

 <p>ISSN NO. 2320-5407</p>	<p>Journal Homepage: -www.journalijar.com</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH (IJAR)</p> <p>Article DOI:10.21474/IJAR01/12580 DOI URL: http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/12580</p>	 <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH (IJAR) ISSN 2320-5407</p> <p>Journal Homepage: http://www.journalijar.com Journal DOI:10.21474/IJAR01</p>
---	--	--

RESEARCH ARTICLE

ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE SOUCHES DE BACTERIES ACETIQUES A PARTIR D'UN ALCOOL DE MANGUE FERMENTE

Mariama Ciré Kourouma¹, Malick Mbengue¹, Khady Sarr¹ and Coumba Touré Kane²

1. Laboratoire de Microbiologie Appliquée et Génie Industriel (MAGI), Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar (ESP), Dakar, Sénégal.
2. Université Sine Saloum El Hadj Ibrahima Niass (USSEIN), Kaolack, Sénégal.

Manuscript Info

Manuscript History

Received: 10 January 2021

Final Accepted: 14 February 2021

Published: March 2021

Key words:-

Isolement, Identification,
Caractérisation, Bactéries Acétiques,
Vinaigre

Abstract

Les bactéries acétiques sont d'un très grand intérêt pour l'industrie biotechnologique, mais leur application la plus importante réside dans leur capacité à oxyder l'éthanol en acide acétique conduisant à la production de vinaigre. Le but de cette étude était d'isoler, de caractériser et d'identifier des souches de bactéries acétiques à partir d'un alcool de mangue fermenté. Les souches isolées ont fait l'objet de tests phénotypiques, et biochimiques tels que la coloration de GRAM, la recherche de la catalase et de l'oxydase, l'oxydation de l'éthanol en acide acétique, le pouvoir suroxydant et le métabolisme de certains glucides. Vingt-huit souches de bactéries acétiques appartenant au genre *Gluconoacetobacter* et *Acetobacter* ont été isolées. Le test de production nous a conduits au choix des cinq souches capables de produire les quantités les plus élevées d'acide acétique. Ces souches nommées respectivement VMA1, VMA5, VMA7, VMAM et VMAO ont ensuite fait l'objet de caractérisation physiologique afin de déterminer leurs conditions optimales de croissance. Les températures optimales de croissance étaient comprises entre 27° et 40°C et les pH optimum entre 5,5 et 7. Les résultats du test de la résistance à l'éthanol ont montré que toutes les cinq souches étaient capables de pousser à 10% d'éthanol (v/v) et les souches VMA1 et VMA5 étaient capables de résister à 25% d'éthanol (v/v). Ces résultats pourraient potentiellement constituer une avancée majeure pour l'industrie du vinaigre.

Copy Right, IJAR, 2021,. All rights reserved.

Introduction:-

Les bactéries acétiques sont caractérisées par leur capacité à oxyder les sucres, les alcools en acides organiques, cétones, aldéhydes ; ce processus est connu sous le nom de « fermentation oxydative » (Lynch et al. 2019). Les espèces de ce groupe appartiennent à la famille des *Acetobacteraceae*; ce sont des bactéries mésophiles, catalase positive, oxydase négative, aérobies strictes avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Kersters et al. 2006). Dix-huit genres de bactéries acétiques ont été recensées à ce jour ; les plus importants en termes de fermentation étant les genres *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter*, et *Komagataeibacter*. Les bactéries acétiques sont répandues dans la nature et peuvent être isolées à partir des fruits, des fleurs, des sucres et particulièrement à partir des boissons fermentées (Gullo et Giudici 2008a) ; (Gomes et al. 2018). L'être humain a longtemps bénéficié des actions des bactéries acétiques avant que ces dernières ne soient reconnues comme étant

Corresponding Author:-Mariama Ciré Kourouma

Address:-Laboratoire de Microbiologie Appliquée et Génie Industriel (MAGI), Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar (ESP), Dakar, Sénégal.

responsables de la fermentation acétique (**Pasteur 1868**) et aujourd'hui, plusieurs domaines de la biotechnologie sont en train d'exploiter les bienfaits qu'offrent les bactéries acétiques (**Raspor et Goranovič 2008**). Toutefois, les bactéries acétiques provoquent une crainte chez les œnologues; elles peuvent détruire les boissons fermentées telles que le vin, le cidre, la bière, produits dans lesquels la production d'acide acétique n'est pas désirée (**Bartowsky et Henschke 2008**).

Certaines transformations effectuées par les bactéries acétiques sont d'un très grand intérêt pour l'industrie biotechnologique : production de Kombucha (**Ayed, Ben Abid, et Hamdi 2017**), d'acide gluconique (**Cañete-Rodríguez et al. 2016**), de cellulose (**Czaja et al. 2007**). Malgré cet intérêt, la production de vinaigre reste le procédé d'application des bactéries acétiques le plus connu (**Sengun et Karabiyikli 2011**).

Les bactéries acétiques sont considérées comme fastidieuses due à leur croissance difficile sur les milieux de culture classiques. Leur cultivabilité est souvent faible et très irrégulière (**Torija et al. 2010**). L'isolement de bactéries acétiques capables de produire d'importantes quantités d'acide acétique avec une meilleure résistance à l'alcool a toujours été un sujet de recherche.

L'objectif de ce travail est d'isoler les différentes bactéries acétiques présentes dans un alcool de mangue fermenté, de faire leur caractérisation phénotypique et biochimique afin de les identifier, et enfin de comparer leurs productivités en acide acétique. Les souches leaders feront ensuite l'objet d'une caractérisation physiologique en vue de déterminer leurs paramètres optimaux de croissance et leur degré de résistance face à l'alcool. Ces dernières pourraient ensuite être utilisées comme starter dans les processus d'acétification industrielle.

Matériels Et Méthodes : -

Les souches bactériennes :

IL d'un alcool de mangue produit au sein du laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Génie Industriel de l'Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar a été laissé fermenter à l'air libre et à température ambiante pendant 3 mois. Il s'est alors formé une mère de vinaigre. 100mL de celle-ci ont été prélevés. A partir de cette solution, une série de dilution en cascade a été réalisée jusqu'à 10^{-7} avec l'eau peptonée comme diluant. Ensuite, 0,1 mL de chaque dilution a été étalée sur un milieu GYC (10% glucose ; 1% yeast extract ; 2% calcium carbonate ; 1,5% agar ; pH 6.8). Après 48H d'incubation à 30°C, les colonies présentant un halo dû à une acidification du milieu ont été sélectionnées. Les souches Gram négatif, oxydase négative, et aérobies stricts sont présumées être des bactéries acétiques. Ces souches isolées ont été conservées dans des tubes Eppendorf, à -80°C, dans un milieu Luria Bertani supplémenté avec 20% de glycérol, pour les études ultérieures.

Caractérisation morphologique et biochimique :

Catalase et oxydase :

L'activité oxydase a été testée en utilisant 1 % de N,N,N',N'-tetraméthyl p-phenylenediamine. L'activité catalase a été testée en ajoutant des cellules jeunes à une goutte d'une solution 10% de H₂O₂.

Production d'acide à partir d'éthanol :

Pour observer la formation d'acide acétique à partir de l'éthanol, la technique de la dissolution du CaCO₃ autour des colonies sur milieu solide a été utilisée. Le milieu gélosé contenait pour 1 litre 10g d'extrait de levure, 20g de CaCO₃, 20mL d'éthanol et 20g d'agar.

Oxydation de l'acide acétique en CO₂ et H₂O :

Encore appelé pouvoir suroxydant, il est mis en évidence sur milieu de Carr contenant 0,3% d'extrait de levure, 2% d'agar et 3% d'éthanol. Le vert de bromocrésol (0,002%) est utilisé comme indicateur coloré. Les cultures ont été ensuite incubées à 30°C pendant 48h.

Oxydation de l'acétate et du lactate :

Les souches ont été inoculées dans un milieu contenant 0,3% de peptone ; 0,2% d'extrait de levures ; 0,2% d'acétate de sodium (ou lactate sodium). Le bleu de Bromothymol (0,002%) a été utilisé comme indicateur coloré. Les cultures ont été ensuite incubées à 30°C pendant 24 h.

Culture en présence de 0,35% d'acide acétique :

Elle est mise en évidence sur le milieu solide YGC (Yeast 1% ; Glucose 10% ; CaCO₃ 2% ; Agar 2,5%) supplémenté de 0,35 % d'acide acétique. Le milieu est incubé à 30° C pendant 48 h.

Culture en présence de 30% D-glucose :

Elle est mise en évidence dans le milieu solide YC (1% Yeast ; 2% CaCO₃ ; 2,5% Agar) supplémenté de 30% de glucose. Le milieu est ensuite incubé à 30°C pendant 24 à 72h.

Production de cellulose :

Les bactéries sont cultivées sur bouillon YC puis incubées à une température de 30°C pendant 48 heures. S'il se forme une formation d'une pellicule à la surface du milieu, celle-ci est prélevée et placée sur une lame pour être recouverte successivement de Lugol, puis l'acide sulfurique à 60%. Le développement d'une couleur bleue traduit la présence de cellulose.

Cétogenèse à partir du glycérol :

Les bactéries ont été ensemencées par touche dans un milieu gélosé au glycérol renfermant 30g de glycérol, 5g d'extrait de levure, et 10g de polypeptone pour 1 litre, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. La révélation se fait en ajoutant 200 microlitres de liqueur de Fehling dans les boîtes de culture, puis l'excédent est versé. Une réaction positive se matérialise par une coloration rouge brique autour des colonies.

Culture sur Hoyer-Frater :

C'est une culture en présence d'ammonium comme seule source d'azote et de 3% d'éthanol. La culture se fait avec une faible quantité de bactéries, soit trois gouttes de suspension bactériennes. Le milieu est incubé à 30°C pendant une période allant de 2 à 14 jours. Le développement est comparé à celui d'un milieu témoin sans ammonium. Un résultat positif se traduit par une turbidité du milieu.

Pigmentation :

La production de pigment est déterminée. Pour cela, les bactéries sont cultivées dans le milieu gélosé YGPC (Yeast Glucose Peptone Carbonate calcium) incliné contenant 3% glucose ; 0,2% extrait de levure ; 0,3% peptone et 0,2% carbonate de calcium. Les cultures sont ensuite incubées pendant 10 jours à 30°C.

Production d'acide à partir de source de carbone :

La capacité des souches bactériennes à produire de l'acide à partir de différentes sources de carbone a été étudiée. Le milieu utilisé contient 0,5% d'extrait de levure, et 1% du sucre à étudier (incluant Glycérol, D-galactose, fructose, D-mannitol, D-glucose, D-mannose, Raffinose, Cellulose). Le Bromocrésol pourpre (0,002%) est utilisé comme indicateur coloré. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

Production d'acide acétique :

Les colonies sélectionnées ont été cultivées sur le bouillon YG jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,4. Un inoculum de 4% à partir du précédent bouillon a été cultivé dans le milieu YGEA (Yeast Glucose Ethanol Acetic acid) pour la production d'acide acétique. Le milieu de production était aéré et les prélèvements se faisaient toutes les 48H.

Estimation de la quantité d'acide acétique :

1ml de culture a été dilué au centième. Après homogénéisation, 20 mL de cette solution ont été placés dans un Erlen Meyer. 2-4 gouttes de phénolphthaléine ont été ajoutées pour apprécier la variation du pH. La solution a ensuite été titrée contre une solution de NaOH 0,1N. La quantité d'acide acétique produite en g pour 100 mL a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$d^{\circ} = (10000 * Vb * Cb * pm(acide\ acétique)) / (Va * mv(acide\ acétique))$$

Vb : Volume de NaOH versé à l'équivalence

Cb : Concentration de la solution de NaOH

Pm : Poids moléculaire de l'acide acétique

Va : Volume de la solution d'acide acétique dosée

Mv : Masse volumique de l'acide acétique

Caractérisation physiologique :

Des tests de cinétique sont faits sur les souches leaders afin d'en déterminer les optima de croissance. IL s'agit d'une évaluation de la population microbienne dans le temps correspondant à une lecture de l'absorbance (= densité optique) de la croissance bactérienne à la longueur d'onde $\lambda = 600\text{nm}$ à l'aide d'un spectrophotomètre Thermo Scientific GENESIS 10S UV-VIS. La courbe DO en fonction du temps est alors tracée afin de déterminer la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) obtenue pendant la phase exponentielle. En effet, lors de cette phase de croissance, l'allure de la courbe $\text{DO}=\text{f}(\text{t})$ est une droite de coefficient directeur μ_{max} . Les paramètres étudiés sont la température et le pH.

Effet de la température ;

Les souches bactériennes ont été cultivées à 30°C dans le milieu YGP jusqu'à $\text{DO}=0,4$; ensuite 500 μL de cette pré-culture ont été ajoutées à 10mL de bouillon YPG. Les cultures ont ensuite été incubées à des températures allant de 27°C à 45°C.

Effet du pH :

Pour étudier l'effet du pH sur la croissance, les bactéries isolées ont été cultivées dans le bouillon YPG avec ajustement du pH à, 3 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5.

Test de résistance à l'éthanol :

Les bactéries isolées ont été cultivées à 30°C pendant 10 jours dans le milieu YG solide supplémenté d'éthanol entre 5-25% (v/v). L'apparition ou non d'une croissance a été observée.

Résultats et discussions :-**Isolement et identification :**

Un total de 28 souches a été isolé et reconnu comme étant des bactéries acétiques. Toutes les souches isolées sont des bacilles à GRAM négatif, aérobies strictes, catalase positive, oxydase négative et elles sont capables d'oxyder l'éthanol en acide acétique produisant un halo clair sur le milieu GYEC. Elles possédaient toutes un pouvoir suroxydant et elles pouvaient également oxyder le lactate en CO_2 et H_2O , deux propriétés biochimiques typiques des bactéries acétiques.

Toutes les souches isolées ont fait l'objet de tests biochimiques tels que décrit dans les matériels et méthodes. Les résultats obtenus (**tableau 1-1 et tableau 1-2**) ont ensuite été comparés à la table d'identification des bactéries acétiques. Cette identification basée sur les caractères biochimiques nous a permis de déterminer les genres auxquels appartiennent les bactéries isolées : 27 souches se présentent comme appartenant au genre *Gluconoacetobacter* et 1 seule souche est affiliée au genre *Acetobacter*.

Tableau 1-1:- Caractères biochimiques des souches isolées.

Caractères biochimiques	VMA 1-VMA 10; VMAe	VMA A; VMA J	VMA B; VMA D	VM AC	VMA E; VMA F; VMA H; VMA I; VMA O	VMA G	VMA K	VMA K'; VMA M'	VM AL	VMA M	VM AP
GRAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Oxydation de l'éthanol en acide acétique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Oxydation de l'acide acétique en CO ₂ et H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydation du lactate en CO ₂ et H ₂ O	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Culture en présence de 0,35 % d'acide acétique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Culture en présence de 30 % D-glucose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Cétogénèse à partir du glycérol	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Culture sur Hoyer Frater	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Production de pigment brun soluble	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+

Tableau1- 2:- Métabolisme de quelques sucres.

Sucres	VM A1	VMA2;VM A6; VMA7	VM A3	VM A4	VM A5	VM A8	VM A9	VMA 10	VMA A	VM AB	VM AC	VMA D
<i>Glycérol</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>D-Mannitol</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Raffinose</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Fructose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Glucose</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>D-Mannose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D-Galactose</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Cellulose</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Tableau1-2:- Métabolisme de quelques sucres (suite).

Sucres	VMAE	VMAF; VMAH	VMAG	VMAI-VMAJ-VMAK	VMAK'	VMAL	VMAM; VMAO; VM Ae	VMAM'	VMAP
<i>Glycérol</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>D-Mannitol</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Raffinose</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>Fructose</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Glucose</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>D-Mannose</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>D-Galactose</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Cellulose</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Les bactéries du genre *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* et *Komagaetebacter*, en plus d'oxyder l'éthanol en acide acétique, peuvent également oxyder l'acide acétique en CO₂ et H₂O; ce phénomène connu sous le nom de

suroxydation est effectuée grâce au cycle de KREBS lorsque l'éthanol se fait rare dans le milieu et qu'il y'a une présence importante d'oxygène dissout (Sharafi, Rasooli, et Beheshti-Maal 2010). Ce phénomène semble être un changement métabolique irréversible après lequel ces bactéries deviennent incapables d'oxyder l'éthanol à nouveau (Raspor et Goranovič 2008). Les souches de *Gluconobacter* sont incapables de suroxyder l'acide acétique à cause d'un dysfonctionnement des enzymes α -cétoglutarate déshydrogénase et succinate déshydrogénase, ces dernières s'arrêtent donc au stade d'oxydation de l'éthanol (W.j et I.s 2002). La suroxydation peut cependant être évitée en maintenant toujours une petite quantité d'éthanol dans le milieu réactionnel (Raspor et Goranovič 2008).

Le genre *Komagaetebacter* était inclus dans le genre *Gluconoacetobacter* ; c'est à la suite d'analyses génétiques et de l'observation de certains caractères phénotypiques que Yamada et al. ont proposé le nouveau genre *Komagaetebacter* (Yamada et al. 2012). En effet, les deux genres se différencient par le fait que les espèces de *Gluconoacetobacter* sont mobiles et ont la capacité de produire un pigment brun soluble (Yamada et Kondo 1984).

Les bactéries acétiques montrent une différence dans leur capacité à oxyder l'éthanol et les sucres. Par exemple, la production d'acide gluconique à partir du glucose et l'activité cétogène à partir du glycérol sont faibles voire négligeables chez les *Acetobacter*, mais importants chez les *Gluconobacter* (Adachi et al. 1978) ; (Sainz et al. 2016). En effet, les espèces du genre *Gluconobacter* possèdent deux glucose déshydrogénases capables de catalyser l'oxydation directe du D-glucose en acide gluconique (Pronk et al. 1989). D'autre part, les espèces appartenant aux genres *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* et *Komagaetaibacter* oxydent mieux l'éthanol que les *Gluconobacter*, ceci pourrait être dû au fait que l'Aldéhyde Déshydrogénase (ADH) des *Gluconobacter* est moins stable en conditions acides que celui des autres genres (Adachi et al. 1978).

Les bactéries acétiques sont décrites comme étant exigeantes et difficiles à isoler ; ceci est attribué au phénomène appelé «état viable mais non cultivable» (Vegas et al. 2010). L'identification phénotypique des bactéries acétiques est fastidieuse ; il est très difficile d'identifier correctement les bactéries acétiques jusqu'au stade espèce en se basant sur leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques (Hanmoungjai et al. 2007) ; (Sengun et Karabiyikli 2011). Ceci est dû à plusieurs raisons incluant la haute fréquence d'apparition de mutations spontanées chez les bactéries acétiques (Takemura, Horinouchi, et Beppu 1991) ; (Prust et al. 2005). Ces mutations auraient causé la perte de plusieurs caractères biochimiques tels que l'oxydation de l'éthanol, la non production de pigment brun soluble, la non production de cellulose entraînant ainsi de profonds changements au niveau de la taxonomie. Ainsi, pour une bonne identification des bactéries acétiques, l'utilisation de méthodes moléculaires est préconisée. Durant ces dernières années, plusieurs techniques moléculaires ont été utilisées : l'analyse du profilage plasmidique (Franke-Whittle et al. 2005), la DGGE-PCR (De Vero et Giudici 2008) ou encore le séquençage de la région du gène de l'ARNr 16S (Yetiman et Kesmen 2015). Toutefois, même si l'identification biochimique est laborieuse et demande beaucoup de temps, elle reste somme toute un moyen simple et pas cher surtout dans les pays en voie de développement.

Test de production d'acide acétique :

Les bactéries isolées ont ensuite fait l'objet d'un test de production d'acide acétique. Celles produisant les quantités d'acide acétique les plus importantes (figure1) ont été sélectionnées et appelées souches leaders à savoir les souches VMA1, VMA5, VMA7, VMAM et VMAO. Le maximum d'acide acétique (3,06% m/v) a été obtenu avec la souche VMA7.

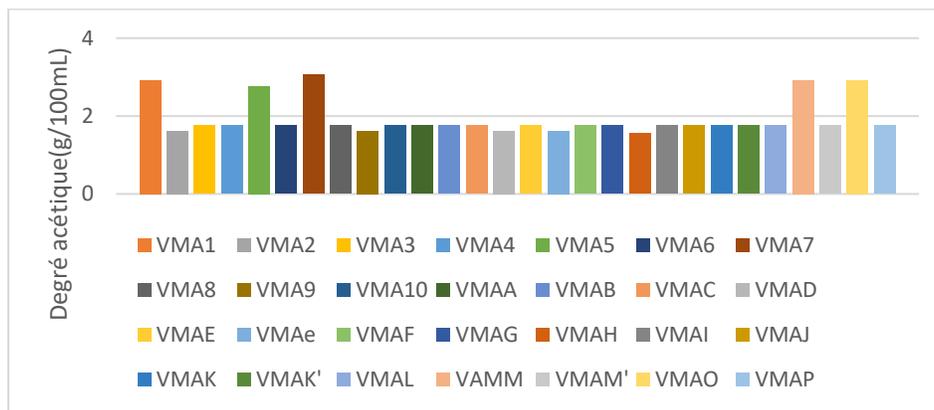


Figure1:- Test de production d'acide acétique.

Caractérisation physiologique :

Les souches leaders dans la production d'acide acétique ont fait l'objet d'une caractérisation physiologique afin de déterminer leurs conditions optimales de croissance pour les études ultérieures.

Effet de la température :

Les bactéries acétiques sont de type mésophile et leur température optimale de croissance varie entre 25 et 30°C. Au-delà de cet optimum, une dénaturation des enzymes essentielles telles que l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) peut survenir, entraînant ainsi une baisse de la production en acide acétique (**de Ory, Romero, et Cantero 1998**). Toutefois, l'isolement de bactéries acétiques capables de croître à des températures élevées est d'une importance capitale pour l'industrie du vinaigre, afin de limiter les pertes générées par le refroidissement des bioréacteurs surtout dans les pays tropicaux (**Chen et al. 2016**). Les températures optimales de croissance obtenues dans cette étude varient entre 27°C et 40°C (**figure2**). Les souches VMA7 et VMAO qui présentent des températures optimales de croissance de 40°C pourraient être intéressantes pour l'industrie du vinaigre.

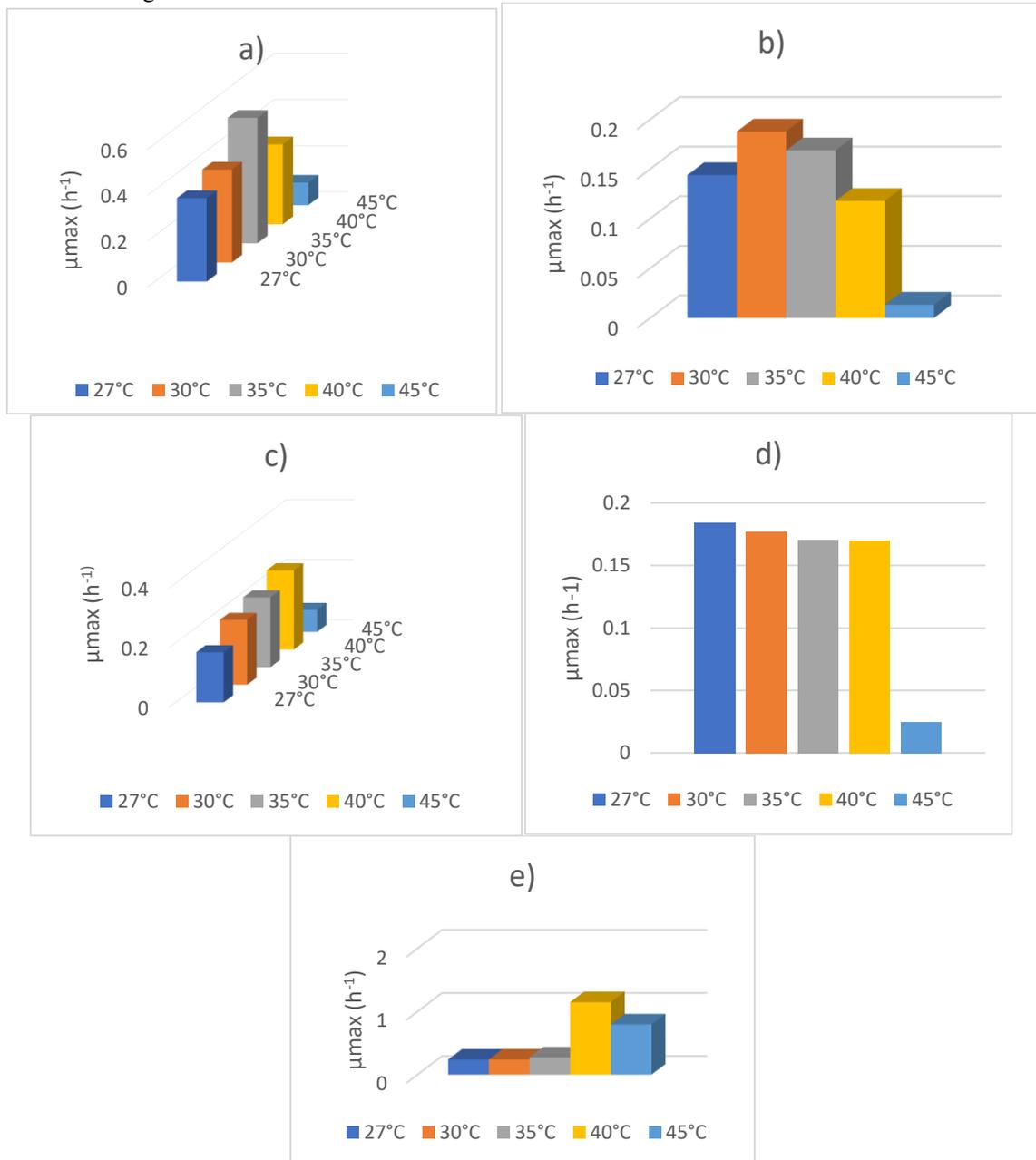


Figure2 :- Effet de la température sur la croissance. (a) : VMA1 ; (b) : VMA5 ; (c) : VMA7 ; (d) : VMAM ; (e) : VMAO

Effet du pH :

Le pH optimum de croissance des bactéries acétiques se situe entre 5–6,5. Elles peuvent cependant croître, à des pH plus bas (Mamlouk et Gullo 2013) ou à des pH plus élevés (Soumahoro et al. 2015). Dans cette étude, les optima de pH varient entre 5 et 7 (figure3). Pratiquement, aucune croissance n'est observée à pH3 et nous notons que les souches se développent aussi bien à pH acide qu'à pH neutre.

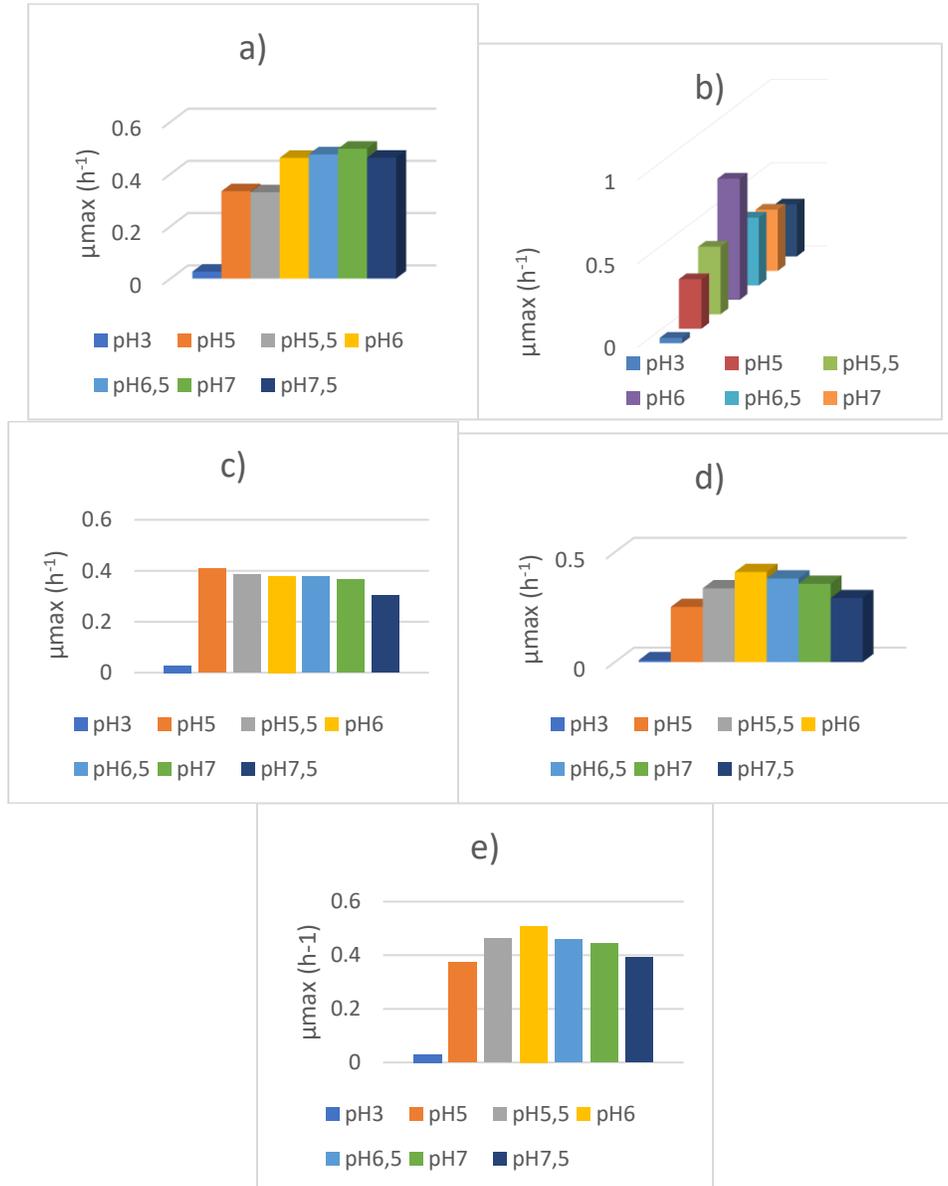


Figure 3:- Effet du pH sur la croissance. (a) : VMA1 ; (b) : VMA5 ; (c) : VMA7 ; (d) : VMAM ; (e) : VMAO.

Test de résistance à l'éthanol :

L'éthanol est le substrat principal pour la production d'acide acétique. Toutefois, une forte concentration en éthanol peut devenir un stress significatif pour les bactéries acétiques, entraînant l'inhibition de leur croissance et donc une baisse de la productivité acétique (Gullo et Giudici 2008b). Cependant, l'obtention de fortes concentrations en acide acétique requiert la présence de bactéries acétiques capables de tolérer de fortes concentrations en éthanol (Gullo, Verzelloni, et Canonico 2014). De plus, un processus d'acétification à partir de concentrations élevées en

éthanol pourrait améliorer la qualité du vinaigre produit (Wei et al. 2012). Dans cette étude, toutes les cinq souches sélectionnées ont bien poussé à 10 degré alcoolique ; les souches VMA1 et VMA5 étaient capables de pousser à une concentration de 25° alcoolique (v/v) en 10jours (Tableau2). Les résultats obtenus montrent que ces deux souches présentent une très forte résistance à l'éthanol. A ce jour, aucune de nos recherches ne nous a permis de faire état de bactéries acétiques capables de survivre dans de telles conditions. Ceci pourrait constituer une avancée majeure pour l'industrie du vinaigre dans la recherche de bactéries acétiques éthanol-résistantes.

Tableau 2:- Effet de l'éthanol sur la croissance bactérienne.

Souchesbactériennes	Pousse à 5° alcoolique	Pousse à 10° alcoolique	Pousse à 15° alcoolique	Pousse à 20° alcoolique	Pousse à 25° alcoolique
VMA1	+++	+++	+++	+++	++
VMA5	+++	+++	+++	+++	++
VMAM	+++	+++	++	-	-
VMA7	+++	++	-	-	-
VMAO	+++	++	-	-	-

Conclusion:-

L'objectif de cette étude était d'isoler, de caractériser et d'identifier des souches de bactéries acétiques à partir d'un alcool de mangue fermenté. Au total vingt-huit souches de bactéries acétiques ont été isolées, dont vingt-sept appartenant au genre *Gluconoacetobacter* et une seule affiliée au genre *Acetobacter*. Le test de production nous a conduit au choix de cinq souches leaders avec un maximum d'acide acétique de 3,06% (m/v). Les cinétiques ont montré que les optima de croissance se situent respectivement entre 27°C et 40°C pour la température et entre 5 et 6,5 pour le pH. Enfin, le test de résistance à l'éthanol a montré que toutes les souches leaders tolèrent bien l'alcool et deux d'entre elles ont pu survivre à une concentration de 25% en éthanol (v/v). Ces résultats obtenus, appliqués à l'industrie du vinaigre pourraient conduire à l'obtention d'un vinaigre de meilleure qualité et aussi une baisse considérable du coût de refroidissement des bioréacteurs.

Références Bibliographiques:-

- Adachi, Osao, Eiji Miyagawa, Emiko Shinagawa, Kazunobu Matsushita, et Minoru Ameyama. 1978. « Purification and Properties of Particulate Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter Aceti*. » *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (12): 2331-40. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.42.2331>.
- Ayed, Lamia, Salwa Ben Abid, et Moktar Hamdi. 2017. « Development of a Beverage from Red Grape Juice Fermented with the Kombucha Consortium ». *Annals of Microbiology* 67 (1): 111-21. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>.
- Bartowsky, Eveline J., et Paul A. Henschke. 2008. « Acetic Acid Bacteria Spoilage of Bottled Red Wine—A Review ». *International Journal of Food Microbiology* 125 (1): 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016>.
- Cañete-Rodríguez, Ana M., Inés M. Santos-Dueñas, Jorge E. Jiménez-Hornero, Armin Ehrenreich, Wolfgang Liebl, et Isidoro García-García. 2016. « Gluconic Acid: Properties, Production Methods and Applications—An Excellent Opportunity for Agro-Industrial by-Products and Waste Bio-Valorization ». *Process Biochemistry* 51 (12): 1891-1903. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.028>.
- Chen, Yang, Ye Bai, Dongsheng Li, Chao Wang, Ning Xu, et Yong Hu. 2016. « Screening and Characterization of Ethanol-Tolerant and Thermotolerant Acetic Acid Bacteria from Chinese Vinegar Pei ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (1): 14. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1961-8>.
- Czaja, Wojciech K., David J. Young, Marek Kawecki, et R. Malcolm Brown. 2007. « The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications ». *Biomacromolecules* 8 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1021/bm060620d>.
- De Vero, Luciana, et Paolo Giudici. 2008. « Genus-Specific Profile of Acetic Acid Bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE ». *International Journal of Food Microbiology* 125 (1): 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.029>.
- Franke-Whittle, Ingrid H., Michael G. O'Shea, Graham J. Leonard, et Lindsay I. Sly. 2005. « Design, Development, and Use of Molecular Primers and Probes for the Detection of *Gluconoacetobacter* Species in the Pink Sugarcane Mealybug ». *Microbial Ecology* 50 (1): 128-39. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0138-z>.
- Gomes, Rodrigo José, Maria de Fatima Borges, Morsyleide de Freitas Rosa, Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez, et Wilma Aparecida Spinosa. 2018. « Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics

- and Applications ». *Food Technology and Biotechnology* 56 (2): 139-51. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>.
10. Gullo, Maria, et Paolo Giudici. 2008a. « Acetic Acid Bacteria in Traditional Balsamic Vinegar: Phenotypic Traits Relevant for Starter Cultures Selection ». *International Journal of Food Microbiology* 125 (1): 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.076>.
 11. ———. 2008b. « Acetic Acid Bacteria in Traditional Balsamic Vinegar: Phenotypic Traits Relevant for Starter Cultures Selection ». *International Journal of Food Microbiology* 125 (1): 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.076>.
 12. Gullo, Maria, Elena Verzelloni, et Matteo Canonico. 2014. « Aerobic Submerged Fermentation by Acetic Acid Bacteria for Vinegar Production: Process and Biotechnological Aspects ». *Process Biochemistry* 49 (10): 1571-79. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.003>.
 13. Hanmoungjai, Watcharee, Ekachai Chukeatirote, Wasu Pathom-aree, Yuzo Yamada, et Saisamorn Lumyoung. 2007. « Identification of Acidotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated from Thailand Sources ». *Research Journal of Microbiology* 2 (février): 194-97. <https://doi.org/10.3923/jm.2007.194.197>.
 14. Kersters, Karel, Puspita Lisdiyanti, Kazuo Komagata, et Jean Swings. 2006. « The Family Acetobacteraceae: The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia ». In *The Prokaryotes*, édité par Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, et Erko Stackebrandt, 163-200. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_9.
 15. Lynch, Kieran M., Emanuele Zannini, Stuart Wilkinson, Luk Daenen, et Elke K. Arendt. 2019. « Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18 (3): 587-625. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>.
 16. Mamlouk, Dhouha, et Maria Gullo. 2013. « Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation ». *Indian Journal of Microbiology* 53 (4): 377-84. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>.
 17. Ory, I. de, L. Enrique Romero, et D. Cantero. 1998. « Modelling the kinetics of growth of Acetobacter aceti in discontinuous culture: influence of the temperature of operation ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (2): 189-93. <https://doi.org/10.1007/s002530051157>.
 18. Pasteur, Louis. 1868. *Études sur le vinaigre, sa fabrication, ses maladies, moyens de les prévenir nouvelles observations sur la conservation des vins par la chaleur*. Paris: Gauthier-Villars.
 19. Pronk, J.T., P.R. Levering, W. Olijve, et J.P. van Dijken. 1989. « Role of NADP-Dependent and Quinoprotein Glucose Dehydrogenases in Gluconic Acid Production by Gluconobacter Oxydans ». *Enzyme and Microbial Technology* 11 (3): 160-64. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90075-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90075-6).
 20. Prust, Christina, Marc Hoffmeister, Heiko Liesegang, Arnim Wiezer, W. Florian Fricke, Armin Ehrenreich, Gerhard Gottschalk, et Uwe Deppenmeier. 2005. « Complete genome sequence of the acetic acid bacterium Gluconobacter oxydans ». *Nature biotechnology* 23 (mars): 195-200. <https://doi.org/10.1038/nbt1062>.
 21. Raspor, Peter, et Dušan Goranovič. 2008. « Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria ». *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (2): 101-24. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>.
 22. Sainz, F., D. Navarro, E. Mateo, M.J. Torija, et A. Mas. 2016. « Comparison of D-Gluconic Acid Production in Selected Strains of Acetic Acid Bacteria ». *International Journal of Food Microbiology* 222 (avril): 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.015>.
 23. Sengun, Ilkin Yucel, et Seniz Karabiyikli. 2011. « Importance of Acetic Acid Bacteria in Food Industry ». *Food Control* 22 (5): 647-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008>.
 24. Sharafi, SM, I Rasooli, et K Beheshti-Maal. 2010. « Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods ». *Iranian Journal of Microbiology* 2 (1): 38-45.
 25. Soumahoro, Souleymane, Ouattara G. Honoré, Goualié Bernadette, Gisèle Koua, Ginette Doué, et Sébastien Niamke. 2015. « Occurrence of High Acetic Acid-Producing Bacteria in Ivorian Cocoa Fermentation and Analysis of Their Response to Fermentative Stress ». *American Journal of BioScience* 3 (janvier): 70-79. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20150303.12>.
 26. Takemura, H, S Horinouchi, et T Beppu. 1991. « Novel Insertion Sequence IS1380 from Acetobacter Pasteurianus Is Involved in Loss of Ethanol-Oxidizing Ability. » *Journal of Bacteriology* 173 (22): 7070-76. <https://doi.org/10.1128/JB.173.22.7070-7076.1991>.
 27. Torija, M.J., E. Mateo, J.M. Guillamón, et A. Mas. 2010. « Identification and Quantification of Acetic Acid Bacteria in Wine and Vinegar by TaqMan–MGB Probes ». *Food Microbiology* 27 (2): 257-65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.001>.
 28. Vegas, Carlos, Estibaliz Mateo, Ángel González, Carla Jara, José Manuel Guillamón, Montse Poblet, M Jesús Torija, et Albert Mas. 2010. « Population Dynamics of Acetic Acid Bacteria during Traditional Wine Vinegar

- Production ». *International Journal of Food Microbiology* 138 (1-2): 130-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.006>.
29. Wei, Ke, Xiaohong Cao, Xin Li, Chunling Wang, et Lihua Hou. 2012. « Genome Shuffling to Improve Fermentation Properties of Acetic Acid Bacterium by the Improvement of Ethanol Tolerance: Shuffling of Bacterium to Improve Its Traits ». *International Journal of Food Science & Technology* 47 (10): 2184-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03086.x>.
30. W.j, Du Toit, et Pretorius I.s. 2002. « The Occurrence, Control and Esoteric Effect of Acetic Acid Bacteria in Winemaking ». <https://scholar.sun.ac.za:443/handle/10019.1/11879>.
31. Yamada, Yuzo, et Keiji Kondo. 1984. « Gluconoacetobacter, a New Subgenus Comprising the Acetate-Oxidizing Acetic Acid Bacteria with Ubiquinone-10 in the Genus Acetobacter. » *The Journal of General and Applied Microbiology* 30 (4): 297-303. <https://doi.org/10.2323/jgam.30.297>.
32. Yamada, Yuzo, Pattaraporn Yukphan, Huong Thi Lan Vu, Yuki Muramatsu, Duangjai Ochaikul, et Yasuyoshi Nakagawa. 2012. « Subdivision of the Genus Gluconacetobacter Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The Proposal of Komagatabacter Gen. Nov., for Strains Accommodated to the Gluconacetobacter Xylinus Group in the α -Proteobacteria ». *Annals of Microbiology* 62 (2): 849-59. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0288-4>.
33. Yetiman, Ahmet E., et Zülal Kesmen. 2015. « Identification of Acetic Acid Bacteria in Traditionally Produced Vinegar and Mother of Vinegar by Using Different Molecular Techniques ». *International Journal of Food Microbiology* 204 (juillet): 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.013>.