

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 57097 A1**
- (43) Date de publication : **29.12.2023**
- (51) Cl. internationale : **C07K 1/14; C07K 1/34; C12N 1/20; C12N 1/26; C07K 1/34; C12N 1/20; C12N 1/26**

-
- (21) N° Dépôt : **57097**
- (22) Date de Dépôt : **20.06.2022**
- (71) Demandeur(s) : **Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Route d'Immouzer BP2626, 30000 FES (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Ananou Samir ; Manni Laila ; Zoubir Oumaima**
- (74) Mandataire : **Ibnsouda Saad**

-
- (54) Titre : **Nouveau procédé de production des bactériocines en utilisant les margines d'olive**
- (57) Abrégé : L'invention présente un procédé de production économique des bactériocines utilisant les margines d'olive, et qui commence par la détermination de la dilution des margines d'olive permettant une meilleure production de la bactériocine, et par la suite, production de ladite bactériocine sur les margines d'olive diluées en incubant des bactéries bactériocinogénique sur les margine d'olive et en ajustant les facteurs physicochimiques pour l'optimisation de la production des bactériocines.

Titre : Nouveau procédé de production des bactériocines en utilisant les margines d'olive

Abrégé :

L'invention présente un procédé de production économique des bactériocines utilisant les margines d'olive, et qui commence par la détermination de la dilution des margines d'olive permettant une meilleure production de la bactériocine, et par la suite, production de ladite bactériocine sur les margines d'olive diluées en incubant des bactéries bactériocinogénique sur les margine d'olive et en ajustant les facteurs physicochimiques pour l'optimisation de la production des bactériocines.

Titre : Nouveau procédé de production des bactériocines en utilisant les margines d'olive

Description

▪ Domaine technique

La présente invention touche le domaine agroalimentaire et le domaine médical / pharmaceutique et plus particulièrement l'invention concerne un nouveau procédé de production des bactériocines en utilisant les margines d'olive.

▪ Description de l'état de la technique

Les documents (Juncioni de Arauz et al., 2009 ; Ananou et al., 2008, 2020 ; Arias et al., 2021) divulguent des procédures de production des bactériocines en utilisant le lactosérum comme substrat économique.

Le document (Juncioni de Arauz et al., 2009) divulgue une procédure de production sur le lait écrémé.

Le document (Arias et al., 2021) utilise la paille de maïs et les déchets de pulpe de betterave sucrière et le document (Senan et al., 2016) un concentré de protéines de lactosérum.

L'invention (WO2007074490 (A1), 2007) révèle un procédé de production de triactylhydroxytyrosol à partir des margines d'olive à utiliser comme antioxydant.

L'invention (KR20080028247 (A), 2008) révèle un procédé de production du méthane à partir des margines d'olive.

L'invention (GR20080100688 (A), 2010) révèle la production d'une poudre de polyphénol et un fertilisant à partir des margines d'olive.

L'invention (PL3494237 (T3), 2021) révèle l'utilisation des margines d'olive dans l'industrie du tannage du cuir.

L'invention (GR1010150 (B), 2022) révèle la fabrication d'un produit naturel dérivé des margines riche en substances aromatiques, savoureux et phénoliques.

▪ Exposé de l'invention

Pour que l'application des bactériocines soit réalisable, les aspects techniques et économiques doivent être abordés. Le plus souvent, les aspects économiques font défaut pour qu'une application de bactériocine à l'échelle industrielle soit réalisable. En plus, les techniques utilisées sont parfois coûteuses, limitées et non rentables.

Une option intéressante consiste à utiliser certains sous-produits des industries agroalimentaires comme substrat. Dans ce sens, plusieurs valorisations ont été décrites pour les margines d'olive (Roig et al., 2006 ; WO2007074490 (A1), 2007 ; KR20080028247 (A), 2008 ; GR20080100688 (A), 2010 ;

Mateo et Maicas 2015 ; Doula et al., 2017 ; PL3494237 (T3), 2021 ; Gerasopoulos et Petrotos, 2022 ; GR1010150 (B), 2022). Toutefois, aucune procédure de production des bactériocines sur les margines d'olives n'a été décrite pour le moment.

L'utilisation des margines d'olive (un effluent issu de l'extraction de l'huile d'olive) offre une très bonne possibilité de recycler/valoriser cet effluent et aussi de réduire les frais de revient des bactériocines produites.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce brevet d'invention, dont l'objectif est la description d'une procédure de production des bactériocines en utilisant les margines d'olive.

▪ Brève description des figures

La figure 1 présente le suivi de l'activité antimicrobienne de la bactériocine OS1 produite par *E. hirae* OS1 cultivée sur les margines d'olive diluée à 1/1000.

La figure 2 présente le suivi de l'activité antimicrobienne de la bactériocine OS1 produite par *E. hirae* OS1 cultivée sur les margines d'olive optimisées.

▪ Description détaillée de l'invention

La présente invention concerne un procédé de production des bactériocines utilisant les margines d'olive comme milieu de production et qui comporte les étapes suivantes :

- a. Dilution des margines d'olive ;
- b. Inoculation d'une souche bactériocinogénique sur les margines diluées;
- c. Ajout de glucose ;
- d. Régulation du pH du mélange ;
- e. Incubation du mélange ; et
- f. Élimination des bactéries productrices et récupération de la bactériocine par filtration sur un filtre de 0,45 µm.

D'après l'invention, la dilution des margines d'olive se fait dans de l'eau distillé avec des dilutions entre de 1 et 1/1000. Selon un mode de réalisation préférentiel la dilution optimale est de de 1/1000.

l'inoculation de la souche bactériocinogénique sur les margines se fait à environ 5%, en ajoutant du glucose à des proportions d'environ 1% (m/v).

Selon un mode de réalisation préférentielle de cette invention la souche bactériocinogénique peut être une souche d'*Enterococcus*, de *Lactobacillus* et de *Lactococcus*.

le pH du mélange d'obtention dudit bactériocine est préférentiellement régulé à environ 6,5, et son l'incubation se fait à 30°C durant une période ente 24 heures et 48 heures.

À la fin dudit procédé les bactéries sont éliminées avec une filtration sur un filtre de 0,45 µm et la bactériocine est récupérée.

Pour le choix de la dilution des margines d'olive : elle est réalisée en utilisant les margines d'olive stériles comme un milieu de production. Ce procédé utilise des dilutions allant de 1 jusqu'à 1/1000 de la margine d'olive (par ajout de l'eau distillée, v/v). La méthode des puits (Ananou et al., 2020) est utilisée pour détecter et évaluer l'activité antimicrobienne de la bactériocine produite sur les margines d'olive, vis-à-vis de une souche indicatrice.

Pour la production de la bactériocine sur la dilution permettant la production : La dilution appropriée permettant la production des bactériocines est postérieurement inoculée à 5% (v/v) de la souche productrice (une souche bactériocinogénique). La production est réalisée à l'aide d'un bioréacteur de paillasse (capacité 1L) sous une température d'incubation de 30°C durant 48h. Un témoin négatif sans inoculation est également testé.

Pour l'optimisation de la production : La dilution de la margine permettant la production des bactériocines est inoculée à 5% (v/v) de la souche productrice, ajoutée du glucose à 1% (m/v) et tamponnée à pH de 6,5. La production est réalisée à l'aide d'un bioréacteur de paillasse (capacité 1L) sous une température d'incubation de 30°C durant 48h.

La bactériocine ainsi produite pourra être récupérée par filtration en utilisant un filtre de 0,45 µm et utilisée comme un bio-conservateur des aliments ou bien comme un agent anti-infectieux.

Exemple : Production de la bactériocine OS1 (produite par *E. hirae* OS1).

La méthode des puits a été utilisée pour détecter et évaluer l'activité antimicrobienne de bactériocine OS1, produite sur les margines d'olive, vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*.

Tout d'abord, nous avons défini la dilution permettant la production de cette bactériocine (des dilutions de 1, 1/10, 1/100 et 1/1000 de margine d'olive stérile ont été préparés et additionnés de la souche productrice à 5%).

Nos résultats montraient que la dilution 1/1000 de la margine d'olive permettait de produire des bactériocines dans la margine d'olive diluée à 1/1000. En effet, des activités de 100 UA/mL et de 37,5 UA/mL ont été observées après 24h et 48h respectivement (Figure 1).

L'optimisation de la production de la bactériocine OS1 a été réalisée en utilisant les margines d'olive stériles (diluée à 1/1000) et en appliquant les paramètres optimaux préalablement décrites sur le lactosérum par Ananou et al. (2008, 2020). Le suivi de la production de la bactériocine OS1 révélait un taux maximal observé après 3-18h d'incubation avec 200 UA/mL pour la culture optimisée (par rapport à 100 UA/mL pour la culture sans optimisation). Ce qui signifie une augmentation d'un facteur de 2 par rapport au témoin (Figure 2).

La bactériocine ainsi produite a été récupérée par filtration sur filtre de 0,45 µm.

La bactériocine obtenue pourra être utilisée en tant que bio-conservateurs des aliments ou bien comme des agents anti-infectieux. En plus, la production de la bactériocine OS1 par *E. hirae* OS1 en utilisant des margines d'olive a permis de valoriser cet effluent issu de l'extraction de l'huile d'olive et d'optimiser la production de la bactériocine OS1.

- **Application industrielle**

Selon l'invention, ce procédé peut être appliqué pour produire les bactériocines à grande échelle et à échelle industrielle. Ces bactériocines peuvent être appliquées par la suite pour la conservation des aliments et pour lutter contre les pathogènes dans le domaine médical.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ananou, S., Lotfi, S., Azdad, O., & Nzoyikorera, N. (2020). Production, recovery and characterization of an enterocin with anti-listerial activity produced by *Enterococcus hirae* OS1. *Applied Food Biotechnology*, 7(2), 103–114. <https://doi.org/10.22037/afb.v7i2.27582>

Ananou, S., Muñoz, A., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2008). Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. *International Dairy Journal*, 18, 923–927. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.001>

Arias A., Feijoo G., Moreira MT. 2021. Process and environmental simulation in the validation of the biotechnological production of nisin from waste. *Biochemical Engineering Journal*. Volume 174, 108105. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108105>

Doula, M.K., Moreno-Ortego, J.L., Tinivella, F., Inglezakis, V.J., Sarris, A., Komnitsas, K. 2017. Olive mill waste: recent advances for the sustainable development of olive oil industry. Pages 29-56. Eds. Charis M. Galanakis, Academic Press, ISBN 9780128053140, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00002-9>.

Gerasopoulos K., Petrotos K. 2022. Utilization of olive mill waste waters to produce bioactive animal feed. Pages 393-412. *Membrane Engineering in the Circular Economy. Renewable Sources Valorization in Energy and Downstream Processing in Agro-Food Industry* Editor(s): Adolfo Iulianelli, Alfredo Cassano, Carmela Conidi, Konstantinos Petrotos. Elsevier, ISBN 9780323852531. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85253-1.00007-1>.

GR1010150 (B), 2022. Method for the production of a natural product derived from olive mill waste water - natural product rich in aromatic, tasty and phenolic substances. PARTENOPOULOS DIMITRIOS-ALFREDOS ANDREA ; PETTAS PARASKEVAS-KYRIAKOS PAVLOU ; CHALOULOS KONSTANTINOS IOANNI ; CHALOULOS IOANNIS-EKTOR KONSTANTINOY.

GR20080100688 (A), 2010. Method for complete exploitation of olive mill waste with coproduction of polyphenol powder and fertiliser. PETROTOS KONSTANTINOS; GKOUTSIDIS PASCHALIS; CHRISTODOULOULIS KONSTANTINOS.

Juncioni de Arauz L., Jozala A.F., Mazzola P.G., Vessoni Penna T.C. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 146-154, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.056>.

KR20080028247 (A), 2008. Production method of methane gas from olive mill waste. CHOI EUI SO.

Mateo J.J., Maicas S. 2015. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Research International* 73, 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.007>

PL3494237 (T3), 2021. Use of olive mill waste waters in the leather tanning industry. FRANCESCHI, MASSIMILIANO, ; PACCHI, GIACOMO, ; MARAVIGLIA, MAURIZIO

Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero M.A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26, 960-969. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.07.024>

Senan, S., Abd El-aal, H., Dave, R., Hassan, A. 2016, Production and stability of nisin in whey protein concentrate, *LWT - Food Science and Technology*, 71, 125-129, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.031>.

WO2007074490 (A1), 2007. Process for producing triactylhydroxytyrosol from olive oil mill waste waters for use as stabilized antioxidant. DE MARTINO, ANTONIO, ; SANNINO, FILOMENA, ; MANNA, CATERINA, ; GIANFREDA, LILIANA, ; CAPASSO, RENATO.

Revendications

1. Procédé de la production des bactériocines caractérisé en ce qu'il utilise les margines d'olive comme milieu de production.
2. Procédé de la production des bactériocines, selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :
 - Dilution des margines d'olive ;
 - Inoculation d'une souche bactériocinogénique sur les margines diluées;
 - Ajout de glucose ;
 - Régulation du pH du mélange ;
 - Incubation du mélange ; et
 - Élimination des bactéries productrices et récupération de la bactériocine par filtration sur un filtre de 0,45 µm.
3. Procédé de la production des bactériocines, selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la dilution des margines d'olive se fait dans de l'eau distillé avec des dilutions entre de 1 et 1/1000.
4. Procédé de la production des bactériocines, selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la souche bactériocinogénique peut être une souche d'*Enterococcus*, de *Lactobacillus* et de *Lactococcus*.
5. Procédé de la production des bactériocines, selon les revendications 1, 2 et 3, caractérisé en ce que la dilution optimale des margines d'olive est de 1/1000.
6. Procédé de la production des bactériocines, selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'inoculation de la souche bactériocinogénique sur les margines se fait à environ 5%.
7. Procédé de la production des bactériocines, selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le glucose est ajouté à des proportions d'environ 1% (m/v).
8. Procédé de la production des bactériocines, selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le pH du mélange est régulé à environ 6,5.
9. Procédé de la production des bactériocines, selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'incubation du mélange se fait à 30°C durant une période entre 24 heures et 48 heures.

Dessins

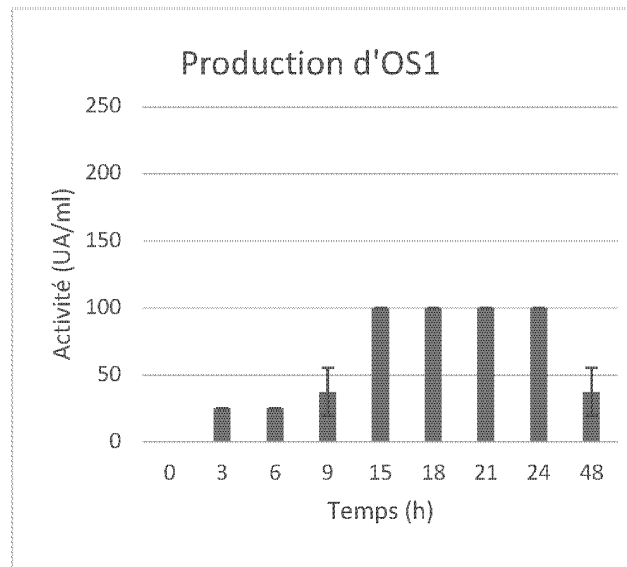


Figure 1. Suivi de l'activité antimicrobienne de la bactériocine OS1 produite par *E. hirae* OS1 cultivée sur les margines d'olive diluée à 1/1000.

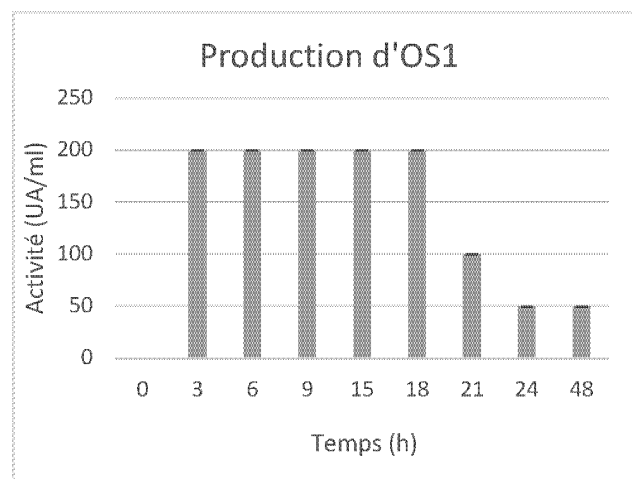


Figure 2. Suivi de l'activité antimicrobienne de la bactériocine OS1 produite par *E. hirae* OS1 cultivée sur les margines d'olive optimisées.

**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée
par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 57097	Date de dépôt : 20/06/2022
Déposant : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah	
Intitulé de l'invention : Nouveau procédé de production des bactériocines en utilisant les margines d'olive	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté	
<input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: BASMA SADIKI	Date d'établissement du rapport : 29/11/2022
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
4 Pages
- Revendications
9
- Planches de dessin
1 Pages

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : C12N1/20, C12N1/26, C12R2001/225, C07K1/14, C07K1/34

CPC : C12N1/20, C12N1/205, C12N1/26, C12R2001/225, C07K14/335, C07K1/14, C07K1/34, A23Y2220/00

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, IEEE, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
Y	BRAHIMI Samira : « Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives « AMOREDJ » fermentés ». 30-06-2015 Université D'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Faculté des sciences, Département de biologie, Laboratoire de microbiologie appliqué, Page 99-105 et 145 Mémoire de Magister https://theses.univ-oran1.dz/document/TH4557.pdf	1-9
Y	Jordane Jasniewski : « Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa. Autre ». Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008. Français. ffNNT : 2008INPL100Nff. fftel-01753062f HAL Id: tel-01753062 https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01753062	1-9
A	TNSN02034A1 ; ECOLE SUPERIEURE DES IND ALIMENTAIRES DE TUNIS [TN] ; 2004-03-05	1-9

*Catégories spéciales de documents cités :

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 -« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 -« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 -« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
 -« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté	Revendications 1-9	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications aucune	Oui
	Revendications 1-9	Non
Application Industrielle	Revendications 1-9	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : BRAHIMI Samira : « Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olives « AMOREDJ » fermentés ».

D2 : Jordane Jasniewski : « Étude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous classe IIa »

1. Nouveauté

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques faisant l'objet des revendications 1-9. Par conséquent l'objet de celles-ci est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche à l'objet de la présente demande. Il divulgue un procédé de culture des lactobacéries dans la margine d'olive et l'intérêt de celui-ci.

L'objet de la première revendication diffère de D1 par l'étape d'extraction des bactériocines.

Le problème technique lié à cette différence est alors considéré comme l'isolement des bactériocines à partir d'une culture bactérienne lactique dans la margine d'olive

Le document D2 divulgue un procédé d'extraction de bactériocine par des agents chimiques et que l'extraction des bactériocines par traitement chimique est essentielle pour éviter les impuretés. Alors, la solution proposée par la présente invention, l'utilisation d'une étape de filtration comme technique de séparation moléculaire par diamètre, est une alternative

évidente qui fait partie des pratiques courantes de l'homme du métier tant qu'aucun effet inventif lié à la pureté de l'extrait n'a été démontré.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-9 n'implique pas d'activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.