



AVIS DE SOUTENANCE DE THESE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès - annonce que

Mme (elle) : **GHOMARI Oumaima**
Soutiendra : **le 05/11/2022 à 10h00**
Lieu : **Centre de Visioconférence**

Une thèse intitulée

Production d'hydroxytyrosol à partir des feuilles d'olives : Bioconversion d'oleuropéine par un consortium microbien de trois isolats Nakazawaea molendini olei, Lachancea fermentati et Bacillus velezensis

En vue d'obtenir le **Doctorat**

FD : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologie (MBSB)

Spécialité: Biochimie et biotechnologie

Devant le jury composé comme suit :

	NOM ET PRENOM	GRADE	ETABLISSEMENT
Président	Pr MERZOUKI Mohammed	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
Directeur de thèse	Pr BENLEMLIH Mohammed	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
Rapporteur	Pr BELHAJ Abdelhaq	PES	Faculté des Sciences - Meknés
Rapporteur	Pr HAJJAJ Hassan	PES	Faculté des Sciences - Meknés
Rapporteur	Pr EL KARKOURI Abdenbi	PH	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
Membre	Pr BOUSTA Dalila	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
Membre	Pr EL AMRI Hamid	PES	Laboratoire de la gendarmerie Royale- Rabat

Résumé :

Trois isolats identifiés comme *Nakazawaea molendini-olei*, *Lachancea fermentati* et *Bacillus velezensis* capables de bioconvertir l'oleuropéine des feuilles d'olive en hydroxytyrosol, ont été utilisés pour développer un consortium plus efficace. Tout d'abord ce consortium a été soumis à une vérification de l'effet antagoniste afin de déterminer si il y'a un effet inhibiteur entre les isolats qui le forme; puis ce consortium a été incubé avec l'extrait de feuille riche en oleuropéine pour étudier leur capacité oleuropéinolytique. L'efficacité de la bioconversion des isolats en consortium a été vérifiée avec l'extrait de feuille d'olive à 1% (équivalent de 1220 ± 0 mg/l en oleuropéine), à une concentration cellulaire de 1,5% (0,5% pour chaque isolat), avec une température d'incubation de 30°C et un pH de 4,5 de l'extrait sans ajustement pendant 5 jours. Les résultats montrent que ce consortium était capable de produire l'hydroxytyrosol à partir l'oleuropéine à une concentration de 524 ± 7 mg/l en 72h, cette forte activité a été optimisée et les résultats indiquent qu'il y a une bioconversion complète d'oleuropéine en hydroxytyrosol en 48h avec une concentration de 599 ± 7 mg/l, et que les conditions optimales pour cette bioconversion sont : une température de 33 °C, une concentration de biomasse cellulaire de 3 % (1% pour chaque isolat), une concentration en substrat de 1%, et un pH de 4,5 de l'extrait non ajusté. Ces résultats sont considérés les meilleurs même si nous avons obtenu presque même concentration d'hydroxytyrosol dans le cas des cultures individuelles, car ces dernières et d'après les premiers résultats ont pris plus de 4 jours pour obtenir une bioconversion complète d'oleuropéine des feuilles d'olives. Ce consortium sera utilisé pour développer un bioréacteur permettant d'obtenir une bioconversion efficace d'oleuropéine des feuilles d'olive de l'industrie oléicole. La bioconversion d'oleuropéine en hydroxytyrosol pourrait ainsi être réalisée par les isolats isolés, mais est stimulée par une interaction synergique du consortium à trois membres, suggérant une possible interaction complémentaire entre les différents isolats surtout au niveau des enzymes responsables de cette bioconversion, ce qui permet de réduire le temps d'incubation. Pour ce raison nous avons suivi les deux enzymes responsables de la bioconversion d'oleuropéine qui sont la β -glucosidase et l'estérase chez les trois isolats individuellement et aussi dans le consortium. Les résultats montrent que les trois isolats *Nakazawaea molendini-olei*, *Lachancea fermentati* et *Bacillus velezensis* ont l'activité β -glucosidase ; $2,9 \pm 0,5$ U/ml ; $2,7 \pm 0,2$ U/ml et $3,3 \pm 0,6$ U/ml respectivement; concernant l'activité estérase, seul la bactérie *Bacillus velezensis* s'est avérée dotée d'activité estérase ($97,1 \pm 0,3$ U/ml), alors que les deux autres isolats ne le possèdent pas. Alors les résultats de suivi de ces deux enzymes dans le consortium montrent que l'activité β -glucosidase a été augmentée jusqu'à $9,2 \pm 0,1$ U/ml, alors pour l'activité estérase de la souche *Bacillus velezensis* a été aussi augmentée de $97,1 \pm 0,3$ U/ml jusqu'à $112 \pm 0,0$ U/ml. Ces résultats expliquent que ces trois isolats ont une interaction synergique entre eux, ce qui permet une bioconversion rapide en 48 heures et efficace par rapport à l'utilisation d'un seul isolat. Et enfin nous avons suivi certaines étapes afin de rendre le liquide de la bioconversion en état solide sous forme d'une poudre, la 1ère étape c'est la filtration à l'aide des filtres de 0,2 μ m afin d'éliminer les micro-organismes du consortium puis une évaporation à 40°C afin de sécher notre extrait, puis nous avons comparé la concentration des composés phénoliques totaux, d'hydroxytyrosol (par HPLC-UV) et de l'activité anti-oxydante de deux extraits, l'extrait de départ avant bioconversion et l'extrait après bioconversion (Après aussi filtration et séchage). Les résultats montrent qu'il y'a une diminution des composés phénoliques totaux après la bioconversion allant de $154 \pm 3,4$ mg/g jusqu'à $133,03 \pm 2,5$ mg/g ($p < 0,05$), alors pour la concentration d'hydroxytyrosol, nous avons trouvé qu'il a resté stable après la bioconversion et après les deux étapes de filtration et de l'évaporation, alors les résultats d'activité anti-oxydante montrent que même si il y'a une diminution des polyphénols totaux, l'extrait obtenu après bioconversion a une forte activité anti-oxydante à cause de la forte concentration d'hydroxytyrosol, cette activité est meilleure par rapport à l'activité de l'acide ascorbique utilisé comme un témoin positif.

Mots clés :

Bioconversion, HPLC-UV, Hydroxytyrosol, *Nakazawaea molendini-olei*, Oleuropéine, feuille d'olivier, *Lachancea fermentati*, *Bacillus velezensis*.

PRODUCTION OF HYDROXYTYROSOL FROM OLIVE LEAVES: BIOCONVERSION OF OLEUROPEINE BY A MICROBIAL CONSORTIUM OF THREE ISOLATES NAKAZAWAEA MOLENDINI OLEI, LACHANCEA FERMENTATI, BACILLUS VELEZENSIS

Abstract:

Three isolates identified as *Nakazawaea molendini-olei*, *Lachancea fermentati* and *Bacillus velezensis* capable of bioconverting olive leaf oleuropein to hydroxytyrosol, were used to develop a more efficient consortium. First this consortium was subjected to an antagonist effect check to determine if there is an inhibitory effect between the isolates that form it; then this consortium was incubated with the leaf extract rich in oleuropein to study their oleuropeinolytic capacity. The efficiency of the bioconversion of the isolates in consortium was verified with the extract of olive leaf at 1% (equivalent of 1220 ± 0 mg / l in oleuropein), at a cell concentration of 1.5% (0.5 % for each isolate), with an incubation temperature of 30° C and a pH of 4.5 of the extract without adjustment for 5 days. The results show that this consortium was able to produce hydroxytyrosol from oleuropein at a concentration of 524 ± 7 mg / l in 72h, this strong activity was optimized and the results indicate that there is a complete bioconversion of oleuropein in hydroxytyrosol in 48h with a concentration of 599 ± 7 mg / l, and that the optimal conditions for this bioconversion are: a temperature of 33° C, a concentration of cellular biomass of 3% (1% for each isolate), a concentration in 1% substrate, and a pH of 4.5 of the unadjusted extract. These results are considered the best even if we obtained almost the same concentration of hydroxytyrosol in the case of the individual cultures, because these last and according to the first results took more than 4 days to obtain a complete bioconversion of oleuropein of the leaves. olives. This consortium will be used to develop a bioreactor to obtain an efficient bioconversion of oleuropein from olive leaves in the olive industry. The bioconversion of oleuropein into hydroxytyrosol could thus be carried out by the isolated isolates, but is stimulated by a synergistic interaction of the three-member consortium, suggesting a possible complementary interaction between the different isolates, especially at the level of the enzymes responsible for this bioconversion, which allows to reduce the incubation time. For this reason we have followed the two enzymes responsible for the bioconversion of oleuropein which are β -glucosidase and esterase in the three isolates individually and also in the consortium. The results show that the three isolates *Nakazawaea molendini-olei*, *Lachancea fermentati* and *Bacillus velezensis* have β -glucosidase activity; 2.9 ± 0.5 U / ml; 2.7 ± 0.2 U / ml and 3.3 ± 0.6 U / ml respectively; Regarding esterase activity, only the bacterium *Bacillus velezensis* was found to have esterase activity (97.1 ± 0.3 U / ml), while the other two isolates did not. Then the results of monitoring of these two enzymes in the consortium show that the β -glucosidase activity was increased up to 9.2 ± 0.1 U / ml, then for the esterase activity of the *Bacillus velezensis* strain was also increased from 97.1 ± 0.3 U / ml up to 112 ± 0.0 U / ml. These results explain that these three isolates have a synergistic interaction with each other, which allows a rapid bioconversion in 48 hours and efficient compared to the use of a single isolate. And finally we followed certain steps in order to make the liquid of the bioconversion in solid state in the form of a powder, the 1st step is the filtration using filters of 0.2um in order to eliminate the micro- organizations of the consortium then an evaporation at 40° C in order to dry our extract, then we compared the concentration of total phenolic compounds, hydroxytyrosol (by HPLC-UV) and the antioxidant activity of two extracts, the starting extract before bioconversion and the extract after bioconversion (also after filtration and drying). The results show that there is a decrease in total phenolic compounds after bioconversion ranging from 154 ± 3.4 mg / g up to 133.03 ± 2.5 mg / g ($p < 0.05$), so for the concentration of hydroxytyrosol, we found that it remained stable after the bioconversion and after the two stages of filtration and evaporation, then the results of antioxidant activity show that even if there is a decrease in total polyphenols, the extract obtained after bioconversion has a strong antioxidant activity because of the high concentration of hydroxytyrosol, this activity is better compared to the activity of ascorbic acid used as a positive control.

Key Words:

Bioconversion, HPLC-UV, Hydroxytyrosol, *Nakazawaea molendini-olei*, Oleuropein, olive leaf, *Lachancea fermentati*, *Bacillus velezensis*.