors de l'isolement.

4.2. Préparation des milieux de culture

Les mêmes milieux de culture utilisés auparavant ont été préparés sous forme liquide, il s'agit de : TSB, YMB, OGB, SDB. La composition de ces milieux de culture est indiquée dans l'annexe 1.

4.3. Pré-culture

La pré-culture a été obtenue comme suit : Des erlenmeyers de 50 ml contenant 10 ml de milieu de culture ont étéensemencés avec un aliquote de colonie à l'aide d'une anse de platine. Les erlens ont été incubés dans un bain marie agitateur (Mettler) à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 24h (Michelon *et al.*, 2012).

4.4. Culture

Pour la mise en culture des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu de culture liquide approprié ont étéensemencés avec 1 ml de pré-culture, placés et incubés dans un bain marie sous agitation de 150 rpm et à 30°C pendant 5 jours (Michelon *et al.*, 2012).

Le schéma ci-dessous illustre les étapes de la fermentation.

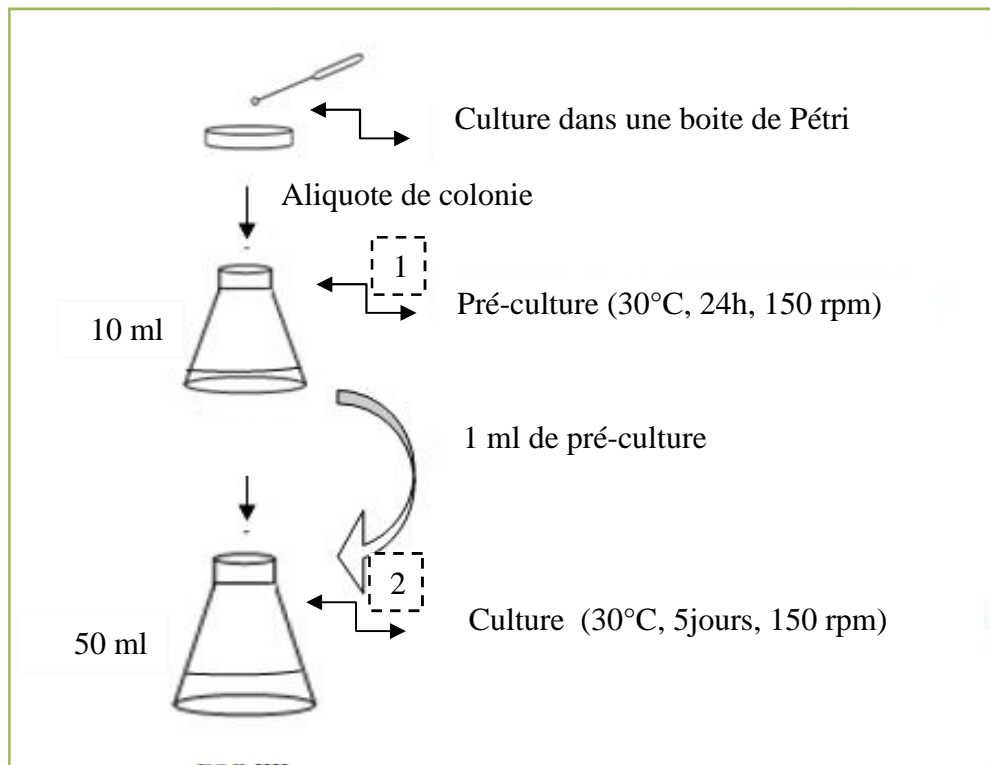


Figure 15. Etapes de la mise en culture.

4.5. Détermination du pH du milieu

Avant et après la fin de la culture, le pH du milieu a été obtenu à l'aide d'un pH-mètre (OHAUS) préalablement étalonné en introduisant l'électrode dans le milieu. La lecture du pH a été faite directement sur l'échelle de l'appareil, à 0,05 unité pH près. L'opération a été répétée trois fois et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart type.

4.6. Détermination de la quantité de biomasse

L'évaluation de la biomasse obtenue a été réalisée avec la quantification de la matière sèche de 15ml de culture prélevé de l'erlen après centrifugation et séchage (Silva *et al.* 2004).

Pour effectuer cette mesure, Les cultures microbiennes ont été homogénéisées à l'ultra-thorax (IKA.T18) pendant 20 secondes à puissance moyenne. 15 ml de culture homogénéisée ont été introduits dans un tube à centrifugation et centrifugés 15 minutes à 3800 g (SIGMA). A l'issue de cette centrifugation, le surnageant été séparé du culot, ce dernier été repris dans 15 ml d'eau distillée. Une nouvelle centrifugation a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant a été éliminé, le culot repris de nouveau dans 2 à 3 ml d'eau distillée et versé dans une coupelle d'aluminium sèche pesée au préalable (m_1).

La coupelle a été alors introduite dans une étuve (Memmert) à 105°C pendant au moins 24 heures, puis refroidie au dessiccateur avant d'être pesée (m_2).

La quantité de biomasse a été enfin déterminée par la formule suivante :

$$m = \frac{(m_2 - m_1) \times 1000}{15}$$

m : biomasse (matière sèche) en g/l.

m_1 : masse de la coupelle vide.

m_2 : masse de la coupelle remplie.

Les quantités de biomasse ont été estimées en g de poids sec par litre de culture.

4.7. Evaluation des pigments caroténoïdes (figure 16)

En raison de la diversité du matériel biologique dans lequel se trouvent les caroténoïdes, aucune technique d'extraction standard ne peut être esquissée. Étant donné que les caroténoïdes sont liposolubles, ils sont extraits avec des solvants organiques (Gross, 1991).

En général, le choix du solvant organique à utiliser pour l'extraction dépend de la nature du matériau à extraire et les propriétés de solubilité des principaux caroténoïdes.

Nous avons opté dans notre étude pour l'utilisation d'un solvant polaire qui est l'acétone. Cette technique a été utilisée par les auteurs : Joshi *et al.* (2013) et Paramita et Madhugiri (2012) qui ont trouvé que l'acétone permet d'extraire des quantités importantes des pigments d'origine microbiens.

4.7.1. Extraction des caroténoïdes

Le protocole d'extraction des caroténoïdes totaux à partir des cultures réalisées a été suivi selon la méthode de Perrier *et al.* (1995).

En fin de culture, les cultures microbiennes ont été récupérées, homogénéisées transférées ensuite dans un tube et centrifugées pendant 5 minutes à 2000 tours par minute. Le surnageant constituant le milieu de culture a été éliminé, le culot contenant les cellules microbiennes a été mélangé à 20 ml d'acétone. La masse cellulaire a été homogénéisée par agitation énergique. Après un repos de 10 à 15 minutes, le tube a été centrifugé une autre fois dans les mêmes conditions.

Dans le même tube contenant l'acétone, 20 à 25 ml d'éther de pétrole ont été combinées, et le mélange a été agité doucement. Après addition de 15 à 20 ml d'eau, le mélange a été transféré dans une ampoule à décanter, une séparation nette des deux phases a eu lieu, si les pigments caroténoïdes étaient présents, la couche supérieure (epiphastique) d'éther de pétrole aura des couleurs des pigments (jaune, orange, rose ou rouge intense, selon l'extrait microbien). La couche d'éther de pétrole a été filtrée dans un tube à essai à travers une quantité (environ 2,5g), du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et apportée au volume approprié le plus proche.

4.7.2. Dosage des pigments caroténoïdes

La détermination quantitative des caroténoïdes a été effectuée par technique spectrophotométrique. L'absorption a été déterminée dans un solvant approprié à la longueur d'onde d'absorption maximale des caroténoïdes (Young et Britton, 1993). Les Propriétés d'absorption des caroténoïdes fournissent un critère pour l'identification et la caractérisation des caroténoïdes. En raison de leurs double-liaison conjuguées (chromophore), les caroténoïdes absorbent la lumière et présentent des bandes d'absorption principalement dans le visible ou, dans certains cas, la région UV. Bien que les bandes d'absorption principale pour la plupart des caroténoïdes se trouvent dans la région de 400-500 nm (Young et Britton, 1993 ; Rodriguez-Amaya, 2001 ; Britton et *al.*, 2004).

Le spectre d'absorption a été obtenu pour tous les extraits dans la longueur d'onde 450 nm, en utilisant un spectrophotomètre (JENWAY 7305). Les résultats ont été exprimés en équivalents de β -carotène (mg / g de matière sèche).

4.7.3. Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage pour la quantification des caroténoïdes a été préparée en utilisant des solutions de β -carotène de différentes concentrations de 100 jusqu'à 6,25 $\mu\text{g/ml}$ (Lin et Chen, 2003) (Tableau 6).

Tableau 6. Gamme d'étalonnage des solutions de β -carotène utilisées.

Solutions	S	S/2	S/4	S/8	S/16
Concentrations de β -carotène ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	25	12,5	6,25

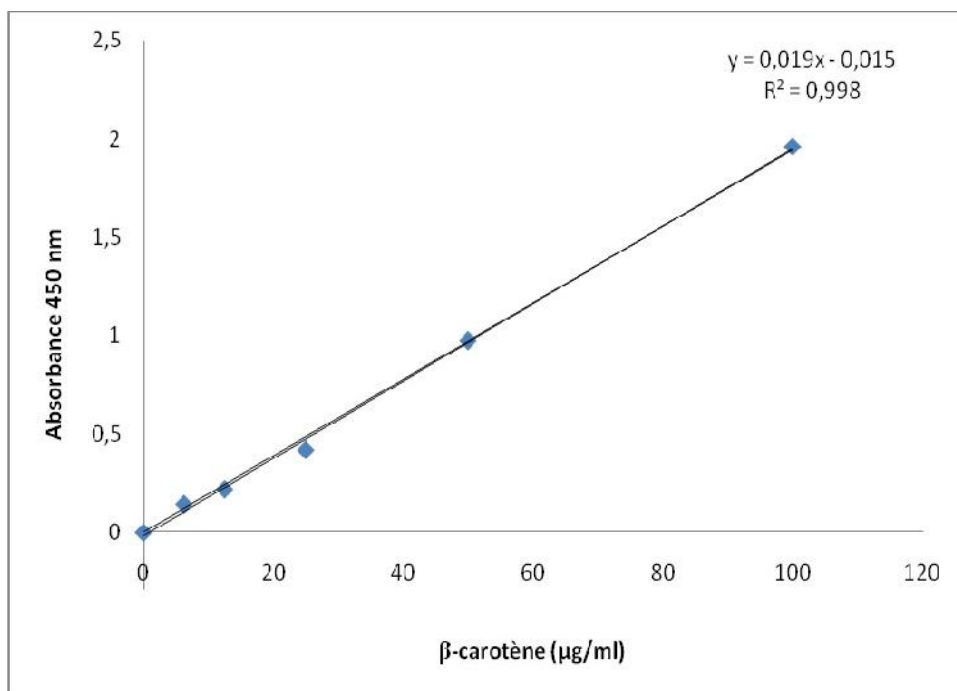


Figure 12. Courbe détalonnage pour la quantification des caroténoïdes.

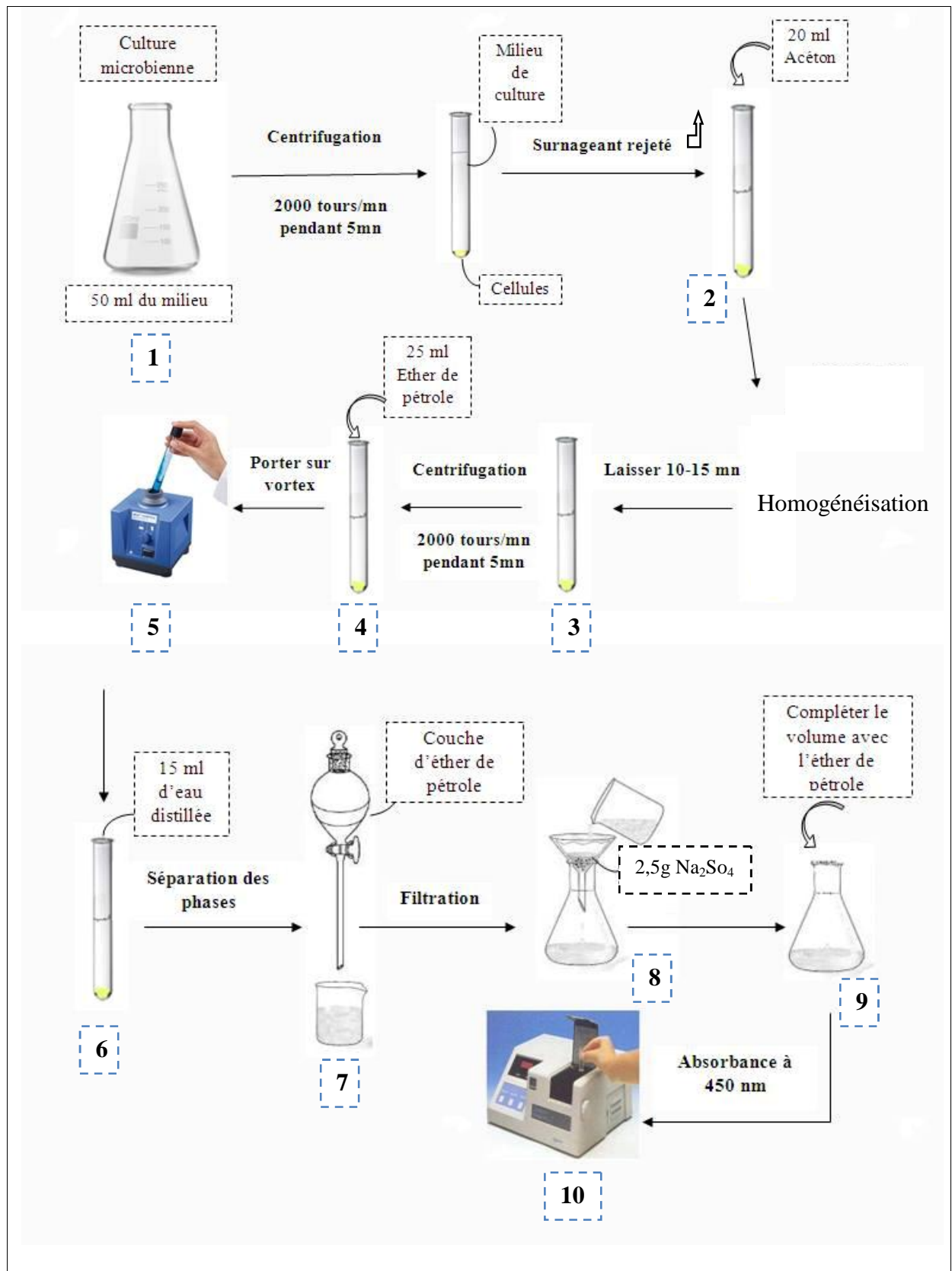


Figure 16. Protocole d'extraction et de dosage des caroténoïdes.

5. Analyse statistique et traitement des résultats

Les courbes et les histogrammes ont été tracés avec le logiciel Microsoft Excel 2007. Les résultats obtenus ont été présentés par leurs moyennes et leurs écart-types.

Afin de vérifier la corrélation entre les paramètres étudiés, nous avons procédé au calcul du coefficient de corrélation. Ainsi, la matrice obtenue permet de déterminer les relations (d'ordre linéaire) entre ces paramètres, pour expliquer la production de pigmentation par les souches étudiées. Le seuil de significations retenu a été $= 0,05$ (soit 5%)

Dans le but de répartir les souches sélectionnées dans des groupes en fonction de la production de biomasse et de la production de pigment, la méthode de classification ascendante hiérarchique (CAH) a été réalisée. Ces regroupements successifs produisent un arbre binaire de classification (dendrogramme).

Pour décrire les relations qui pourraient exister entre les paramètres mesurés (plus ou moins corrélés), une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des résultats obtenus. Selon Philipeau (1986), cette analyse est une méthode statistique permettant de présenter sous forme graphique le maximum d'information contenue dans le tableau initial. Ainsi, les paramètres mesurés ont été introduits comme variables actives. Après analyse, seuls les axes ayant une valeur propre supérieure à 1 ont été retenus (Kaizer, 1960). Ces axes permettent de définir de nouvelles variables, soit composantes principales, qui permettent d'expliquer la variabilité observée. Par ailleurs, les souches étudiées ont été représentées sous forme de nuage de points dont la répartition a été déterminée par les coordonnées de chaque souche sur les axes retenus.

Les différentes analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel Statistica, version 12 (StatSoft Inc., 2014) et XLSTAT version 4 (2015).

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Etude microbiologique

1.1.1. Flore totale et flore productrice de pigments

L'évaluation du nombre de micro-organismes présents dans les échantillons utilisés est rapportée dans le tableau 7.

Les résultats obtenus montrent une charge microbienne plus ou moins abondante variant d'un échantillon à l'autre ; un nombre important dans le lactosérum, la mélasse et les margines avec respectivement 296.10^2 UFC/ml, 210.10^2 UFC/ml et 147.10^2 UFC/ml ont été observés tandis que dans l'échantillon des olives vertes le nombre de la flore totale est évalué de 22.10^2 UFC/g. Nous rappelons que pour ce dernier résultat la numération est effectuée sur milieu YMA (gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt) et sur milieu OGA (gélose à l'oxytétracycline-glucosé). Dans les autres milieux nous avons constaté l'absence totale de développement microbien.

Les dénombrements de la flore pigmentée dans nos échantillons varient dans un intervalle composé d'une valeur supérieur (61.10^2 UFC/g) remarquée dans la mélasse et une valeur inférieur (1.10^2 UFC/g) dans les olives vertes. Les margines et le lactosérum ont des valeurs de 40.10^2 UFC/ml et 18.10^2 UFC/ml respectivement.

D'après ces résultats les colonies pigmentées dénombrées représentent 18% de la flore totale observées dans tous les échantillons. En ce qui concerne la flore pigmentée la totalité des colonies est observée dans le milieu TSA (78.10^2 UFC/ml) par contre les colonies pigmentées dans les milieux de cultures TSAS, SDA, OGA sont remarqués en nombre minoritaire.

Nous avons remarqué que dans le lactosérum la présence des isolats pigmentés sont mis en évidence que dans le milieu TSA, les colonies pigmentées dans les autres milieux sont absentes. Dans les olives vertes, le milieu YMA est le seul milieu contenant des colonies pigmentées. En ce qui concerne les échantillons de margines et de mélasse, une diversification de milieux de culture a été observée pour le dénombrement des microorganismes pigmentés (Figure 17).

Tableau 7. Effectif de la flore pigmentée par rapport à la flore totale ($\times 10^2$ UFC/ml).

Milieux	Margine	Mélasse	Lactosérum	Olives	Totale
TSA	20 / 50	40 / 130	18 / 29	0 / 0	78 / 209
TSAS	05 / 15	01 / 02	0 / 220	0 / 0	06 / 237
YMA	13 / 48	11 / 31	0 / 40	01 / 17	25 / 136
SD	0 / 23	05 / 35	0 / 0	0 / 0	05 / 58
OGA	02 / 11	04 / 12	0 / 07	0 / 05	06 / 35
Totale	40 / 147	61 / 210	18 / 296	01 / 22	120 / 675



Figure 17. Effectif de la flore pigmentée dans les différents milieux.

1.1.2. Aspect morphologique des isolats pigmentés

L'isolement des 120 colonies pigmentées est basé sur un premier criblage selon la pigmentation de la colonie sur le milieu de culture de dénombrement. L'étude des caractéristiques morphologiques des isolats a permis leur regroupement en tenant compte de leur aspect macroscopique et microscopique, la morphologie cellulaire et le type de pigmentation.

1.1.2.1. Isolats bactériens pigmentés

L'étude des caractères morphologique des colonies isolées a partir de mélasse nous a permis d'avoir des colonies pigmentées, dont la coloration varie du blanc crème au jaune. Nous avons observé que seule 3 colonies avaient la couleur orange. Ces colonies de même forme circulaire avec des pourtours réguliers ou irréguliers, de surface lisse ou rugueuse parfois mate ou brillante représentent un nombre de 58 isolats. La forme cellulaire en coques est la plus répandue (46 isolats), tandis que la forme bacilles est observé dans 12 isolats seulement (Tableau 8).

Les 19 isolats isolés de l'échantillon de margines présentent une pigmentation qui varie du blanc crème au jaune. Les cellules présentent aussi une morphologie variable (Tableau 9).

Les isolats développés dans le lactosérum sont en nombre de 8 isolats de couleur blanc crème et 4 isolats de couleur jaune, la forme circulaire avec un pourtour régulier est la plus dominante, quant à la surface celle-ci varie du type lisse avec son aspect brillant ou mate au type rugueux. En ce qui concerne les cellules trois types ont été observées : les bacilles, les coques et les coccobacilles (Tableau 10).

Tableau 8. Morphologie des souches bactériennes isolées de mélasse.

Milieux de culture	Nombre d'isolats	Colonies				Cellules		
		Couleur	Forme	Pourtour	Surface	Forme	Disposition	
TSA	5	Jaune	Circulaire plate	Irrégulier	Lisse brillante	Coques	Isolées et en amas	
	17	Blanc crème						
	2	Jaune	Circulaire	Régulier	Lisse mate	Bacilles	Isolées	
	2	Blanc crème						
	1	Blanc crème	Circulaire plate	Régulier	Lisse mate	Coques	Isolées et en amas	
	2	Jaune	Circulaire	Irrégulier				
	3	Blanc crème						
	1	Jaune	Circulaire	Circulaire bombée	Régulier	Lisse brillante	Coques	Isolées et en amas
	3	Orange						
	2	Jaune						
1	Blanc crème							
TSAS	1	Blanc crème				Coques	Isolées	
YMA	10	Jaune				Bacilles	En amas	
OGA	4	Blanc crème	Circulaire étalée	Irrégulier	Rugueuse brillante	Coques	Isolées	
SDA	5	Jaune			Rugueuse mate			

Tableau 9. Morphologie des souches bactériennes isolées des margines.

Milieux de culture	Nombre d'isolats	Colonies				Cellules	
		Couleur	Forme	Pourtour	Surface	Forme	Disposition
TSA	1	Blanc	Circulaire plate	Irrégulier	Lisse mate	Coques	Isolées
	1	Crème				Bacilles	
TSAS	5	Blanc crème	Ondulée		Rugueuse mate		Coques
YMA	4	Jaune	Circulaire étalée	Irrégulier bouclé	Lisse brillante	Bacilles	
	2		Circulaire bombée	Irrégulier			Rugueuse mate
	2	Blanc crème	Ondulé plate		Régulier	Lisse brillante	
	1	Jaune	Circulaire bombée	Bacilles			Isolées
	2	Blanc crème	Circulaire plate				
OGA	1	Blanc crème	Circulaire	Irrégulier	Rugueuse mate	Coques	Isolées

Tableau 10. Morphologie des souches bactériennes isolées du lactosérum.

Milieux de culture	Nombre d'isolats	Colonies				Cellules	
		Couleur	Forme	Pourtour	Surface	Forme	Disposition
TSA	3	Blanc Crème	Circulaire Plate étalée	Irrégulier	Lisse brillante	Bacilles	Isolées
	1	Jaune	Circulaire				
	3	Jaune	Circulaire étalée		Rugueuse brillante	Cocco- bacilles	En amas
	1	Blanc crème	Circulaire				
	2						
	1		Ondulée plate		Rugueuse brillante	Coques	Isolées
	1	Blanc crème	Circulaire bombée	Régulier			

1.1.2.2. Isolats de levures pigmentés

Les isolats de levures obtenus à partir des quatre échantillons et qui ont pu se développer sur les trois milieux de culture représentent un totale de 31 souches. Quatre pigmentations ont été remarquées : blanc crème, jaune, orange et rose (Tableau 11).

Le nombre de souches dominant (21 isolats) est évalué dans les margines. Dans les autres échantillons notamment le lactosérum, la mélasse et les olives vertes le nombre été faible et il est respectivement (6 colonies, 3 colonies, 1 colonies).

Les colonies des isolats observées sont de forme circulaire ou ondulée, le pourtour régulier ou irrégulier et de surface variable d'un isolat à un autre. Les pigmentations des colonies observées sont : blanc crème (22 isolats), jaune (9 isolats), orange (2 isolats), rose (1 isolat).

Tableau 11. Morphologie des souches de levures isolées des quatre échantillons.

Echantillons	Milieux de culture	Nombre d'isolats	Colonies			
			Couleur	Forme	Pourtour	Surface
Mélasse	TSA	2	Jaune	Circulaire Bombée	Régulier	Lisse brillante
	YMA	1	Rose	Circulaire plate		Rugueuse mate
Margine	TSA	5	Blanc crème	Ondulée	Irrégulier	Rugueuse mate
		7				Lisse mate
		2	Jaune			Lisse brillante
		2	Blanc crème			
	YMA	2	Jaune	Circulaire bombée		Rugueuse mate
		1	Blanc crème	Ondulé plate		Régulier
	OGA	1	Orange	Circulaire plate		
Lactosérum		TSA	1	Blanc crème	Circulaire étalée	Irrégulier
	1		Régulier			Rugueuse mate
	2		Jaune		Circulaire	Irrégulier
	2					
Olives	YMA	1	Jaune	Circulaire bombée	Régulier	Lisse brillante

1.1.2.3. Isolats de moisissures pigmentés

Nous avons remarqué que les échantillons ne présentent aucun développement de moisissures susceptible d'avoir une pigmentation recherchée et cela pour tous les milieux de cultures utilisés.

La répartition de chaque groupe microbien en fonction des échantillons et des milieux de cultures est présentée dans la figure 18.

- Selon le milieu de culture : nous avons remarqué que la majorité de la flore pigmentée est composée de bactéries, dans tous les milieux de culture utilisés, seule les milieux TSA et YMA que nous avons obtenu un effectif conséquent de bactéries et de levures, alors que pour les autres milieux les levures sont presque inexistant.
- Selon la matière première : l'effectif le plus grand est observé dans la mélasse et constitué de bactéries, pour les margines nous avons remarqué des effectifs proches pour les deux groupes microbiens, par contre l'inexistence de bactéries et un effectif médiocre de levures est observé dans les olives vertes.

1.1.3. Aspect biochimique de la flore pigmentée

Les tests biochimiques que nous avons pu réalisés sont en nombre de cinq (GRAM, catalase, utilisation de mannitol, mobilité et la sporulation) pour les bactéries (Tableau 12) et deux pour les levures (caractère cultureux et le type de la reproduction végétative) (Tableau 13). Ces tests ont été réalisés sur les 120 isolats pigmentés.

La flore bactérienne est constituée de 30 isolats qui sont Gram positif et 59 isolats sont Gram négatif, tous les isolats sont catalase positif quelque souches possèdent la possibilité d'assimiler le mannitol d'autres ne la possèdent pas, la mobilité est observée chez 16 isolats isolés à partir de mélasse, lactosérum et margines avec respectivement (4 isolats, 11 isolats, 1 isolat). L'aptitude à la sporulation s'avère négative pour toute la flore pigmentée testée une exception faite pour l'isolat (72) à partir de lactosérum avec présence de spore terminale.

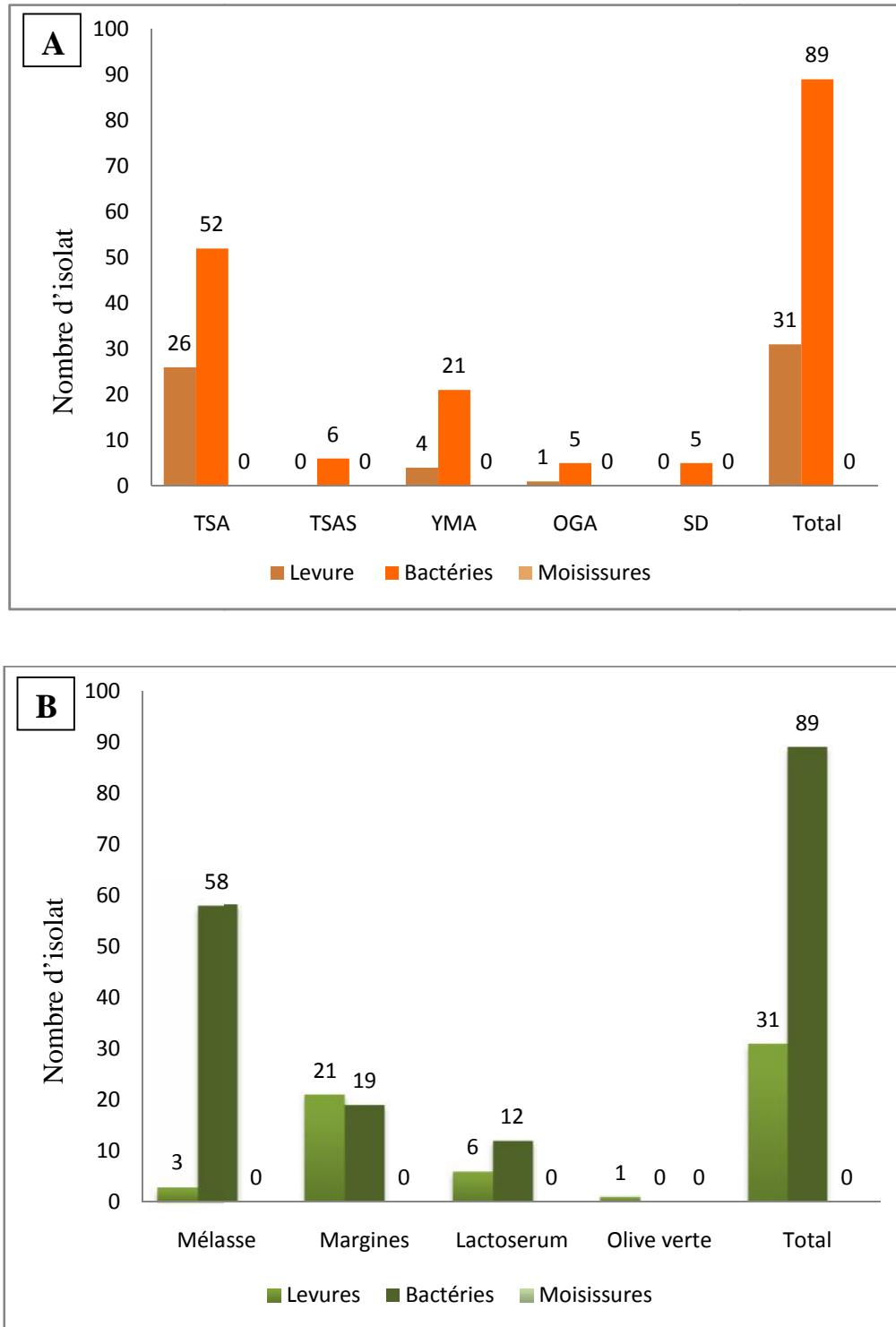


Figure 18. Répartition des groupes d'isolats dans les échantillons.

A : Selon le milieu de culture ; B : Selon la matière première.

Tableau 12. Tests biochimiques effectués pour la flore pigmentée (bactéries).

N° Isolat	Echantillon /Milieu	Gram	Catalase	Mannitol	Mobilité	Sporulation
1 ; 2	Margine/ TSA	+	+	-	-	-
22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 33 ; 38 ; 41 ; 43 ; 44 ; 51 ; 57 ; 58 ; 59	Mélasse/ TSA	+	+	-	-	-
32		+	+	+	-	-
35 ; 36		-	+	-	+	-
40		+	+	+	+	-
45 ; 46 ; 55		-	+	+	-	-
47		-	+	+	+	-
21 ; 29 ; 30 ; 31 ; 34 ; 39 ; 48 ; 49 ; 50 ; 52 ; 53 ; 54 ; 56 ; 57 ; 60		-	+	-	-	-
61 ; 63 ; 64 ; 66 ; 68 ; 70 ; 71	Lactosérum/ TSA	-	+	+	+	-
62 ; 65		+	+	+	+	-
72		+	+	+	+	+
77		+	+	+	+	-
78		-	+	+	-	-
79	Margine / TSAS	+	+	+	-	-
80 ; 81		-	+	+	-	-
82 ; 83		-	+	-	-	-
84	Mélasse / TSAS	+	+	+	-	-
85 ; 86 ; 87 ; 88 ; 90 ; 91 ; 92 ; 93	Margine/ YMA	-	+	+	-	-
94		+	+	+	-	-
95 ; 96		-	+	+	-	-
99 ; 100 ; 101 ; 102 ; 103 ; 104 ; 105 ; 106 ; 107 ; 108	Mélasse/ YMA	-	+	-	-	-
111	Margine/ OGA	-	+	+	+	-
112 ; 113 ; 114 ; 115	Mélasse/ OGA	+	+	-	-	-
116 ; 117 ; 118 ; 119 ; 120	Mélasse/ SDA	-	+	+	-	-

L'étude des caractères cultureux des isolats de levures révèle deux types de cultures ; par formation de dépôt au fond du tube (28 isolats) et avec apparition d'anneau en surface (3 isolats), la reproduction végétative est observée chez 26 isolats qui se caractérisent par une fission binaire des cellules, le bourgeonnement multilatéral est observé chez 2 isolats tandis que le bourgeonnement polaire est observé dans un seul isolat. Les formes des cellules se présentent sous formes rondes, ovales ou filaments.

Tableau 13. Tests biochimiques effectués pour la flore pigmentée (Levures).

N° isolat	Echantillon/ Milieu	Caractères cultureux	Reproduction végétative	Forme des cellules
3 ; 4 ; 5 ; 6	Margine / TSA	Dépôt	B3	Filaments
7 ; 8 ; 9 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20		Dépôt	B3	Filaments
10		Dépôt+ anneau	B3	Filaments
37 ; 42	Mélasses/ TSA	Dépôt	B2	Ovales
67 ; 74 ; 75 ; 76	Lactosérum /TSA	Dépôt	B3	Filaments
69 ; 73		Dépôt + anneau	B3	Filaments
89 ; 97	Margine/ YMA	Dépôt	B3	Filaments
98	Olives/ YMA	Dépôt	B1	Ovales
109	Mélasses/ YMA	Dépôt	B1	Rondes
110	Margine/ OGA	Dépôt	B1	Ovales

- *Type de bourgeonnement : B1 : Bourgeonnement polaire ; B2 : Bourgeonnement multilatérale ; B3 : fission binaire.*

1.2. Isolats pigmentés sélectionnés

Le criblage des souches est réalisé selon trois types de pigmentation (jaune, orange, rose) caractéristique des caroténoïdes (Figure 19). Un totale de 40 isolats entre bactéries et levures ont été sélectionnés et codifiés.

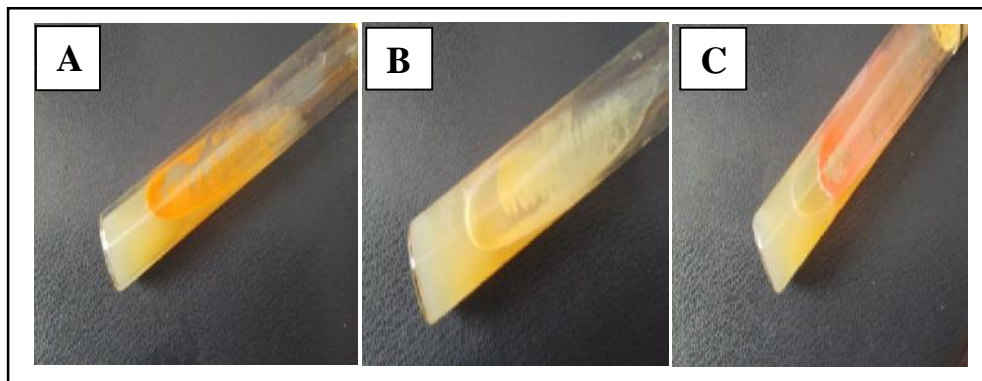


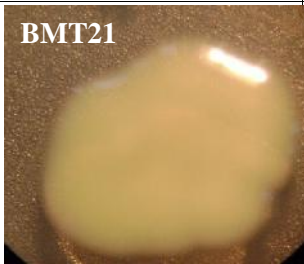
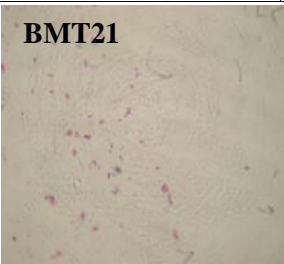
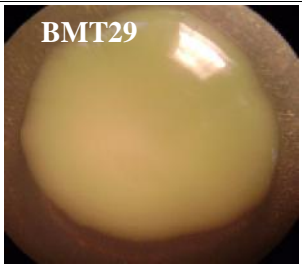
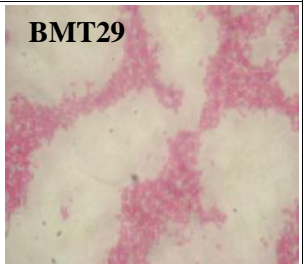
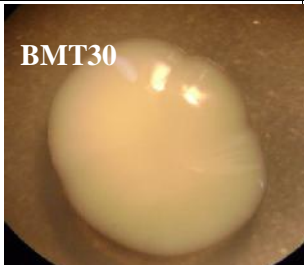
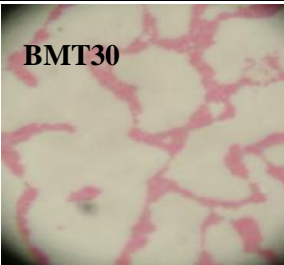
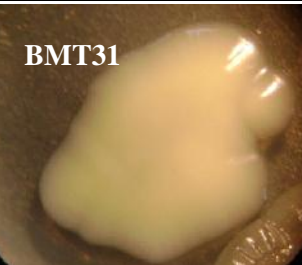
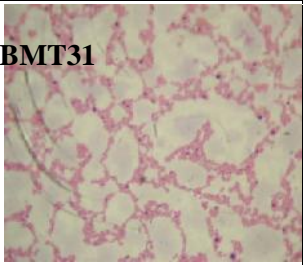
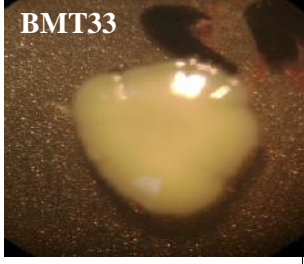
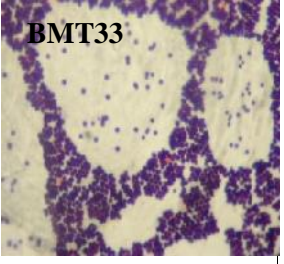
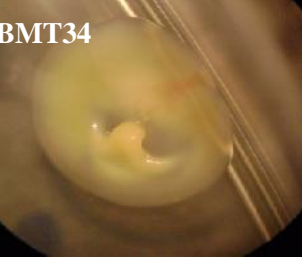
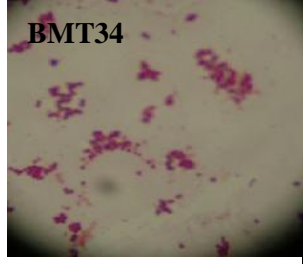
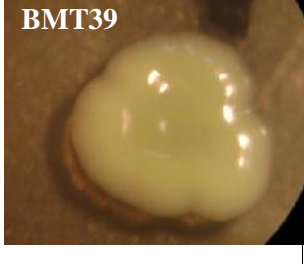
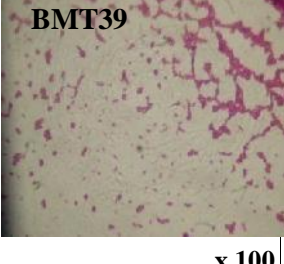
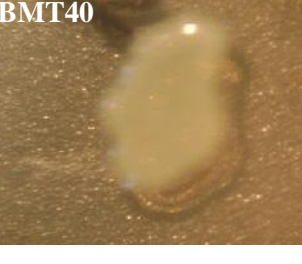
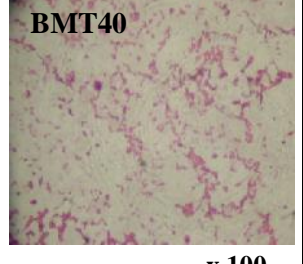
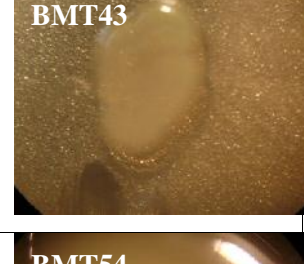
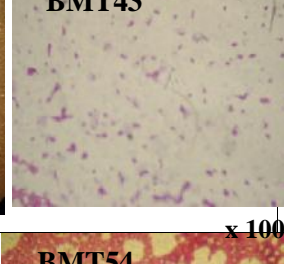
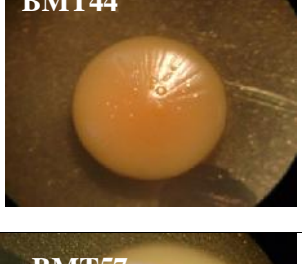
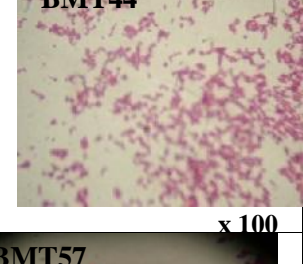

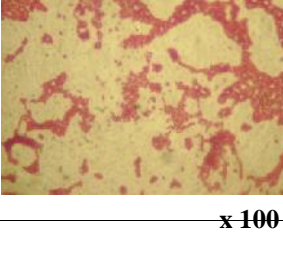

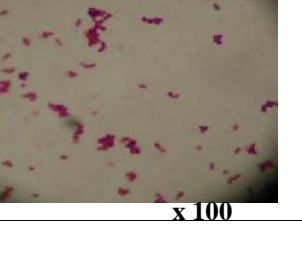
Figure 19. Pigmentation des souches sélectionnées.

(A : Pigment orange sur YMA ; B : Pigment jaune sur TSA ; C : Pigment rose sur OGA).

1.2.1. Isolats bactériens

Les bactéries pigmentées sont en nombre de 27 isolats (tableau14), possédant tous une catalase positive signe de développement en conditions d'aérobiose et ne présente pas la capacité à la sporulation. 8 isolats sont Gram positif et 19 sont Gram négatif, la plupart des isolats ne présentent pas la possibilité d'assimiler le mannitol comme source de carbone sauf pour les isolats : BMT40, BLacT78, BMarY90, BMarY91, BMS116, BMarY85, BMarY86, BMarY87, BMarY88, BLacT66, BLacT68, BMarY94. Quatre isolats sont mobiles, le reste est immobile (Tableau 15).

Tableau 14. Représentation photographique de l'aspect des 27 isolats bactériens.

Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
	 x 100		 x 100
	 x 100		 x 100
	 x 100		 x 100
	 x 100		 x 100
	 x 100		 x 100
	 x 100		 x 100

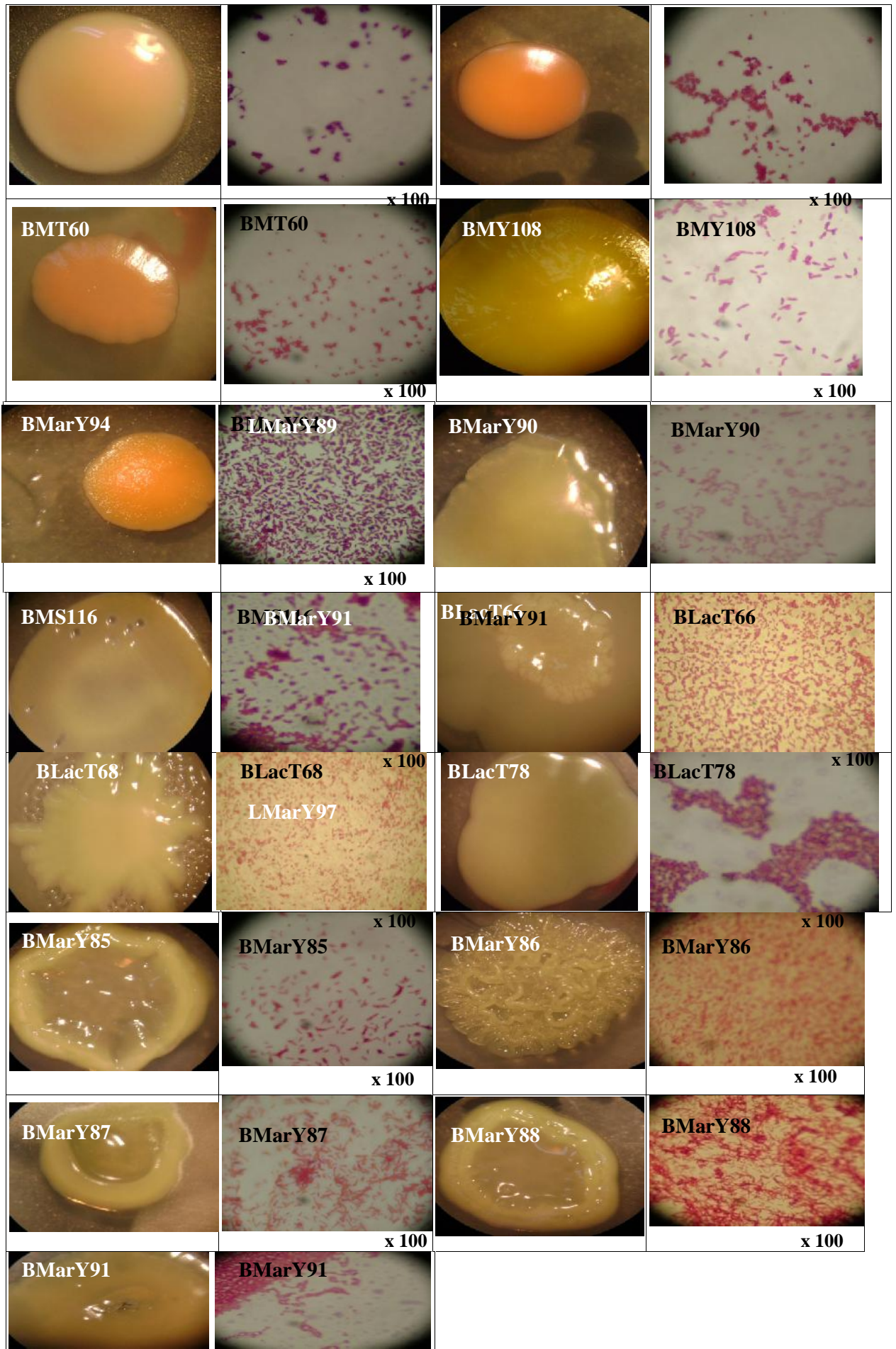


Tableau 15. Tests biochimiques sur les isolats bactériens

Isolat (Couleur)	Gram	Catalase	Mannitol	Mobilité	Sporulation	Genre présumé
BMT43(Jaune) BMT44 (Orange) BMT57(Jaune) BMT58(Jaune) BMT59 (Jaune)	+	+	-	-	-	<i>Micrococcus</i> <i>Corynebacterium</i>
BMT33(Jaune)	+	+	-	+	-	
BMT40 (Jaune)	+	+	+	+	-	
BMT21 (Jaune) BMT29 (Jaune) BMT30 (Jaune) BMT31 (Jaune) BMT34 (Jaune) BMT39(Jaune) BMT54 (Jaune) BMT60 (Orange)	-	+	-	-	-	<i>Aeromonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Vibrio</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
BLacT78 (Jaune) BMarY90(Jaune) BMarY91(Jaune) BMS116(Jaune)	-	+	+	-	-	
BMarY85(Jaune) BMarY86(Jaune) BMarY87(Jaune) BMarY88(Jaune)	-	+	+	-	-	<i>Aeromonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Vibrio</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
BM Y108 (Jaune)	-	+	-	-	-	
BLacT66(Jaune) BLacT68(Jaune)	-	+	+	+	-	
BMarY94(Orange)	+	+	+	-	-	<i>Staphylococcus</i>

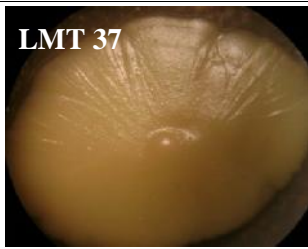
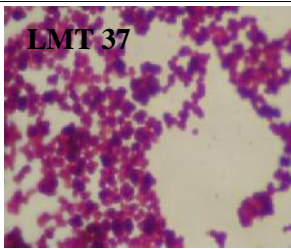
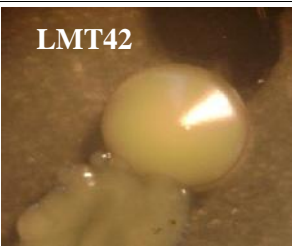
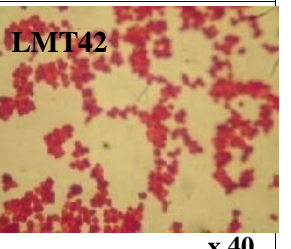

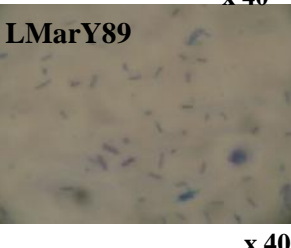



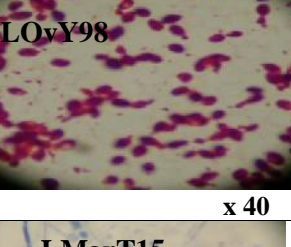

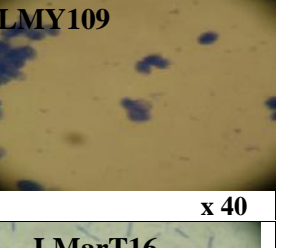

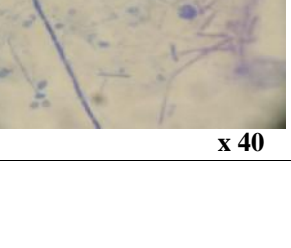

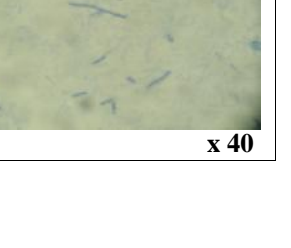
- Résultat : (+) : positif ; (-) : négatif ;
- Type d'isolat : B : bactérie ;
- Milieu de culture : T : TSA ; Y : YMA ; O : OGA ; S : SD ;
- Echantillon : M : Mélasse ; Mar : Margine ; Lac : Lactosérum.

1.2.2. Isolats de levures

Le caractère morphologique des isolats de levures est présentés dans le tableau 16. Le caractère culturelle sur milieu liquide est un indice qui permet de différencier les levures qui se développent au fond du tube (culot), dans le long du tube (floculation) et en surface (anneau). En ce qui concerne nos résultats tous les isolats forment un culot au fond du tube avec absence de formation d’anneau en surface ou floculation.

Le type de bourgeonnement est multilatérale chez les levures isolées de mélasse, tandis que la reproduction par fission a été observée chez 9 souches de levures isolées à partir de margine et de mélasse, deux isolats (LMarO110, LOvY98) se reproduisent par bourgeonnement polaire (Tableau 17).

Tableau 16. Représentation photographique de l'aspect des 13 isolats de levures

Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
 LMT 37	 LMT 37 x 40	 LMT42	 LMT42 x 40
 LMarY89	 LMarY89 x 40	 LMarY97	 LMarY97 x 40
 LOvY98	 LOvY98 x 40	 LMY109	 LMY109 x 40
 LMarT15	 LMarT15 x 40	 LMarT16	 LMarT16 x 40

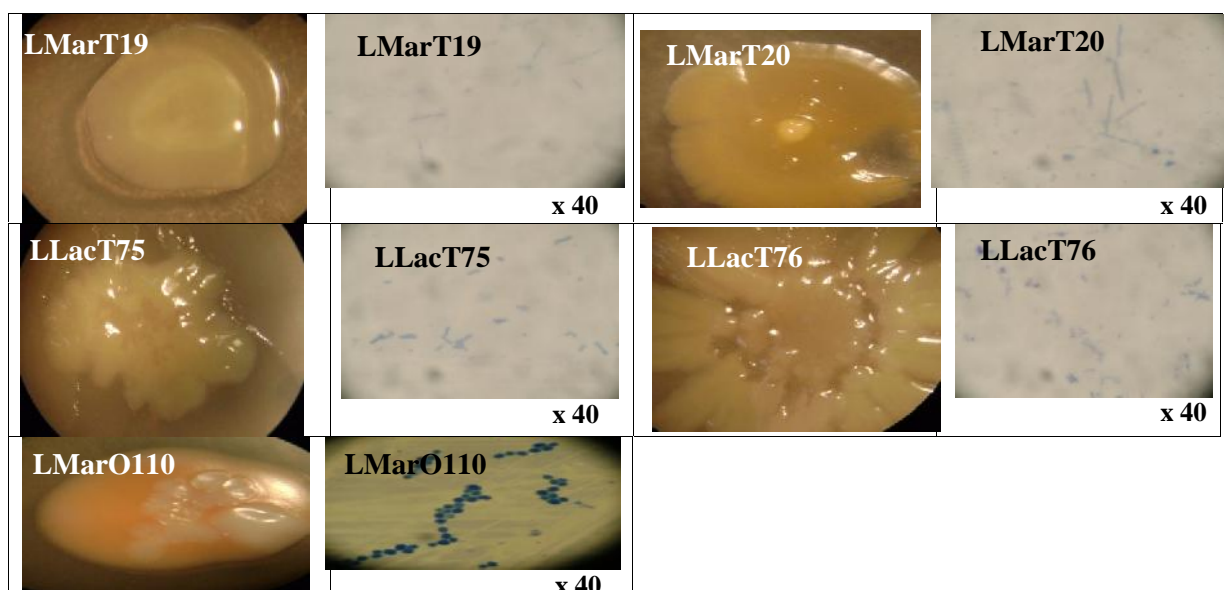


Tableau 17. Caractère culturaux et type de reproduction des isolats de levures.

Code isolat (Couleur)	Caractère culturaux	Reproduction végétative	Forme des cellules	Genre présumé
LMT37 (Jaune) LMT42 (Orange)	Dépôt	B2	Ovales	<i>Rhodotorula</i> <i>Saccharomyces</i>
LMarO110 (Orange)	Dépôt	B1	Rondes	
LLacT75 (Jaune) LLacT76 (Jaune)	Dépôt	B3	Filamenteuses	<i>Candida</i>
LMarT15 (Jaune) LMarT16 (Jaune) LMarT19 (Jaune) LMarT20 (Orange)	Dépôt	B3	Filamenteuses	
LMarY89 (Jaune)	Dépôt	B3	Filamenteuses	
LMarY97 (Orange)	Dépôt	B3	Filamenteuses	
LMY109 (Rose)	Dépôt	B3	Rondes	
LOvY98 (Jaune)	Dépôt	B1	Ovales	

- Type d'isolat : L : Levure ;
- Milieu de culture : T : TSA ; Y : YMA ; O : OGA ;
- Echantillon : M : Mielasse ; Mar : Margine ; Lac : Lactosérum ; Ov : Olives ;
- Type de bourgeonnement : B1 : Bourgeonnement polaire ; B2 : Bourgeonnement multilatérale ; B3 : fission binaire.

1.3. Production de pigments par les isolats sélectionnés

Pour évaluer le potentiel de production et le type de pigment des 40 isolats sélectionnés, les souches sont cultivées sur leurs milieux de culture d'origine sous forme liquide (Figure 20).

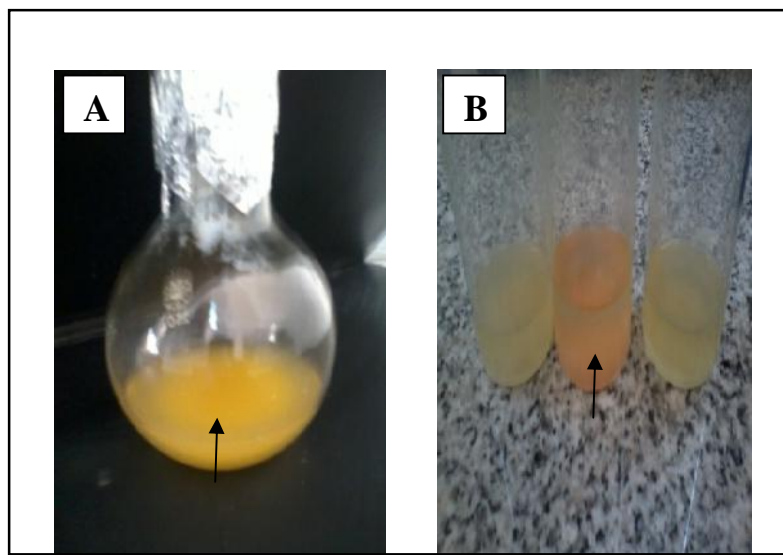


Figure 20. Production de pigment à la fin de la culture sur milieu liquide.

A : Pigment jaune de BMY108 sur YMB ; B : Pigment orange de BMT44 sur TSB.

Les résultats des paramètres définies dans la partie matériel et méthodes sont : la détermination du pH, de la biomasse et le dosage des pigments caroténoïdes (en équivalent de -carotène).

1.3.1. pH

Cette mesure est réalisée avant et en fin de cultures (Tableau 17), nous remarquons qu'à la fin des cultures le pH du milieu TSB devient alcalin, par contre sur milieu YMB et SDB le pH a légèrement augmenté par rapport à la mesure initiale. Certains résultats ont attiré notre attention ils concernent le pH des souches (LMarY97, LOvY98, LMY109, LMarO110), la mesure effectuée indique une baisse remarquable du pH finale comparé à celui initialement mesuré indiquant une acidification du milieu. Un autre cas celui des souches (LmarY89, BMY108 ; BLacT66) et il s'agit d'une alcalinisation du milieu YMA qui se traduit par une augmentation du pH initiale ($6,02 \pm 0,04$; $7,33 \pm 0,01$) au pH finale des cultures ($8,72 \pm 0,01$, $8,16 \pm 0,24$; $9,52 \pm 0,65$) respectivement.

Tableau 18. Détermination du pH avant et après mise en culture.

Code Isolat	pH initial	pH final*	Code Isolat	pH initial	pH final*
LMarT15	7,33 ± 0,01	8,42 ± 0,09	BMT60	7,33 ± 0,01	8,47 ± 0,01
LMarT16	7,33 ± 0,01	8,83 ± 0,11	BlacT66	7,33 ± 0,01	9,52 ± 0,65
LMarT19	7,33 ± 0,01	8,89 ± 0,03	BMarY85	6,02 ± 0,04	6,53 ± 0,02
LMarT20	7,33 ± 0,01	8,50 ± 0,45	BMarY86	6,02 ± 0,04	6,77 ± 0,04
BMT21	7,33 ± 0,01	8,32 ± 0,16	BMarY87	6,02 ± 0,04	6,65 ± 0,01
BMT29	7,33 ± 0,01	8,44 ± 0,12	BMarY88	6,02 ± 0,04	6,68 ± 0,04
BMT30	7,33 ± 0,01	8,58 ± 0,31	LMarY89	6,02 ± 0,04	8,72 ± 0,01
BMT31	7,33 ± 0,01	8,44 ± 0,14	BLacT68	7,33 ± 0,01	8,72 ± 0,26
BMT33	7,33 ± 0,01	8,53 ± 0,28	LLacT75	7,33 ± 0,01	8,85 ± 0,32
BMT34	7,33 ± 0,01	8,57 ± 0,00	LLacT76	7,33 ± 0,01	8,51 ± 0,09
LMT37	7,33 ± 0,01	8,75 ± 0,32	BLacT78	7,33 ± 0,01	8,55 ± 0,10
BMT39	7,33 ± 0,01	8,38 ± 0,11	BMarY90	6,02 ± 0,04	6,52 ± 0,43
BMT40	7,33 ± 0,01	8,49 ± 0,38	BMarY91	6,02 ± 0,04	6,75 ± 0,43
LMT42	7,33 ± 0,01	8,27 ± 0,06	BMarY94	6,02 ± 0,04	6,96 ± 0,26
BMT43	7,33 ± 0,01	8,66 ± 0,16	LMarY97	6,02 ± 0,04	4,78 ± 0,26
BMT44	7,33 ± 0,01	8,73 ± 0,65	LOvY98	6,02 ± 0,04	5,80 ± 1,44
BMT54	7,33 ± 0,01	8,23 ± 0,00	BMV108	6,02 ± 0,04	8,16 ± 0,24
BMT57	7,33 ± 0,01	8,44 ± 0,00	LMY109	6,02 ± 0,04	4,49 ± 0,45
BMT58	7,33 ± 0,01	8,42 ± 0,00	LMarO110	7,03 ± 0,01	4,27 ± 0,50
BMT59	7,33 ± 0,01	8,57 ± 0,00	BMS116	6,31 ± 0,00	6,95 ± 0,07

* : Valeur moyenne des trois essais ± écart type.

1.3.2. Quantification de la biomasse

La détermination de la biomasse en quantité de matière sèche a été effectuée également après la fin de la culture et exprimée par litre de milieu de culture (Tableau 18). Cette mesure va nous servir pour la comparaison de la productivité des souches pigmentées. Les isolats de levures sélectionnées ont montré des quantités de biomasse comprise entre une valeur minimale et maximale de ($0,65 \pm 0,07$ et $2,3 \pm 0,42$ g/L) tandis que les isolats de bactéries ont

montré des quantités comprise entre ($0,4 \pm 0,00$ et $2,85 \pm 0,07$ g/L). Concernant le milieu TSA la quantité de biomasse la plus élevée est représentée chez les bactéries par l'isolat (BMT39 ; $2,8 \pm 0,56$ g/L) et chez les levures par l'isolat (LLacT76 ; $1,9 \pm 0,14$ g/L). Tandis que pour le milieu YMA la valeur maximale de biomasse chez les isolats est de $2,85 \pm 0,07$ g/L observée pour les bactéries (BMarY86) est de $2,3 \pm 0,42$ g/L remarquée chez la souche (LMarY89).

Tableau 19. Détermination de la biomasse exprimée en g de poids sec par litre de culture.

Code isolat	Biomasse (g/L)*	Code isolat	Biomasse (g/L)*	Code isolat	Biomasse (g/L)*
LMarT15	$0,95 \pm 0,07$	BMT43	$1,8 \pm 0,56$	BMarY87	$2,55 \pm 0,07$
LMarT16	$0,85 \pm 0,21$	BMT44	$0,5 \pm 0,14$	BMarY88	$1,85 \pm 0,07$
LMarT19	$1,1 \pm 0,14$	BMT54	$0,95 \pm 0,07$	LMarY89	$2,3 \pm 0,42$
LMarT20	$0,65 \pm 0,07$	BMT57	$0,4 \pm 0,00$	BMarY90	$0,9 \pm 0,14$
BMT21	$2,5 \pm 0,42$	BMT58	$1,15 \pm 0,07$	BMarY91	$1,8 \pm 0,28$
BMT29	$0,65 \pm 0,35$	BMT59	$1,7 \pm 0,00$	LMarY94	$1,05 \pm 0,07$
BMT30	$0,55 \pm 0,07$	BMT60	$1,35 \pm 0,07$	LMarY97	$1,05 \pm 0,21$
BMT31	$0,75 \pm 0,21$	BlacT66	$1 \pm 0,00$	LOvY98	$1,3 \pm 0,42$
BMT33	$1 \pm 0,00$	BLacT68	$1,1 \pm 0,42$	BMV108	$1,35 \pm 0,49$
BMT34	$1,2 \pm 0,28$	LLacT75	$0,85 \pm 0,21$	LMY109	$0,85 \pm 0,07$
LMT37	$0,7 \pm 0,28$	LLacT76	$1,9 \pm 0,14$	LMarO110	$1,65 \pm 0,49$
BMT39	$2,8 \pm 0,56$	BLacT78	$0,55 \pm 0,21$	BMS116	$1 \pm 0,00$
BMT40	$1,85 \pm 0,21$	BMarY85	$1,85 \pm 0,07$		
LMT42	$0,8 \pm 0,28$	BMarY86	$2,85 \pm 0,07$		

* : Valeur moyenne des trois essais \pm écart type.

1.3.3. Estimation des pigments caroténoïdes

Le dosage des pigments caroténoïdes synthétisés par les souches sélectionnées est exprimé en mg de β -carotène par g de matière sèche (Tableau 19). La quantité obtenue varie selon le milieu de culture et les souches impliqués. Dans le milieu de culture TSA les quantités les plus élevées sont constatées chez l'isolat bactérien (BMT29 : $0,24 \pm 0,16$ mg/g MS) et chez la levure (LMT42 : $0,22 \pm 0,19$ mg/g MS). Tandis que pour les milieux YMA et OGA, nous avons remarqué que les valeurs les plus élevées sont représentées par des bactéries (BMT108 : $1,79 \pm 0,02$ mg/g MS ; LMarO110 : $0,72 \pm 0,00$ mg/g MS). Les souches BMS116 et BMarY87 représentent des quantités moyennes en pigment les plus faibles ($0,01 \pm 0,00$ mg/g MS) dans les milieux YMB et SDB respectivement.

Tableau 20. Quantité de pigments exprimée en mg équivalent de β -carotène par g de matière sèche.

Code isolat	Quantité de pigments (mg/g MS)*	Code isolat	Quantité de pigments (mg/g MS)*	Code isolat	Quantité de pigments (mg/g MS)*
LMarT15	$0,14 \pm 0,00$	BMT43	$0,08 \pm 0,02$	BMarY87	$0,01 \pm 0,00$
LMarT16	$0,08 \pm 0,03$	BMT44	$0,10 \pm 0,00$	BMarY88	$0,03 \pm 0,00$
LMarT19	$0,10 \pm 0,02$	BMT54	$0,07 \pm 0,02$	LMarY89	$0,08 \pm 0,04$
LMarT20	$0,13 \pm 0,01$	BMT57	$0,07 \pm 0,01$	BMarY90	$0,08 \pm 0,03$
BMT21	$0,04 \pm 0,02$	BMT58	$0,11 \pm 0,00$	BMarY91	$0,04 \pm 0,05$
BMT29	$0,24 \pm 0,16$	BMT59	$0,05 \pm 0,00$	LMarY94	$0,07 \pm 0,01$
BMT30	$0,07 \pm 0,03$	BMT60	$0,21 \pm 0,05$	LMarY97	$0,12 \pm 0,02$
BMT31	$0,11 \pm 0,01$	BlacT66	$0,09 \pm 0,09$	LOvY98	$0,09 \pm 0,08$
BMT33	$0,08 \pm 0,01$	BLacT68	$0,08 \pm 0,07$	BMY108	$1,79 \pm 0,33$
BMT34	$0,15 \pm 0,05$	LLacT75	$0,06 \pm 0,00$	LMY109	$0,09 \pm 0,01$
LMT37	$0,08 \pm 0,00$	LLacT76	$0,06 \pm 0,03$	LMarO110	$0,72 \pm 0,00$
BMT39	$0,03 \pm 0,01$	BLacT78	$0,05 \pm 0,04$	BMS116	$0,01 \pm 0,00$
BMT40	$0,07 \pm 0,02$	BMarY85	$0,03 \pm 0,00$		
LMT42	$0,22 \pm 0,19$	BMarY86	$0,02 \pm 0,00$		

* : Valeur moyenne des trois essais \pm écart type.

1.4. Analyse statistique

➤ **Corrélation entre les paramètres mesurés**

L'étude des liens existant entre les trois paramètres mesurés, à savoir ; pH finale, quantité de biomasse et quantité de pigments caroténoïdes, a révélé l'absence de corrélation entre les mesures réalisées (Figure 21). Les paramètres mesurés révèlent l'absence de différence significative entre les valeurs moyennes des groupes de bactéries et de levures à un seuil de signification ($p < 0.05$). La répartition des souches se présente sur toute la surface du graphe. Nous remarquons deux points observés loin de la distribution: il s'agit de l'isolat LMarO110 (pH : 4,27 ; biomasse : 1,65 g/L ; quantité de pigment : 0,72 mg de β -carotène/ g de MS) et de l'isolat BMY108 (pH : 8,16 ; biomasse : 1,35 g/L ; quantité de pigment : 1,79 mg de β -carotène/ g de MS).

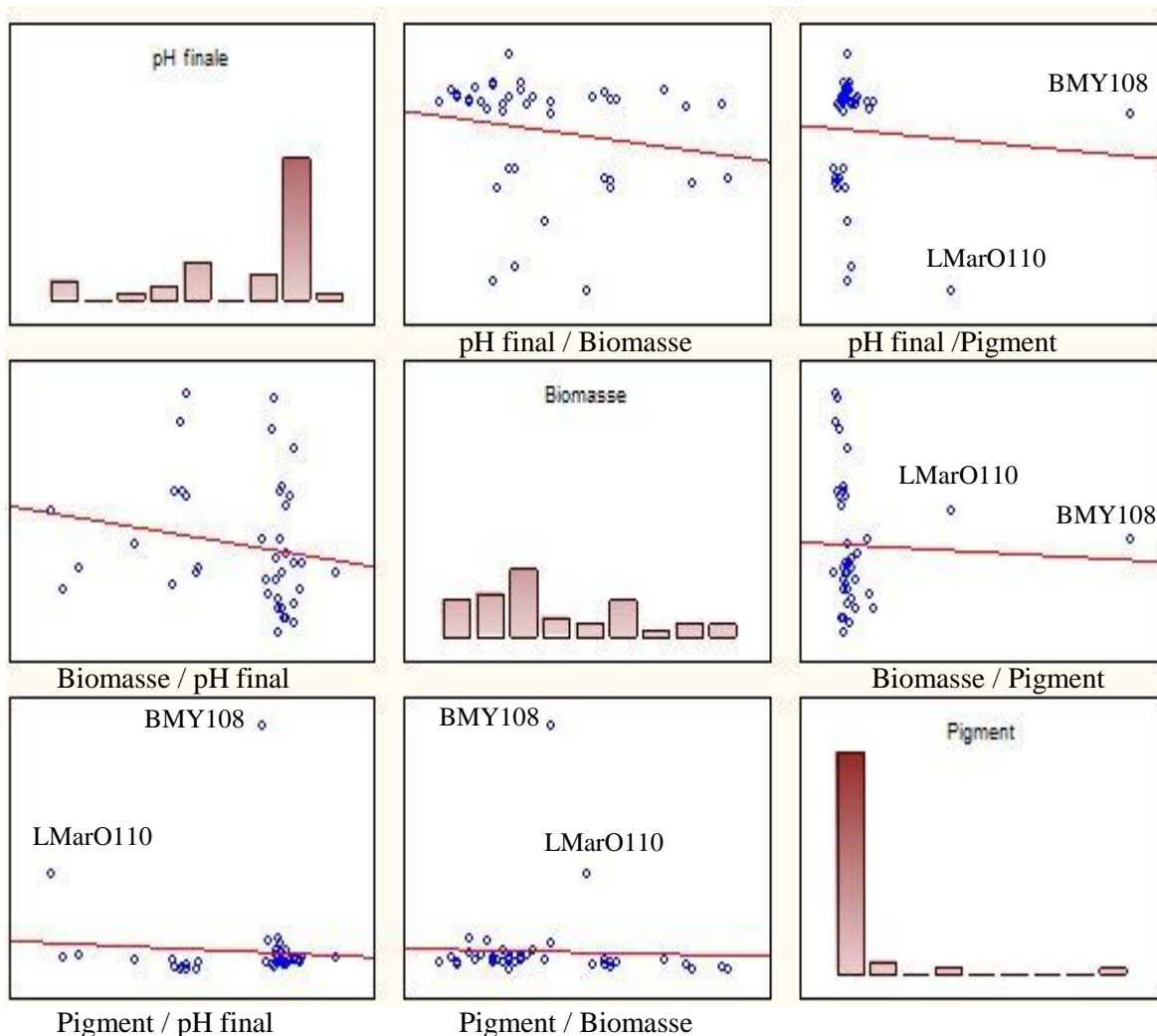


Figure 21. Type de corrélation entre les paramètres mesurés en fin de culture.

➤ Classification ascendante hiérarchique

Pour mieux comprendre la relation entre la production de pigments caroténoïdes des 40 isolats et la production de biomasse dans les différents milieux de culture. Une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été effectuée. Ce regroupement donne lieu à trois groupes de souches. Chaque groupe contenant de 1 à 27 souches. Le dendrogramme pour chacun des trois groupes est plat. (Figure 22). Nous observons que, indépendamment de production de biomasse, la souche (BMY108) est la plus forte productrice de β -carotène. Par ailleurs, les souches du premier groupe présentent une faible Production en pigment caroténoïdes quelque soit la quantité de biomasse produite.

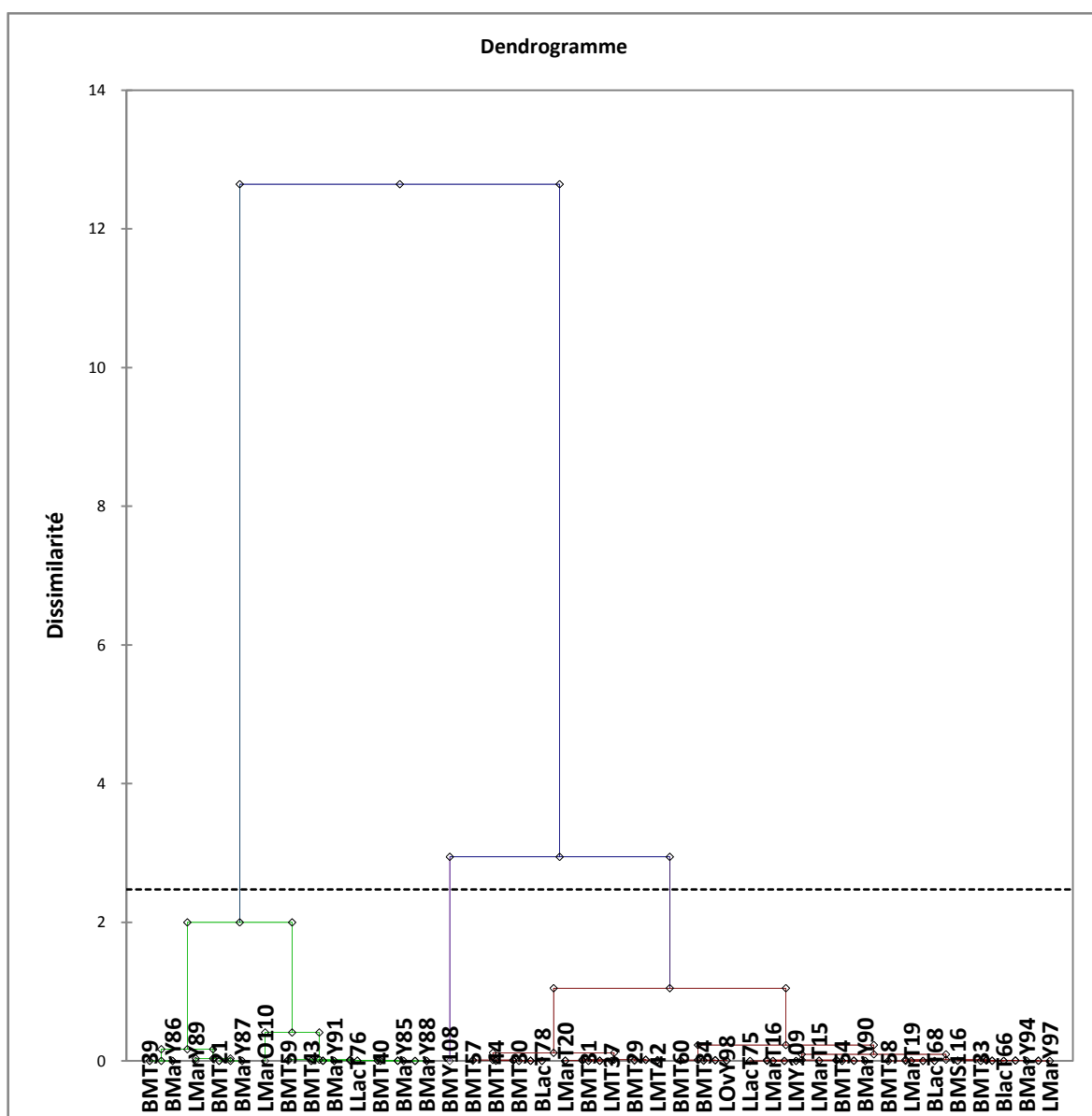


Figure 22. Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique (CAH) des 40 souches sur la base de leur potentiel de production de caroténoïdes (β -carotène).

➤ Analyse en composantes principales

L'analyse en composante principale a été réalisée avec le même nombre d'isolats sélectionnés. Cette analyse a expliqué 25,82 % et 47,21 % de la variance dans les deux premiers axes discriminants respectivement (Figure 23). Le bi-plot de la distribution des individus (Figure 24) distingue les trois groupes discriminés qui sont clairement séparés sur la carte et bien définis. Les souches les plus productrices de pigments caroténoïdes (groupe 2 et 3; vert et bleu) sont groupées dans le côté droit, les plus faibles productrices (groupe 1, violet) sont dans le côté gauche et les plus ou moins productrices sont réparties au centre de la carte.

Nous avons observé une variation non significative de la production de pigments entre les différents groupes de souches selon les différents milieux utilisés. D'une manière générale une diminution de production est notée d'un groupe à l'autre et au sein de même groupe d'un isolat à l'autre. Concernant les isolats qui présentent un potentiel élevé en caroténoïdes (groupe 2 et 3) la variabilité de la production du pigment parmi les souches a été plus prononcée en quantité de biomasse moyenne. Alors que les souches au sein du groupe 1 montrent une bonne production de biomasse cellulaire mais un taux de diminution en caroténoïdes.

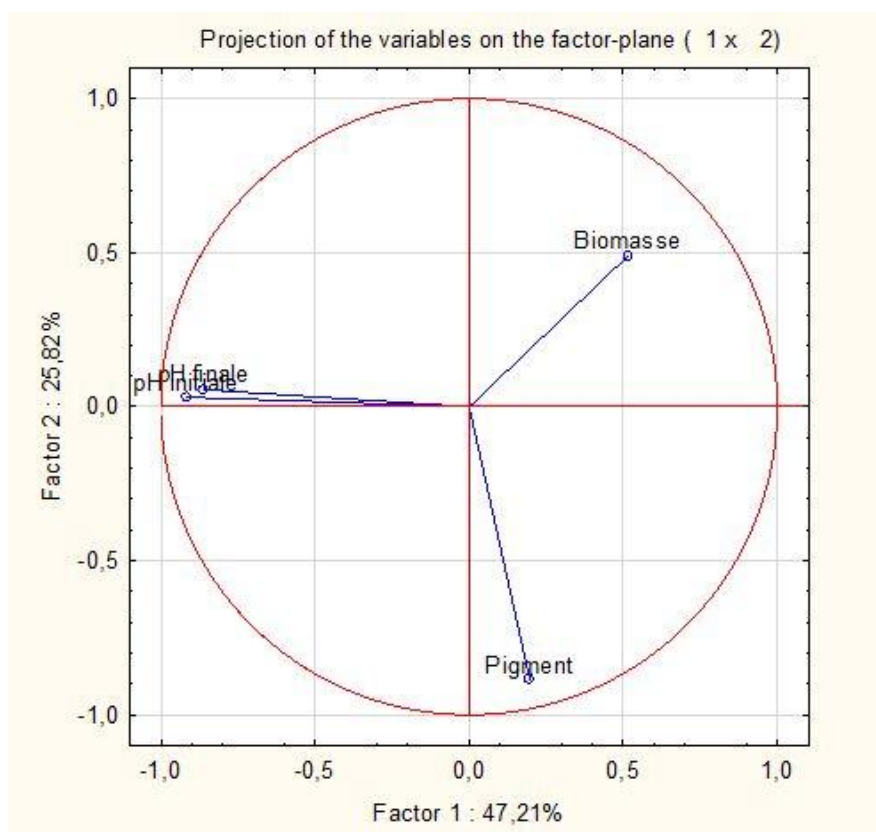


Figure 23. Présentation de l'analyse en composantes principales

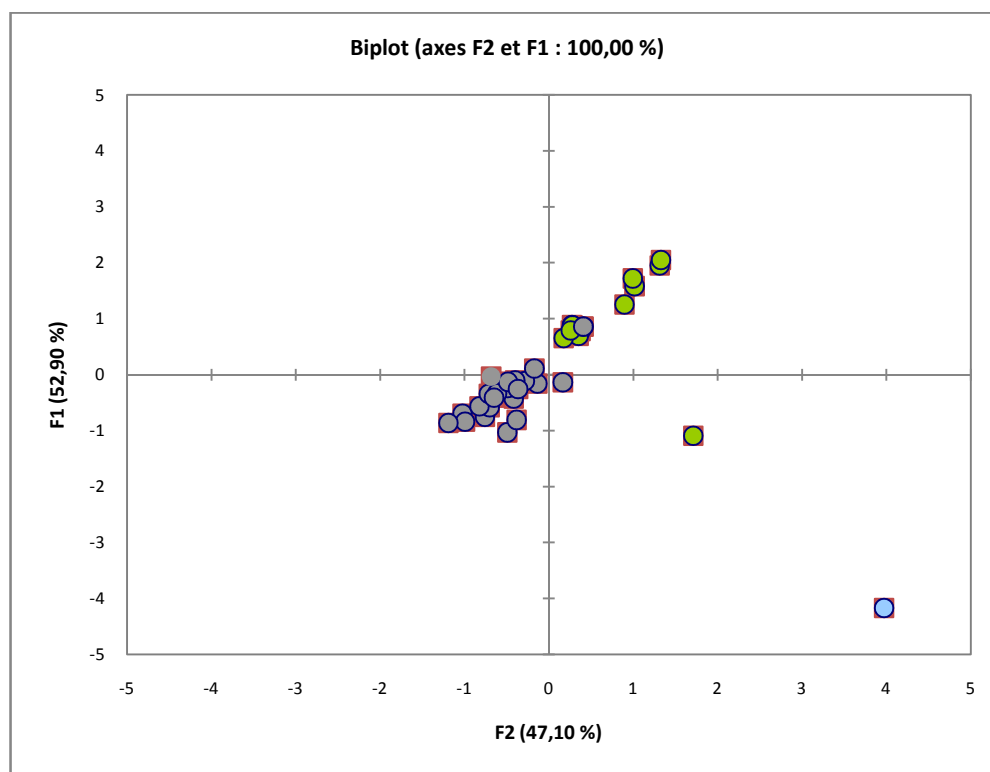


Figure 24. Bi-plot de l'analyse en composante principale discriminant les 3 groupes issus des 40 souches sélectionnées.

- Groupe 1 (violet) : LMarT15, LMarT16, LMarT19, LMarT20, BMT29, BMT30, BMT31, BMT33, BMT34, LMT37, LMT42, BMT44, BMT54, BMT57, BMT58, BMT60, BLacT66, BLacT68, LLacT75, BLacT78, BMarY90, BMarY94, LMarY97, LOvY98, LMY109, BMS116.
- Groupe 2 (vert): BMT21, BMT39, BMT40, BMT43, BMT59, LLacT76, BMarY85, BMarY86, BMarY87, BMarY88, LMarY89, BMarY91, LMarO110.
- Groupe 3 (bleu) : BMY108.

2. Discussion

Dans notre étude, nous avons utilisés trois sous produits, issues de l'industrie agro alimentaire (mélasse, margines, lactosérum) et les olives vertes, pour isoler la flore productrice de pigments. La mélasse et les margines ont favorisés l'obtention de la flore pigmentée dans tous les milieux de cultures (TSA, TSAS, YMA, OGA, SD). Par contre, le lactosérum et les olives vertes ont permis l'isolement de cette flore que dans un seul type de milieu de culture (TSA pour le lactosérum et YMA pour les olives vertes).

La flore pigmentée obtenu dans les margines et la mélasse est plus abondante et diversifiée; car ces produits représentent un environnement riche en élément nutritif favorable pour la croissance et la pigmentation des microorganismes, et peuvent être utilisé pour des applications biotechnologiques (Hamdi, 1991). Par ailleurs l'étude mené par Bhosale et Gadre (2001) à montré aussi l'utilité de la mélasse de cane à sucre comme substrat complet et source de carbone pour le développement de cette flore. De plus les recherches de Frengova *et al.* (1994) sur des levures pigmentées, en utilisant le lactosérum (lactose comme substrat), présentent un intérêt pour la production de pigments caroténoïdes.

Le faible nombre de la flore pigmentée obtenu, dominé par les levures, et isolé à partir des olives vertes; peuvent être expliqués par la présence de composé dans les olives qui inhibent le développement microbien d'une part et d'autre part l'exigence de la flore vis-à-vis de certaine éléments spécifiques pour pouvoir se développer (Hayman *et al.*, 2000). Plusieurs explications ont été proposées par des auteurs pour justifier ces résultats : Fleming *et al.* (1973) ont rapporté l'existence d'un principe amer dans les olives à la récolte, l'oleuropéine, ce dernier se décompose en substances inhibitrices de bactéries. Ils ont indiqué également la possibilité qu'ont les levures pour tolérer les constituants des olives en générale et en particulier l'oleuropéine. Selon des études menées par Marquina *et al.* (1992) et Hernandez *et al.* (2007), des différences importantes ont été rapportée dans les populations de levures trouvées dans les olives ; ils ont conclus que les levures étant les espèces les plus abondantes et les plus répons isolés sur milieu à base d'extrait de malt et d'extrait de levures, nos résultats confirment bien les arguments présentés par ces auteurs.

La température d'incubation dans notre étude a été fixée à 30°C pour tous les isolements, en se basant sur plusieurs études qui ont démontré que le maximum de production de pigment est favorable à 30°C (Panesar *et al.*, 2013). Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature selon lesquels ils ont trouvé que le rendement maximal de

production de pigments a été enregistré à des températures de 29°C à 32°C (Latha *et al.*, 2005). De plus, l'effet de la température sur la caroténogenèse des levures dépend de la spécificité de l'espèce et des caractéristiques de la souche du micro-organisme (Frengova *et al.*, 1994).

Parmi les 120 souches pigmentées isolées et purifiées, 40 isolats ont été sélectionné selon leur potentiel de production de pigment (jaune, orange, rose) (Costa *et al.* 1987).

La présence d'une source de carbone comme le glucose est considérée comme un stimulateur potentiel de la croissance et de la biosynthèse des pigments par les microorganismes (Frengova et Beshkova, 2009). Ce substrat est présent dans la composition de tous les milieux de culture utilisés dans notre étude. Cet argument justifie bien les résultats obtenus. Frengova *et al.*, (2009), ont utilisé *Rhodotorula glutinis* pour produire du β -carotène cultivé dans différents milieu contenant : le glucose, le lactosérum, la mélasse et complété d'extrait de levure et de saumure de radis fermenté. Cette étude a montré la possibilité de diminuer les coûts d'exploitation industrielle pour la synthèse des caroténoïdes microbiens est l'utilisation comme alternative des déchets agro-industriels comme sources de substrats énergétique.

Pour quantifier la production des pigments, les isolats ont été cultivés sur les mêmes milieux de culture à l'état liquide, à la suite d'une étape de pré-culture (phase d'adaptation). En fin de culture deux cas de modifications de pH ont été observés: une baisse de pH a été enregistrée chez 4 isolats de levures dans les milieux OGA (LMarO110 :7,03 à 4,27) et YMA (LMarY97 : 6,02 à 4,78 ; LOvY98 : 6,02 à 5,80 ; LMY109 : 6,02 à 4,49). Une augmentation du pH pour toutes les 36 souches restantes composées de levures et bactéries (TSA : 7,33 à 8,58 ; YMA: 6,02 à 6,57 ; OGA : 7,03 à 4,27; SD : 6,31 à 6,95).

La diminution du pH dans cette étude, peut être expliquée par la présence de substrat fermentescible (le glucose) utilisé dans les milieux de cultures tel que YM (Papanikolaou *et al.*, 2002). Pendant la croissance microbienne, les changements de pH dans le milieu de culture sont la conséquence de la libération des acides organiques (acide acétique, acide citrique etc..), pendant la phase d'adaptation, entraînant une diminution du pH (Machado *et al.*, 2015).

L'augmentation du pH observés dans nos cultures, peuvent être liés à la protéolyse, chez le microorganisme, considéré comme un phénomène naturel qui se produit après l'épuisement complet du substrat carboné ; conséquence de la dégradation des acides aminés, avec la formation de composés ammoniacaux qui provoquent l'augmentation du pH (Valduga *et al.*, 2009). Principalement lorsque la souche ne peut pas utiliser une autre source de carbone (Kim *et al.*, 2004)). Selon Frengova *et al.* (1994), la biosynthèse des caroténoïdes provoque des changements de pH dans le milieu de fermentation à la suite de la croissance des levures. En général, le pH d'un milieu de fermentation diminue au cours des 72 premières heures de cultures puis augmente pendant la phase exponentielle de caroténogénèse ; à la suite de ce stade, le pH reste constant, indiquant la fin du processus. Par ailleurs l'étude menée sur *Rhodotorula glutinis* a montré que cette espèce pouvait produire des pigments sur une gamme de pH de 5.0 à 7.0, bien que la production maximale a été enregistrée à pH 6.0 (Panesar *et al.*, 2013).

Le dosage spectrophotométrique des quantités de β -carotène a révélé l'existence de deux souches potentiellement productrices : BMY108 (1,79 mg/g MS) et LMarO110 (0,72 mg équivalent de β -carotène / g MS). Par contre pour les autres isolats, cette production est faible et varie de (0,01 – 0,24 mg équivalent de β -carotène / g MS).

Des résultats ont été rapportés par plusieurs auteurs (Costa *et al.* (1987), Razavi et Marc (2006) et Marova *et al.* (2012) qui ont évalués la fraction de β -carotène produite par la souche *Rhodotorula* (0,63 mg/ g MS). L'étude de Galaup *et al.* (2015), a démontré qu'une souche du groupe *Brevibacterium* était aussi capable de produire des pigments (190 mg/l de milieu de culture). Tous ces résultats ont été obtenus après enrichissement du milieu de culture par d'autres constituants (MgSO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄), tandis que la production de nos quantités équivalentes en β -carotène ont été obtenus sur un milieu synthétique de base.

L'analyse statistique réalisée sur les résultats obtenus, a permis de constater :

- L'absence de corrélation entre la production de pigments caroténoïdes et la production de biomasse, ceci peut être dû aux paramètres suivants : la diversité des souches et les milieux de cultures ;

- L'analyse en composantes principales a révélée qu'au sein des groupes de souches, l'influence est remarquée vis-à-vis du pH, la variation du pH influe notablement la production de biomasse mais n'a aucun effet sur la production de β -carotène.

- La classification ascendante hiérarchique basée sur le potentiel de production de biomasse et de β -carotène, par les 40 souches, a identifié trois groupes. Les souches au sein de chaque groupe se distinguent par l'augmentation ou la diminution de la production de pigments. Le groupe ayant la production de β -carotène la plus élevée, indépendamment de la biomasse, est le groupe trois, composé par uniquement un isolat (BMY108). Ces résultats nous ont permis de mettre en valeur une souche qui pourrait être intéressante dans les applications biotechnologiques.

Les tests statistiques réalisés sur nos résultats, ont confirmés que la capacité de produire des pigments caroténoïdes n'est pas un caractère lié à l'espèce et elle pourrait différer dans les souches appartenant à la même espèce (Buzzini et Martini, 1999).

Conclusion générale

L'étude microbiologique réalisée sur les quatre échantillons appartenant au biotope algérien : mélasse, lactosérum, margines et les olives vertes a permis d'isoler 120 souches pigmentées sur cinq milieux de culture : TSA, TSAS, YMA, OGA, SD. La caractérisation microbiologique a permis d'obtenir 89 souches bactériennes et 31 souches de levures.

La sélection basée sur les trois type de pigmentation caractéristique des caroténoïdes à révélée 40 souches destinées pour la mise en culture sur milieu liquide (même milieux conçu pour l'isolement) et cela pour tester leurs capacités de production de pigments caroténoïdes.

La caractérisation morphologique et biochimique des isolats à permet le rapprochement du genre basée sur les clefs de Bergey (1934) et Vos *et al.* (2011) pour les souches bactériennes et de Harrigan (1998) et Kurtzman *et al.* (2011) pour les souches levuriennes : pour les souches bactériennes Gram+ (BMT33, BMT40, BMT43, BMT44, BMT57, BMT58, BMT59) ; (BMarY94) appartiennent probablement aux genres suivants : *Micrococcus*, *Corynebacterium* ; *Staphylococcus* respectivement. Tandis que les souches Gram- (BMT21, BMT29, BMT30, BMT31, BMT34, BMT39, BMT54, BMT60, BLacT78, BMarY90, BMarY91, BMS116, BLacT66, BLacT68, BMarY85, BMarY86, BMarY87, BMarY88, BMY108) appartiennent probablement aux genres : *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Enterobacteriaceae*.

En ce qui concerne les souches levuriennes (LMT 37, LMT42, LMarO110) ; (LMarT15, LMarT16, LMarT19, LMarT20, LLacT75, LLacT76, LMarY87, LMarY89) ; (LMY109, LOvY98) sont suspectés appartenir aux genres suivants : *Saccharomyces*, *Rhodotorula* ; *Candida* ; *Pichia*.

La réalisation des cultures sur milieux liquides (TSB, YMB, OGB, SDB) pour l'évaluation du potentiel de production de pigments caroténoïdes de différentes souches testées mettent en évidence une absence de corrélation entre les deux paramètres mesurés (production de biomasse et production de β -carotène) à un seuil de signification p 0.05, la classification ascendante hiérarchique a permet de classer trois groupes selon le potentiel de production de pigment, en effet la souche BMY108 est considérée comme meilleure productrice de pigment caroténoïdes avec une biomasse de $1,35 \pm 0,49$ g/L et une production de $1,79 \pm 0,33$ mg équivalent de β -carotène /g de MS.

Cependant, ces travaux préliminaires ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'identification et l'application des souches, tester leurs pouvoirs technologiques intéressant

l'agro-alimentaire, la valorisation des sous-produits de l'industrie alimentaire par voie microbienne. En effet, l'utilisation des déchets comme source nutritif pour alimenter les cultures participe à la résolution des problèmes ecologiques.

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives constituant la continuité de ce travail qui seront :

- L'identification des souches isolées par d'autres tests physiologiques et par les techniques de la biologie moléculaire.
- L'optimisation de la production de pigments pour un meilleur rendement.
- Purification et caractérisation des pigments caroténoïdes produits par méthodes chromatographiques et étude de stabilité pendant la conservation.

Références bibliographiques

- Adrian J., Bourlier G. et Sabel A. (1980). Composition minérale du lactosérum. Influence des facteurs technologiques, saisonniers et géographiques. *Le lait* : **60**, 447-57.
- Aissam H., Errachidi F., Merzouki M. et Benlemlih M. (2002). Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. *Cahiers de l'Association scientifique européenne pour l'eau et la santé* : **7**, 23-30.
- Aksu, Z. et Eren, A.T. (2005). Carotenoid production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem* : **40**, 2985-2991.
- Alais C. (1984) Science du lait: principes des techniques laitières.
- Albrecht M., Misawa N. et Sandmann G. (1999). Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β -carotene and zeaxanthin. *Biotechnology letters* : **21**, 791-5.
- Aparicio R. et Harwood J. (2013). Handbook of olive oil. *Handbook of Olive Oil*.
- Arroyo-López F., Duran-Quintana M., Ruiz-Barba J.L., Querol A. et Garrido-Fernández A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* : **23**, 791-6.
- Bendimerad N. (2013). Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben.».
- Bergey D.H. (1934). Bergey's manual of determinative bacteriology. *The American Journal of the Medical Sciences* : **188**, 282.
- Berry D.R. et Paterson A. (1990). Enzymes in the food industry. In: *Enzyme Chemistry* (pp. 306-51. Springer.
- Bhat S.V., Khan S.S. et Amin T. (2013). Research article isolation and characterization of pigment producing bacteria from various foods for their possible use as biocolours.
- Bhosale P. et Gadre R. (2001). Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Letters in Applied Microbiology* **33**, 12-6.
- Bleoju M. et González Sanjosé M. (2007). Study about the stability and some technological properties of the pigments synthesized by *epicoccum nigrum*. *Innovative Romanian Food Biotechnology* : **1**, 37-44.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Guy P., Larpent J. et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

- Britton G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* : **9**, 1551-8.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (1995). Isolation and Analysis. In: *Carotenoids*. Birkhäuser: Basel, Stuttgart, Germany.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (2008). *Carotenoids, vol. 4: natural functions*. Springer Science & Business Media.
- Buzzini P. (2001). Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*-*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *J Appl Microbiol* : **90**, 843-7.
- Cartier S., Bonnenfant P., Lancrenon X. et Rousset F. (1999). Récupération de sucre dans les bas-produits d'une nouvelle raffinerie: Comparaison entre la cristallisation et la chromatographie: Spécial Sucres. *Industries alimentaires et agricoles* : **116**, 55-61.
- Chaves-López C., Serio A., Grande-Tovar C.D., Cuervo-Mulet R., Delgado-Ospina J. et Paparella A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: the Colombian heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* : **13**, 1031-48.
- Christon R. et Le Dividich J. (1978). Utilisation de la melasse de canne a sucre dans l'alimentation du porc: essai d'interpretation des acquisitions recentes. In: *Annales de zootechnie*, pp. 267-88. EDP Sciences.
- Collins M.D. (2006). The genus *Brevibacterium*. In: *The Prokaryotes*. pp : 1013-9. Springer.
- Costa I., Martelli H., Da Silva I. et Pomeroy D. (1987). Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain. *Biotechnology letters* : **9**, 373-5.
- Costa I., Martelli H., Da Silva I. et Pomeroy D. (1987). Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain. *Biotechnology letters* : **9**, 373-5.
- De Carvalho J.C., Cardoso L.C., Ghiggi V., Woiciechowski A.L., de Souza Vandenberghe L.P. et Soccol C.R. (2014). Microbial Pigments. In: *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* : pp. 73-97. Springer.
- Diguta F.C. (2010). Ecologie des moisissures présentes sur les baies de raisin. Université de Bourgogne; ROUMANIE-Université des Sciences Agronomiques-BUCAREST.
- Dourou M., Kancelista A., Juszczak P., Sarris D., Bellou S., Triantaphyllidou I.-E., Rywinska A., Papanikolaou S. et Aggelis G. (2016). Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *Journal of Cleaner Production* : **139**, 957-69.

- Dufossé L. (2006). Microbial production of food grade pigments. *Food technology and Biotechnology* : **44**, 313-23.
- Dufossé L. (2013). Microbial aryl carotenoids as bioactive food ingredients.
- Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad S.M., Blanc P., Murthy K.N.C. et Ravishankar G.A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology* : **16**, 389-406.
- Edebo L. et Magnusson K.E. (1973). Disintegration of cells and protein recovery. *Pure and Applied Chemistry* : **36**, 325-38.
- Eric A Johnson et Schroeder W.A. (1996). Microbial carotenoids. In: *Downstream processing biosurfactants carotenoids* (pp. 119-78. Springer.
- Fechter W., Kitching S., Rajh M., Reimann R., Ahmed F., Jensen C., Schorn P. et Walthew D. (2001). Direct production of white sugar and whitestrap molasses by applying membrane and ion-exchange technology in a cane sugar mill. In: *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol*, pp. 100-7.
- Fezzani B. et Cheikh R.B. (2009). Extension of the anaerobic digestion model No. 1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation processes for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *Journal of hazardous Materials* : **162**, 1563-70.
- Fiestas Ros de Ursinos J. et Borja Padilla R. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas y aceites* : **43**, 101-6.
- Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Parrella A. et Temussi F. (2003). Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *J Agric Food Chem*: **51**, 1005-9.
- Fisgativa H., Tremier A. et Dabert P. (2016). Characterizing the variability of food waste quality: A need for efficient valorisation through anaerobic digestion. *Waste Manag* : **50**, 264-74.
- Fontana J., Czczuga B., Bonfim T., Chociai M., Oliveira B., Guimaraes M. et Baron M. (1996). Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Bioresour Technol* : **58**, 121-5.
- Francesco G. (1993). Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae* : **47**, 15-20.

- Frengova G., Simova E., Pavlova K., Beshkova D. et Grigorova D. (1994). Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and bioengineering* : **44**, 888-94.
- Frigaard N.-U., Maresca J.A., Yunker C.E., Jones A.D. et Bryant D.A. (2004). Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Journal of bacteriology*: **186**, 5210-20.
- Galanakis C.M., Tornberg E. et Gekas V. (2010). A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT-Food Science and Technology*: **43**, 1009-17.
- Galaup P., Sutthiwong N., Leclercq-Perlat M.N., Valla A., Caro Y., Fouillaud M., Guérard F. et Dufossé L. (2015). First isolation of *Brevibacterium* sp. pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*: **68**, 144-7.
- Garcia-Castello E., Cassano A., Criscuoli A., Conidi C. et Drioli E. (2010). Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Water research*: **44**, 3883-92.
- Ghedira K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie* : **6**, 83-9.
- Goodwin T. (1980). Biosynthesis of carotenoids. In: *The biochemistry of the carotenoids* (pp. 33-76. Springer, London : Chapman and Hal.
- Guiraud J. (2003a). Microbiologie alimentaire: milieux et techniques générales de culture. *Dunod, Paris*, 178-80.
- Guiraud J.P. (2003b). *Microbiologie Alimentaire*, Dunod. Paris.
- Hadjou L., Lamani O. et Cheriet F. (2013). Labellisation des huiles d'olive algériennes: contraintes et opportunités du processus. *New Medit* : **12**, 35-46.
- Hamdi M. (1991). Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. *Biologie cellulaire et Microbiologie, These doctorat, Universite de Provence, France*.
- Hannibal L., Lorquin J., D'Ortoli N.A., Garcia N., Chaintreuil C., Masson-Boivin C., Dreyfus B. et Giraud E. (2000). Isolation and Characterization of Canthaxanthin Biosynthesis Genes from the Photosynthetic Bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. *Journal of bacteriology*: **182**, 3850-3.
- Harrigan W.F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. Gulf Professional Publishing.

- Hayman E.P., Yokoyama H., Chichester C.O. et Simpson K.L. (1974) Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bacteriology* : **120**, 1339-43.
- Hayman G.T., Mannarelli B.M. et Leathers T.D. (1995). Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. *Journal of industrial microbiology* : **14**, 389-95.
- Herz S., Weber R.W., Anke H., Mucci A. & Davoli P. (2007) Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry* **68**, 2503-11.
- Herz S., Weber R.W., Anke H., Mucci A. et Davoli P. (2007). Intermediates in the oxidative pathway from torulene to torularhodin in the red yeasts *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *C. capitatum* (Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*: **68**, 2503-11.
- Jimenez A., Guillen R., Sanchez C., Fernandez-Bolanos J. et Heredia A. (1995) Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during " Spanish green olive" processing. *J Agric Food Chem* : **43**, 2240-6.
- Jimenez A., Guillen R., Sanchez C., Fernandez-Bolanos J. et Heredia A. (1995). Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during " Spanish green olive" processing. *J Agric Food Chem* : **43**, 2240-6.
- Johnson E.A. et Lewis M.J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology* : **115**, 173-83.
- Joshi V., Sharma R. et Girdher A. (2013). Production and evaluation of biocolour (carotenoids) from '*Rhodotorula*' using apple pomace: Effect of composition of different nitrogen sources and methods of cell disruption. *International Journal of Food and Fermentation Technology*: **3**, 127.

- Jouan P. (2002). Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. Editions Quae.
- Kaizer HF., 1960. The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*, 20 : 141-151.
- Kebbouche-Gana S. et Touzi A. (2001). Valorisation du lactosérum par la production de levures lactiques avec les procédés de fermentation continue et discontinue.
- Kosseva M., Fatmawati A., Palatova M. et Kent C. (2007). Modelling thermophilic cheese whey bioremediation in a one-stage process. *Biochemical Engineering Journal*: **35**, 281-8.
- Kurtzman C., Fell J.W. et Boekhout T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Latha B. et Jeevaratnam K. (2010). Purification and characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* : **5**, 166-74.
- Levi-Minzi R.M., Riffaldi F. et R Saviozzi A. (1995). Dynamique de certaines caractéristiques des margines épandues sur le sol.
- Lin C. et Chen B. (2003). Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*: **1012**, 103-9.
- Longhi L.G., Luvizetto D.J., Ferreira L.S., Rech R., Ayub M.A. et Secchi A.R. (2004). A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*: **31**, 35-40.
- Lv L., Gu X., Tang J. et Ho C.-T. (2007). Antioxidant activity of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* Thunb in vivo. *Food Chemistry*: **104**, 1678-81.
- Machado W.R.C. et de Medeiros Burkert J.F. (2015). Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. *African Journal of Microbiology Research* : **9**, 209-19.
- Maldonade I.R., Rodriguez-Amaya D.B. et Scamparini A.R. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*: **107**, 145-50.
- Maldonade I.R., Scamparini A.R. et Rodriguez-Amaya D.B. (2007). Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*: **38**, 65-70.
- Malik K., Tokkas J. et Goyal S. (2012). Microbial pigments: a review. *Int J Microbial Res Technol*: **1**, 361-5.

- Mantzouridou F., Tsimidou M.Z. et Roukas T. (2006). Performance of crude olive pomace oil and soybean oil during carotenoid production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *J Agric Food Chem*: **54**, 2575-81.
- Marquina D., Peres C., Caldas F., Marques J., Peinado J. et Spencer-Martins I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*: **14**, 279-83.
- Mata-Gómez L.C., Montañez J.C., Méndez-Zavala A. et Aguilar C.N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial cell factories*: **13**, 12.
- Mateo J.J. et Maicas S. (2015). Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Research International* : **73**, 13-25.
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F. et Lenoir J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments*: **19**, 663-75.
- Mehaia M.A. et Cheryan M. (1986). Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme and microbial technology*: **8**, 289-92.
- Meléndez-Martínez A.J., Britton G., Vicario I.M. et Heredia F.J. (2007). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*: **101**, 1145-50.
- Meyer P.S. et Du Preez J.C. (1994). Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. *Applied microbiology and biotechnology*: **40**, 780-5.
- Middelberg A.P. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology advances*: **13**, 491-551.
- Mizukami H., Konoshima M. et Tabata M. (1978). Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochemistry*: **17**, 95-7.
- Morillo J., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A. et Russell N. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied microbiology and biotechnology*: **82**, 25-39.
- Morin-Savy S. (2005). Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques: des carotènes aux xanthophylles. Brest.
- Morr C. et Ha E. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*: **33**, 431-76.

- Murphy C. (2014). Olives: Origins and Development. In: *Encyclopedia of Global Archaeology* : pp. 5576-9. Springer.
- Muthezhilan R., Ragul R., Pushpam A.C., Narayanan R.L. et Hussain A.J. (2014). Isolation, Optimization and Extraction of Microbial Pigments from Marine Yeast *Rhodotorula* Sp (Amby109) As Food Colourants. *Biosci Biotechnol Res Asia*: **11**, 271-8.
- Nasrabadi M.R.N. et Razavi S.H. (2010). Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzianatronolimnaea* HS-1. *J Biosci Bioeng*: **109**, 361-8.
- Nishioka Y., Oyagi A., Tsuruma K., Shimazawa M., Ishibashi T. et Hara H. (2011). The antianxiety-like effect of astaxanthin extracted from *Paracoccus carotinifaciens*. *Biofactors*: **37**, 25-30.
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K. et Stockmann R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J Agric Food Chem*: **53**, 823-37.
- Oliver J. et Palou A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*: **881**, 543-55.
- Palozza P., Sgarlata E., Luberto C., Piccioni E., Anti M., Marra G., Armelao F., Franceschelli P. et Bartoli G.M. (1996). n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *The American journal of clinical nutrition*: **64**, 297-304.
- Panesar R., Patil S. et Panesar P. (2013). Standardization of Medium components and Process parameters for Biopigment Production using *Rhodotorula glutinis*. *International Journal of Food and Fermentation Technology*: **3**, 149.
- Park P., Kim E. et Chu K. (2007). Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology* : **53**, 148-52.
- Park, P.K., Kim, E.Y. et Chu K.H (2007). Chemical disruption of yeast cell for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and purification technology* : **53**, 148-152.
- Pejin D., Došenovi I., Razmovski R., Karadži V. et Grbi J. (1996). Dependence of biotin content on molasses composition. *Journal of food quality*: **19**, 353-61.
- Perrier V., Dubreucq E. et Galzy P. (1995). Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Archives of microbiology*: **164**, 173-9.

- Phadwal, K et Singh, P.K.(2003). Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource technology* : 90, 55-58.
- Philippeau G., (1986). Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. ITCF, 63 p.
- Prescott L.M., Harley, John P, Klein et Donald A (2002). Laboratory exercises in microbiology.
- Ranalli A. (1991). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*: **37**, 30-9.
- Rao A.V. et Rao L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research***55**, 207-16.
- Rawat I., Kumar R.R., Mutanda T. et Bux F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* : **88**, 3411-24.
- Ray R. (2004). Extracellular amylase (s) production by fungi *Botryodiplodia theobromae* and *Rhizopus oryzae* grown on cassava starch residue. *Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology, India*: **25**, 489-95.
- Razavi, S.H. (2004). Détermination de conditions de mise en oeuvre d'une souche nouvellement isolée de *Sporobolomyces ruberrimus* pour la production de torularhodine. Thèse: INPL-Nancy.
- Reboux G., Roussel S. et Grenouillet F. (2006). Moisissures de l'environnement agricole. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*: **16**, 248-62.
- Reynders M., Rawlings D. et Harrison S. (1996). Studies on the growth, modelling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. *Biotechnology letters*: **18**, 649-54.
- Ryu-Beung H., Park B.-G., Chi Y.-E. et Lee J.-H. (1989). Production of purplish-red pigment in mixed culture of *Streptomyces propurpuratus* ATCC 21630 and *Bacillus* sp. R-89. *Microbiology and Biotechnology Letters*: **17**, 327-33.
- Sakaki H., Nakanishi T., Tada A., Miki W. et Komemushi S. (2001). Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *J Biosci Bioeng*: **92**, 294-7.

- Sakaki H., Nochide H., Komemushi S. et Miki W. (2002). Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21. *J Biosci Bioeng*: **93**, 338-40.
- Sandmann G., Albrecht M., Schnurr G., Knörzer O. et Böger P. (1999). The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*: **17**, 233-7.
- Seker S., Beyenal H. et Tanyolac A. (1999). Modeling milk clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*. *Journal of food science*: **64**, 525-9.
- Silva C., Cabral J. et Van Keulen F. (2004). Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp. *Biotechnology letters*: **26**, 257-62.
- Simpson K.L. (1983). Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proceedings of the Nutrition Society*: **42**, 7-17.
- Siqueira P.F., Karp S.G., Carvalho J.C., Sturm W., Rodríguez-León J.A., Tholozan J.-L., Singhanian R.R., Pandey A. et Soccol C.R. (2008). Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresour Technol* : **99**, 8156-63.
- Stahl W. et Sies H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*: **24**, 345-51.
- Stahmann K.-P., Revuelta J. et Seulberger H. (2000). Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied microbiology and biotechnology*: **53**, 509-16.
- StatSoft Inc., (2014). Statistica (Data Analysis Software). Version 12.0.
- Steg A. et Van Der Meer J. (1985). Differences in chemical composition and digestibility of beet and cane molasses. *Animal Feed Science and Technology*: **13**, 83-91.
- Tinoi J., Rakariyatham N. et Deming R. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*: **40**, 2551-7.
- Torrecilla J.S., Mena M.L., Yáñez-Sedeño P. et García J. (2008). Field determination of phenolic compounds in olive oil mill wastewater by artificial neural network. *Biochemical Engineering Journal* : **38**, 171-9.

- Tsagaraki E., Lazarides H.N. et Petrotos K.B. (2007). Olive mill wastewater treatment. In: *Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food Industry*: pp. 133-57. Springer.
- Tsakona S., Skiadaresis A.G., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Kookos I.K. et Koutinas A.A. (2016). Valorisation of side streams from wheat milling and confectionery industries for consolidated production and extraction of microbial lipids. *Food Chemistry* : **198**, 85-92.
- Vachali P., Bhosale P. et Bernstein P.S. (2012). Microbial carotenoids. In: *Microbial Carotenoids From Fungi* : pp. 41-59. Springer.
- Valduga E., Valério A., Treichel H., Di Luccio M. et Furigo Júnior A. (2008). Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. *Journal of chemical technology and biotechnology* : **83**, 1267-74.
- Vandamme E.J. (1989). *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*. Springer Science & Business Media.
- Vazquez M., Santos V. & Parajo J. (1997) Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **19**, 263-8.
- Venil C.K., Zakaria Z.A. et Ahmad W.A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*: **48**, 1065-79.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H. et Whitman W. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.
- Wang F., Jiang J.G. et Chen Q. (2007). Progress on molecular breeding and metabolic engineering of biosynthesis pathways of C 30, C 35, C 40, C 45, C 50 carotenoids. *Biotechnology advances* : **25**, 211-22.
- Woo A. (2002). La grande diversité du lactosérum.
- Young A. et Britton G. (2012). *Carotenoids in photosynthesis*. Springer Science & Business Media.

Annexes

Annexe 01: Milieux de cultures.**- Eau physiologique (pH = 7) :**

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 120 °C durant 15 min.

- TSA (pH = 7.3) :

Tryptone (peptone de caséine)	17 g
Peptone de soja	3 g
Glucose	2.5 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate dipotassique	2.5 g
Gélose	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Autoclaver 15 minutes à 120°C.

- YMA (pH = 6) :

Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Glucose	5 g
Peptone	5 g
Gélose	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Autoclaver 15 minutes à 120°C.

- OGA (pH= 7) :

Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Gélose	16 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Autoclaver 20 minutes à 115°C. Ajouter avant emploi au milieu en surfusion, 100 ml d'oxytétracycline à 1 mg/ml.

- **SDA (pH = 6.3) :**

Peptone de viande	5 g
Peptone de caséine	5 g
Dextrose	20 g
Gélose	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Autoclaver 20 minutes à 120°C, le milieu est additionné avant emploi de chloramphénicol (1 ml à 0.5% de chloramphénicol par tube).

- Les milieux de culture liquide TSB, YMB, OGB, SDB ont la même composition des milieux cités au dessus exemptés d'agar.

Annexe 02 : Milieux et coloration pour les tests biochimiques.**- Coloration de Gram**

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

- Mannitol mobilité (pH = 8,1):

Peptone	20 g
Nitrate de potassium	1 g
Mannitol	2 g
Rouge de phénol.....	40 mg
Gélose	4 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Répartir en tubes à essais (8 à 10 ml). Autoclaver 15 minutes à 120°C.

- Bouillon nutritif (pH = 7,4) :

Chlorure de sodium	5 g
Extrait de levure	2 g
Extrait de viande	1 g
Peptone	5 g
Eau distillée qsp	1000 mL

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 15 minutes.

- **Bouillon à l'extrait de levure-glucosé :**

Extrait de levure	5 g
Glucose5 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Répartir en tubes à essais (10 ml) ou en erlenmeyers. Autoclaver 15 minutes à 120°C.

La gélose à l'extrait de levure glucose s'agit du milieu précédent glucosé à 2%. Il est réparti en boîtes de Pétri ou réparti en tubes « inclinés ».

Communications

Isolements de souches microbiennes productrices de pigments à partir de biotopes algériens

BOUTANA Wissem, BELHOULA Nora, BEKHOUCHE Farida*

Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments- Institut de la Nutrition et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A.)- Université des Frères Mentouri 1 – Constantine- Algérie
*Correspondant : faridabekhouché@yahoo.fr

INTRODUCTION La valorisation des sous-produits agro alimentaires, pouvant polluer l'environnement, est une alternative pour obtenir des microorganismes capables de produire des pigments (caroténoïdes, xanthophylle, anthocyanine). Les pigments microbiens sont d'intérêt industriel, car ils sont souvent plus stables et solubles que ceux provenant de sources végétales ou animales (De Carvalho *et al.*, 2014). Ils contribuent à l'amélioration de la qualité organoleptique de l'aliment (Bhat *et al.*, 2013).

OBJECTIF Recherche de souches microbiennes et productrices de pigments à partir de biotopes algériens d'origine agroalimentaire

MATERIEL ET METHODES

I- Matériaux écologiques d'isolement



II- Mise en évidence des souches pigmentées

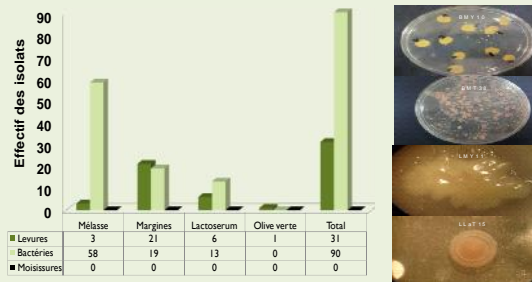
- **Milieux de cultures** : Tryptone soja agar (TSA); Tryptone soja agar sel (TSAS); Extrait de levure extrait de malt glucosé (YMA) ; Sabouraud dextrose ; Oxytetracycline glucosé agar (OGA).
- **Ensemencement en surface ; incubation 30°C ; 24h-120h.**
- **Dénombrement, isolement et caractérisation des isolats**
Observations macroscopiques (Aspect des colonies; type de pigmentation); Estimation de la flore totale et flore pigmentées; Observations microscopiques: Colorations de Gram (bactéries) et au bleu de méthylène (levures et moisissures) ;
- **Tests biochimiques**: Catalase; Mannitol Mobilité; test de la sporulation. (Valduga *et al.*, 2008; Guiraud 2003))

RESULTATS

I- Effectif de la flore pigmentée par rapport à la flore totale (x 10² UFC/g.)

Milieux	Margines	Mélasse	Lactosérum	Olives	Totale
TSA	20 / 50	40 / 130	18 / 29	0 / 0	78 / 209
TSAS	05 / 15	01 / 02	0 / 220	0 / 0	06 / 237
YMA	13 / 48	11 / 31	0 / 40	01 / 17	25 / 136
SD	0 / 23	05 / 35	0 / 0	0 / 0	05 / 58
OGA	02 / 11	04 / 12	0 / 07	0 / 05	06 / 35
Totale	40 / 147	61 / 210	18 / 296	01 / 22	120 / 675

II- Effectif des isolats pigmentés en fonction du matériel écologique; exemple de colonies observées



III. Caractérisation des isolats

Isolats bactériens	Pigmentation	GRAM	Catalase	Mannitol	Mobilité	Sporulation
Coques						
BMT ₃₉	Jaune	-	+	-	-	-
BMT _(21, 29, 30, 31, 34, 44)	jaune	-	+	-	-	-
BMT ₃₂	crème	-	+	-	+	-
BMT ₄₀	jaune	-	+	+	+	-
BMT _(57, 58, 59, 60)	rose	-	+	-	-	-
BLaT ₇₈ , BMS ₁₁₆	jaune	-	+	-	+	-
BMT ₅₄	Jaune	-	+	-	-	-
Bacilles						
BMT ₍₄₃₎	jaune	+	+	-	-	-
BLaT ₆₈	jaune	-	+	+	-	-
BMaY _(85, 86, 87, 88)	jaune	-	+	-	+	-
BMaY ₉₄	Rose	+	+	+	-	-
BMY ₁₀₈	orange	-	+	-	-	-
BMaY _(80, 81)	Jaune	-	+	-	+	-
Coccobacille						
BLaT ₆₆	jaune	-	+	+	+	-

Isolats lévuriens	Pigmentation des colonies	Culture sur milieu liquide	Reproduction végétative	Forme des cellules
LMT _(37, 42)	jaunes	Dépôt cellulaire	Bourgeonnement multilatérale	Ovales
LLaT _(75, 76)				Filamenteuses
LMaT _(15, 17, 20)	oranges	Dépôt cellulaire	Bourgeonnement polaire	Bâtonnets
LMaT ₁₉	jaunes			rondes
LMaY ₉₇	oranges			Ovales
LMaO ₁₁₀	jaunes	Dépôt cellulaire	fission binaire	Rondes
LOV ₈₈	roses			
LMY ₁₀₉	roses			

(T : TSA ; Y : YMA ; O : OGA ; S : SDA ; M : Mélasse ; Ma : Margine ; La : Lactosérum)

CONCLUSION

Les matériaux écologiques avec un important potentiel d'isolats pigmentaires, sont les margines et la mélasse. Leurs valorisations en microbiologie industrielle, comme source de substrat pour la production de pigments est souhaitable. Les milieux de culture utilisés dans ce travail sont normalement sélectifs (Valduga *et al.*, 2008; Cooney *et al.*, 1966). Dans notre cas, nous avons obtenus différents groupes producteurs et non producteurs de pigments. Les milieux TSA et YMA s'avèrent être les plus favorables aux développements des souches pigmentées. Cependant nos résultats restent prometteurs pour la suite de nos investigations de recherches.

REFERENCES

- Bhat S. V., Khan S.S., Amin T. (2013). Isolation and characterization of pigment producing bacteria from various foods for their possible use as biocolours. *Int. J. Recent Sc. Res.* 4(10): 1605-1609
- Cooney J., Marks H., Smith A.M. (1966). Isolation and identification of canthaxanthin from *Micrococcus roseus*. *Journal of bacteriology* 92, 342-5.
- De Carvalho J.C., Cardoso L.C., Ghiggi V., Woiciechowski A.L., de Souza Vandenberghe L.P. & Socolo C.R. (2014). Microbial Pigments. In: *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. pp. 73-97. Springer.
- Guiraud J.P. (2003). *Microbiologie Alimentaire*, Dunod. Paris.
- Valduga E., Valério A., Treichel H., Di Luccio M. & Furigo Júnior A. (2008) Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. *Journal of chemical technology and biotechnology* 83, 1267-74.

Abstract

The use of microorganisms for the production of natural pigments is considered to be one of the fastest growing pathways in biotechnology. The considerable interest in biopigments, in particular carotenoids, is linked to their use as additives to coloring properties in the food industry and also thanks to their provitaminic (vitamin A), antioxidant and antiradical properties. The aim of our work is the isolation of pigmented strains from Algerian biotopes (molasses, margines, whey and olives) and to test their carotenoid pigment synthesis capacities. The creamy white, yellow, orange and pink colors served for the first selection of 120 pigmented strains of which 89 are bacteria and 21 are yeasts. The second selection resulted in 40 strains which were used to demonstrate the production of pigments in liquid media (TSB, YMB, OGB and SDB) the bacterial group consisting of 27 isolates and the yeast group represented by 13 isolates. Measurements of pH, amount of biomass and carotenoid pigment content revealed no significant variability between the last two parameters. The pigment production test revealed that the BMY108 strain is potentially producing carotenoids (1.79 ± 0.33 mg of equivalent β -carotène/g MS) and this on synthetic medium. These findings open the possibilities of alternatives such as the use of low-cost substrates as agro-industrial waste for the improvement of production.

Key words: Biopigments, carotenoids, pigmented strains, isolation.

يعتبر استخدام الكائنات الحية الدقيقة لإنتاج الأصباغ الطبيعية من بين طرق التكنولوجيا الحيوية التي يتم العمل على تطويرها. ويرتبط اهتمام كبير بالحيوية خاصة الكاروتينات استخدامها كإضافات لصناعة المواد الغذائية وأيضاً بفضل خصائصها الطبيعية الفيتامين (فيتامين أ) . الهدف من عملنا هو عزل سلالات المصطبغة من الموائل الجزائرية (دبس السكر، الماء النباتية، مصل اللبن والزيتون) قدراتها على الأصباغ الكاروتينية الخاصة بهم. يرض الكريمي

40	ختبار الثاني	21	بكتيري	89	مصطبغة منها	120	ختبار
				التي تم استخدامها لتسليط الضوء على إنتاج			
				مجموعة البكتيرية			
13	قياسات	27	درجة الحموضة، وكمية الكتلة الحيوية ومحتوى أصباغ كاروتينويد عن تباين هام بين هاتين الأخيرتين. في حين				
				إمكانية الكاروتينات			
				، هذه النتائج تفتح احتمالات بديلة مثل استخدام ركائز			
				والصناعية لتحسين الإنتاج.			

النفائيات الزراعية

• :الأصباغ الحيوية، الكاروتينات، السلالات الصباغية،

Nom et prénom : BOUTANA Wissem

Année universitaire : 2016-2017

Thème : Isolement de souches microbiennes à partir de biotopes algérien et mise en évidence de la production de pigments caroténoïdes

Nature du diplôme : Magister

Spécialité : Sciences Alimentaires

Option : Biotechnologie et Génie des Industries Alimentaires

Résumé

L'utilisation de microorganismes pour la production de pigments naturels est considérée comme l'une des voies en plein développement en biotechnologie. L'intérêt considérable pour les biopigments notamment les caroténoïdes est lié à leur utilisation en tant qu'additifs aux propriétés colorantes dans l'industrie alimentaire et aussi grâce à leurs propriétés provitaminique (vitamine A), antioxydante et antiradicalaire. Le but de notre travail était d'isoler des souches pigmentées à partir de biotopes algériens (mélasse, margines, lactosérum et olives vertes) et de tester leurs capacités de synthèse de pigments caroténoïdes. Les pigmentations blanche crème, jaune, orange, rose ont servi pour la première sélection de 120 souches pigmentées dont 89 isolats ont été des bactéries et 21 isolats ont été des levures. La deuxième sélection a abouti à 40 souches qui ont servi pour la mise en évidence de la production de pigments sur milieux liquides (TSB, YMB, OGB, SDB). Le groupe bactérien a été constitué de 27 isolats et le groupe de levures a été représenté par 13 isolats. Les mesures du pH, de la biomasse et de la teneur en pigments caroténoïdes ont révélé une variabilité non significative entre les deux derniers paramètres. Le test de la production de pigment a révélé que la souche BMY108 isolée à partir de mélasse a été potentiellement productrice de caroténoïdes ($1,79 \pm 0,33$ mg équivalent β -carotène/g MS) et cela sur milieu synthétique de base (YM). Ces constatations ouvrent les possibilités d'alternatives comme l'utilisation de substrat à faible coût, tel les déchets agro-industriels pour l'amélioration de la production de biopigments.

Mots clé : Biopigments, caroténoïdes, souches pigmentées, isolement.