

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA - Béjaia

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des sciences alimentaires
Spécialité Qualité des produits et sécurité alimentaire**



Réf :.....

**Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme**

MASTER

Thème

**Contribution à l'étude de pigments d'intérêt
industriel produit par des souches halophiles
extrêmes**

Présenté par :

KHALFOUNE Maya Taous & KHELADI Kenza

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Mme OUKIL Naima

MCA

Présidente

Mme IDRES-IMADALOU Nacéra

MCA

Encadreur

Mme TOUATI Naima

MCA

Examinatrice

Année universitaire : 2021 / 2022

Remerciements

Nous tenons avant tout à remercier le bon Dieu de nous avoir donné la force d'accomplir et d'aller au bout de ce travail

Merci à notre promotrice Mme IMADALOU-IDRES Nacéra d'avoir accepté de diriger ce projet de fin cycle, pour son aide et ses orientations.

Un grand merci au personnel de laboratoire de génie biologique pour tous les moments de travail passés au laboratoire.

Nous remercions également les membres du jury, Mme OUKIL Naima et Mme TOUATI Naima de nous avoir fait l'honneur d'examiner le fruit de notre travail.

Nous exprimons notre reconnaissance envers toutes les personnes qui, de près ou de loin, nous ont appuyé et ont contribué à la réalisation de ce travail.

Kenza et Maya

Dédicaces

Comme témoignage de ma gratitude, je dédie le fruit de ce modeste travail

À mes chers parents,

Pour tous leurs sacrifices, leurs heures de sommeil manquées, leur amour, leur soutien et leurs prières depuis toujours,

À mon cher frère,

Qui a toujours été un modèle pour moi, pour son assistance incessante, ses précieux conseils et son appui constant,

À mon cher grand-père,

Que j'espère fier de là où il est, pour sa bonne éducation, les principes et les valeurs qu'il a su m'inculquer,

À toute ma famille et mes chers amis

Pour leur soutien à chaque étape de ma vie, leur consilience, leur tendresse et leurs encouragements,

À ma chère amie Sarah,

Pour son inestimable aide, son énorme contribution et son support constant à chaque instant,

À ma très chère binôme : Kenza,

Sans qui rien de tout ça n'aurait été possible, pour son soutien moral, sa patience, sa motivation et sa compréhension tout au long de notre parcours,

À tous ceux ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à la réussite de ce projet

Maya

Dédicaces

Je dédie le fruit de ce modeste travail comme un geste de gratitude

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mon cher frère et ma chère sœur, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien morale et pour leur appui,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

A ma chère ma cousine Meriem qui ma toujours encouragé et soutenu,

A ma chère binôme : Maya pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet,

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

KENZA

Liste d'abréviation

DO: Densité optique

SS : Solution saline

MS : Milieu synthétique

CCM : Chromatographie sur couche mince

V/V : Volume/volume

AA : Acide acétique

PS : Poids sec

UV : Ultraviolet

PRC : Pré-culture

Abs : Absorbance

EOH : Ethanol

AC : Acétone

Rf : Front du solvant

HFX : Haloferax

SM : Solution mère

MVA : Mevalonic acid pathway

GGDP : Géranyl-géranyl diphosphate

AMD : Amidon

MH : Mueller Hinton

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Structures chimiques des principaux pigments appartenant à la famille des caroténoïdes	10
2	Différents stades de la biosynthèse des caroténoïdes	11
3	Propriétés physico-chimiques et biologiques des caroténoïdes	12
4	Extraction par solvants des pigments endocellulaires	21
5	Aspects des colonies sur milieu solide à base de glucose (a), coloration simple des cellules avec frottis dans SS (b) et frottis dans acide acétique (c)	26
6	Absorbance des cultures halophiles à différentes longueur d'ondes	27
7	Croissance et production des pigments en fonction du temps	29
8	Différents stade de croissance de la F8	30
9	Activités antibiotiques des souches	31
10	Activités enzymatiques des souches	32
11	Absorbance des caroténoïdes extraits de la tomate avec différents solvants	33
12	Absorbance des caroténoïdes extraits des culots bactériens avec différents solvants	33
13	Chromatographie sur couche mince des extraits de la souche 1 (A) et de la souche F8 (B) sur les systèmes de solvants suivants (V/V): Hexane/Acétone① ; Méthanol /Acétone②; Méthanol/Chloroforme③ et Heptane/Acétone④.	34
14	Extrait sec solubilisé dans la solution à 10% de vitamine E	37
15	Evolution de l'absorbance de la D1 et la SM	38
16	Evolution de l'absorbance F15 et la SM	38
17	Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des Extraits	39
18	Extraits acétone/éthanol de bactériorubérine (a) avant séchage, (b) après séchage (c) : boisson avant ajout du colorant, (d) : boisson après ajout du colorant	40

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Codage des colorants alimentaires autorisés en Europe	5
II	Origine et applications industrielles de certains colorants naturels.	6
III	Facteurs influençant la stabilité des colorants alimentaires naturels	6
IV	Effets secondaires et applications industrielles de certains colorants synthétiques.	7
V	Propriétés médicinales de certains caroténoïdes.	13
VI	Les souches utilisées	19
VII	Caractéristiques des cultures en milieu liquide	28
VIII	Résultats obtenus de la CCM avec différents systèmes de solvant	34

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Introduction 2

Synthèse bibliographiques

1	Les colorants alimentaires.....	3
1.1	Définition.....	3
1.2	Historique.....	3
1.3	Importance des colorants alimentaires.....	3
1.4	Réglementation.....	4
1.5	Origine des colorants alimentaires.....	5
1.5.1	Colorants naturels.....	5
1.5.2	Colorants de synthèse.....	6
1.5.3	Colorants microbiens.....	7
1.6	Effets des colorants alimentaires sur la santé.....	8
1.6.1	Effets néfastes.....	8
1.6.2	Effets bénéfiques.....	8
2	Caroténoïdes.....	9
2.1	Généralités.....	9
2.2	Structure et fonction des caroténoïdes.....	9
2.3	Biosynthèse des caroténoïdes.....	11
2.4	Métabolisme des caroténoïdes.....	11
2.5	Propriétés des caroténoïdes.....	12
2.6	Sensibilité des caroténoïdes.....	13
2.6.1	L'oxygène.....	13
2.6.2	La lumière.....	13
2.6.3	La chaleur.....	14
2.7	Sources des caroténoïdes.....	14

2.7.1	Caroténoïdes dans les fruits et légumes	14
2.7.2	Caroténoïdes des animaux	14
2.7.3	Caroténoïdes des algues marines.....	14
2.7.4	Caroténoïdes des bactéries	14
3	Production de caroténoïdes par les Haloarchées	16
3.1	Généralités sur les haloarchées.....	16
3.2	Caroténoïdes produits par les haloarchées.....	16
3.2.1	Activités biologiques des bactériorubérines	16
3.2.2	Avantages des caroténoïdes haloarchéens	17
3.2.3	Applications industrielles des caroténoïdes haloarchéens	17

Partie expérimentale

Matériel et méthode

1	Matériel	19
1.1	Matériel biologique	19
1.2	Milieu de culture	19
1.3	Appareillage et réactifs.....	19
2	Méthodes	20
2.1	Culture des souches en batch (ErlenMeyer)	20
2.1.1	Préparation de la pré-culture :	20
2.1.2	Inoculation des Erlenmeyers	20
2.2	Cinétique de croissance.....	20
2.3	Analyse des cultures.....	20
2.3.1	Estimation de la croissance	20
2.3.2	Extraction des pigments	20
2.3.3	Recherche de métabolites dans les surnageants de culture.....	22
2.3.3.1	Les enzymes hydrolytiques.....	22
2.3.3.2	L'activité antibiotique.....	22
2.4	Séparation des composants du pigment par chromatographie sur couche mince (CCM) .	22
2.4.1	Choix du solvant de développement.....	22
2.4.1.1	Chromatographie sur gel de silice.....	23
2.4.1.2	Chromatographie sur papier	23
2.5	Utilisation du pigment comme additif alimentaire	23
2.5.1	Composition de la boisson	24

2.5.2	Caractéristiques physico-chimiques de la boisson.....	24
2.5.3	Procédé de fabrication de la boisson	24
2.6	Activité antioxydante de l'extrait brut : test DPPH	24
2.6.1	Principe du test DPPH :.....	24
2.6.2	Protocole du test DPPH :	25

Résultats et discussion

1	Caractérisation morphologique des souches utilisées.....	26
2	Choix de la longueur d'onde pour l'estimation de la croissance	27
3	Caractérisation des Cultures en milieu liquide.....	27
4	Cinétique de croissance en système batch	29
5	Recherche de substances extracellulaires produites	30
5.1	Production de substances antibiotiques	30
5.2	Recherche de l'activité enzymatique	31
6	Etude du pigment membranaire	32
6.1	Choix du solvant d'extraction.....	32
6.1.1	Cas du témoin (tomate).....	32
6.1.2	Cas du culot bactérien	33
6.2	Choix du solvant de développement.....	34
7	Séparation de l'extrait pigmentaire	35
7.1	CCM sur papier	35
7.2	CCM sur gel de silice.....	36
8	Utilisation du pigment comme additif alimentaire	37
8.1	Solubilité de l'extrait brut.....	37
8.2	Stabilité.....	37
8.3	Activité antioxydante de l'extrait brut : DPPH	39
8.4	Ajout du colorant à la boisson.....	39
	Conclusion	41

Introduction

Les pigments d'origine naturelle ont différentes sources : les végétaux, les insectes et les animaux. Ils regroupent les colorants les plus courants de la période préhistorique jusqu'à l'apparition des colorants synthétiques au milieu du 19^{ème} siècle. Malgré leurs effets néfastes sur la santé et l'environnement, ils dominent largement le marché (**Ardila-Leal et al., 2021**).

Une alternative aux pigments synthétiques commence à émerger chez les industriels : les pigments microbiens, et ce en raison de leurs nombreux avantages parmi lesquels une meilleure biodégradabilité et compatibilité avec l'environnement ainsi qu'une productivité plus importante à moindre coût, ce qui offre des perspectives prometteuses à plusieurs niveaux. L'optimisation du processus de fabrication et des composants du milieu est considérée comme une stratégie clé pour une récupération économique des pigments (**Akilandeswari et Pardeep, 2017**).

L'extraction des pigments bactériens sous des formes pures et concentrées est le principal défi technologique. Il est maintenant possible de produire des pigments d'origine bactérienne à des fins d'applications dans divers domaines, principalement dans le secteur agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique et textile (**Venil et al., 2013**).

Des travaux de recherche doivent être menés pour formuler les milieux de fermentation pour chaque pigment bactérien à grande échelle en utilisant des sources économiques et facilement disponibles pour le processus commercial. Les progrès récents en matière de biologie synthétique et d'ingénierie métabolique des bactéries permettront d'augmenter considérablement le nombre de pigments pouvant être produits économiquement en quantités suffisantes pour une application industrielle.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressées à la production de pigments d'intérêt industriel par des souches halophiles extrêmes et à l'identification et la caractérisation de ces derniers, et ce dans l'optique de les utiliser comme additifs alimentaires afin de colorer une boisson à base de jus d'orange.

Pour cela, nous avons divisé notre travail en deux parties ; la première étant consacrée à une synthèse bibliographique basée sur des recherches concernant les colorants alimentaires en général, mais également sur les colorants produits par les souches étudiées, plus précisément : les caroténoïdes.

Introduction générale

En ce qui concerne la deuxième partie, elle résume les différentes étapes de notre travail au sein du laboratoire ; de la production des pigments, à l'extraction, la caractérisation et enfin l'utilisation en tant qu'additif alimentaire.

Synthèse bibliographiques

1 Les colorants alimentaires

1.1 Définition

Connus sous le nom de colorants ou d'additifs de couleur, les pigments alimentaires permettent de conférer, d'optimiser et d'améliorer la coloration d'un produit alimentaire, souvent altérée par les procédés de transformation utilisés dans l'agroalimentaire ainsi que les traitements thermiques appliqués. Ils apportent une valeur ajoutée aux recettes en termes de visuel uniquement (**Amrouche, 2016**).

1.2 Historique

L'ajout de colorants aux aliments est une pratique ancienne, mentionnée dès 1500 av. J.-C. en Égypte, où les confiseurs ajoutaient des extraits naturels et du vin pour améliorer l'apparence de leurs produits. Des papyrus mentionnent également l'ajout de curcuma et de safran aux plats pour les rendre plus appétissants. Avec le début des temps modernes et l'urbanisation croissante, le commerce des épices au XIV^e siècle a permis l'accès à des substances exotiques très colorantes (**Ulrik, 2010**).

Au XIV^e siècle, très peu de moyens scientifiques permettaient de détecter sûrement l'altération des denrées et peu de lois l'interdisaient. Les vendeurs de l'époque proposaient alors plus de 80 colorants artificiels. Nombre d'entre eux sont toxiques tel que : **l'oxyde de plomb** (Pb_3O_4 , rouge) et **le cinabre** (HgS , vermillon) (**Downham et collins, 2000**).

Avant 1850, les colorants alimentaires étaient d'origine naturelle (safran, cochenille, curcuma). Les premiers colorants artificiels datent donc de la seconde moitié du XIX^e siècle et sont au départ, préparés à partir des produits de distillation de la houille, notamment la mauvéine synthétisée en 1856 et obtenue à partir de l'aniline (**Triki, 2018**).

1.3 Importance des colorants alimentaires

Depuis quelques années, les colorants alimentaires sont utilisés comme moyen d'accroître le plaisir esthétique de la nourriture. Des études ont montré qu'une belle couleur peut stimuler l'appétit et donc tromper le consommateur en améliorant l'aliment original. Les industriels l'ont bien compris : il faut choisir la bonne couleur (**Delgado-Vargas, 2002**).

Les colorants sont de plus en plus utilisés par l'industrie agro-alimentaire, car ils répondent à une demande des consommateurs, devenus très exigeants quant à l'aspect visuel des produits comestibles. D'un point de vue nutritionnel, l'usage des colorants alimentaires n'est généralement pas nécessaire. En outre, ils ont pour but d'améliorer l'aspect des aliments. Ils permettent de palier une perte de coloration pendant la production, de colorer des aliments incolores et de renforcer une idée gustative spécifique. Ils compensent également les variations saisonnières **(Delgado-Vargas, 2002)**.

1.4 Réglementation

Les colorants alimentaires ne sont pas des additifs indispensables, le seul but de leur emploi est d'agir sur la couleur de l'aliment, ce qui n'a aucun intérêt hygiénique connu autre que « esthétique ». Leur usage permet d'exiger une nécessité de sécurité sanitaire plus forte que d'autres additifs **(Ulrik, 2010)**.

Les premières lois règlementant l'usage de certaines substances dans la nourriture listent les ingrédients interdits, contrairement aux réglementations actuelles dont les listes sont positives et listent les ingrédients permis, tout ingrédient non explicitement autorisé est supposé interdit. Leur but reste cependant le même : d'abord assurer la protection des consommateurs, ensuite ne pas entraver l'intérêt commercial. Lorsqu'un colorant s'avère nocif, il est retiré des listes autorisées ou sa dose journalière admissible est abaissée de manière à ne pas exposer les consommateurs à des doses dangereuses de ces matières **(Ulrik, 2010)**.

Différents organismes fixent les listes de colorants autorisés en fonction des pays, par ailleurs, le codex Alimentarius élaboré collectivement et édité par les Nations unies définit un cadre qui, sans être légalement contraignant, sert de base à la plupart des réglementations nationales actuelles **(Ulrik, 2010)**.

Les colorants alimentaires autorisés en Europe sont dotés d'un numéro de code précédé de la lettre E et composé de trois chiffres dont celui des centaines est le 1. Celui des dizaines correspond à leur couleur :

Tableau I: Codage des colorants alimentaires autorisés en Europe (Ulrik, 2010).

Chiffre des dizaines	Couleur
0	Jaune
1	Orange
2	Rouge
3	Bleu
4	Vert
5	Brun
6	Noir
7	Colorant minéraux
8	Colorants spéciaux

1.5 Origine des colorants alimentaires

1.5.1 Colorants naturels

Jusqu'en 1850, les colorants alimentaires connus étaient uniquement d'origine naturelle. C'était des colorants pour la plupart organiques qui provenaient :

- › De végétaux comestibles : carotte (orange), betterave (rouge), peau de raisin noir (noir)...
- › D'extraits de plantes : (feuilles, écorces) ...
- › D'extraits d'origine végétale non habituellement consommée : stigmate de crocus (safran)...
- › Du résultat de la transformation de substances naturelles.
- › D'extraits d'insectes

Avec de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire, on peut distinguer les colorants d'origine naturelle selon leurs sources : (Tableau II)

Tableau II: Origine et applications industrielles de certains colorants naturels

Pigment	Couleur	Origine	Applications industrielles
Curcumine	Jaune vif	Végétale	Lait, confiture, saucisse, beurre, gelée, sauce, bouillon.
B- carotène	Rouge /orange	Végétale	Produits laitiers, margarine, beurre.
Cochenille	Rouge vif	Animale	Boissons sucrées, Chewing-gum, yaourts, pâtisseries, flans, entremets, bonbons, confiseries.
Encre de sèche (sépia)	Noir /brun/violet	Animale	Pâtes alimentaires, crème chantilly, coques de macarons, pain à hamburger.

› Stabilité des colorants alimentaires naturels

La catégorie de colorants alimentaire la moins stable et la plus sensible englobe les colorants naturels car leur stabilité dépend de la composition, du procédé de fabrication, de l'emballage et de la date limite de consommation. Les principaux facteurs intervenant sont soulignés dans le tableau III :

Tableau III: Facteurs influençant la stabilité des colorants alimentaires naturels

Facteur	Effets	Solutions éventuelles
Lumière	Décoloration	Conservation à l'abri de la lumière
pH	Dépôt à pH bas Changement de couleur	Micro encapsulation
Oxydation	Dégradation, décoloration	Micro encapsulation Usage d'antioxydants
Métaux	Dégradation Dépôt de calcium	Agents chélatants (séquestrant)
SO ₂	Décoloration	Remplacer le SO ₂ par d'autres antioxydants

1.5.2 Colorants de synthèse

Créés industriellement par l'homme, les colorants alimentaires d'origine synthétique sont des copies conformes des colorants naturels. Ce sont des colorants obtenus par synthèse chimique, mais qui sont des répliques d'additifs naturels (**Delgado-Vargas, 2002**).

Parmi les colorants de synthèse les plus importants, on compte : (Tableau IV)

Tableau IV: Effets secondaires et applications industrielles de certains colorants synthétiques

Pigments	Couleurs	Effet secondaire	Applications industrielles
Tartrazine (E102)	Jaune	Allergène	Boissons, pouding, gâteau, fruit et légume en conserve, lait écrémé.
L'amarante (E123)	Rouge foncé	Cancérogène	Vins spiritueux, œuf de poisson, caviar.
Bleu patenté (E131)	Bleu foncé	Allergène	Bonbon

1.5.3 Colorants microbiens

Les résultats négatifs et décevants des nombreux examens minutieux et analyses détaillées effectuées sur les colorants alimentaires synthétiques et leurs effets néfastes sur la santé des consommateurs ont suscité un vif intérêt pour les alternatives naturelles (**Tuli et al., 2015**).

Les micro-organismes sont considérés comme étant les outils les plus polyvalents en biotechnologie et ce grâce à leur capacité à produire diverses molécules, notamment des enzymes, des antibiotiques, des acides organiques et des pigments. La présence de pigments a été signalée dans l'ensemble du monde microbien, y compris les bactéries, les champignons, les levures, les algues et les protozoaires (**Tuli et al., 2015**).

Ces microorganismes peuvent être isolés, cultivés et purifiés à partir de diverses sources environnementales telles que les masses d'eau, le sol, les plantes, les insectes et les animaux. Parmi les molécules produites par les micro-organismes figurent les caroténoïdes, les mélanines, les flavines, les quinones, et plus particulièrement les monascines, la violacéine ou l'indigo (**Tuli et al., 2015**).

› Avantages des colorants microbiens

Les colorants microbiens sont préférables en raison de leur facilité de mise à l'échelle ainsi que de leur coût de production relativement faible. La fermentation microbienne pour la production de pigments naturels présente plusieurs avantages tels qu'une production moins chère, des rendements plus élevés, une extraction plus facile, des matières premières moins coûteuses, l'absence de variations saisonnières et des techniques d'amélioration des souches pour augmenter le pigment naturel. Ceux-ci peuvent également avoir des avantages pour la

santé comme l'activité anticancéreuse, l'activité antimicrobienne et l'activité antioxydante. Ils peuvent aussi être utilisés comme additifs, antioxydants, intensificateurs de couleur et ingrédients alimentaires fonctionnels (**Sen et al., 2019**).

1.6 Effets des colorants alimentaires sur la santé

1.6.1 Effets néfastes

Certains colorants alimentaires sont responsables d'intolérances. Seul le rouge de la cochenille E124 provoque, rarement, des allergies. D'autres sont mutagènes et génotoxiques ou encore provoquent des cancers de la thyroïde. Les colorants alimentaires que l'on peut considérer comme toxiques pour l'être humain et à éviter sont la Tartrazine E102 et l'Amarante E123. Ces additifs sont entre autre suspectés de jouer un rôle dans le syndrome d'hyperactivité et pourraient contenir des substances cancérigènes (**Delgado-Vargas, 2002**). Ceci dit, les réactions d'intolérance liées aux colorants alimentaires en générale ne sont pas de même nature voici la liste de celles le plus fréquemment observées :

- ⇒ Action sur le système nerveux central et périphérique (effet excitant) ;
- ⇒ Anomalie des récepteurs neuroniques ;
- ⇒ Inhibition ou déficit de certains enzymes ;
- ⇒ Augmentation de la perméabilité intestinale. (**Belhadj F. 2015**)

1.6.2 Effets bénéfiques

Heureusement pour le consommateur, tous les colorants alimentaires ne sont pas dangereux pour la santé. On peut citer la Curcumine (E100), car elle a un effet inhibiteur sur les cellules cancéreuses et leur prolifération ainsi qu'un puissant effet anti inflammatoire. C'est également le cas du Lycopène E160d et du β -carotène E160a. Ces deux colorants appartiennent à une même famille : les caroténoïdes que l'on retrouve dans presque tous les fruits et légumes (**Tuli et al., 2015**).

2 Caroténoïdes

2.1 Généralités

Les caroténoïdes, également appelés tétraterpénoïdes regroupent les molécules des familles des carotènes et des xanthophylles. Ce sont les deuxièmes pigments naturels les plus abondants. Plus de 700 caroténoïdes ont été isolés et identifiés dans la nature (**Naziri et al., 2014**).

La production de ce type de pigment est répandue chez de nombreux organismes vivants. Ils sont synthétisés par les organismes photosynthétiques (cyanobactéries, algues, plantes) ainsi que par certains champignons et bactéries (**Naziri et al., 2014**).

La grande majorité des animaux ne peuvent pas synthétiser de caroténoïdes, ils sont donc acquis lors de leur alimentation et modifiés structurellement par la suite (**Rodriguez-Amaya, 2001**).

Parmi les caroténoïdes on compte le β -carotène, l'astaxanthine, la lutéine, la canthaxanthine et le lycopène qui en sont des exemples importants (**Naziri et al., 2014**).

L'omniprésence naturelle de ces pigments a fait des caroténoïdes les additifs alimentaires les plus utilisés en tant que colorants et/ou antioxydants.

2.2 Structure et fonction des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des composés hydrophobes qui sont compris essentiellement en un squelette hydrocarboné en C40. Ainsi, tous les caroténoïdes possèdent une longue chaîne conjuguée de doubles liaisons et une symétrie quasi bilatérale autour de la double liaison centrale (**Rodrigo-Baños et al., 2015**).

Les caroténoïdes peuvent être classés en différents groupes sur la base des critères utilisés.

1) La structure chimique de base et de la présence d'oxygène :

Les caroténoïdes sont classés en deux groupes :

- **Les carotènes ou hydrocarbures caroténoïdes** : composés uniquement de carbone et d'hydrogène tels que le lycopène et le β -carotène.

- **Les xanthopylles ou caroténoïdes oxygénés** : qui sont oxygénés et peuvent contenir des groupes fonctionnels : la lutéine et la canthaxanthine qui sont des xanthopylles (figure1).

2) Teneur en vitamine A :

Les caroténoïdes peuvent être classés comme suit :

- **(A)** : précurseurs de la vitamine A qui ne pigmentent pas comme le β -carotène ;
- **(B)** : pigments à activité partielle de la vitamine A comme la cryptoxanthine ;
- **(C)** : précurseurs de la vitamine A qui ne pigmentent pas ou peu, comme la violaxanthine et la néoxanthine ;
- **(D)** : précurseurs de la vitamine A qui pigmentent, comme la lutéine, la zéaxanthine et la canthaxanthine.

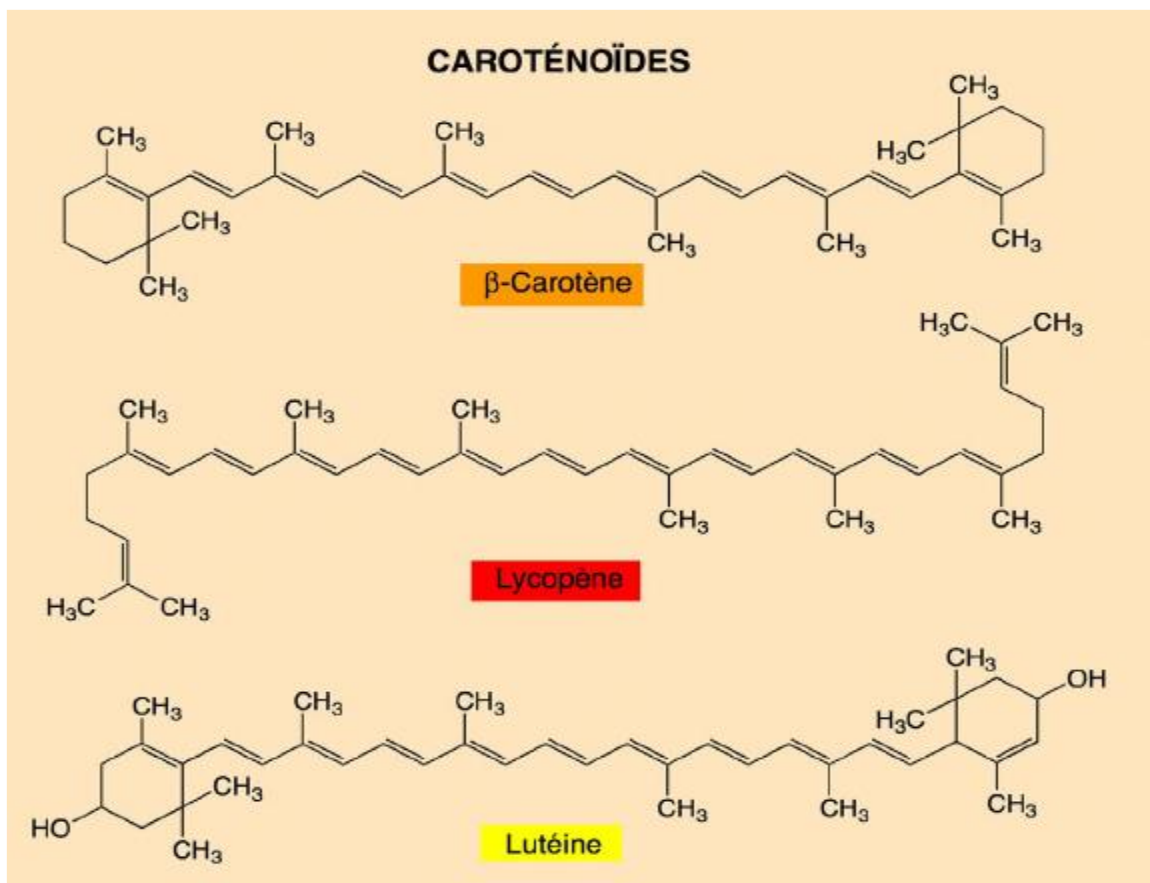


Figure 1 : Structures chimiques des principaux pigments appartenant à la famille des caroténoïdes (Renoult et Valeur, 2015).

2.3 Biosynthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes synthétisés à partir de l'acétyl coenzyme-A via l'acide mévalonique (Delia et Rodriguez-Amaya, 2001).

Les principaux stades de biosynthèse des caroténoïdes sont résumés dans la figure qui suit :

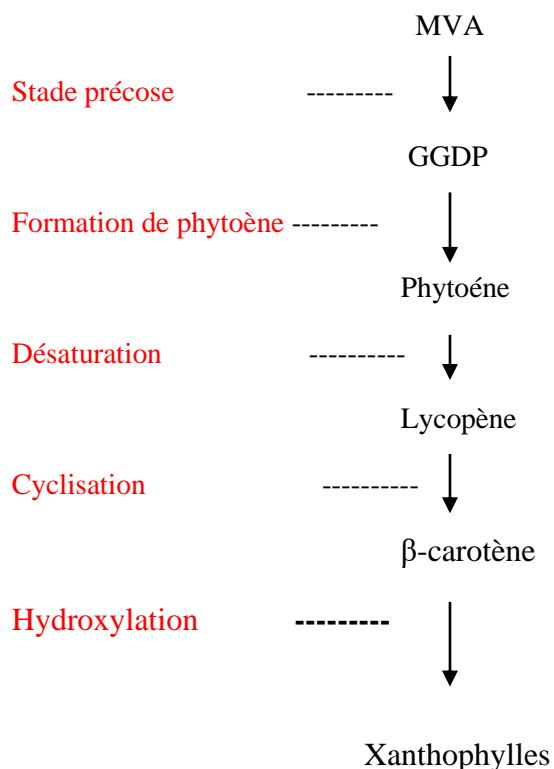


Figure 2: Différents stades de la biosynthèse des caroténoïdes (Zaghdoudi, 2015).

2.4 Métabolisme des caroténoïdes

Chez l'homme, il a été bien démontré que la plupart des caroténoïdes ingérés sont absorbés par les cellules de la muqueuse gastro-intestinale et apparaissent inchangés dans la circulation et les tissus. Dans l'intestin, les caroténoïdes sont absorbés par diffusion passive après avoir été incorporés dans les micelles formées par les graisses alimentaires et les acides biliaires. Les caroténoïdes micellaires sont ensuite incorporés dans les chylomicrons et libérés dans le système lymphatique, et après transportés dans le plasma exclusivement par les lipoprotéines (Tan et Norhaizan, 2019).

Bien que pas moins de quarante caroténoïdes soient habituellement ingérés dans l'alimentation, seuls six caroténoïdes et leurs métabolites ont été retrouvés dans les tissus humains, ce qui suggère une sélectivité dans l'absorption intestinale des caroténoïdes (Tan et Norhaizan, 2019).

2.5 Propriétés des caroténoïdes

La figure ci-dessus représente les propriétés des caroténoïdes : (figure3)

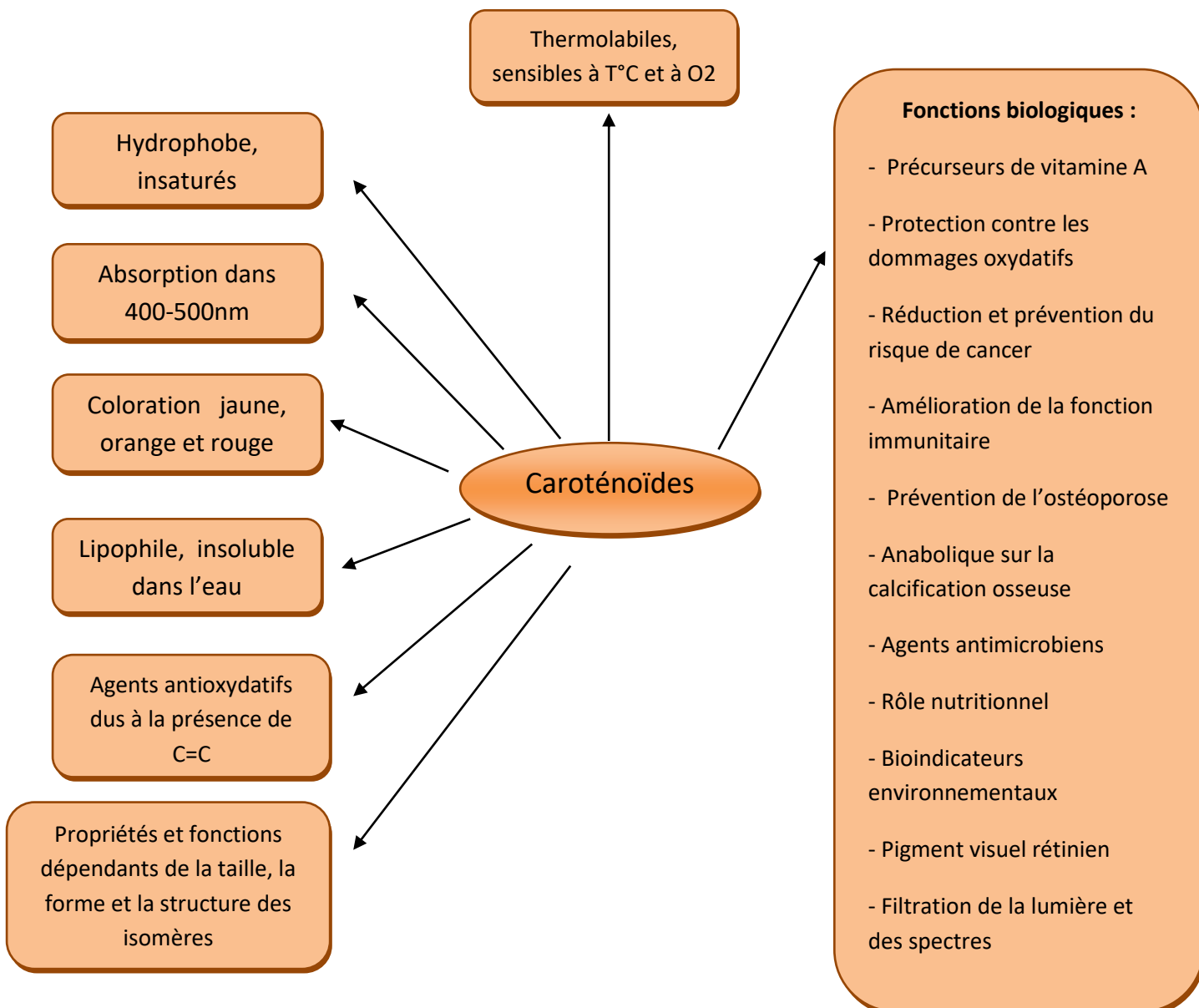


Figure3 : Propriétés physico-chimiques et biologiques des caroténoïdes (kriti et al., 2014).

Les caroténoïdes sont connus pour leurs propriétés médicinales. Les plus importantes sont citées dans le tableau ci-dessous :

Tableau V: Propriétés médicinales de certains caroténoïdes

Activité	Pigment
Activité provitaminique A	- α -Carotène - β -Carotène - β -cryptoxanthine
Activité antioxydante /pro-oxydante	-Bactériorubérine -Cantaxanthine
Activité anticancéreuse	- Lutéine - Lycopène - β -carotène - Astaxanthine
Activité anabolique sur les composants osseux	- β -cryptoxanthine
Activité anti-inflammatoire	-Bactériorubérine -Astaxanthine

2.6 Sensibilité des caroténoïdes

Le principal problème dans l'analyse des caroténoïdes provient de leur instabilité. Ainsi, quelle que soit la méthode analytique choisie, des mesures de précaution pour éviter la formation d'artefacts et de pertes quantitatives doivent être une pratique courante dans le laboratoire (**Delia et Rodriguez-Amaya, 2001**).

2.6.1 L'oxygène

La présence de traces d'oxygène dans les échantillons et de tout agent oxydant même dans les extraits bruts de caroténoïdes, peuvent rapidement conduire à un blanchiment et à la formation d'artefacts, tels que les caroténoïdes époxy et les apocaroténals (**Delia et Rodriguez-Amaya, 2001**).

Les mesures préventives

- 1) Utilisation d'une atmosphère sous vide ou d'une atmosphère d'azote ou d'argon.
- 2) Utilisation d'antioxydants, en particulier lorsque l'analyse est prolongée.

2.6.2 La lumière

L'exposition à la lumière, en particulier la lumière solaire directe ou les rayons ultraviolets, induit une photoisomérisation trans-cis et la photodestruction des caroténoïdes. (**Delia et Rodriguez-Amaya, 2001**).

Les mesures préventives

- 3) Effectuer l'analyse sous lumière tamisée.
- 4) Envelopper les récipients contenant des caroténoïdes dans du papier aluminium.
- 5) Recouvrir les cuves de développement de la CCM (maintenir à l'obscurité).

2.6.3 La chaleur

En raison de la thermolabilité des caroténoïdes, le chauffage ne doit être effectué qu'en cas de nécessité absolue (**Delia et Rodriguez-Amaya, 2001**).

Les mesures préventives

- 6) Concentrer les extraits dans un évaporateur rotatif à pression réduite à $T < 40^{\circ}\text{C}$, et l'évaporation du solvant doit être terminée à l'azote ou à l'argon.
- 7) Veiller à ce que l'extrait ne se dessèche pas complètement dans l'évaporateur rotatif.

2.7 Sources des caroténoïdes

2.7.1 Caroténoïdes dans les fruits et légumes

Les fruits, les légumes et leurs produits de transformation représentent la première source de caroténoïdes, car ils ont la capacité de les synthétiser de novo. Environ 40 espèces sont présentes dans un régime alimentaire humain typique (**Maoka, 2019**).

2.7.2 Caroténoïdes des animaux

Les caroténoïdes peuvent être présents chez certains animaux (les oiseaux, certains poissons, les crustacés et les insectes) en raison de la consommation d'aliments riches en caroténoïdes. Ils peuvent aussi être produits par certains métabolismes de transformation (oxydation ou réduction), à partir des pigments présents dans la chaîne alimentaire (**Maoka, 2019**).

2.7.3 Caroténoïdes des algues marines

Les algues et les microalgues sont une troisième source importante de caroténoïdes. Les algues vertes (chlorophyta) sont riches en β -carotène, lutéine, zéaxanthine, fucoxanthine, ect. Les algues rouges (rhodophyta) contiennent en plus de l' α -caroténoïde (**Guedes et al., 2011**).

2.7.4 Caroténoïdes des bactéries

Plusieurs bactéries ont été étudiées en raison de leur potentiel biotechnologique pour la production de pigments, parmi elles, la *Flavobacterium sp.* qui est une bactérie marine connue liée à la production optimale de zéaxanthine. L'*Haloferax alexandrinus* a de bonnes perspectives industrielles pour la production de canthaxanthine (**Cardoso et al., 2017**).

D'autres bactéries telles que l'*Agrobacterium aurantiacum*, la bactérie modifiée *Escherichia coli*, les *Mycobacterium brevicavae*, *Mycobacterium lacticola*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodococcus maris*, *Streptomyces chrestomyceticus* et *Erwinia uredovora*. *Erwinia uredovora* ont également la capacité de synthétiser des caroténoïdes (**Cardoso et al., 2017**).

Les bactéries appartenant aux espèces thermophiles halophiles *Halococcus morrhuae* et *Halobacterium salinarum* qui présentent des colonies de couleur rouge et orange sont également productrices de caroténoïdes, responsables de leur coloration caractéristique. Le *H. salinarum* produit la bactériorubérine qui est le caroténoïde le plus trouvé (**Cardoso et al., 2017**).

3 Production de caroténoïdes par les Haloarchées

3.1 Généralités sur les haloarchées

Les archées halophiles extrêmes sont des microorganismes extrémophiles qui exigent des concentrations en sel très élevée pour croître. Ils sont présents dans les environnements hypersalins avec une concentration en sel proche de la saturation tel que les lacs salés, les marais salants, les sols salins, et dans les aliments fermentés et conservés à base de sel. Ils peuvent survivre pendant de longues périodes dans les cristaux de sel (**Corral *et al.*, 2020**).

Ces microorganismes contiennent des pigments de type caroténoïdes, donc rouges, ce qui confère à leurs colonies des couleurs vives et caractéristiques. Ils sont classés sur la base de leur niveau d'exigence et de tolérance en sel (**Rodrigo-Baños *et al.*, 2015**).

Les Haloarchées sont pour la plupart des organismes aérobies qui utilisent les substrats organiques comme source de carbone et d'énergie. Certains sont anaérobies et photohétérotrophes grâce à la bactériorhodopsine (**Rodrigo-Baños *et al.*, 2015**).

3.2 Caroténoïdes produits par les haloarchées

La bactériorubérine est le principal pigment caroténoïde produit par les haloarchées. C'est un pigment rouge-orange ubiquitaire et abondant chez les haloarchées modérément à extrêmement halophiles (**Naziri *et al.*, 2014**).

Ce caroténoïde est le principal pigment caroténoïde responsable de la coloration rougeâtre des archées de la famille des Haloarchées. Ce pigment a une structure moléculaire assez particulière. C'est un caroténoïde terpénoïde tétra-hydroxylé à 50 atomes de carbone. Il joue un rôle de pigment biologique et de métabolite bactérien (**Naziri *et al.*, 2014**).

3.2.1 Activités biologiques des bactériorubérines

Dans le domaine médical, les caroténoïdes C50 peuvent être utilisés comme agents de prévention des maladies cardiaques ou activateurs de la production d'anticorps et également comme anti-tumoraux. Ces mêmes caroténoïdes ont montré une activité antivirale contre les virus de l'hépatite B et C en inhibant leurs polymérase, et pourraient ainsi être utilisés comme agents antiviraux (**Rodrigo-Baños *et al.*, 2015**).

En outre, certaines études ont montré que ces caroténoïdes seraient dotés d'activités anticancéreuses, antihémolytiques et antitumorales (**Rodrigo-Baños et al., 2015**).

Les fonctions biologiques des caroténoïdes C50 chez l'homme sont liées à leur nature d'antioxydants. Ils sont capables de protéger les cellules contre les attaques des radicaux libres et d'exercer ainsi une action préventive contre un certain nombre de maladies dégénératives (**Rodrigo-Baños et al., 2015**).

Certaines études ont trouvé que la bactériorubérine présente une capacité antioxydante supérieure à celle du β -carotène, ceci est lié au nombre de doubles liaisons conjuguées dans leurs structures. En effet, la bactériorubérine contient 13 doubles liaisons contre 11 dans le β -carotène (**Rodrigo-Baños et al., 2015**).

Ils sont également impliqués dans la photoprotection et la photoréparation des dommages de l'ADN causés par le rayonnement UV, tandis que le rétinol est produit en quantité suffisante pour servir de chromophore aux opsines utilisées dans la phototrophie et la photoréparation utilisées dans la phototrophie et la phototaxie (**Rodrigo-Baños et al., 2015**).

3.2.2 Avantages des caroténoïdes haloarchéens

La production des caroténoïdes par les haloarchaea présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la tolérance de ces microorganismes aux concentrations élevées en sels empêche la contamination par d'autres microorganismes, ce qui permet de travailler dans des conditions non stériles, facilitant ainsi leur culture à grande échelle et réduisant les coûts de production. Ensuite, le processus d'extraction des caroténoïdes est facile, rapide et pas cher (**Rodrigo-Baños et al., 2015 ; Torregrosa-Crespo et al., 2018 ; Giani et al., 2019**).

Les haloarchaea présentent un taux de production de caroténoïdes supérieur à celui rapporté pour plusieurs microalgues. Enfin, cette production peut être améliorée ou accélérée par modification génétique ou même en modifiant les conditions de culture (**Rodrigo-Baños et al., 2015 ; Torregrosa-Crespo et al., 2018 ; Giani et al., 2019**).

3.2.3 Applications industrielles des caroténoïdes haloarchéens

Le développement de nouveaux colorants pour l'industrie alimentaire est un défi, car les colorants doivent être compatibles avec les saveurs, la sécurité sanitaire et la valeur nutritionnelle d'un aliment, mais également avoir un impact minimal sur le prix du produit. En

outre, les colorants alimentaires doivent de préférence être des composés naturels plutôt que synthétiques. (Sen *et al.*, 2019).

La perception du public envers les couleurs naturelles a augmenté en raison de leur sécurité pour la santé et de leur caractère écologique. Les pigments microbiens, qui constituent une source importante de couleurs naturelles, possèdent un large éventail de propriétés médicinales. Ils peuvent être produits à grande échelle à des coûts relativement faibles (Tuli *et al.*, 2015).

Compte tenu des tendances de consommation, l'industrie agroalimentaire essaye de remplacer intégralement les composés synthétiques par des composés naturels notamment les colorants qui sont de large utilisation dans les conserves, les confiseries, les boissons, mais qui sont très connus pour leurs effets indésirables, tant sur la santé que sur l'environnement (Sen *et al.*, 2019).

Les caroténoïdes produits par les haloarchées peuvent donc être utilisés comme des agents de coloration dans les denrées alimentaires, limitant ainsi l'utilisation des colorants synthétiques. Grâce à leurs importantes propriétés antioxydantes, ces caroténoïdes serviraient d'additifs alimentaires. Leur action protégerait, d'une part les aliments des altérations provoquées par l'oxydation, et d'autre part jouerait un rôle important dans la prévention de plusieurs pathologies. Les aliments fonctionnels supplémentés par ces caroténoïdes pourraient ainsi prévenir certaines pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires, certains cancers et certaines affections des yeux liées au vieillissement (dégénérescence de la rétine). Ces composés peuvent également être utilisés en tant que suppléments alimentaires destinés à l'alimentation animale (volailles, crustacés, etc.) (Tuli *et al.*, 2015).

Actuellement, les caroténoïdes sont utilisés commercialement comme colorants alimentaires naturels, complément de nutriments, additifs alimentaires, compléments alimentaires pour animaux et, plus récemment, comme nutraceutiques à des fins cosmétiques et pharmaceutiques (Sen *et al.*, 2019).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1 Matériel

1.1 Matériel biologique

Nous avons utilisé plusieurs souches halophiles extrêmes isolées de différents milieux hypersalins algériens (**Idres-Imadalou, 2019**). Ces souches sont caractérisées par la production de pigments endo-cellulaires (**Tableau VI**).

La souche *Halobacterium salinarium* (DSMZ3754) est utilisée comme souche de référence pour la mise en évidence de l'activité antibiotique.

Tableau VI : Les souches utilisées

Souche	Conditions de culture			Affiliation ^a (16S)
	Température	pH	NaCl	
1	40°C	7.2	25%	NI
2	40°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
F8	43°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
3	40°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
4	40°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
5	40°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
V5M2A	40°C	7.2	15%	<i>Haloarchaea</i>
S4	40°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
F6	40°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
F15	40°C	7.2	25%	<i>Haloarchaea</i>
D1	40°C	7.2	25%	NI

NI : Non identifié ; ^a Idres-Imadalou (2019)

1.2 Milieu de culture

Pour la croissance des souches halophiles, nous avons utilisé un milieu synthétique à base de glucose spécifique aux halophiles extrêmes (**annexe 3**).

Nous avons également utilisé ce milieu synthétique gélosé, dans lequel le glucose est remplacé par une autre source de carbone, pour la détermination des activités enzymatiques.

Le milieu MH sert à cultiver la souche de référence *H.salinarum* (**annexe 3**).

1.3 Appareillage et réactifs

La liste des appareillages et réactifs utilisés figure dans l'annexe 1.

2 Méthodes

2.1 Culture des souches en batch (ErlenMeyer)

2.1.1 Préparation de la pré-culture :

Une colonie est d'abordensemencée dans un tube contenant 5 ml du milieu de culture liquide. L'incubation est effectuée à 40°C sous agitation (200rpm) pendant 2 à 3 jours. Cette culture sert à inoculer un Erlenmeyer de 100ml contenant 20ml de milieu.

2.1.2 Inoculation des Erlenmeyers

Des Erlenmeyers de 500 et 250 ml contenant respectivement 80ml et 40ml de milieu liquide sont inoculés à 5 ou 10% de la pré-culture, puis incubés à 40°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à l'apparition d'une forte pigmentation.

2.2 Cinétique de croissance

La croissance de la souche F8 et la production du pigment sont suivies en fonction du temps ; des prélèvements de 5mL sont réalisés quotidiennement. La turbidité des cultures, le pH des surnageants et l'absorbance du pigment sont déterminés.

2.3 Analyse des cultures

2.3.1 Estimation de la croissance

La croissance des souches halophiles est estimée par la mesure de la densité optique (DO) des cultures diluées au $1/10^{\text{ème}}$ dans une solution saline (SS). Les absorbances sont mesurées à différentes longueurs d'ondes : 517 ; 546 ; 635 ; 500, 550 et 600 nm.

2.3.2 Extraction des pigments

Les cultures obtenues sont centrifugées à 5000rpm pendant 15 min, les surnageants récupérés sont conservés à 4°C et les culots présentant une pigmentation sont soumis à une extraction par solvants organiques (**Figure 4**)

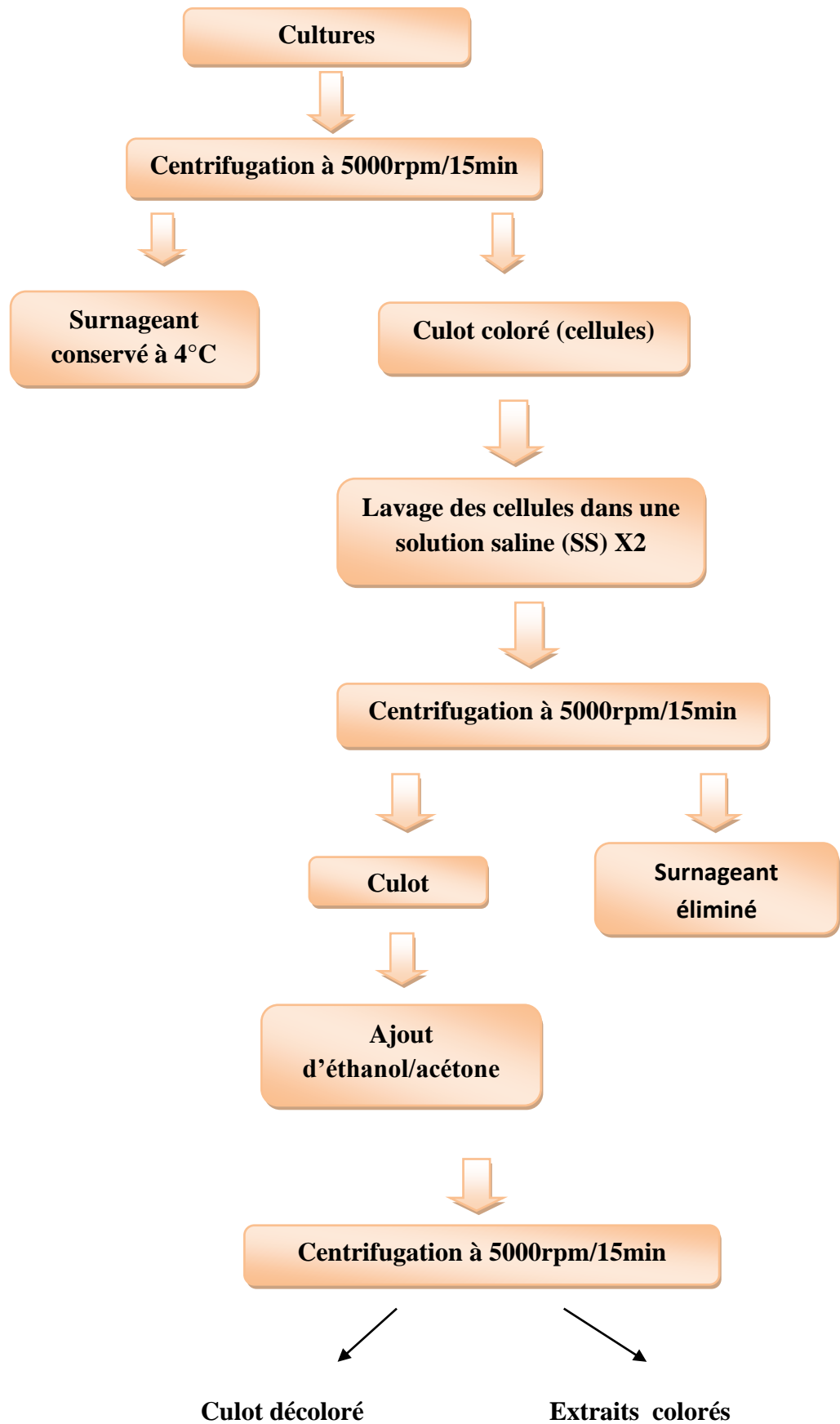


Figure 4: Extraction par solvants des pigments endocellulaires

2.3.3 Recherche de métabolites dans les surnageants de culture

2.3.3.1 Les enzymes hydrolytiques

Les activités amylolytiques, protéolytiques, gélatinasiqes, lipolytiques sont mises en évidence en utilisant respectivement les milieux gélosés additionnés, d'amidon, de lait écrémé, gélatine, de Tween 20 et de Tween 80. Pour cela, des spots de 5µl des surnageants de chaque souche y sont déposés à l'aide d'une micropipette de 10µL.

Pour éviter la dessiccation des milieux, les boites sont mises dans des sachets en plastique (**Rodriguez et al., 1980**), et sont incubées à 40°C jusqu'à l'apparition d'un résultat.

2.3.3.2 L'activité antibiotique

Il s'agit de mettre en évidence la capacité d'une souche à produire ou non des substances antimicrobiennes (halocines) vis-à-vis de la souche de référence *H. salinarum* DSMZ 3754.

Pour cela nous avons utilisé la méthode de diffusion en double couche d'agar. Une couche fine de milieu solide est coulée sur une boite de Petri. Après solidification, elle est additionnée d'une autre couche du même milieu semi-solide ensemencé par le germe cible à 1%. Après solidification, 5µl de surnageants sont déposés à la surface des boites, après séchage des spots, les boites sont incubées à 40°C jusqu'au développement du germe cible. Un résultat positif se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour du spot (**Shand, 2006**).

2.4 Séparation des composants du pigment par chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une technique analytique de choix et bien indiquée pour la séparation et l'identification des pigments. La séparation s'effectue par migration des molécules à travers la phase stationnaire dans un solvant ou un mélange de solvants appelé solvant de développement.

2.4.1 Choix du solvant de développement

Les caroténoïdes extraits sont soumis à une CCM sur gel de silice et sur papier, en utilisant les systèmes de solvant suivants :

- Heptane / acétone (40 : 40) (**Kumar et al., 2012**)
- Hexane / acétone (40 : 40) (**Asker et al., 2002**)
- Méthanol / acétone (40 : 40) (**Rodic et al., 2012**)
- Méthanol / chloroforme (40 : 40) (**Jordi et Andreu, 2000**)

2.4.1.1 Chromatographie sur gel de silice

20 à 50 µl des extraits sont déposés à l'aide de capillaires sur la plaque de silice à 1,5 cm des bords, en veillant à sécher les tâches après chaque dépôt. La plaque est mise dans un bécher contenant un système de solvant que l'on recouvre. Lorsque la position du front du solvant arrive à 1 cm du bord extérieur, on retire la plaque et on trace le front de l'éluant. (**Lecomte,2009**). Le rapport frontal Rf est calculé selon la formule suivante :

$$Rf = \frac{d}{D}$$

d : la distance parcourue par la tâche

D : la distance parcourue le par front du solvant.

2.4.1.2 Chromatographie sur papier

20µl d'extrait sont déposés au milieu du papier à 1,5cm de chacun des bords. On sèche entre chaque dépôt pour éviter d'avoir de larges tâches moins intenses. 80ml du système de solvant sont introduits à l'intérieure de la cuve de chromatographie. Deux feuilles imprégnées du système de solvant, sont d'abord placées sur chaque extrémité de la cuve, avant d'introduire les dépôts (**Lecomte,2009**).

Lorsque la position du front du solvant arrive à 1cm du bord extérieur, on retire la plaque, on trace le front de l'éluant et pour terminer, on calcule le rapport frontal de chaque échantillon (**Lecomte,2009**).

2.5 Utilisation du pigment comme additif alimentaire

Les pigments produits par les souches D1 et F15 sont utilisés comme additifs alimentaires afin de colorer une boisson à base de jus d'orange.

2.5.1 Composition de la boisson

La boisson au jus d'orange est composée de :

- Eau,
- Sucre (10%)
- Concentré de jus d'orange (10% de jus dans la boisson finie)
- Acide citrique (régulateur d'acidité)
- Acide ascorbique (antioxydant)

2.5.2 Caractéristiques physico-chimiques de la boisson

- Brix: 11.2%
- Acidité: 3.8 g/l
- Densité : 1.043

2.5.3 Procédé de fabrication de la boisson

- Reconstitution à froid,
- Pasteurisation à 90°C pendant 30 secondes,
- Refroidissement à température ambiante,

Avant de procéder à la coloration du jus, 500uL des extraits acétone/éthanol colorés des souches D1 et F15 sont séchés au four pasteur à 40°C pendant 6h dans le but d'effectuer les tests de solubilité et de stabilité des pigments.

1) Test de solubilité :

Afin de déterminer la solubilité des pigments dans l'eau, les extraits secs sont mélangés à 3mL d'une solution de vitamine E à 10%.(Touati-ferhat, 2022)

2) Test de stabilité :

Les extraits secs mélangés à la solution de vitamine E à 10% sont soumis à des tests de stabilité. L'évolution des absorbances des solutions mères et des solutions à la vitamine E est suivie durant 5 jours. (Touati-ferhat, 2022)

2.6 Activité antioxydante de l'extrait brut : test DPPH

2.6.1 Principe du test DPPH :

Le test DPPH mesure l'activité antioxydante des composés capables de transférer des atomes d'hydrogène. Le composé (DPPH•+) est un cation radical coloré et stable de couleur pourpre qui montre un maximum d'absorbance à 517 nm. Les composés antioxydants provoquent une décoloration de la solution, du violet vers le jaune. Cette réaction est rapide et proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon.

2.6.2 Protocole du test DPPH :

Un volume de 2ml de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1ml de solution méthanolique de DPPH.

Le mélange est laissé pour une durée de 30min à l'obscurité et à température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à par spectrophotomètre. Les absorbances obtenues pour chaque souche testée sont comparées à celle de l'acide ascorbique, utilisé comme contrôle positif.

L'évaluation de l'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la relation suivante :

$$\% = [(A0 - A1)/A0] \times 100$$

A0 : absorbance du contrôle (solution de DPPH sans extrait).

A1 : absorbance en présence de l'extrait.

Résultats et discussion

1 Caractérisation morphologique des souches utilisées

Afin de déterminer l'aspect des souches étudiées, nous avons procédé à une observation macroscopique et microscopique de ces dernières.

Aspect macroscopique

Les souches utilisées sont repiquées sur MS à base de glucose. Sur milieux solides, on obtient des colonies plates, circulaires, à bords réguliers et dont le diamètre varie de 1 à 2 mm. Cet aspect est apparu après plus d'une semaine d'incubation à 40°C. Toutes les souches ont présenté une coloration allant du rouge à l'orangée (**figure a**).

Aspect microscopique

Nous avons observé quelques cellules au microscope optique (1.25 x100) après une coloration simple à la fuschine. Deux frottis sont employés, l'un préparé avec une SS et l'autre avec de l'acide acétique.

➤ Frottis SS

Nous avons remarqué que les cellules n'ont pas de forme précise, ce qui est dû à la présence de cristaux de sel qui modifient leur vraie forme.

➤ Frottis acide acétique

Le rôle de l'AA étant de dissoudre le sel présent à l'intérieur des cellules, nous avons pu observer leur apparence réelle. Nous avons remarqué que la plupart des souches se présentent sous un aspect pléomorphe.

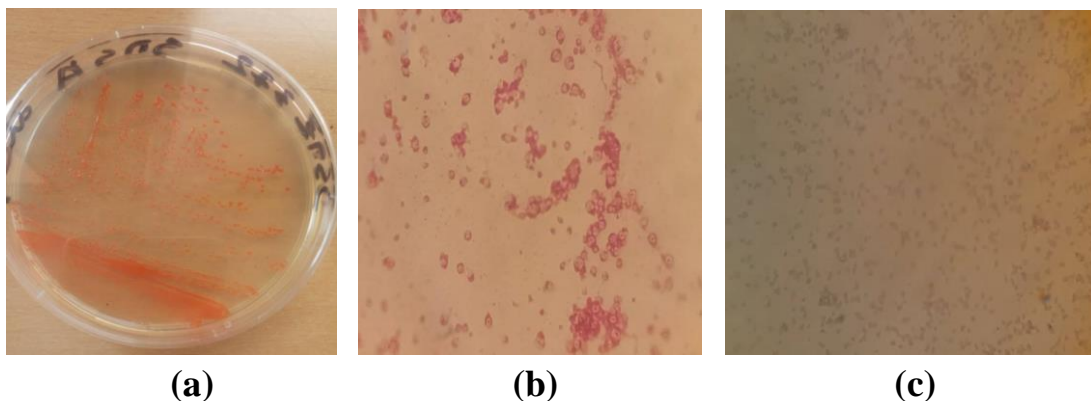


Figure 5 : Aspects des colonies sur milieu solide à base de glucose (a), coloration simple des cellules avec frottis dans SS (b) et frottis dans acide acétique (c)

2 Choix de la longueur d'onde pour l'estimation de la croissance

Nous avons estimé la croissance de 7 cultures halophiles à différentes longueurs d'ondes afin de déterminer celle qui donne le maximum d'absorbance (**Figure 6**)

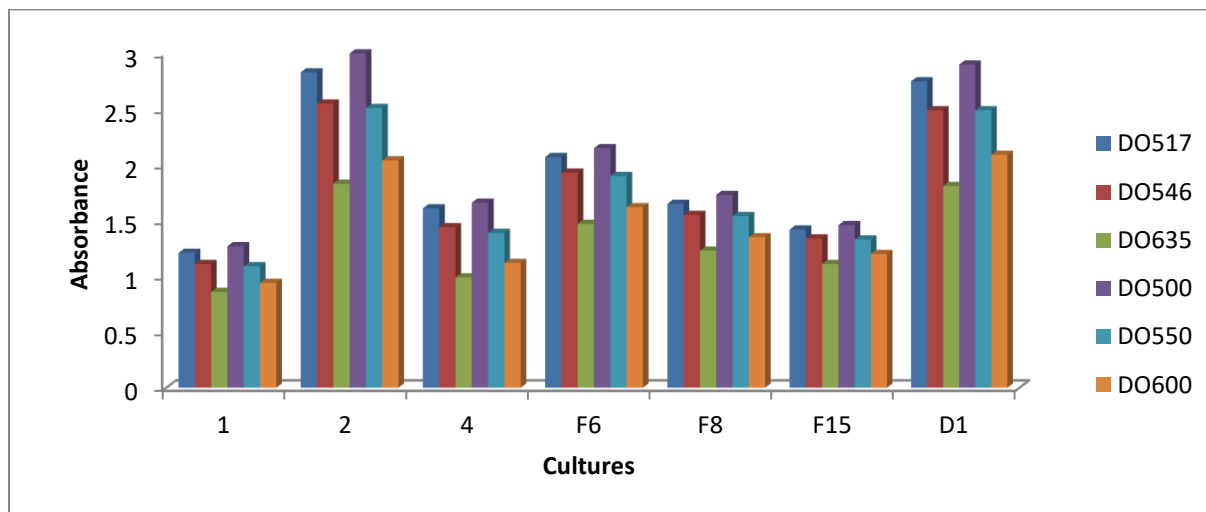


Figure 6: Absorbance des cultures halophiles à différentes longueur d'ondes

Nous avons remarqué que toutes les souches présentent une DO plus élevée à 500nm, ce qui signifie qu'elles absorbent le plus à cette longueur d'ondes. C'est pourquoi nous avons sélectionné cette valeur pour l'estimation de la biomasse.

3 Caractérisation des Cultures en milieu liquide

La majorité des souches présentent une bonne croissance sur le MS à base de glucose. Le développement le plus important est obtenu avec les souches 2 et 5 avec respectivement 2.83 et 2.26 de DO.

Nous avons pu observer que toutes les souches produisent un pigment intracellulaire.

Tableau VII: Caractéristiques des cultures en milieu liquide

Cultures	DO ₅₀₀	pH	PS Du culot	Pics des pigments membranaires		Degré de pigmentation DO ₄₉₀ /DO ₅₀₀
S ₁₀	1,83	6,43	0,31	485 374 318	0,668 0,443 4	0,36
2	2,83	5,41	0,80	526 388 372 321	2,449 1,260 1,052 4	0,86
③	1,50	5,85	0,24	523,5 492,5 387,5 317	0,254 0,331 0,117 4	0,22
④	1,43	6,01	0,20	523,5 491,5 387,5 317,5	0,236 0,313 0,128 4	0,21
⑤	2,26	5,36	0,74	491,5 387,5 370,5 318	1,133 0,413 0,370 4	0,50
1E ₅₀₀	1,6	2,88	0,29	471 365 338	0,226 0,132 0,134	0,13
V ₅ M ₂	1,6	4,60	0,13	524 492 386 316	0,206 0,257 0,144 1,301	0,15
D1	0,82	5,28	0,23	491 523	0,633 0,448	0,77
F8	1,73	5,62	0,13	490	0,421	0,24
F15	1,46	5,55	0,28	446	0,464	0,31

D'après les spectres obtenus dans le visible, les longueurs d'ondes maximales (523, 491, 446 nm) sont retrouvées dans presque tous les extraits testés. Ces pics correspondent aux caroténoïdes C₅₀ : les bactériorubérines ; synthétisées chez la plupart des haloarchées (**Biswas et al., 2016**)

4 Cinétique de croissance en système batch

La figure ci-dessous représente la croissance et la production de la F8 en fonction du temps.

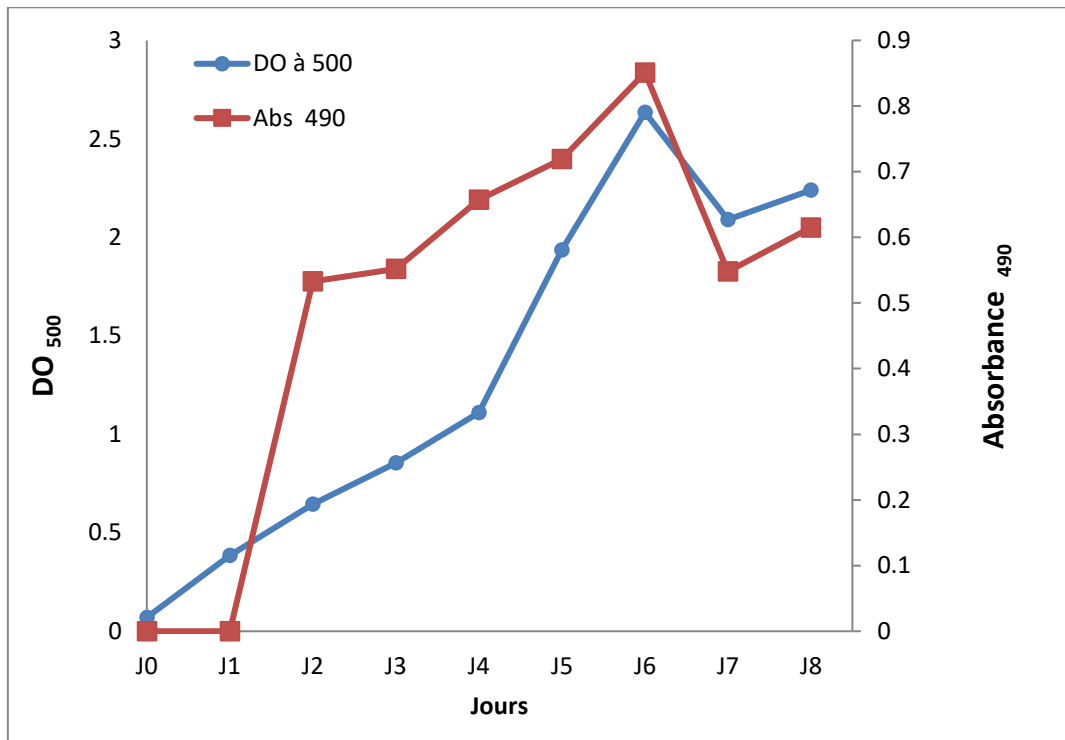


Figure7 : Croissance et production des pigments en fonction du temps

La croissance de la souche F8 est suivie quotidiennement en milieu liquide à base de glucose.

Les résultats montrent que la DO augmente en fonction du temps pour atteindre une valeur maximale avoisinant 3 au bout du 6^{ème} jour.

Concernant la pigmentation, on constate qu'elle augmente progressivement (**Figure 8**) pour atteindre une absorbance maximale de 0,85 au 6^{ème} jour également.

La pigmentation et la croissance évoluent simultanément, leur évolution est proportionnelle.



Figure 8: Différents stade de croissance de la F8

5 Recherche de substances extracellulaires produites

Des substances d'intérêt industriel sont recherchées dans les surnageants des cultures, notamment les substances antibiotiques et les enzymes.

5.1 Production de substances antibiotiques

Différents surnageants ; issus de cultures à différents stades de croissance sont testés pour la présence de substances antibiotiques.

Les résultats montrent que l'activité antibiotique est retrouvée dans tous les surnageants, elle se manifeste précocement comme pour les pré-cultures 1 et 4 (**Figure 9**)

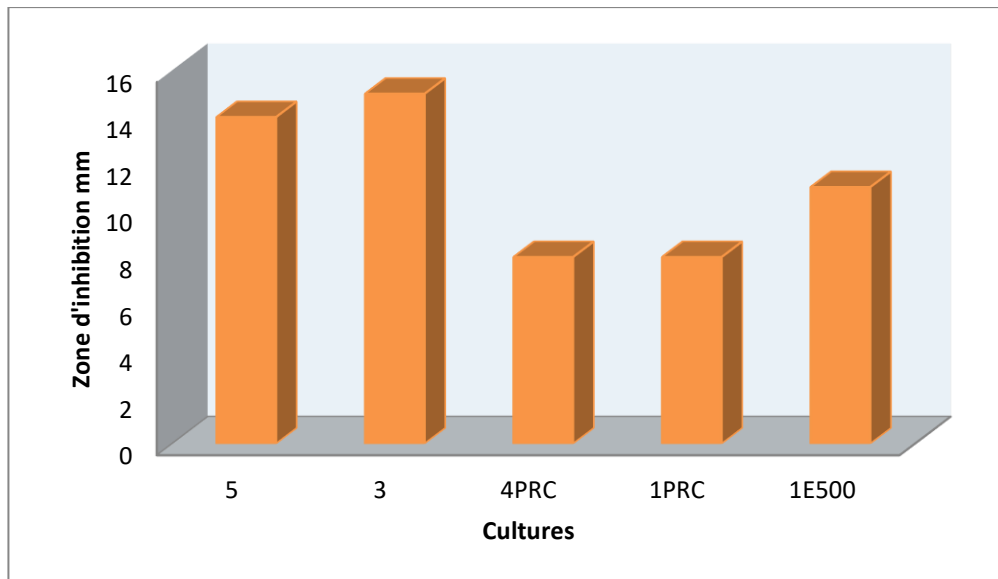


Figure 9: Activités antibiotiques des souches

Nous remarquons que toutes les souches utilisées inhibent la croissance de la souche de référence *Halobacterium salinarum* (DSMZ3754) et que cette substance est libérée dans le milieu, il s'agit probablement d'halocine.

5.2 Recherche de l'activité enzymatique

Différents surnageants ; issus de cultures à différents stades de croissance sont testés pour la détermination des activités amylolytiques, protéolytiques, gélatinasiques et lipolytiques.

Dans le cas des pré-cultures, aucune activité enzymatique n'a été détectée, contrairement aux cultures matures, ce qui veut dire que la production d'enzymes ne démarre qu'aux stades de croissance avancée.

On a remarqué une dominance de l'activité amylolytique chez toutes les souches matures, excepté pour la culture 1E₅₀₀ qui n'a synthétisé que des lipases. Les souches 3A et 3B n'ont produit que des enzymes amylolytiques.

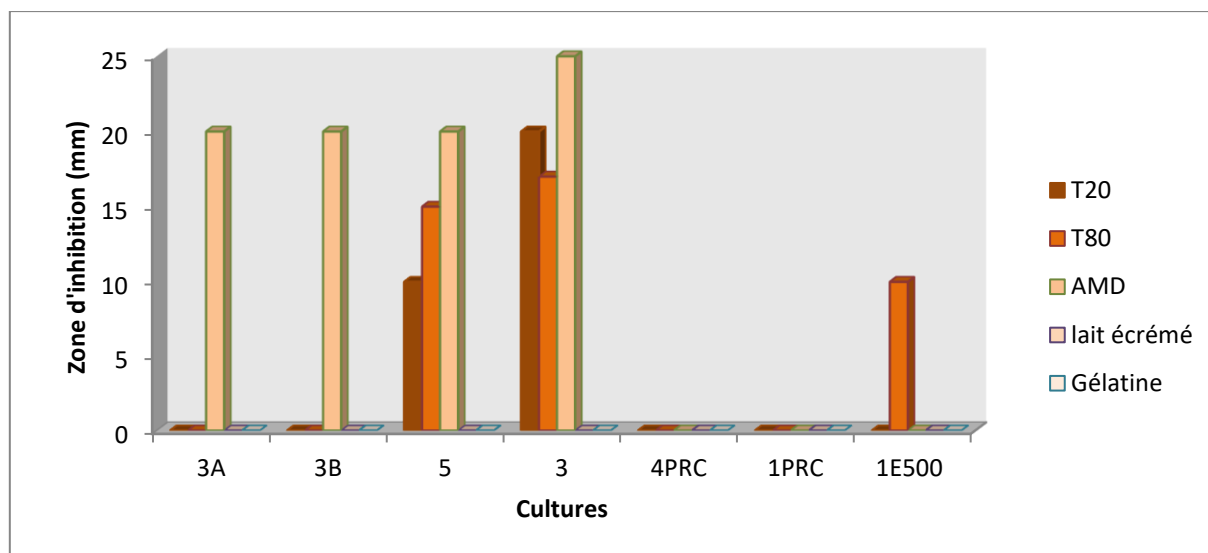


Figure 10: Activités enzymatiques des souches

6 Etude du pigment membranaire

6.1 Choix du solvant d'extraction

Pour le choix du solvant d'extraction des culots pigmentés, nous avons utilisés différents solvants :

- De l'acétone à 96%
- De l'éthanol à 90%
- Un mélange v/v d'acétone et éthanol.

Comme témoin, nous avons extraits les caroténoïdes de la tomate.

6.1.1 Cas du témoin (tomate)

Nous avons remarqué une décoloration immédiate de la pulpe de tomate ; le pigment a été directement extrait par le système de solvant (acétone/éthanol) (v/v). Nous avons observé le changement de couleur du système de solvant qui a viré immédiatement vers l'orangé.

Les spectres dans le visible pour de différents extraits sont déterminés, on obtient des pics au λ_{\max} suivants : 471 et 500nm. Nous avons observé que la meilleur absorbance est obtenue dans le mélange v/v d'acétone et éthanol (**Figure 11**)

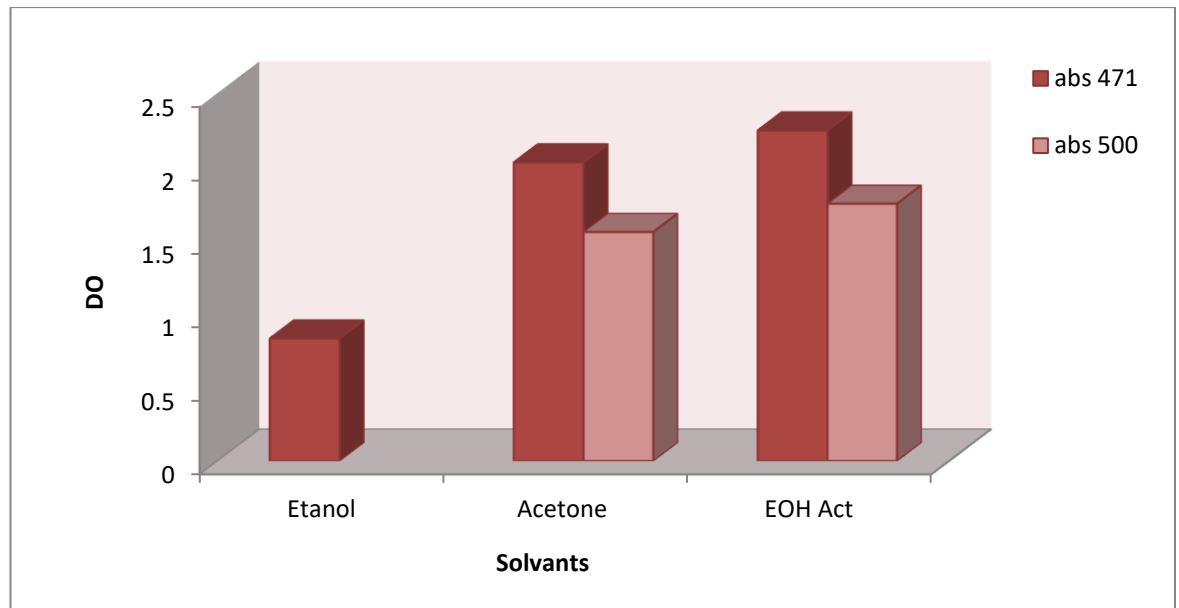


Figure 11: Absorbance des caroténoïdes extraits de la tomate avec différents solvants

6.1.2 Cas du culot bactérien

En ce qui concerne le culot bactérien, nous avons observé le changement immédiat de la couleur du mélange de solvant acétone/ éthanol, qui a viré vers l'orangé.

Le spectre est déterminé pour les extraits, les pics d'absorptions maximales sont obtenus aux longueurs d'ondes suivantes : 491 et 524nm. Nous constatons que l'absorbance la plus élevée est obtenue dans mélange d'acétone/ éthanol (**Figure 12**).

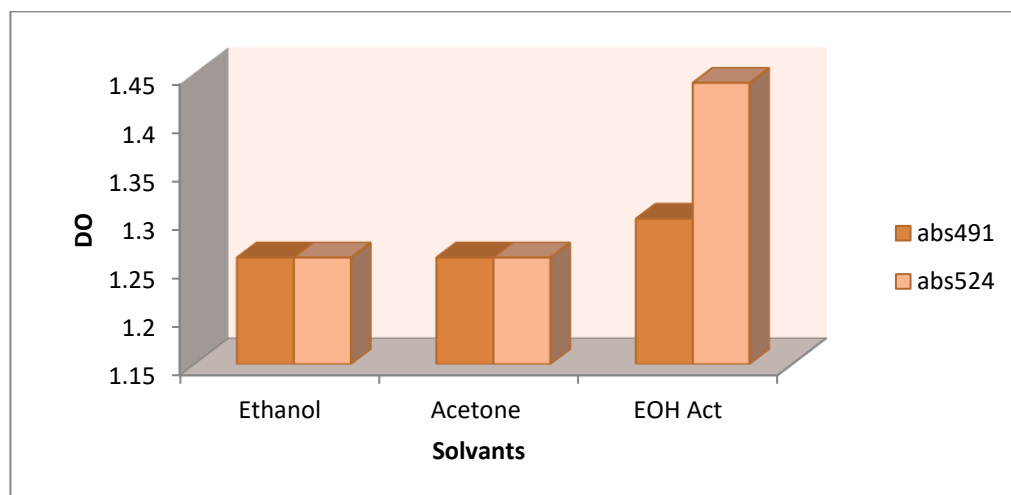


Figure 12: Absorbance des caroténoïdes extraits des culots bactériens avec différents solvants

D'après les résultats obtenus, nous avons choisi le mélange acétone/éthanol comme solvant d'extraction.

D'après **Chen *et al.*, (2015)**, les solvants donnant de meilleurs résultats pour l'extraction des pigments dans le cas de *Hfx mediterranei* sont l'acétone, l'éthanol et le méthanol.

6.2 Choix du solvant de développement

Afin de séparer et de purifier les pigments, nous avons testé 4 systèmes de solvants (①,②,③,④) et nous avons observé les résultats de la CCM (**Tableau VIII et Figure 13 et 14**).

Tableau VIII: Résultats obtenus de la CCM avec différents systèmes de solvant

Système de solvant	Observation
① Hexane/acétone (v/v)	Une seule tâche droite, pas de séparation.
② Méthanol/acétone (v/v)	Une large tâche, pas de séparation.
③ Méthanol/chloroforme (v/v)	Aucune tâche visible.
④ Heptane/acétone (v/v)	Bonne séparation, tâches distinctes.

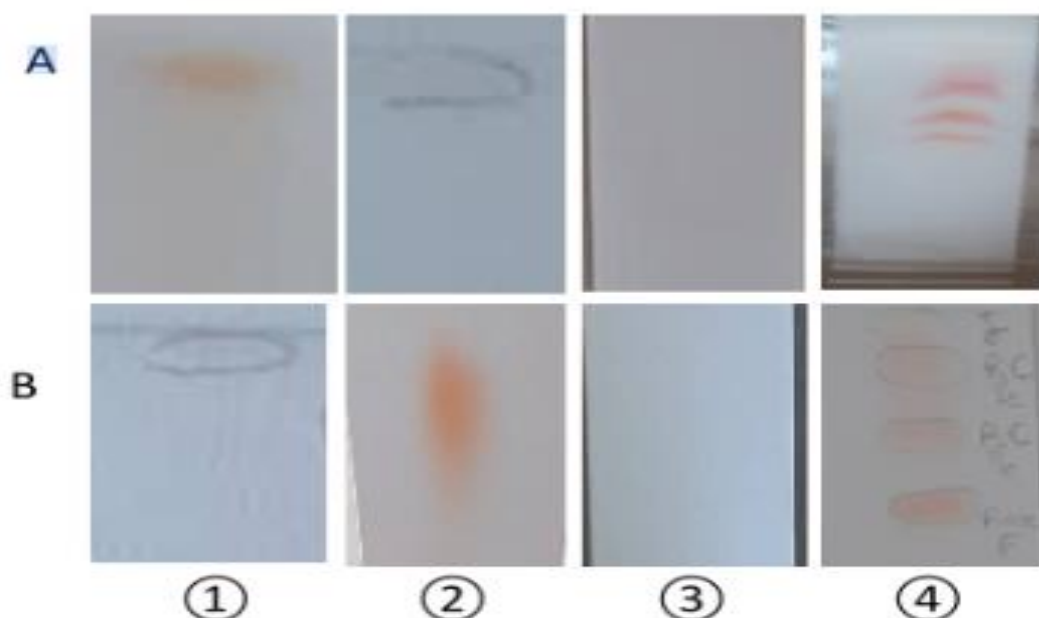


Figure13: Chromatographie sur couche mince des extraits de la souche 1 (A) et de la souche F8 (B) sur les systèmes de solvants suivants (V/V): Hexane/Acétone① ; Méthanol/Acétone② ; Méthanol/Chloroforme③ et Heptane/Acétone④.

D'après les résultats obtenus, nous avons opté pour le mélange heptane/acétone (v/v) pour la suite de l'expérimentation, en tant que système de solvant pour le développement de la CCM car la séparation dans ce système nous a permis d'isoler et de distinguer les différentes tâches.

7 Séparation de l'extrait pigmentaire

7.1 CCM sur papier

Souche ① :

Tâche	Couleur	Rf	λ_{\max} (nm)	Abs	Identification des pics
Tâche 1	Orange foncée	0,56	407 698	0,049 0,020	Précurseur β -carotène
Tâche 2	Orange foncée	0,69	404 698	0,044 0,017	Précurseur β -carotène
Tâche 3	Orange claire	0,75	484 698	0,070 0,042	β -carotène
Tâche 4	Rose claire	0,81	411 698	0,059 0,026	Néoxanthine
Tâche 5	Jaune	0,97	437 698	0,053 0,023	β -carotène



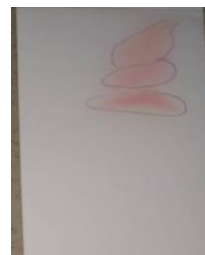
Souche S₄A :

Tâche	Couleur	Rf	λ_{\max} (nm)	Abs	Identification des pics
Tâche 1	Orange foncée	0,56	505 698	0,030 0,013	Lycopène
Tâche 2	Rouge claire	0,12	412 698	0,022 0,005	Néoxanthine
Tâche 3	Rouge	0,79	401 698	0,022 0,005	Précurseur β -carotène
Tâche 4	Orange claire	0,85	412 698	0,048 0,021	Néoxanthine
Tâche 5	Jaune foncée	0,97	412 698	0,101 0,055	Néoxanthine

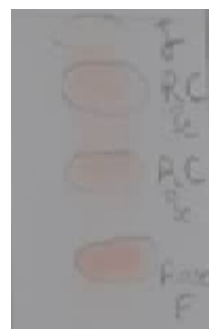


Souche F₆:

Tâche	Couleur	Rf	λ_{\max} (nm)	Abs	Identification des pics
Tâche 1	Rouge	0,74	593 698	0,142 0,115	Bactériorhodopsine
Tâche 2	Rose	0,81	403 698	0,091 0,047	Précurseur β -carotène
Tâche 3	Rose claire	0,88	593 698	0,125 0,098	Bactériorhodopsine

Souche F₈B :

Tâche	Couleur	Rf	λ_{\max} (nm)	Abs	Identification des pics
Tâche 1	Rose foncée	0,74	490 524	0,017 0,017	Bactériorubérine
Tâche 2	Rose claire	0,85	490 524	0,021 0,021	Bactériorubérine
Tâche 3	Rose claire	0,93	490 524	0,024 0,023	Bactériorubérine
Tâche 4	Jaune	0,98	490 524	0,015 0,017	Bactériorubérine



7.2 CCM sur gel de silice

Souche 2 :

Tâche	Couleur	Rf	λ_{\max} (nm)	Abs	Identification des pics
Tâche 1	Orange claire	0,42	415 698	0,320 0,272	Néoxanthine
Tâche 2	Orange foncée	0,50	414 698	0,243 0,140	Néoxanthine
Tâche 3	Rose	0,61	404 698	0,294 0,154	Précurseur β -carotène
Tâche 4	Orange claire	0,65	426 698	0,104 0,072	β -carotène



D'après les spectres d'absorbance des tâches obtenues par CCM, les souches étudiées produisent principalement les caroténoïdes suivants :

- β -carotène et précurseurs de la β -carotène
- Lycopène
- Néoxanthine
- Bactériorubérine
- Bactériorhodopsine

8 Utilisation du pigment comme additif alimentaire

8.1 Solubilité de l'extrait brut

Nous avons mélangé chaque extrait brut séché à 3,5 mL une solution de vitamine E à 10% dans l'optique de déterminer sa solubilité.

Nous avons observé que les extraits n'ont eu aucun mal à se mélanger à la solution, donnant ainsi une coloration homogène, sans dépôt et ce, même au fil du temps.

La figure ci-dessous illustre la solubilité des pigments dans la solution de vitamine E à 10%.



Figure 14: Extrait sec solubilisé dans la solution à 10% de vitamine E

8.2 Stabilité

Pour le test de stabilité, nous avons également utilisé des extraits bruts séchés des souches D1 et F15 mélangés à 3,5 mL de solution à la vitamine E.

On a mesuré les absorbances en utilisant les solutions mères comme témoin afin d'observer l'évolution de la stabilité des extraits sur une durée de 5 jours et de la comparer à celle des pigments sans stabilisateur.

La **figure 15**, représente l'étude de la stabilité pour la souche D1.

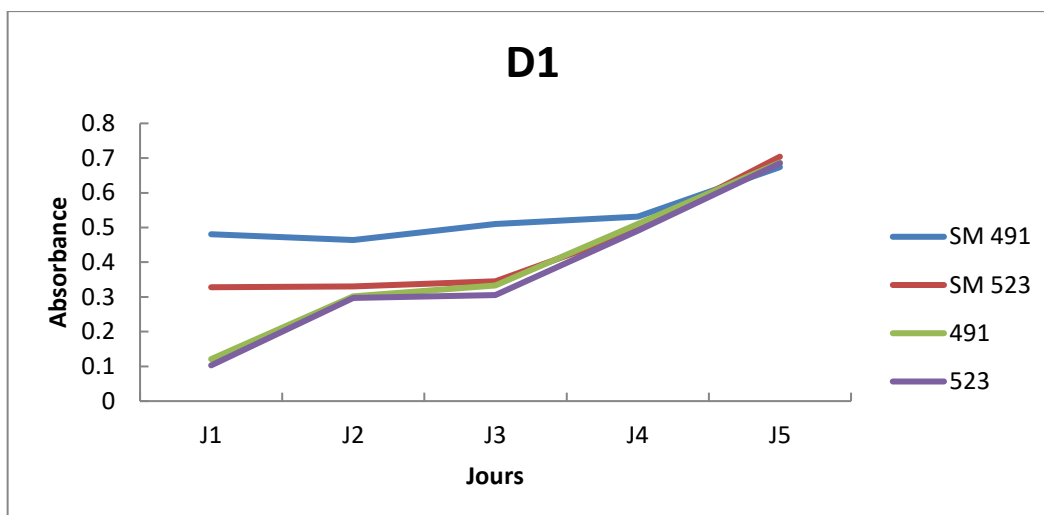


Figure 15: Evolution de l'absorbance de la D1 et la SM

On a remarqué que l'absorbance des pigments augmente du 1er au 2ème jour, puis se stabilise au bout du 3ème jour, ensuite elle augmente encore de 0,3 à 0,7 pour les deux longueurs d'ondes.

Concernant l'absorbance de la solution mère à 523 et 491 nm, elle est stable du 1er au 3ème jour puis augmente jusqu'à atteindre une valeur de 0,6.

On peut conclure que l'ajout de la vitamine E en tant que stabilisant a eu un léger effet sur les pigments des souches D1, car d'après les résultats, on constate que les solutions mères sont stables d'elles-mêmes et que leurs absorbances augmentent même.

Les résultats obtenus sont montrés dans la figure suivante pour le cas de la F15

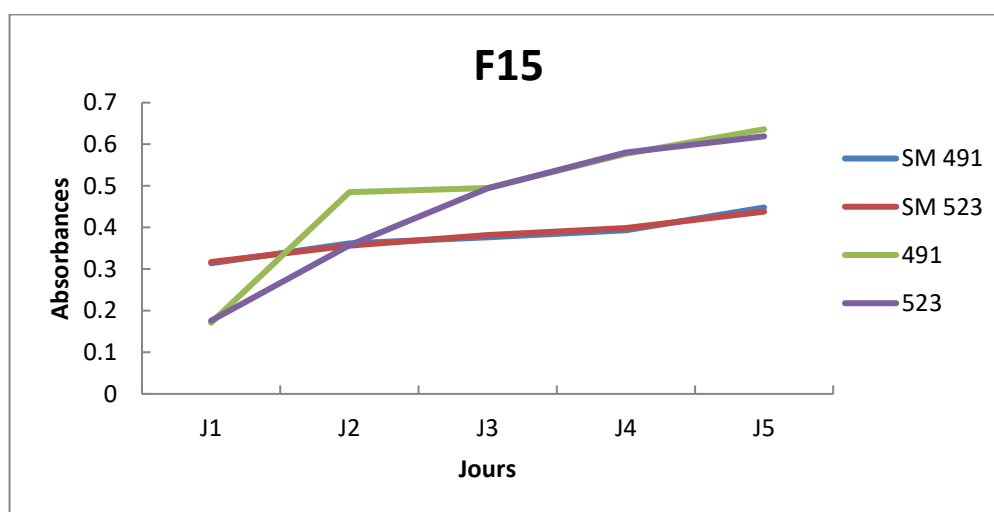


Figure 16: Evolution de l'absorbance F15 et la SM

Par contre, pour le cas de la F15, nous avons remarqué que la vitamine E a eu un effet beaucoup plus important. On voit une augmentation conséquente des absorbances des solutions à la vitamine E (de 0,1 à 0,6), contrairement aux solutions mères qui augmentent très légèrement, de 0,35 à 0,40 environ. Ce qui prouve que chaque souche est différente.

8.3 Activité antioxydante de l'extrait brut : DPPH

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation.

D'après la figure ci-dessous, les résultats montrent que l'activité anti-radicalaire dépasse les 50% dans la plupart des cas. Elle est presque similaire à celle de l'acide ascorbique (78%) et la dépasse même dans certains cas (souche 3) (**Figure 17**)

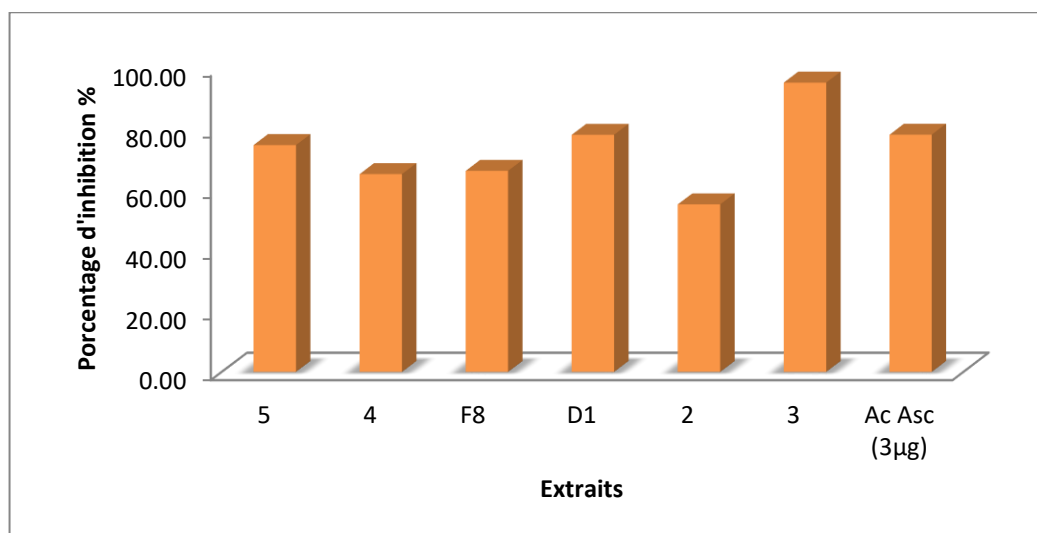


Figure 17: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des Extraits

8.4 Ajout du colorant à la boisson

Après avoir effectué les différents tests, nous avons jugé les colorants obtenus à partir des souches D1 et F15 aptes à être utilisés en tant qu'additifs pour colorer la boisson à base de jus d'orange.

Les extraits sur lesquels les tests ont été effectués étant épuisés, nous avons relancé les mêmes cultures (D1 et F15), dans les mêmes conditions et nous avons par la suite procédé à l'extraction et au séchage des pigments comme cité précédemment.

12 ml de pigments dans le mélange acétone/éthanol ont été séchés à 40°C pendant 6h. Après séchage, ils ont été diffusés dans 3ml de solution à 10% de vitamine E et ensuite ajoutés à 20mL de la boisson.

On ne remarque aucune coloration après ajout des pigments. Ces derniers ne se sont pas dissous dans le jus et ont formé une mousse colorée en orangé à la surface de la boisson, comme on peut le constater sur les figures ci-dessous :

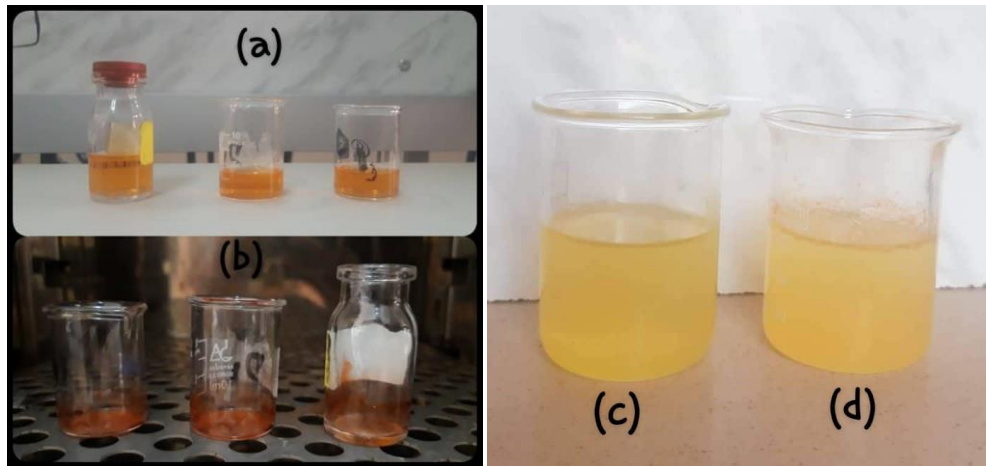


Figure 18: Extraits acétone/éthanol de bactériorubérine (a) avant séchage, (b) après séchage

(c) : boisson avant ajout du colorant, (d) : boisson après ajout du colorant

Conclusion

Conclusion

L'étude réalisée a eu pour objectif de produire des pigments à visée alimentaire, à partir de souches halophiles extrêmes, de les caractériser et de les utiliser afin de colorer une boisson à base de jus d'orange.

À l'issu des résultats obtenus, pour les différents paramètres étudiés sur les différentes souches exploitées et leurs pigments, nous avons pu tirer les conclusions suivantes :

- Les souches employées sont positives pour la production de pigments caroténoïdes orangés, possédant un pouvoir antioxydant. Par ailleurs ces souches halophiles extrêmes libèrent des substances à activité antimicrobienne et/ou des activités enzymatiques.

- Les systèmes de solvants ayant donné les meilleurs résultats sont : le mélange acétone/éthanol (v/v) pour l'extraction des pigments et le mélange heptane/acétone (v/v) pour le développement des CCM.

- Les pigments synthétisés par les souches halophiles extrêmes étudiées sont principalement des bactériorubérines C50, semblables aux bactériorubérines des Haloarchaea.

Malgré les résultats très satisfaisant obtenus après les tests de solubilité et de stabilité effectués sur les pigments sélectionnés, la coloration de la boisson n'a pas abouti à un résultat recevable.

Ces tests et résultats restent partiels, d'autres travaux s'imposent afin d'améliorer et d'optimiser le rendu de production de pigments alimentaires issus des souches halophiles extrêmes, il serait donc intéressant

- D'augmenter le nombre d'essais en jouant sur la composition du milieu et les concentrations dans le but d'améliorer les conditions de production.

- De pousser plus loin les études ciblant la purification des extraits caroténoïdes des ces souches pour avoir le meilleur résultat possible.

- D'approfondir l'analyse des colorants qui ont servi pour notre étude afin de déterminer les erreurs.

- Dans le cas d'un essai en industrie agroalimentaire, produire en grande quantité afin d'avoir un résultat apparent.

A

- **Akilandeswari P., Pradeep B.V. (2017).** Microbial Pigments: Potential Functions and Prospects.
- **Asker D., Awad T., and Ohta Y.(2001).** Lipids of *Haloferax alexandrinus* Strain TM^T: an Extremely Halophilic Canthaxanthin-Producing Archaeon. *Jornal of bioscience and bioengineering* ; Vol. 93, No 1, 37-43. 2002.

B

- **Belhadj F,(2015).** Caractérisation et l'étude des Colorants Alimentaires ; Diplôme de Master en Chimie ; Analyse Spectrale en Chimie ; Université Abd El-Hamide Ibn Badis Mostaganem ; p 6.
- **Biswas J., Haque F.B, and Paul A.K. (2016).** Carotenogenesis in *Haloferax* sp. Strain BKW301, a Halophilic Archaeon from Indian Solar Saltarns.

C

- **Cardoso L.A.C., Karen Y.F.K., and Karp S.G. (2017).** Microbial production of carotenoids.
- **Chen W.C., Hsu S., Lin M., Hsu Y. (2015).** Mass production of C₅₀ carotenoids by *Haloferax mediterranei* in using extruded rice bran and starch under optimal conductivity of brined medium.
- **Corral P., Amoozegar M.A., and Ventosa A. (2020).** Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. 18(1): 33.

D

- **Delgado-Vargas F. (2002).** Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. Ed:1.p: 344.
- **Delia B., Rodriguez-Amaya (2001).** A GUIDE TO CAROTENOID ANALYSIS IN FOODS, ISBN 1-57881-072-8.(pHd) Universidade Estadual de campinas.

Références Bibliographique

- **Downham A., Collins P. (2001).** Colouring our foods in the last and next millennium. 35(1): 5-22.
- **Dufossé L.(2006).** Microbial Production of Food Grade Pigments, Food Technology and Biotechnology, ISSN 1330-9862, 44 (3), 313–321.

G

- **Giani M., Garbayo I., Vílchez C., Martínez-Espinosa R.M. (2019)** Haloarchaeal Carotenoids: Healthy Novel Compounds from Extreme Environments.
- **Guedes A.C., Amaro H.M., and Malcata F.X. (2011).** Microalgae as Sources of Carotenoids. 9(4): 625–644.

I

- **Idres-imadalou N.(2019) Isolement et criblage de procaryotes halophiles producteurs de bactériocines à partir de sites salins d'Algérie.** Thèse de doctorat, Université de Bejaia, Algérie.

J

- **Jordi O., and Andreu P.(2000)** Chromatographic determination of carotenoids in foods . Journal of chromatography A. pp 543-555.

K

- **Kirti K., Amita S., Priti S., Kumar A.M., and Jyoti S.(2014).** Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications.
- **Kumar M., Utkarsh R.M., and Mitra A.,(2012).** Rapid separation of carotenes and evaluation of their in vitro antioxidant properties from ripened fruit waste of Areca catechu – A plantation crop of agro-industrial importance. Industrial Crops and Products.

L

- **Lecomte M (2009).** CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIEROU EN COUCHE MINCE (CCM).Application à la mycologie, p 24-35.

M

- **Maoka T (2019).** Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*. Vol 74, p 1-16.

N

- **Naziri D., Hamidi M., Hassanzadeh S., Tarhriz V., Zanjani B.M., Nazemyieh H., Hejazi M.A., and Hejazi M.S. (2014).** Analysis of Carotenoid Production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an Extremely Halophilic Archeon from Urmia Lake, 4(1): 61-67.

R

- **Renoult J.P., Valeur B. (2015).** Les couleurs de la vie, Mécanismes de production, fonctions et diversité , l'actualité chimique 13: 397-398
- **Rodic Z., Simonovska B., Albreht.A., Vovk.I. (2012).** Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. *Journal of chromatography A*. pp 59-65.
- **Rodrigo-Baños M., Garbayo I., Vílchez C., Bonete M.J., and Martínez-Espinosa R.M.(2015).** Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology.
- **Rodrigo-Baños M., Garbayo I., Vílchez C., Bonete M.J., and Martínez-Espinosa R.M., Jacobson P.B. (2015).** Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology, Academic Editor.
- **Rodriguez-valera F., Ruiz-Berraquero F., and cormenzana R.A. (1980).** isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganicwith carbon sources. *Journal of general Microbiology*.119:535-538.

S

- **Sen T., Barrow C.J., Deshmukh S.K. (2019).** Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward.

Références Bibliographique

- **Shand R.F. (2006).** Detection, quantification and purification of halocins : peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles. *Methods in Microbiology*. 35.

T

- **Takashi Maoka (2019)** Carotenoids as natural functional pigments.
- **Tan B.L., and Norhaizan M.E. (2019).** Carotenoids: How Effective Are They to Prevent Age-Related Diseases
- **Torregrosa-Crespo J., Montero Z., Fuentes J.L., García-Galbis M.R., Garbayo I. , Vílchez C., and Martínez-Espinosa R.M. (2018).** Exploring the Valuable Carotenoids for the Large-Scale Production by Marine Microorganisms.
- **Tuli H. S, Chaudhary P, Beniwal V, and Sharma A.K. (2015).** Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives, 52(8): 4669–4678

U

- **Ulrike Arlt. (2010).** Foods Colours Legislation. Natural Food Colours Association.

V

- **Venil C.K., Zakaria Z.A. et Ahmada W.A. (2013).** Bacterial pigments and their applications

Z

- **Zaghdoudi K. (2015).** Optimisation de l'extraction des caroténoïdes à partir du persimmon (*Diospyros kaki* L), de l'abricot (*prunus armeniaca* L) et de la pêche (*prunus persica* L) : étude photophysique en vue d'une application en thérapie photodynamique (PDT) [phD Thesis]. Université de lorraine.

Consultation personnelle

Références Bibliographique

Touati-Ferhat K, (2022). Consultation personnelle, Chargé de recherche et développement au niveau du groupe Tchén-Lait, Bejaia.

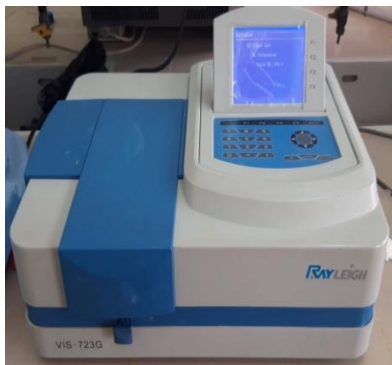
Tableau 1 : Appareillages utilisés dans la partie expérimentale



Centrifugeuse



Spectrophotomètre UV



Spectrophotomètre visible



PH mètre



Balance de précision



Vortex



Four paster



Etuve



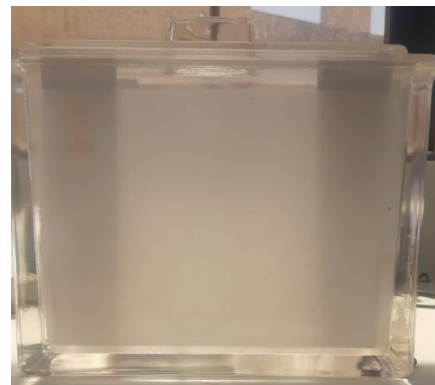
Autoclave



Bain marie



Plaque chauffante agitatrice



Cuve CCM

Tableau 2 : Matériel et produit chimique utilisés

Matériel	Produit chimique
<ul style="list-style-type: none">• Portoirs de tubes• Tubes à essai• Boîtes Pétri• Erlen mayer• Béchers• Pipette graduée• Eprouvette graduée• Flacons• Cuve de CCM• Seringues• Pipettes Pasteur• Micropipette• Embouts à micropipette• Spatule• Anse de platine	<ul style="list-style-type: none">• Lugol• Méthanol• Ethanol• Acétone• Chloroforme• heptane• DPPH

• La composition du milieu synthétique pour Halobactéries:

- Milieu de base 1L
- Solution de glucose 20 ml (25g dans 100 ml d'eau distillée)
- Solution NH₄Cl 5 ml (20 g dans 100 ml ED
- S. FeSO₄,6H₂O 2 ml (0,2 g dans 100 ml HCl à 1mM)
- S. K₂HPO₄ 2 ml (5 g dans 100 ml ED)

Toutes ces solutions sont stérilisées par filtration

- Milieu de base (g/l)

NaCl	200
MgSO ₄ ,7H ₂ O	36
Tris	6
KCl	4
CaCl ₂	1
- pH 7,5 avec HCl concentré, stérilisation à l'autoclave

Tableau 3: Identification des caroténoïdes selon leurs absorbances

	λ_{max} (nm)	Références
Bacterioruberine	387 466 488 525	Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon <i>Haloarculajaponica</i> (2014)
Monoanhydrobacterioruberin	369 385 465 492 524	
Bisanhydrobacterioruberin	370 386 460 492 524	
Isopentenyldehydrorhodopin	375 455 480 511	
Lycopene	296 363 445 472 501	
Phytoene	277 288 298	
β Carotène	426 452 481	
Canthaxantine	481	
Lycopene	447 470 505	
Bacterioruberine	469 493,5 526,5	
Bacterioruberine	469 492 524	Carotenogenesis in <i>Haloferax</i> sp. Strain BKW301, a Halophilic Archaeon from Indian Solar Saltarns (2016)
β Carotène	425 450 480	Extraction, dosage et stabilisation des caroténoïdes d'agrumes (1979)

Lycopene	445 472 502	
Bacterioruberine	467 493 527	Propriétés biologiques des caroténoïdes extraits de <i>Halobacterium halobium</i> isolé d'un salin solaire tunisien (2013)
Xanthorhodopsin	460 490 522 560	Isolation of a new <i>Pseudomonas halophila</i> strain possess bacteriorhodopsin-like protein by a novel method for screening of photoactive protein producing bacteria (2013)
Bacterioruberine	370 385 467 493 527	
Lycopène	448 474 505	Analysis of Carotenoid Production by <i>Halorubrum</i> sp. TBZ126; an Extremely Halophilic Archeon from Urmia Lake(2014)
Bacterioruberine	466 495 528	
β Carotène	425 455 482	
Tetrahydrobisanhydrobacterioruberin	441 466 498	Complete Biosynthetic Pathway of the C ₅₀ Carotenoid Bacterioruberin from Lycopene in the Extremely Halophilic Archaeon <i>Haloarcula japonica</i> (2015)



Figure1: Culture F8 en milieu liquide

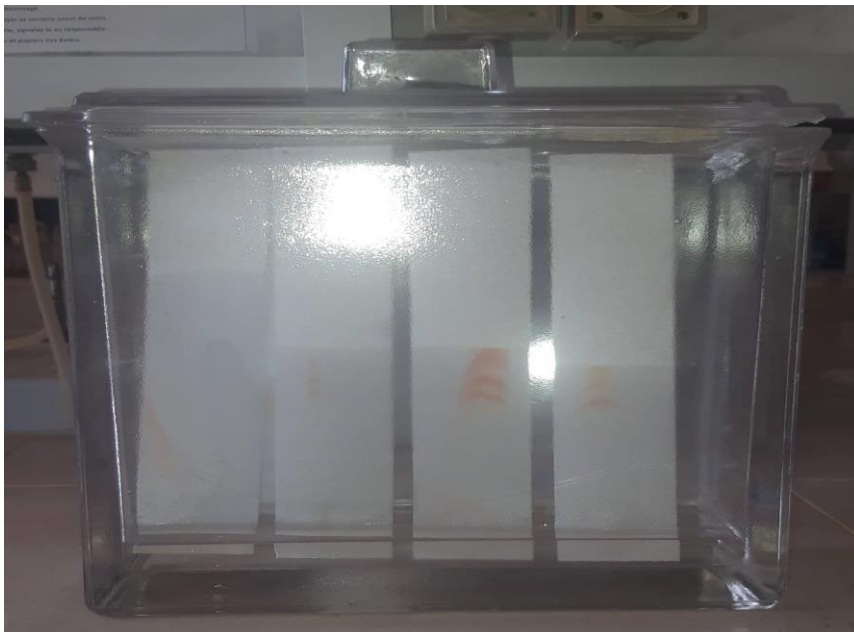


Figure2: Cuve de chromatographie



Figure3: Exemple d'activité enzymatique

Résumé :

Les colorants sont de plus en plus utilisés par l'industrie agro-alimentaire, car ils répondent à une demande des consommateurs, devenus très exigeants quant à l'aspect visuel des produits comestibles. Les colorants alimentaires d'origine synthétique ont été largement utilisés dans diverses industries, malheureusement beaucoup sont toxiques.

Comme alternative aux pigments synthétiques, les pigments bactériens sont prometteurs car la plupart sont des caroténoïdes, ils ont reçu une attention considérable, en raison de leurs nombreuses applications en tant que colorants, additifs alimentaires et antioxydants. Des souches halophiles extrêmes caractérisées par une coloration rouge orangée ont fait l'objet de cette étude. L'analyse des différentes cultures montre la présence du pigment dans le culot, le meilleur solvant d'extraction correspond au mélange Acétone/Ethanol. Le système de solvant idéal pour la séparation des composés sur CCM, est l'heptane/Acétone. L'identification par spectrophotométrie UV-visible révèle la présence de caroténoïdes C50 correspondant à la Bactériorubérine, du lycopène et le β carotène. L'activité antioxydante dépasse les 50% dans tous les extraits, elle est même plus élevée que celle de l'acide ascorbique (78%) dans le cas de la souche 3 (95%).

De plus, ces souches halophiles sont productrices d'antibiotiques et d'enzymes hydrolytiques.

En conclusion, les caroténoïdes identifiés dans ce travail à partir des bactéries halophiles extrêmes, ainsi que les métabolites produits, ouvrent des perspectives pour une application biotechnologique.

Mots clés : Colorant, Caroténoïde, bactéries halophiles, bactérioruberine, antioxydant, antibiotique, CCM, DPPH.

Abstract :

Dyes are increasingly used by the food industry, as they meet a demand from consumers, who have become very demanding in terms of the visual appearance of edible products. Food colorants of synthetic origin have been widely used in various industries, unfortunately many are toxic.

As an alternative to synthetic pigments, bacterial pigments are promising because most are carotenoids, they have received considerable attention, due to their many applications as dyes, food additives and antioxidants. Extreme halophilic strains characterized by orange-red coloration were the subject of this study. The analysis of the different cultures shows the presence of the pigment in the cells, the best extraction solvent corresponds to the Acetone/Ethanol mixture. The ideal solvent system for the separation of the compounds on TLC, is heptane/Acetone. Identification by UV-visible spectrophotometry reveals the presence of C50 carotenoids corresponding to Bacteriorubérine, lycopene and β carotene. The antioxidant activity exceeds 50% in all extracts, it is even higher than that of ascorbic acid

(78%) in the case of strain 3 (95%). In addition, these halophilic strains produce antibiotics and hydrolytic enzymes.

In conclusion, the carotenoids identified in this work from extreme halophilic bacteria, as well as the metabolites produced, open up prospects for biotechnological application.

Key words: Dye, carotenoid, halophilic bacteria, bacterioruberin, antioxidant, antibiotic, TLC, DPPH.