

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie – Microbiologie



THÈSE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

En Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies

Thème

Valorisation des sous-produits oléicoles par bioconversion

Présentée par : M^{elle} DERMECHE Samia

Devant le jury :

Président :	M^r HOUALI Karim	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou
Directrice de thèse :	M^{me} MOULTI-MATI Farida	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou
Examineurs :	M^{me} BENAHMED DJILALI Adiba	Maître de Conférences à l'Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou
	M^r RIBA Amar	Professeur à l'Université M'Hamed Bougara, Boumerdes
	M^r NOUANI Abdelouahab	Professeur à l'Université M'Hamed Bougara, Boumerdes
	M^r YABRIR Benalia	Maître de Conférences à l'Université Ziane Achour, Djelfa

Soutenue le 12/03/2020

Remerciements

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet de thèse.

En premier lieu, mes plus vifs remerciements s'adressent à ma Directrice de thèse, Professeur MOULTI-MATI Farida de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour m'avoir proposé de faire une thèse sous sa direction, sa gentillesse, ses qualités humaines, son soutien continu et pour tous les conseils qu'elle m'a prodigués au parcours de cette thèse. Je la remercie profondément pour ses encouragements et sa disponibilité.

J'adresse ma plus grande gratitude et mes plus chaleureux remerciements au Professeur Christian LARROCHE, de l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (France), pour m'avoir accueillie au sein de ses laboratoires et pour m'avoir permis de mener mon travail expérimental dans les meilleures conditions. Je lui suis très reconnaissante pour sa disponibilité et ses conseils lors des réunions. Je le remercie pour m'avoir fait découvrir le monde des consortia microbiens et des fermentations anaérobies.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également au Professeur Philippe MICHAUD, de l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (France), pour m'avoir accueillie et permis de réaliser le travail expérimental dans les meilleures conditions. Je lui suis très reconnaissante pour avoir toujours facilité mon installation au cours de mes séjours à Clermont-Ferrand, malgré ses préoccupations.

J'adresse tous mes remerciements au professeur Abderrahmane MATI, Directeur du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de mes expérimentations. Je le remercie vivement pour tout son soutien, ses encouragements pour progresser dans nos recherches et pour tous ses précieux conseils depuis la graduation.

J'adresse mes chaleureux remerciement au Docteur Nadine ESSAYEM Directrice de Recherche au CNRS, Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon, IRCELYON-CNRS. Je la remercie infiniment pour m'avoir fait découvrir plusieurs méthodes analytiques.

.....
Je tiens à remercier vivement les membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer et critiquer ce travail.

Merci à Mr HOUALI KARIM, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements.

Je suis très honorée par la présence dans mon jury de thèse, de Mme BENAHMED DJILALI Adiba, Maître de Conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mr RIBA Amar, Professeur à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, pour l'honneur qu'il me fait d'être examinateur de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Mr NOUANI Abdelouahab, Professeur à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, et Mr YABRIR Benalia, Maître de Conférences à l'université Ziane Achour de Djelfa, je suis particulièrement reconnaissante et honorée par leur participation au jury de ma thèse.

.....

Mes remerciements s'adressent également aux personnes avec lesquelles j'ai collaboré au cours de cette thèse, sous la responsabilité du Professeur Philippe MICHAUD, et en particulier à Mr Pierre FONTANILLE Maître Conférences HDR à l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal.

J'adresse mes profonds remerciements et respect au Docteur Régis NOUAILLE du Laboratoire Microorganismes génome et environnement (LMGE), je lui suis très reconnaissante pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses qualités humaines et conseils avisés qui ont toujours été très constructifs et ont participé grandement à ma formation. Je tiens aussi à le remercier pour avoir toujours été présent lors des premières étapes des manipulations, Merci infiniment Régis.

Je voudrais exprimer ma plus grande gratitude envers le Professeur Edouardo Sydney-Bittencourt, pour m'avoir initié à entamer les premiers pas dans le monde des cultures anaérobies.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 de l'Université Blaise Pascal en particulier Madame Christine GARDARIN, Marilline THEVENIOT et Aurélie BOURNILLHAS du LMGE, techniciennes de laboratoire, pour leur aide précieuse et l'initiation au fonctionnement de plusieurs instruments de laboratoire notamment HPLC et GC.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire LABAB et mes collègues de la faculté des sciences, départements de chimie, pour leur aide et encouragements.

Des remerciements particuliers et chaleureux s'adressent à mes amies, Malika Nadour, Saliha Si-Ahmed, Souad Isselnane, Amel Ghazi, Katia Asmani et Thanina Afif Chaouache, je leur dis Merci pour votre soutien permanent, votre compréhension, encouragement et surtout vos qualités humaines. Je vous suis très reconnaissante mes amies.

Merci également, à mes collègues, Rym Salah, Djamila Messaoudi, Samia Bedouhène, Nadia Lardjane et Saida Mouhoune, pour leur encouragement et amitiés.

Je n'oublie pas de remercier Nariman Mati, Reeta Singhania, Aurélie Bournillhas pour leur agréable compagnie et leurs bonnes humeurs lors de mon séjour à Clermont Ferrand.

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien permanent. J'adresse mes remerciements particuliers à mes parents pour leur amour et leur soutien inconditionnel tout au long de cette thèse et durant toutes mes années d'études, je ne les remercierai jamais assez. Un grand merci à ma sœur, mes frères, ma belle-sœur, sans oublier mes adorables petits neveux qui nous procurent beaucoup de joie et de bonheur.

*No discovery is
useless, no curiosity misplaced or too
ambitious, and we may be certain that
every advance achieved in the quest of
pure knowledge will
sooner or later play its part in the service of man.*

Ernest Henry Starling

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

1^{ère} partie : Revue bibliographique

I. Génération et caractérisation des sous-produits oléicoles 3

1.1. Oléiculture, production de l'huile d'olive 3

1.1.1. Production à l'échelle mondiale 3

1.1.2. Production à l'échelle nationale 3

1.1.3. Génération des sous-produits oléicoles 4

1.2. Procédés d'extraction de l'huile d'olive 6

1.2.1. Préparation des olives pour l'extraction 6

1.2.2. Procédé discontinu d'extraction par presse 6

1.2.3. Procédé continu d'extraction par centrifugation 7

1.2.3.1. Procédé d'extraction à trois phases 8

1.2.3.2. Procédé d'extraction à deux phases 8

1.3. Paramètres d'extraction responsables de la qualité de l'huile d'olive et des margines 11

1.3.1. Addition de l'eau 11

1.3.2. Oxygène ou aération 11

1.3.3. Température et durée de malaxation 14

1.3.4. Propriétés rhéologiques de la pâte d'olives 14

1.3.5. Addition de co-adjuvants 14

1.4. Description des sous-produits oléicoles et impact de leur rejet sur l'environnement 15

1.4.1. Caractérisation physico-chimiques des margines et des grignons 15

1.4.1.1. Composition générale 15

1.4.1.2. Fraction phénolique des margines et des grignons 15

1.4.2. Caractéristiques microbiologiques 17

1.4.3. Impacts des sous-produits oléicoles sur l'environnement 17

1.4.3.1. Pollution de l'atmosphère	18
1.4.3.2. Pollution des ressources en eaux et effet sur la vie aquatique	19
1.4.3.3. Pollution du sol.....	19
II. Valorisation biochimique des margines et des grignons	21
2.1. Extraction de biomolécules d'intérêt et applications	21
2.1.1. Composés phénoliques des margines et des grignons.....	21
2.1.2. Récupération des lipides, polysaccharides et pectines d'intérêt	23
2.1.2.1. Lipides.....	23
2.1.2.2. Polysaccharides	23
2.2. Avancées récentes sur les bioactivités des margines et leurs extraits phénoliques .	26
2.2.1. Propriétés antioxydantes des polyphénols	26
2.2.2. Propriétés physiologiques	26
2.2.3. Potentiel antimicrobien.....	27
2.2.3.1. Préservation des aliments et santé	27
2.2.3.2. Préservation des plantes et des cultures	29
2.2.3.3. Mécanismes antimicrobiens des composés phénoliques	30
III. Valorisation biotechnologique : bioconversion et dépollution des sous-produits oléicoles	31
3.1. Biodépollution.....	31
3.2. Bioconversion en biomolécules d'intérêt	34
3.2.1. Etapes de la bio-digestion anaérobie	35
3.2.1.1. Hydrolyse de la biomasse organique	35
3.2.1.2. Acidogénèse et production de biohydrogène	35
3.2.1.3. Biométhanisation	38
3.2.2. Voies biochimiques et microorganismes impliqués dans la production de biohydrogène.....	38
3.2.3. Microorganismes consommateurs de biohydrogène	40
3.2.4. Produits de valeur issus de la production de biohydrogène.....	41
3.2.5. Facteurs pouvant moduler la production de biohydrogène.....	41
3.2.5.1. Inoculum et méthodes d'enrichissement.....	42
3.2.5.2. Traitements chimiques et aération	42
3.2.5.3. Effet du potentiel d'hydrogène	44

3.2.5.4. Pression partielle en biohydrogène	45
3.2.5.5. Prétraitement du substrat en vue d'augmenter le rendement en biohydrogène ..	45
3.3. Valorisation bio-énergétique des margines et des grignons	46
3.3.1. Biohydrogène	46
3.3.2. Acides gras volatils	47
3.3.3. Biométhane	50
3.3.4. Lipides pour biodiesel	51
3.4. Bioconversion en biopolymères et autres biomolécules	52
3.4.1. Bioéthanol	52
3.4.2. Polysaccharides	52
3.4.3. Biosurfactants.....	53
3.4.4. Acide citrique	53
3.4.5. Protéines et champignons comestibles	53
3.4.6. Bioconversion en enzymes	54
3.5. Autres applications et utilisations agricoles	56
3.5.1. Margines brutes	56
3.5.3. Margines issues des bioconversions	56
3.5.4. Compostage.....	57
3.5.5. Fibres alimentaires	58

2^{ème} partie : partie expérimentale

I. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel	60
1.1.1. Appareils.....	60
1.1.2. Consommable	60
1.1.3. Réactifs, produits chimiques et milieux de cultures.....	61
1.1.4. Substrats de culture : margines et grignons	61
1.1.5. Micro-organismes utilisés	61
1.1.5.1. Souches microbiennes et consortia utilisés lors des bioconversions	62
1.1.5.2. Souches utilisées pour les activités antimicrobiennes	62
1.2. Méthodes	62
1.2.1. Caractérisation des substrats (margines et grignons)	62
1.2.1.1. Détermination de la matière sèche totale	62

1.2.1.2. Teneur en cendres et en matières organiques.....	63
1.2.1.3. Demande chimique en oxygène	63
1.2.1.4. Dosage des composés phénoliques.....	64
1.2.1.5. Analyse de la composition du grignon en biopolymères.....	64
1.2.2. Mise en route des fermentations anaérobies	66
1.2.2.1. Inocula microbiens pour les fermentations anaérobies.....	66
1.2.2.2. Conditions opératoires	67
1.2.2.3. Préparation des milieux.....	67
1.2.3. Potentiel biochimique en biohydrogène (BHP)	69
1.2.3.1. Consortia microbiens reconstitués sans méthanogènes	69
1.2.3.2. Expérimentation en tubes Hungate et en flacons en verre.....	70
1.2.3.4. Cultures sous évacuation continue de biogaz dans les flacons	72
1.2.3.5. Expériences conduites en bioréacteur de 7 litres.....	73
1.2.3.6. Culture du microbiote ruminal sur margines après extraction des polyphénols ..	73
1.2.4. Potentiel biochimique de biométhanisation (BMP)	74
1.2.4.1. Biométhanisation en bouteilles	74
1.2.4.2. Biométhanisation dans des réacteurs contrôlés par un système automatisé (AMPTS)	74
1.2.5. Analyse des produits issus des fermentations anaérobies	75
1.2.5.1. Analyse qualitative et quantitative des biogaz	75
1.2.5.2. Analyse de la phase liquide.....	76
1.2.5.3. Analyse de la complexité des populations microbiennes	77
1.2.6. Evaluation de la croissance de levures oléagineuses et de lactobacilles probiotiques sur les margines	78
1.2.6.1. Levures oléagineuses	79
1.2.6.2. Bactéries probiotiques.....	79
1.2.6.3. Production des inocula.....	79
1.2.6.4. Evaluation de la croissance cellulaire	79
1.2.7. Extraction des polyphénols	81
1.2.7.1. Préparation des extraits organiques de margines	81
1.2.8. Activités biologiques des fractions phénoliques extraites de margines	83
1.2.8.1. Mise en évidence de l'activité antioxydante	83
1.2.8.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne	84
1.2.8.5. Screening de souches formatrices de biofilm.....	88

1.2.8.6. Évaluation de l'activité antibiofilm	88
II. RESULTATS ET DISCUSSIONS	89
2.1. Quelques caractéristiques physico-chimiques des substrats utilisés	89
2.1.1. Margines	89
2.1.2. Grignons	91
2.2. Bioconversion des sous-produits oléicoles en biohydrogène.....	93
2.2.1. Fermentations anaérobies en tubes Hungate et sélection des biodigesteurs.....	93
2.2.1.1. Biomolécules produites par les fermentations	93
2.2.1.2. Analyse RMN des phases liquides après fermentation.....	96
2.2.1.3. Sensibilité des consortia sélectionnés aux margines brutes	97
2.2.1.4. Sélection des consortia acclimatés	98
2.2.1.5. Comportement des biodigesteurs libres où traités au BES	100
2.2.1.6. Réponse des biodigesteurs préalablement traités au BES.....	100
2.2.1.7. Comportement des biodigesteurs sous l'effet de la pression du biogaz	105
2.2.1.8. Discussion à propos de la diversité dans les acides gras volatils et autres biomolécules d'intérêt.....	109
2.2.1.9. Biodigestion anaérobie des margines après extraction des polyphénols	112
2.2.1.10. Mise en évidence et contrôle de la complexité des consortia microbiens	117
2.3. Potentiel biochimique de la biométhanisation des sous-produits oléicoles	118
2.3.1. Culture en flacons.....	118
2.3.2. Culture en réacteur type AMPTS.....	121
2.4. Evaluation de la croissance de levures oléagineuses et de lactobacilles sur les margines	
2.4.1. Les levures	126
2.4.1.1. Cultures sur les margines brutes et diluées	126
2.4.1.2. Culture sur les margines enrichies.....	126
2.4.2. Croissance des lactobacilles en présence de margines	130
2.4.2.1. Expériences conduites sur les margines du système par presse	130
2.4.2.2. Expériences conduites avec les margines du système à trois phases	131
2.5. Bioactivités des margines et de leurs extraits.....	135
2.5.1. Activités antioxydantes	135
2.5.2. Activités antibactériennes des margines et de leurs extraits.....	137
2.5.2.1. Margines brutes	137

2.5.2.2. Extraits organiques	137
2.5.2.3. Concentration minimale inhibitrice	144
2.5.2.4. Extraits de margines issues du système semi-moderne par presse.....	146
2.5.2.5. Activité antibiofilm de l'extrait de margines vis-à-vis de souches uropathogènes	148
2.6. Discussion générale	152
2.6.1. Potentiel inhibiteurs des margines	152
2.6.2. Potentiel de production en biohydrogène	153
2.6.2.1. Obstacles et avantages des cultures mixtes.....	153
2.6.2.2. Inhibition de la méthanogenèse et avantages du procédé	156
2.6.2.3. Les acides gras volatils	156
2.6.3. Culture de levures et de lactobacilles	156
2.6.4. Valorisations énergétiques combinées et/ou dépollution	158
2.6.5. Rôle antimicrobien	159
Conclusion générale et perspectives.....	162
Références bibliographiques	
Communications et publications	
Annexes	

Résumé

Résumé

Les sous-produits oléicoles (SPO) peuvent engendrer de réels problèmes écologiques sans aucun traitement préalable avant leur dissipation dans l'environnement. Par conséquent, les voies biotechnologiques visant aussi bien leur bioconversion en biomolécules d'intérêt ainsi que l'exploitation de leurs polyphénols, suscitent un grand intérêt. Dans ce contexte, des margines et grignons d'olives de variété *Chamlal* ont été soumis à des traitements de bioconversion avec des consortia microbiens, souches de clostridium pures, levures oléagineuses et des lactobacilles. Les margines et leurs fractions phénoliques ont été évaluées pour leur potentiel antimicrobien et antioxydant.

Le volet expérimental était focalisé sur la faisabilité de bioconversion des SPO via la fermentation anaérobie par différents consortia microbiens. Il en ressort des résultats que la production de Bio-H₂, de biométhane et des acides gras volatils (AGVs) pourrait non seulement être affectée par le prétraitement au suppresseur de méthanogènes, le sulfonate de bromoéthane (BES), mais également être reliée à la charge organique du substrat, teneurs en polyphénols et aux potentialités métaboliques des biodigesteurs microbiens. Les charges organiques élevées en substrat se sont révélées anti-méthanogènes.

Les margines brutes se sont révélées inhibitrices de la croissance des consortia mais aussi de levures oléagineuses et de souches probiotiques. En revanche, au regard de ces deux derniers groupes microbiens, la dilution et/ou l'enrichissement des margines permet leur survie, prolifération et une réduction concomitante de polyphénols. *Yarrowia lipolytica* a montré une croissance remarquable en plus de l'élimination des polyphénols sur les margines diluées.

En vue d'améliorer le bioprocédé, l'extraction des polyphénols s'est avérée d'une part, une solution pour lever l'inhibition vis-à-vis des bioconversions et d'autre part, une valorisation à visée alimentaire et médicale. En effet, les tests antimicrobiens et antibiofilm contre des souches pathogènes ont permis de mettre en relief l'ensemble des extraits phénoliques comme des molécules bioactives intéressantes. De plus, des activités antioxydantes, appréciables ont été enregistrées avec le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

La valorisation énergétique (AGVs et Bio-H₂), l'extraction de lipides à partir des levures oléagineuses pourraient être des volets cibles pour de futures investigations. Les extraits phénoliques ouvrent une voie prometteuse de lutte biologique contre les bactéries pathogènes humaines, d'altération alimentaire et phyto-pathogènes.

Le couplage entre un procédé plus écologique pour l'extraction des polyphénols des margines et un bioprocédé de digestion subséquente, du substrat exemptes de polyphénols, pourraient être considérées comme une option de bioremédiation attractive.

Mots clés : Sous-produits oléicoles, bioconversion, biohydrogène, acides gras volatils, biométhane, polyphénols, bioactivités.

Abstract

Through olive oil extraction processes a considerable volumes of olive mill by-products (OMBP) are annually provided and need a specific management minimizing their negative environmental impact. In this context, the current investigation focuses on biotechnological exploitation of olive mill wastes, from olive oil industry using *Chemlali* variety olive trees in Algeria.

The potential of OMBP as nutrient resources for biofuels and microbial biomass production was assessed respectively, by mean of microbial consortia developed from different ecosystems, oleaginous yeasts and lactobacilli. Biohydrogen, biomethane and volatile fatty acids (VFAs) production were not only related to BES pretreatment but also to substrate concentration and the biological performance of the consortia. Both, high concentration and BES inhibit the fermentation activity of methanogenic microorganisms in all cases. The main accumulated VFAs were acetate and butyrate.

Polyphenols recovery and OMBP dilution provides not only high added value antioxidants and antimicrobial biomolecules, but also led to help the digestibility toward the bio-energetic anaerobic bioconversion. Antibacterial screening trials were carried out with polyphenolic extracts from OMBP by agar diffusion disc and antibiofilm assays, which revealed significant effects against food born, meat spoiling, soft rots plant and pathogenic bacteria.

Polyphenols antioxidant activity experiments provides a scavenging capacity toward the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Half diluted as well as residual OMBP from extraction subjected to subsequent anaerobic batch digester, produced biogas and a mixture of volatile fatty acids (VFAs) mainly composed by acetic and butyric acids.

Phenolic extracts from OMW could be considered as interesting antioxidants and antibacterial agents against pathogenic and food spoiling bacteria to replace the synthetic medicines. VFAs as well as biohydrogen should be the targeted metabolites for this process under high concentration. The coupling between an eco-friendly polyphenol extraction method and a subsequent digestion process of the residual substrate could be considered as an attractive bioremediation option.

Keywords: Olive mill byproducts, bioconversion, biohydrogen, biomethane, volatil fatty acids, polyphénols, bioactivities.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution de la production mondiale de l'huile d'olive et sa répartition géographique	5
Figure 2. Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne	5
Figure 3. Système discontinu d'extraction de l'huile d'olive par presse.....	7
Figure 4. Système continu d'extraction de l'huile d'olive par centrifugation à trois phases.....	9
Figure 5. Système continu d'extraction de l'huile d'olive par centrifugation à deux phases ..	10
Figure 6. Etapes du système d'extraction de l'huile d'olive à trois phases et paramètres responsables de la qualité de le l'huile et des SPO	12
Figure 7. Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'extraction de l'huile d'olive	13
Figure 8. Conséquences écologiques des rejets de margines dans le milieu naturel.....	20
Figure 9. Diagramme général représentant les différentes voies de valorisation biotechnologiques des sous-produits oléicoles	22
Figure 10. Structure des principaux composés phénoliques des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive.....	24
Figure 11. Voies fermentaires possibles et micro-organismes impliqués	34
Figure 12. Structure des AGVs	36
Figure 13. Etapes de biodégradation et les voies microbiologiques impliquées dans la fermentation des déchets.....	37
Figure 14. Stratégies employées pour l'amélioration du rendement en biohydrogène durant la voie fermentaire sombre de substrats organiques	43
Figure 15. Bioprocédé en deux étapes pour la production de biohydrogène et du biométhane à partir de déchets organiques.....	43
Figure 16. Diagramme retraçant les différentes voies investiguées au cours de cette thèse ...	59
Figure 17. Protocole de dosage des polyphénols des margines	64
Figure 18. Diagramme descriptif de l'ensemble des étapes entreprises pour l'analyse de la composition des grignons d'olive	65
Figure 19. Photographie du réacteur d'hydrolyse et des hydrolysats du grignon d'olive	65
Figure 20. Récapitulatif de l'ensemble des tests et analyses réalisé pour la fermentation anaérobie des SPO.....	68
Figure 21. Photographies montrant la préparation des milieux à base de margines pour la méthanisation	69
Figure 22. Photographies montrant la préparation et répartition des milieux en flacons	71
Figure 23. Photographies montrant la répartition des milieux à base de margines en tubes Hungate sous flux de CO ₂	71
Figure 24. Schéma du montage de mesure des volumes de biogaz sous éprouvettes	72
Figure 25. Schéma du bioréacteur anaérobie de 7 litres	73
Figure 26. Photographie montrant la fermentation en réacteur de méthanisation	75
Figure 27. Photographies illustrant la collecte et l'analyse directe du biogaz produit	76
Figure 28. Préparation des échantillons pour la recherche d'AGVs par analyse HPLC	77
Figure 29. Etapes de culture et de dénombrement des souches	80
Figure 30. Protocole d'obtention des polyphénols à partir des margines	81

Figure 31. Protocole d'extraction des polyphénols des margines après délipidation.....	82
Figure 32. Dispositif d'évaporation des solvants d'extraction sous flux	82
Figure 33. Récupération des composés phénoliques en vue de tester leurs bioactivités	83
Figure 34. Structure du DPPH-et sa réduction par l'antioxydant RH.....	84
Figure 35. Méthodes utilisées pour l'étude des activités antimicrobiennes.....	85
Figure 36. Pourcentage en Bio-H ₂ produits à partir des fermentations	94
Figure 37. Potentiel de bioconversion des margines diluées en Bio-H ₂ par les consortia	95
Figure 38. Résultat de l'analyse qualitative et quantitative par RMN des AGVs produits par le consortium AC et la souche pure RA cultivés sur le grignon et les margines	97
Figure 39. Potentiel de production en biohydrogène et en AGVs (butyrate/acétate) sur des margines concentrées à 38 ± 1,9 g DCO /L.....	98
Figure 40. Résultats des BHP obtenus en fin de fermentation avec ou sans évacuation continue du biogaz.....	105
Figure 41. Cinétique de production de biomolécules produites en Bioréacteur	108
Figure 42. Diagramme regroupant la stratégie de couplage entre l'extraction de CP et la fermentation des margines résiduelles.....	113
Figure 43. Rendement en Bio-H ₂ produit par digestion anaérobie des margines diluées et des margines déphénolisées par le microbiote ruminal (RM)	114
Figure 44. Pourcentage en Bio-H ₂ et rendement en biogaz produit par digestion anaérobie des margines diluées et des margines déphénolisées par le microbiote ruminal RM	115
Figure 45. Profil sur gels TTGE obtenus pour les consortia (AC, PBR et MR) au cours des cultures conduites en tubes Hungate	118
Figure 46. Composition du biogaz du test BMP sur AMPTS.....	122
Figure 47. Cinétique de production du biogaz du test BMP sur AMPTS	122
Figure 48. Exemple d'un graphe de l'analyse HPLC des AGVs produits dans la phase liquide Fermentation en AMPTS avec le consortia LBMA	123
Figure 49. Biogaz cumulé du test BMP sur AMPTS	124
Figure 50. Croissance de bactéries probiotiques sur milieu MRS enrichi avec les margines.	133
Figure 51. Valeurs IC ₅₀ obtenues pour différents extraits phénoliques	136
Figure 52. Activité antibiofilm d'extraits de margines vis à vis de souches uropathogènes .	149
Figure 53. Activité antibiofilm d'un extrait de margines vis à vis de souches de référence .	150
Figure 54. Composantes principales d'un bioprocédé fermentaire	152
Figure 55. Molécules cibles de bionconvesion anaérobie des margines	155
Figure 56. Réponse des levures aux substrats de fermentation.....	157
Figure 57. Diagramme récapitulant les paramètres étudiés, leur importance, obstacle et solution à présager pour un procédé en scal-up	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques physico-chimiques des margines et des grignons d'olives.....	16
Tableau II. Déphénolisation des sous-produits oléicoles par des traitements microbiens	32
Tableau III. Diversité physiologique des voies de production de bio-hydrogène	40
Tableau IV. Bioconversion des sous-produits oléicoles en biométhane et en biohydrogène par un procédé unique et / ou combiné.....	48
Tableau V. Milieux de culture utilisés	61
Tableau VI. Récapitulatif de l'ensemble des souches et consortia utilisés	70
Tableau VII. Paramètres et conditions initiales des cultures réalisées en AMPTS avec les margines.....	75
Tableau VIII. Microorganismes fongiques et bactériens utilisés pour la fermentation des margines.....	78
Tableau IX. Souches bactériennes de référence utilisées lors des tests antimicrobiens	86
Tableau X. Souches uropathogènes testées pour leurs sensibilités vis-à-vis des extraits de margines	86
Tableau XI. Quelques caractéristiques physicochimiques des margines employées pour les bioconversions	89
Tableau XII. Résultat de l'analyse qualitative et/ou quantitative des biopolymères, matière organique et minérale contenus dans les grignons	92
Tableau XIII. Production d'AGVs et d'autres biomolécules à partir de margines diluées ...	94
Tableau XIV. Profil en AGVs et autres biomolécules solubles produits par le consortium MR sur des margines concentrées à $38 \pm 1,9$ g DCO /L.....	99
Tableau XV. Profil en AGVs et autres biomolécules solubles produits par le consortium AC, préalablement acclimaté, sur des margines concentrées à $38 \pm 1,9$ g DCO /L.....	99
Tableau XVI. Profil en AGVs et autres biomolécules solubles produits par le consortium PBR, préalablement acclimaté, sur des margines concentrées à $38 \pm 1,9$ g DCO /L	99
Tableau XVII. Résumé de différents rendements en biohydrogène et biométhane obtenus à partir de substrats (margines et grignons), en conditions similaires, comparés à ceux de la présente étude.....	102
Tableau XVIII. Biomolécules produites, en phase liquide en fin de fermentation avec ou sans évacuation continue du biogaz	106
Tableau XIX. AGVs et autres métabolites détectés dans la phase liquide (g/L) après digestion anaérobie des margines diluées et des margines déphénolisées par le microbiote ruminal RM	116
Tableau XX. Biométhanisation des margines avec le consortium LBM	120
Tableau XXI. Résultats de l'analyse HPLC de la phase liquide du test AMPTS après 15 jours de culture.....	123
Tableau XXII. Volume de biogaz cumulé en fin de la culture et le résultat en BMP	124
Tableau XXIII. Evaluation de la croissance des levures et des lactobacilles sur les margines	127
Tableau XXIV. Biomasse produite par <i>Yarrowia lipolytica</i> sur les margines issues du système par presse	128

Tableau XXV. Biomasse produite par <i>Cryptococcus curvatus</i> sur les margines issues du système par presse	128
Tableau XXVI. Teneurs en polyphénols, exprimées en équivalent d'acide gallique (mgEAG/g MST), contenues dans les margines brutes ou diluées avant et après fermentation	129
Tableau XXVII. Croissance de <i>L. rhamnosus</i> sur les margines issues du système par presse	130
Tableau XXVIII. Croissance de <i>L. casei</i> sur les margines issues du système par presse	130
Tableau XXIX. Diamètres d'inhibition exercés par les extraits de margines vis à vis des souches testées	138
Tableau XXX. Résumé sur les différents résultats antimicrobiens des margines ou de leurs extraits enregistrés dans de similaires ou différentes conditions comparées à la présente étude	142
Tableau XXXI. Valeurs des CMI enregistrées pour l'extrait de margines	144
Tableau XXXII. Diamètres des zones d'inhibition exercées par les extraits phénoliques des margines, avant et après fermentation avec les levures et les lactobacilles, contre des bactéries pathogènes et d'altération des aliments (moyennes \pm SD)	146
Tableau XXXIII. Les margines comme source d'additifs alimentaires antimicrobiens et de fongicides attractifs	160

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Acétate	Eth : Ethanol
AC : Consortium acidogénique de la microflore du rumen	For : Formiate
ADN : Acide désoxyribonucléique	FS : Fermentation sombre
AG : Acide gallique	GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
AGVs : Acides gras volatils	Glc : Glucose
AMPTS : Système automatique pour le teste de potentiel de biométhanisation “Automatic Methane Potentiel Test System”	Gly : Glycérol
ARN : Acide désoxy-ribonucléotide	HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
ATCC : American Type Culture Collection	IC50 : Concentration en extrait qui inhibe 50% du DPPH.
BES : Bromo Ethane Sulfoate	Isoval : Isovalerate
BHIB : Bouillon Infusion cœur-cervelle “Brain Heart Infusion Broth”	Lac : lactate
BHP : Potentiel Biochimique en Biohydrogène “Biochemical Hydrogen Potential”	LB : <i>Lactobacillus</i>
BMP : Potentiel Biochimique de Biométhanisation, “Biochemical Methane Potential”	LBM : consortium de Fumier
But : Butyrate	LBMA : consortium de Fumier A
C6 : Isolat Clostridium	LCM : Fumier de vache “cow manure consortium”
CG : Chromatographie gazeuse	MDGR : Margines diluées + grignon,
CMI : Concentration minimale inhibitrice	MDPR : Margines diluées + pulpe résiduelle du grignon.
COI : Conseil Oléicole International	ME1 : Margines après extraction des CP (acidification avec HCL)
COR : Charge organique	ME2 : Margines après extraction des CP (acidification avec H ₃ PO ₄).
CP : Composés phénoliques	EE : Extrait à l’acétate d’éthyle
PPT : polyphénols totaux	EE1 : Extrait à l’acétate d’éthyle (HCl) ;
C. curvatus : <i>Cryptococcus curvatus</i>	EE2 : Extrait à l’acétate d’éthyle (H ₃ PO ₄) ;
CSTR : Réacteur agité en batch “Complete stirred tank reactor”	EE1d : EE1 délipidé
CV : Cristal violet	ME1GR : ME1+ grignon ;
DA : Digestion anaérobie	ME2GR : ME2 + grignon ;
DBO : Demande biologique en oxygène	ME1PR : ME1+ pulpe résiduelle du grignon ;
DCO : Demande chimique en oxygène	ME2PR : ME2 + pulpe résiduelle du grignon ;
DMSO : Diméthylsulfoxyde	M : Margines brutes
DO : Densité optique	M1 : Margines issues du système à trois phases
DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle	M2 : Margines issues du système d’extraction à trois phases
EAG : Equivalent en acide gallique	M3 : Margines issues du système d’extraction à trois phasiques

M4 : Margines issues du système d'extraction semi-moderne par presse
MAR : microflore de margines
L. acidophilus : *Lactobacillus acidophilus*
L.bevis : *Lactobacillus bevis*
L.Casei : *Lactobacillus casei*
L.gaseri : *Lactobacillus graisei*
L. paracasei : *Lactobacillus paracasei*
L. Rhannosus : *Lactobacillus Rhamnosus*
MD : Margines diluées
DE1 : Extrait au diéthyl éther ;
DE1d : Extrait au diéthyl éther délipidé ;
MEA : Gélose à l'extrait de malt
 « Malt Extract Agar »
MEB : Bouillon à l'extrait de malt
 « Malt Extract Broth »
MH : Bouillon Mueller-Hinton
 « Mueller-Hinton Broth »
MHA : Gélose Mueller Hinton
 « Mueller-Hinton Agar »
MPR: Grignon broyé
 « milled olive mill pomace residue »
MR: Microflore additionné au fumier
MRS : Milieu de Man-Rogosa- Sharpe
MRSA : « Man Rogosa and Sharpe Agar »
MRSB : Bouillon Man Rogosa « Man-Rogosa- Sharpe Broth »
MST : Matière sèche totale
MSV : Matière sèche volatile
NmL : Normaux litres

PBR: Anoxic zone of the Pavin Lake consortium.
PBS : Phosphate buffered saline
PCR: « Polymerase Chain Reaction »
PHA : Polyhydroxyalcanoate
PREE : Extrait de grignon à l'acétate d'éthyle
Pro : Propionate
Qsp : Quantité suffisante pour
RA : *Ruminococcus sp*
Rha : Rhamnose
RM : Microflore du rumen
RMN: Raisonance Magnétique Nucléaire
Rpm : Rotation par minute
SBR : Sequencing Batch Reactor
SPO : Sous-produits oléicoles
Succ : Succinate
TC : teneur en cendre
TGGE: Electrophorèse en gel avec gradient temporelle de température.
 « Temporal Temperature Gel Gradient Electrophoresis »
TRH : Temps de rétention hydraulique
UFC : Unité Formant Colonie
Val : Valérate
VINA: Vinasse consortium
Y. Lipolytica : *Yarrowia lipolytica*

Introduction générale

L'arboriculture fruitière est très diversifiée en Algérie. Elle est constituée essentiellement de l'olivier, du figuier, de la vigne et des agrumes, lesquels sont les espèces les plus importantes sur le plan économique et social. L'oléiculture est une activité ancestrale, elle constitue un moyen de satisfaction des besoins alimentaires et un patrimoine culturel en Algérie. C'est une pratique traditionnelle, plus particulièrement en Kabylie, où la variété *Chamlal* prédomine. De nos jours, l'oléiculture et l'industrie de l'extraction de l'huile d'olive sont en pleine extension en raison des apports bénéfiques des produits de l'olivier pour la santé et de l'importance de ce dernier, tant que sur le plan agro-économique, sociale et environnementale.

À l'échelle mondiale, selon le Conseil Oléicole International (COI), 29×10^5 tonnes d'huile d'olive sont produites annuellement, plus particulièrement, dans les régions méditerranéennes comme l'Espagne, l'Italie, la Grèce, le Portugal, la Turquie, la Syrie, la Tunisie et l'Algérie. Parallèlement à l'extraction de l'huile d'olive, les industries oléicoles génèrent deux types de résidus, une fraction solide appelée grignon et une fraction liquide communément désignée sous le nom de margines. Les grignons correspondent aux sous-produits solides composés de résidus de pulpe et de fragments de noyaux alors que les margines correspondent aux effluents liquides. A l'échelle mondiale environ 30 millions de m³ de margines et 20 millions de tonnes de grignons sont annuellement produits.

De nos jours, les procédés biotechnologiques ciblant aussi bien l'extraction de biomolécules actives, la biodépollution et la bioconversion de sous-produits agro-industriels en produits d'intérêt, ont récemment suscité un grand intérêt. Les sous-produits oléicoles (SPO) étant riches en matière organique et en composés phénoliques (CP) peu biodégradables, dans une moindre mesure pour les grignons, peuvent engendrer de réels problèmes de pollution sans prétraitement préalable, avant leur dissipation dans l'environnement. Par conséquent, le développement de procédés de traitement de ces effluents s'impose.

L'extraction de biomolécules actives naturelles, à partir de sous-produits biosourcés telles que les margines, peut constituer d'une part, une stratégie pour leur traitement et d'autre part, une valorisation à visée alimentaire ou médicale. Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines l'hygiène alimentaire et la santé (GALANAKIS et al., 2017). De surcroit, bien que les microorganismes soient capables d'une vie libre (vie planctonique), l'organisation dans une structure plurimicrobienne, dite biofilm, représente leur mode de vie le plus fréquent et est un siège pour l'émergence de souches résistantes et d'autres dites persistantes et récalcitrantes, ce qui mobilise les chercheurs à trouver des moyens de lutte naturelles contre les microorganismes pathogènes et la formation de biofilms.

Les voies de bio-traitement les plus appliquées aux sous-produits agro-industriels sont les fermentations aérobies et anaérobies en cultures mixtes ou en monoculture. La fermentation aérobie en monoculture est souvent dédiée à la production de produits spécifiques. Quant à la digestion anaérobie, c'est un processus biochimique séquentiel, se produisant en trois étapes principales, désignées sous le nom de l'hydrolyse, l'acidogénèse et la méthanogénèse. Les bioprocédés anaérobies reposent sur l'utilisation de communautés microbiennes mixtes, ayant des relations syntrophiques et synergiques assurant la dégradation de composés complexes. En revanche, l'un des principaux verrous rapporté dans la littérature (DERMECHE et al., 2013 ; GALANACKIS, 2017) pour les bioprocédés fermentaires de

margines, ainsi que d'autres déchets agro-industriels, réside dans leurs charges organiques importantes en composés inhibiteurs et/ou indigestibles. En effet, le bioprocédé de bioconversion par fermentation sombre (FS) des SPO par des consortia microbiens doit être bien exploré et compris à l'égard des effets de concentrations et de prétraitements. Une préalable évaluation des potentialités métaboliques de chaque communauté polymicrobienne utilisée, consortium microbien étudié, pour chaque voie intéressante doit être envisagée. Cette stratégie devrait permettre ainsi de présager la voie de biovalorisation la plus attractive à entreprendre en terme de biométhanisation ou de production d'AGVs et/ou de Bio-H₂. La richesse des SPO en polyphénols et en matières organique, notamment les margines, justifie le choix de leur valorisation, non seulement comme substrat de bioconversion microbienne, mais aussi en tant que bioresourçes de molécules naturelles.

Dans ce contexte, la présente thèse évalue le potentiel des SPO en tant que substrat pour la production de biofuels par différents biocatalyseurs microbiens anaérobies mésophiles, développés à partir d'écosystèmes différents ainsi que leur potentiel antimicrobien. À notre connaissance, en Algérie, la présente étude est la seule qui traite et discute le contexte des activités antibiofilm, la production et la diversité de biomolécules à travers la fermentation sombre (FS) telle que le Bio-H₂ et les AGVs avec des consortia traités ou pas au BES. L'originalité du présent travail s'inscrit aussi dans un volet abordant des bioconversions en biomasses de levures oléagineuses.

Le travail retranscrit dans ce manuscrit est alors réparti en plusieurs parties mettant l'accent sur la biorémédiation et la valorisation biotechnologique des SPO, en particulier les margines et les grignons.

La première partie est consacrée à une revue bibliographique, rassemblant des données essentielles et avancées récentes sur la valorisation biochimique et biotechnologique des SPO, traduites à partir d'articles de recherche et de revues les plus récents.

La seconde partie est dédiée à la description des techniques et méthodes expérimentales mises en application au cours de cette étude.

Quant à la troisième partie, celle-ci est scindée en trois autres sous-chapitres et est portée sur la discussion des résultats obtenus. Dans un premier volet, le travail a été orienté sur la faisabilité de la bioconversion des SPO par fermentation anaérobie en biomolécules d'intérêt tels que le Bio-H₂, le Bio-CH₄ et les AGVs. Les margines brutes, diluées et résiduelles après extraction de la fraction polypénolique, ont fait l'objet de substrats de biodigestion anaérobies, conduites en batch. La sensibilité de ces consortia aux différentes concentrations en margines, l'effet de l'extraction des polyphénols et le traitement au sulfonoate de bromoéthane (BES) sont discutés.

Le second volet expérimental porte sur la production de biomasse de levures oléagineuses et l'évaluation de la viabilité ou la croissance de souches probiotiques sur les margines. Le dernier volet aborde une partie expérimentale visant pour une valorisation biotechnologique maximale des margines et ce, par un couplage entre la valorisation énergétique et la récupération de biomolécules actives. Dans cette dernière optique, le potentiel antimicrobien, des margines et de leurs polyphénols, a été évalué *in vitro* sur une panoplie de microorganismes pathogènes

Pour terminer, une discussion et conclusion générale sur l'ensemble des investigations de cette étude ainsi que les perspectives seront dégagées.

1^{ère} Partie

Revue bibliographique

***Génération, caractérisation
et impact des SPO sur
l'environnement***

I. Génération et caractérisation des sous-produits oléicoles

1.1. Oléiculture, production de l'huile d'olive

L'oléiculture à base de l'olivier *Olea europea*, une espèce caractéristique de la région méditerranéenne, constitue une composante essentielle de l'agriculture Algérienne (AMADOU et al., 2005). Les produits de l'olivier sont bien renommés pour leur vertu nutritionnelles et sanitaires salutaires confirmées. En raison des apports bénéfiques des produits de l'olivier pour la santé et de l'importance de ce dernier, tant que sur le plan agro-économique, sociale et environnementale, l'oléiculture est en pleine expansion à l'échelle mondiale et nationale.

1.1.1. Production à l'échelle mondiale

L'industrie oléicole est une activité économique importante, principalement répandue dans les pays méditerranéens qui tiennent environ 98% de la production mondiale. Le verger mondial d'oliviers a atteint une superficie de 11193000 hectares. Les principaux vergers se trouvent en Espagne, Italie, Turquie et Tunisie (AFIDOL, 2012).

Selon le Conseil Oléicole International (COI) et comparativement à la campagne 2016/2017, les chiffres de la campagne 2017/2018 soulignent une augmentation de 28% de la production mondiale de l'huile d'olive, laquelle a atteint environ $3,27 \times 10^6$ tonnes (t) (figure 1). Cette augmentation correspond en partie au groupe des pays producteurs européens, qui arrive en tête avec $2,18 \times 10^6$ t, soit 65% de la production mondiale et gagnent globalement 24 % par rapport à la campagne précédente. Par contre, l'Espagne a vu sa production diminuée de 2,7 % ($1,25 \times 10^6$ t). Les autres pays ont noté une augmentation considérable, tels que l'Italie, la Grèce et le Portugal, lesquels ont enregistré 135,3 % ($4,28 \times 10^5$ t), 77,4 % ($3,46 \times 10^5$ t) et 94,2 % ($1,34 \times 10^5$ t), respectivement. La production a augmenté également dans la plupart des autres pays membres du COI pour atteindre $9,055 \times 10^5$ t, autrement dit 46,2 % de plus par rapport à la campagne antérieure. L'Algérie, l'Argentine, la Jordanie, le Maroc, la Palestine, la Tunisie et la Turquie ont enregistré une production de plus, laquelle est de 8×10^5 t d'huile d'olive. Les pays non membres du COI, tels que la Syrie, l'Australie et le Chili, devraient produire conjointement $1,77 \times 10^5$ t d'huile d'olive (COI, 2018). Les Etats-Unis, reste le principal importateur d'huile d'olive avec 37%, suivi de l'union européenne avec 16 % (COI, 2018).

1.1.2. Production à l'échelle nationale

L'oléiculture, laquelle est une activité ancestrale, constitue un moyen de satisfaction des besoins alimentaires, c'est un patrimoine culturel en Algérie (CHOUAKI et al., 2006). De par

ses multiples fonctions telles que la lutte contre l'érosion, la valorisation des terrains agricoles et la fixation des populations dans les zones de montagne, l'olivier représente l'une des espèces principale fruitières cultivées en Algérie et caractéristique de la région méditerranéenne. L'oléiculture est constituée d'une gamme diversifiée de variétés d'olivier où la variété *Chemlal* prédomine et occupe près de 55% de la superficie oléicoles du pays (LAMANI et al., 2016 ; COI, 2018).

Le verger oléicole algérien occupe une superficie d'environ 500 000 ha, la figure 2 représente sa répartition géographique où les données du COI délimitent la plus grande région oléicole algérienne dans le centre-nord du pays, plus particulièrement en Kabylie. Environ 80% des oliveraies se retrouvent dans des zones de montagne, sur des terrains accidentés et marginaux caractérisés par une pluviométrie moyenne. En effet, l'agriculture de montagne a, depuis très longtemps, contribué à la sécurité alimentaire des ménages dans ces régions (LAMANI et al., 2016). La partie restante des oliveraies se situe dans les plaines occidentales du pays. L'oléiculture est concentrée exclusivement au niveau de six principales wilayas, trois wilayas de la région du centre, qui représente plus de 50% de la surface oléicole nationale (Bejaia, Tizi-ouzou, Bouira) et trois de la région Est (Bourdj Bourreridj, Sétif et Jijel). Quant au reste du verger oléicole, plutôt consacré à la production d'olives de table, il se trouve essentiellement dans trois autres wilayas (COI, 2018).

L'Algérie, membre du COI, est l'un des pays méditerranéens renommés en production d'huile d'olive de bonne qualité. D'après le COI, la production nationale lors de la campagne 2016/2017 était de $6,67 \times 10^4$ t d'huile d'olive, soit 2% de la production mondiale. Par contre, $8,25 \times 10^4$ t sont enregistrées en 2017/2018, soit 31% de plus, occupant ainsi la 9^{ème} place au niveau mondial. Par contre, une baisse de production est notée pour la campagne 2018-2019, laquelle est de l'ordre de $7,6 \times 10^4$ t selon les dernières prévisions du COI (2018).

1.1.3. Génération des sous-produits oléicoles

La conséquence de la production importante et croissante d'huile d'olive dans les pays méditerranéens, à l'instar de l'Algérie, est la génération de grandes quantités de sous-produits connus sous l'appellation de margines et de grignons d'olives. A l'échelle mondiale près de 30 millions de m³ de margines et 20×10^6 t de grignons sont générés chaque année par les industries oléicoles. La production en l'Algérie est estimée en moyenne de 2×10^5 t de margines et 9×10^5 t de grignons d'olive. L'Algérie est confrontée, comme les autres pays producteurs de l'huile d'olive, à la problématique de pollution que peuvent engendrer les effluents oléicoles et au développement de biotechnologies de traitement de ces derniers. Avant de décrire les voies

de valorisations des résidus oléicoles, prenons d'abord connaissance des différents systèmes d'extraction, des paramètres pouvant influencer la qualité de l'huile d'olive et des résidus oléicoles, leurs composition chimique et impact sur l'environnement.

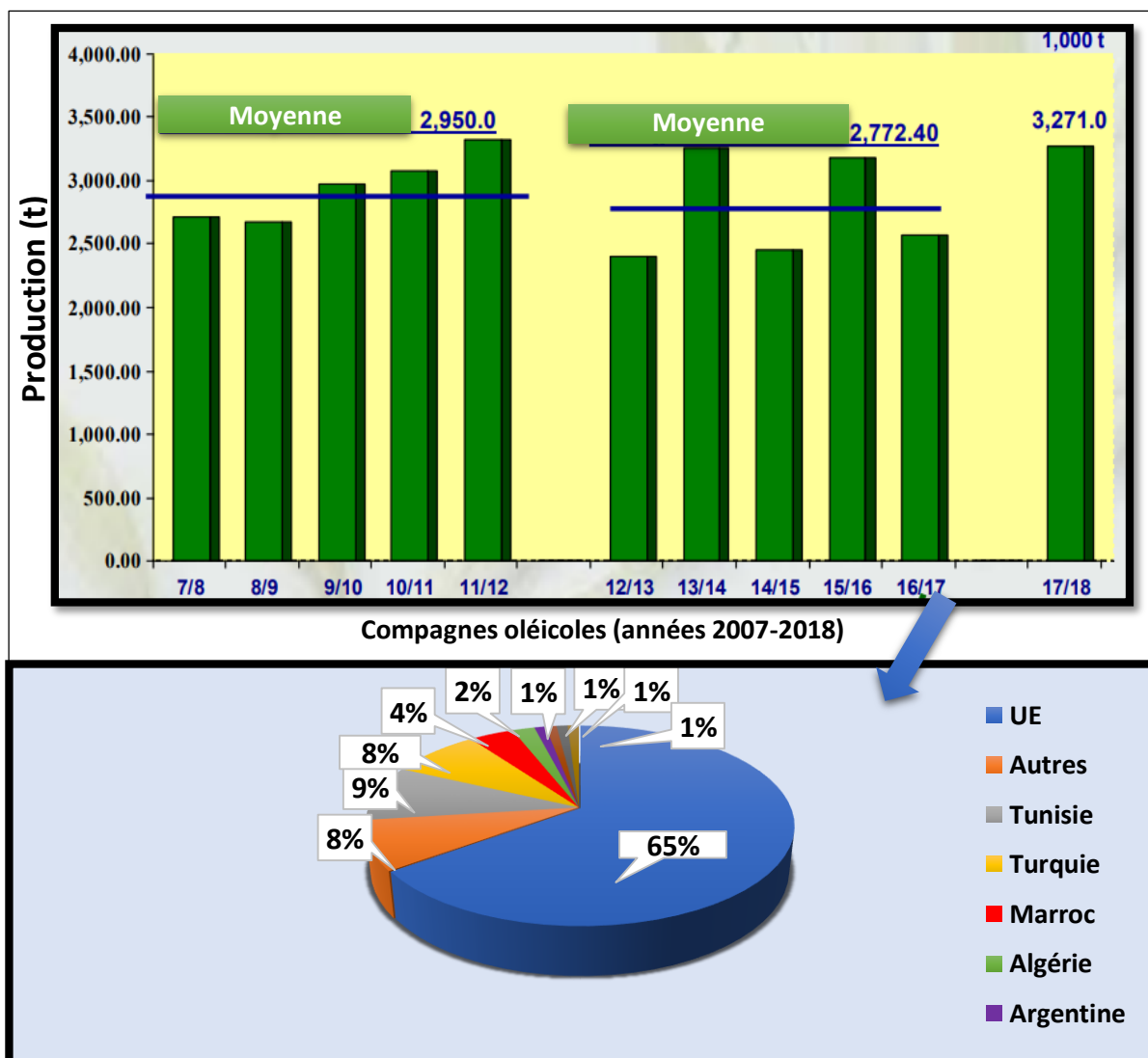


Figure 1. Évolution de la production mondiale de l'huile d'olive et sa répartition géographique (COI, 2018). UE : union européenne.

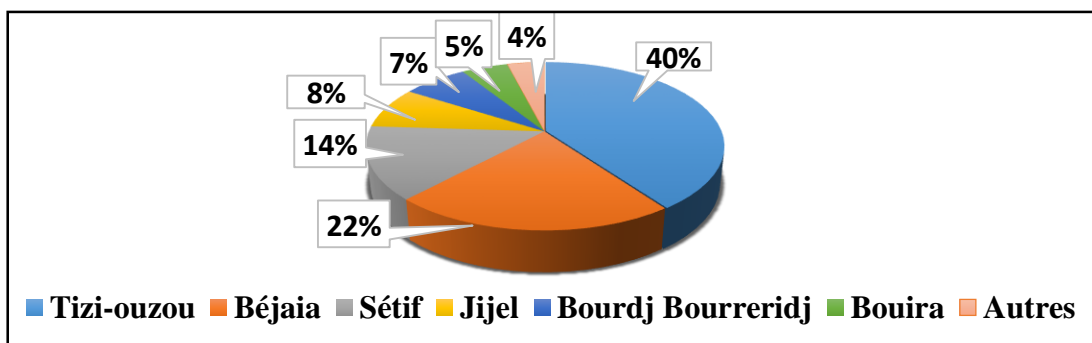


Figure 2. Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne (HADJOU et al., 2013).

1.2. Procédés d'extraction de l'huile d'olive

L'huile d'olive est obtenue à partir du fruit de l'olivier grâce à des procédés d'extraction à plusieurs étapes, qualifiés de discontinus par pressage ou continus par centrifugation (horizontales et verticales) dans des industries oléicoles traditionnelles ou modernes. La qualité de l'huile d'olive et le rendement d'extraction sont étroitement associés à la variété, la période de collecte, la durée de stockage des olives et le système d'extraction employé.

L'utilisation de certaines préparations enzymatiques durant le processus d'extraction améliore la qualité de l'huile d'olive ainsi que le rendement d'extraction (MONTEDORO et *al.*, 1993; PERES et *al.*, 2014 ; PERES et *al.*, 2017).

1.2.1. Préparation des olives pour l'extraction

Avant de procéder à l'extraction de l'huile d'olive, la première étape consiste en le nettoyage des olives, l'enlèvement des tiges, des feuilles, des brindilles et d'autres débris. Le lavage vise également à éliminer les pesticides et les poussières (SOUILEM et *al.*, 2017). Les contaminants légers sont alors éliminés par un flux d'air ou d'eau et les particules lourdes retombent dans un bain d'eau. Le lavage est un point de contrôle critique en raison d'une éventuelle contamination microbiologique et de dommages physiques pouvant affecter les olives (SOUILEM et *al.*, 2017). Le stockage des olives à court terme avant l'extraction de l'huile peut réduire les attributs sensoriels de l'huile d'olive en raison des changements dans les propriétés physico-chimiques des CP (VICHI et *al.*, 2015).

1.2.2. Procédé discontinu d'extraction par presse

Le procédé d'extraction de l'huile d'olive le plus répandu et le plus ancien est bien le système discontinu par presse (figure 3). La pâte résultante suite au broyage des olives est étendue sur des disques de fibres entassés les uns sur les autres puis placés dans le pressoir. Ces disques sont traditionnellement construits en fibres de chanvre ou de noix de coco ou en fibres synthétiques pour de plus faciles nettoyage et maintenance (KAPELLAKIS et *al.*, 2008).

La phase solide de la pâte des olives est compactée par pression appliquée sur les disques, les phases liquides générées, l'huile et les eaux de végétation (connues sous le nom de margines, amuredje en Kabylie, amurca ou alpechin en Europe) sont ensuite récupérées. Afin de faciliter la séparation de l'huile des autres phases, une faible quantité d'eau est ajoutée. De plus, ce procédé génère aussi une fraction solide appelée grignon d'olive (amegrouche en Kabyle) contenant la pulpe d'olive, la peau, le noyau et l'eau. Ce sous-produit, mélangé avec une émulsion qui contient l'huile d'olive, est séparé par décantation du reste des margines.

Les principaux avantages de cette méthode résident dans le faible coût de l'équipement, la simplicité de la technique et plus particulièrement, la faible quantité d'eau utilisée réduisant ainsi le volume des margines à environ 40 à 60 L/100 kg d'olives (KAPELLAKIS *et al.*, 2008). En revanche, ces margines en étant plus concentrées, posent de sérieux problèmes écologiques comparées à celles générées par les autres procédés d'extraction utilisant des volumes d'eau plus importants (DI GIOVACCHINO *et al.*, 2002). De surcroît, la discontinuité du procédé demeure fastidieuse et présente un coût élevé de la main d'œuvre.

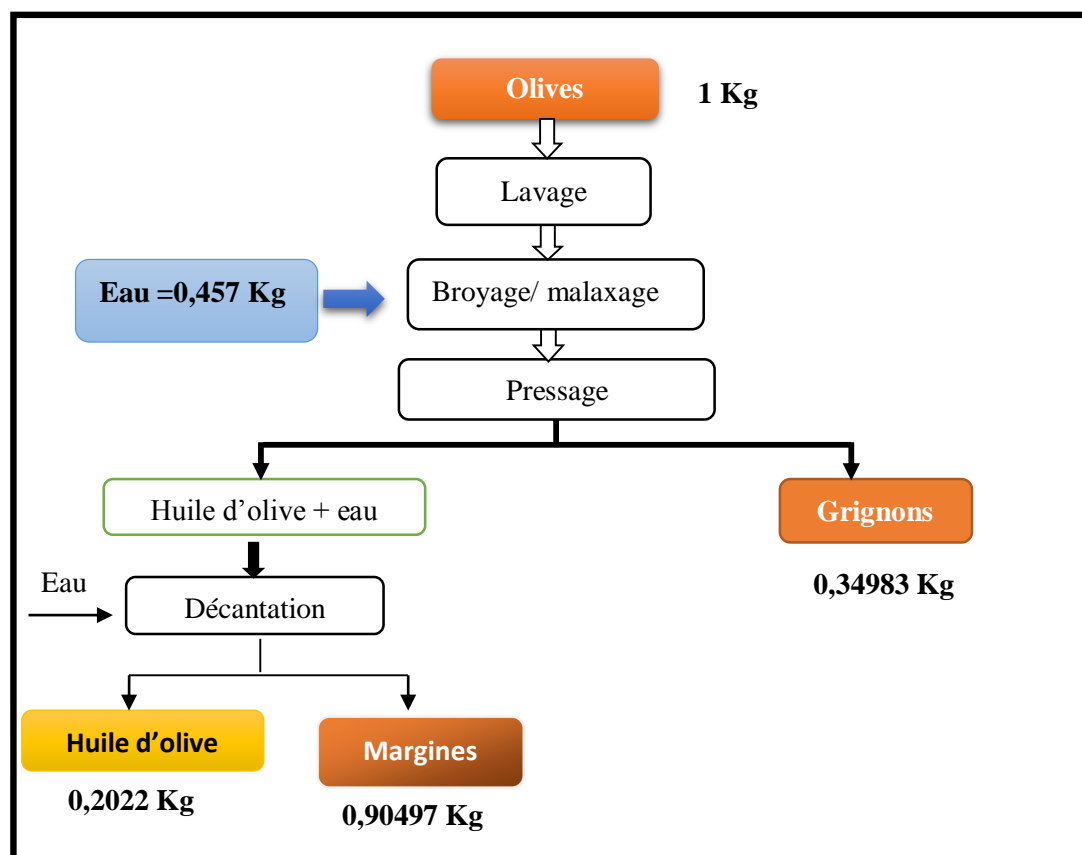


Figure 3. Système discontinu d'extraction de l'huile d'olive par presse (VLYSSIDES *et al.*, 2004 ; DERMECHE *et al.*, 2013).

1.2.3. Procédé continu d'extraction par centrifugation

Le procédé continu d'extraction de l'huile d'olive utilise un décanteur industriel où s'effectue le fractionnement des phases par centrifugation selon la différence de densité des composants de la pâte d'olives (huile, eau et résidus insolubles). La pâte d'olive, obtenue suite au broyage et malaxage automatique, peut être alors traitée soit par un décanteur centrifuge à deux phases, soit par un décanteur centrifuge à trois phases. Dans le système à deux phases, le produit est séparé en phase liquide (huile) et en phase solide (fragments des noyaux, pulpe et un concentra d'eau de végétation). Dans le système d'extraction à trois phases (figure 4), le

produit est séparé en phase liquide légère (huile), en phase liquide lourde (les margines) et en phase solide qui est le grignon (fragments de noyaux et pulpe). Cette dernière porte plusieurs appellations en Europe selon sa concentration, laquelle est étroitement associée aux volumes d'eau utilisées. Ainsi, les termes ou appellations "olive pomace, alperujo" européennes se réfèrent aux grignons humides pâteux du système d'extraction à deux phases. Dans les deux systèmes à deux et à trois phases, la phase huileuse est récupérée par une séparation gravitationnelle (SOUILEM *et al.*, 2017).

1.2.3.1. Procédé d'extraction à trois phases

Le procédé d'extraction à trois phases a été introduit durant les années 1970 d'une part, pour la rapidité opérationnelle en vue d'augmenter les quantités d'olives à traiter et les rendements d'extraction et d'autre part, pour réduire la main d'œuvre et la durée de stockage des olives (SOUILEM *et al.*, 2017).

Comme le montre la figure 4, le procédé d'extraction continu à trois phases génère un volume considérable de margines qui représente environ 80 à 120 L/100 Kg d'olive et ce, en raison de l'addition de l'eau chaude à l'étape de centrifugation qui est de 1,25 à 1,75 fois supérieure à une extraction traditionnelle (ALBURQUERQUE *et al.*, 2004).

Une automatisation totale et une production d'huile rapide et de meilleure qualité sont les avantages marquant ce système. En revanche, une consommation élevée en eau et en énergie ainsi que des coûts d'équipements assez importants soulignent les inconvénients de ce système. En dépit de la grande consommation en eau, ce procédé demeure toujours employé et plus particulièrement dans les pays producteurs de grandes quantités de l'huile d'olive et ce, sur de courtes périodes.

1.2.3.2. Procédé d'extraction à deux phases

Le procédé d'extraction à deux phases a été développé durant les années 1990. Il a été surnommé de décanteur économique, car il ne nécessite pas l'adjonction de gros volumes d'eau et par conséquent, il génère d'infimes quantités de margines comme le résume la figure 5 (ROIG *et al.*, 2006., KAPELLAKIS *et al.*, 2008). Ces dernières, sont incluses avec le grignon et la pulpe résiduels pour donner un grignon humide constituant ainsi un sous-produit semi solide.

Le système à deux phases est caractérisé par sa grande capacité de traitement, jusqu'à 100 tonnes d'olives par jour. Le grignon peut être exploité pour extraire davantage d'huile et augmenter ainsi les rendements (APARICIO *et HARWOOD*, 2013 ; ROMERO-GARCIA *et al.*, 2014). Cependant, le grignon humide résultant est difficile à gérer pour sa charge polluante

associée à sa concentration importante en matières organiques et en polyphénols. Le système d'extraction à deux phases prédomine actuellement en Espagne, où environ 90% des huileries opèrent avec cette technologie. Néanmoins, les problèmes de gestion des grignons humides très polluants limitent son utilisation par les autres pays producteurs de l'huile d'olive (MCNAMARA *et al.*, 2008).

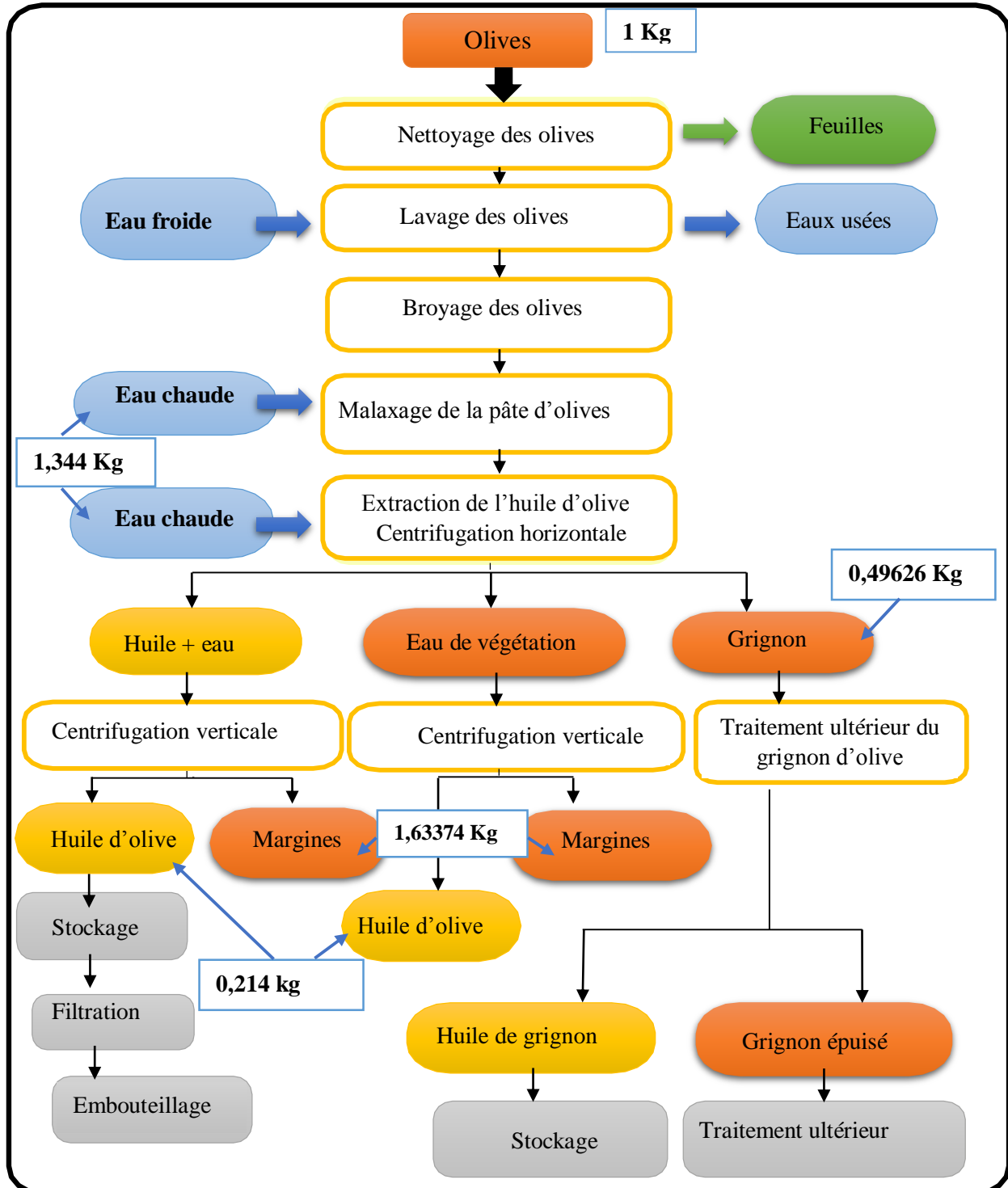


Figure 4 : Système continu d'extraction de l'huile d'olive par centrifugation à trois phases (VLYSSIDES *et al.*, 2004 ; DERMECHE *et al.*, 2013 ; NADOUR *et al.*, 2015).

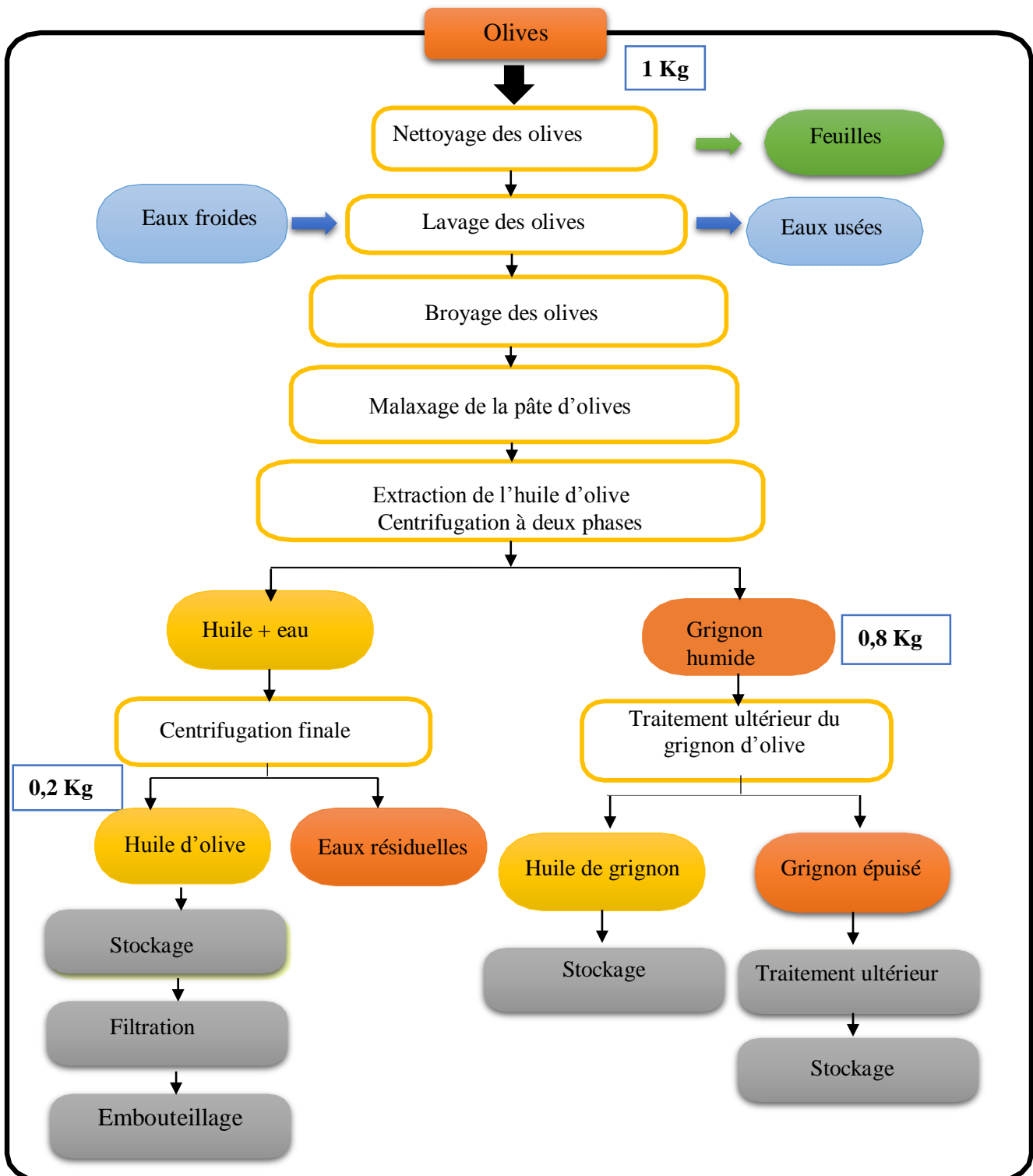


Figure 5. Système continu d'extraction de l'huile d'olive par centrifugation à deux phases (VLYSSIDES *et al.*, 2004 ; DERMECHE *et al.*, 2013 ; NADOUR *et al.*, 2015).

1.3. Paramètres d'extraction responsables de la qualité de l'huile d'olive et des margines

La figure 6 rassemble les étapes d'extraction de l'huile d'olive et les paramètres pouvant affecter positivement ou négativement la qualité de l'huile d'olive. Quant à la figure 7, elle résume les avantages et les inconvénients des systèmes d'extraction.

1.3.1. Addition de l'eau

Lors de l'extraction de l'huile d'olive, l'addition de l'eau affecte considérablement la distribution des polyphénols hydrosolubles entre l'huile et l'eau, ce qui favorise par conséquent leur libération dans la phase aqueuse. En raison des grands volumes d'eau employés, l'huile d'olive résultante via le système à trois phases se trouve alors plus pauvre en CP hydrophiles (MASELLA *et al.*, 2012). En effet, l'huile perd une grande partie en CP, ce qui la rend moins résistante à l'oxydation (TSIMIDOU *et al.*, 1992 ; ROIG *et al.*, 2006). Evidemment, il a été démontré que la réduction du volume d'eau dans le système à trois phases donne lieu à une huile plus concentrée en CP (AMIRANTE *et al.*, 2002). En contrepartie, il est à noter que la teneur en eau des margines et des grignons humides est un facteur déterminant de leur richesse en CP totaux, en sucres hydrosolubles et ainsi leur charge polluante. Une petite partie de la fraction phénolique est retenue dans les grignons mais la majeure partie est éliminée dans les margines et l'huile durant la trituration.

1.3.2. Oxygène ou aération

Une importante concentration en oxygène, plus particulièrement dans le système traditionnel, durant la malaxation active les enzymes responsables de l'oxydation des polyphénols (TAMBORRINO *et al.*, 2014). A cet effet, un système innovant a été développé pour le contrôle de la concentration en oxygène dans l'espace libre de l'appareil de malaxation (CATANIA *et al.*, 2016). D'autres chercheurs ont proposé l'introduction de l'azote durant la malaxation, celui-ci a pour effet une bonne protection contre l'oxydation et génère, par conséquent, une huile avec un important pouvoir antioxydant (YORULMAZ *et al.*, 2011). La centrifugation contribue à une augmentation significative de la concentration en oxygène dissous et accélère ainsi l'oxydation. Afin de réduire cette oxygénation de l'huile, MASELLA *et al.* (2012) ont suggéré d'alimenter la centrifugation verticale avec un gaz inerte. La sédimentation naturelle est une bonne alternative à la centrifugation, mais elle est considérée non convenable pour les procédés modernes en raison de la durée plus longue d'opération (GILA *et al.*, 2016).

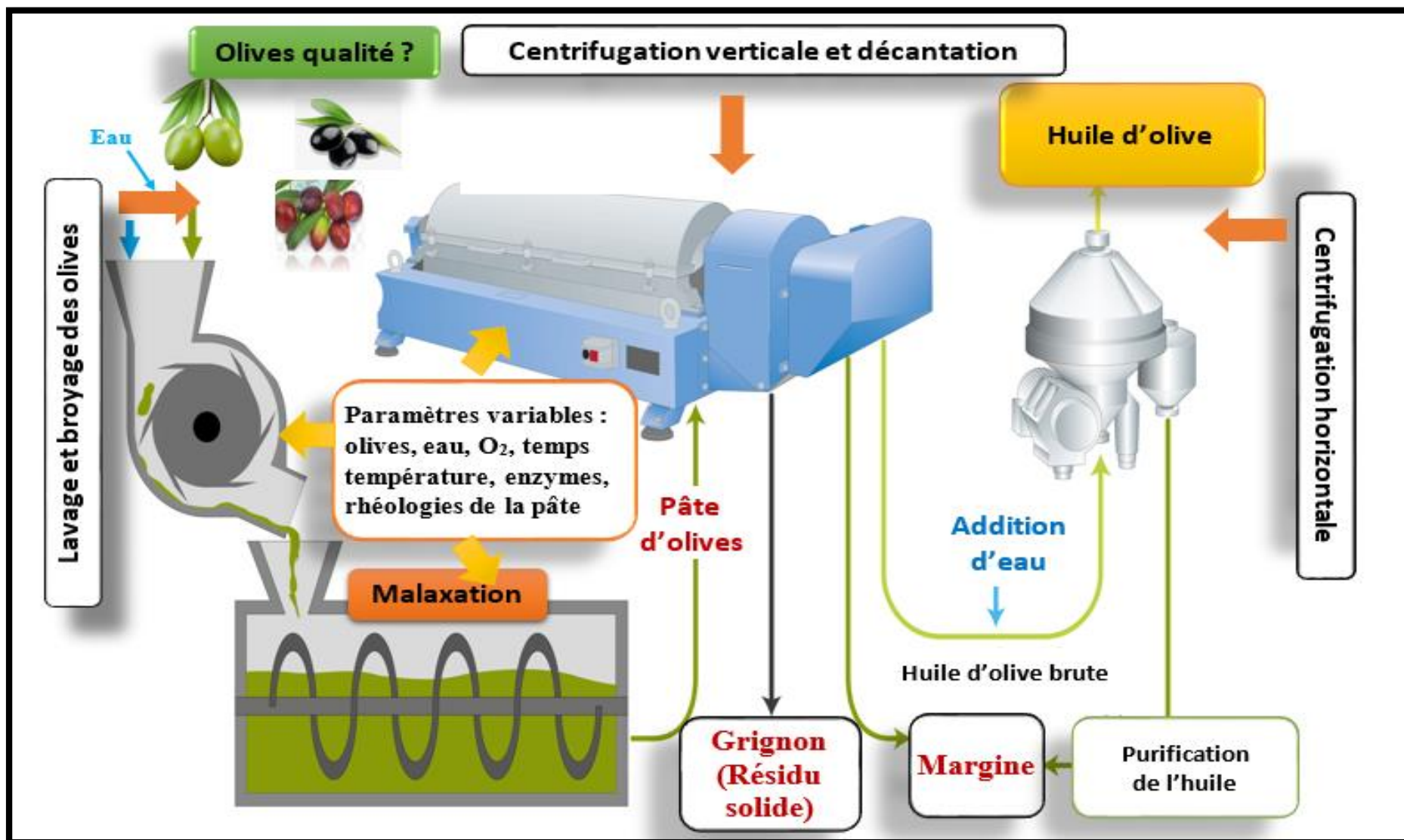


Figure 6. Etapes du système d'extraction de l'huile d'olive à trois phases et paramètres responsables de la qualité de le l'huile et des sous-produits oléicoles. Schéma d'après AHMED et al. (2019) modifié.

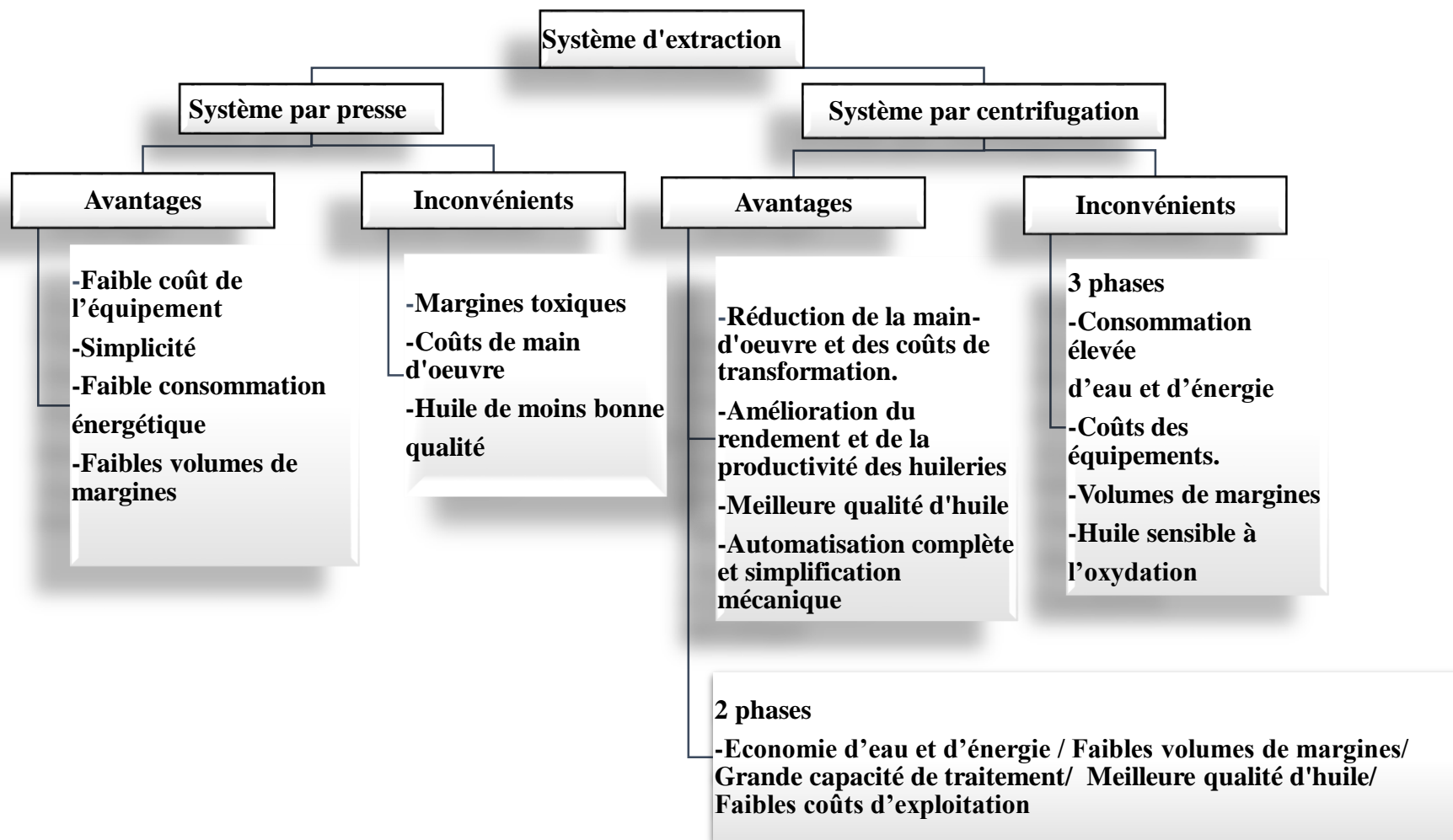


Figure 7. Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'extraction de l'huile d'olive.

1.3.3. Température et durée de malaxation

Les propriétés physiques de la pâte des olives dépendent de la composition en acides gras de l'huile et sont fortement affectées par la température. Cette dernière est un paramètre important à contrôler durant l'extraction (GILA *et al.*, 2015 ; GILA *et al.*, 2016). En effet, le temps et la température de malaxation affecte considérablement la qualité de l'huile et plus particulièrement leur profil en CP et aromatiques (JIMENEZ *et al.*, 2014 ; REBOREDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). Une augmentation significative du sécoiridoïdes, de l'hydroxytyrosol et du tyrosol est souvent associée à l'élévation de la température de malaxation de 20 à 40°C (RANALLI *et al.*, 2001a ; DI GIOVACCHINO *et al.*, 2002 ; INAREJOS-GARCIA *et al.*, 2009). Ceci est dû à l'augmentation des coefficients de partition des composés entre la phase huileuse et la phase aqueuse ainsi que la solubilité relative dans la phase huileuse (RODIS *et al.*, 2002). La température élevée facilite l'extraction de l'huile d'olive et la solubilisation des CP. En revanche, celle-ci active certaines enzymes responsables de l'oxydation des CP. Un compromis doit être alors entrepris entre la qualité et le rendement en huile d'olive. A cet effet, une faible température et une durée de 30 à 45 minutes de malaxation sont recommandées par certains auteurs (CLODOVEO *et al.*, 2014).

1.3.4. Propriétés rhéologiques de la pâte d'olives

L'extraction de l'huile d'olive dépend étroitement des propriétés rhéologiques de la pâte associée à sa teneur en eau et sa variété en plus de la température d'extraction (ALTIERI *et al.*, 2013). De ce fait, le contrôle de ces paramètres s'impose afin d'optimiser le rendement d'extraction tout en préservant la qualité de l'huile résultante. Certains travaux se sont alors focalisés sur la conception d'un système automatique capable d'ajuster les paramètres de fonctionnement de la machine d'extraction et ce, en fonction des caractéristiques de la pâte des olives tout en garantissant une alimentation constante de la centrifugeuse malgré la variabilité des propriétés physiques de la pâte d'olive (ALTIERI *et al.*, 2013, 2014).

1.3.5. Addition de coadjuvants

L'efficacité de la malaxation peut être améliorée par l'addition de coadjuvants pour une meilleure rupture et déstabilisation de l'émulsion huile /eau permettant ainsi une augmentation du rendement de l'huile (ESPINOLA *et al.*, 2015; GUERMAZI *et al.*, 2015; SADKAOUI *et al.*, 2015). Les coadjuvants rapportés dans la littérature, sont les enzymes, le talc, les carbonates de calcium et les sels. L'addition d'enzymes pectolytiques, hémicellulolytiques et cellulolytiques assure la dégradation des structures des parois cellulaires des olives et libèrent

ainsi les CP hydrophiles complexés aux polysaccharides (ALIAKBARIAN *et al.*, 2008). Plus de CP libres seront alors libérés dans l'huile d'olive et ce, en fonction de la formulation enzymatique employée.

1.4. Description des sous-produits oléicoles et impact de leur rejet sur l'environnement

1.4.1. Caractérisation physico-chimiques

1.4.1.1. Composition générale

Les margines sont des effluents liquides de couleurs rouge-à-noire légèrement acides dont les valeurs de pH sont comprises entre 4,2 et 5,9 (EROGLU *et al.*, 2008) et entre 2,24 et 5,9 d'après AKAR *et al.* (2009). Elles sont caractérisées par une conductivité électrique très élevée. Les principales caractéristiques physico-chimiques des margines et des grignons d'olives sont récapitulées dans le tableau I.

Les résultats des analyses compositionnelles des margines et des grignons varient qualitativement et quantitativement selon la variété des olives, les conditions climatiques, les pratiques agronomiques, le temps de stockage (entreposage) des olives ainsi que le procédé d'extraction. Les margines, plus particulièrement celles issues du système à trois phases, sont riches en eau (83 – 92%) avec une charge organique élevée dont les composants principaux sont les CP, les sucres et les acides organiques. Elles contiennent également des éléments minéraux, tels que le potassium (DERMECHE *et al.*, 2013).

Les grignons sont essentiellement composés de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Cependant, des lipides résiduels et des protéines y sont également présents (RODRIGUEZ *et al.*, 2008). Quant aux grignons humides, ils sont composés de résidus solides, noyaux broyés, contenus dans une pâte de pulpe et d'eau de végétation et sont, comparés à ceux issus des autres systèmes d'extraction, caractérisés par un taux d'humidité élevé (65-75%) (ALBA-MENDOZA *et al.*, 1990 ; ALBURQUERQUE *et al.*, 2004).

1.4.1.2. Fraction phénolique des margines et des grignons

Les CP (acides phénoliques et polyphénols) sont des métabolites secondaires, produits à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques). Généralement distribués dans le règne végétal et abondants dans notre alimentation, les CP comptent aujourd'hui parmi les catégories d'antioxydants naturels les plus discutés (BOSKOU, 2006 a, b ; GALANAKIS *et KOTSIUO*, 2017). Ils comprennent un ou plusieurs groupes hydroxyles (partie polaire) attachés directement à un noyau aromatique (partie non polaire). Plutôt que des molécules libres, les CP se retrouvent souvent dans les plantes comme des esters

ou des glycosides. Cette stéréochimie les distingue les uns des autres suivant leurs variables polarités (GALANAKIS *et al.*, 2013 ; GALANAKIS et KOTSIU, 2017).

Tableau I. Caractéristiques physico-chimiques des margines et des grignons d'olives (DERMECHE *et al.*, 2013).

Paramètres	Sous-produits oléicoles		
	Margines	Résidus solides	
		Grignons	Grignons humides
Pulpe (%)	-	12-35	10-15
Matière sèche (%)	6,33-7,19	87,1-94,4	-
Cendres (%)	1	1,7-4	1,42-4
pH	2,24-5,9	-	4,9-6,8
Conductivité électrique	5,5-10	-	1,78-5,24
Carbone total (%)	2-3,3	29,03-42,9	25,37
Matière organique (%)	57,2-62,1	85	60,3-98,5
Carbone organique (g/L)	20,19-39,8	-	-
Solides totaux en suspension	25-30	-	-
Carbone inorganique (g/L)	0,2	-	-
Azote total (%)	0,63	0,2-0,3	0,25-1,85
Lipides (%)	0,03-4,25	3,5-8,72	3,76-18,0
CP totaux (%)	0,63-5,45	0,2-1,146	0,4-2,43
Sucres totaux (%)	1,5-12,22	0,99-1,38	0,83-19,3
Protéines totales (%)	-	3,43-7,26	2,87-7,2
Éléments minéraux (%)			
P	0,19	0,03-0,06	0,03-0,14
K	0,44-5,24	0,1-0,2	0,63-2,9
Na	0,15	-	0,02-0,1
Ca	0,42-1,15	-	0,23-1,2
Mg	0,11-0,18	-	0,05-0,17
Fe	0,26 ± 0,03	-	0,0526-0,26
Cu	0,0021	-	0,0013-0,0138
Mn	0,0015	-	0,0013-0,0067
Zn	0,0057	-	0,0010-0,0027
Cellulose (%)	-	17,37-24,14	14,54
Hémicellulose (%)	-	7,92-11,00	6,63
Lignine (%)	-	0,21-14,18	8,54

Les margines contiennent typiquement des concentrations en CP comprises entre 0,5 à 24 g/L, soit environ 98% des phénols présents dans les olives (RODIS *et al.*, 2002), seulement 2% d'entre eux passent dans la phase huileuse à travers l'extraction (RAHMANIAN *et al.*, 2014). Comme décrit précédemment pour l'huile d'olive, la qualité et/ou la teneur en polyphénols des margines et des grignons dépend aussi essentiellement de la qualité variétale et du degré de

maturité de l'olive, des conditions climatiques et des techniques d'extraction. Elle dépend aussi du temps de conservation (durée de stockage avant l'extraction) (KHOUI et al., 2006).

Les SPO sont riches en CP répartis en fonction de leurs polarités respectives. Les polyphénols présentent des structures très variées. Il existe des molécules de structure simple, de forme phénolique avec un cycle benzénique sur lequel sont fixés des groupements hydroxyles : les acides coumarique, hydroxy-coumarique, caféique, ferrulique, cinnapique. Il existe également d'autres composés plus complexes comme les flavonoïdes et les anthocyanes. Leur structure est toujours constituée de cycles benzéniques plus ou moins substitués par des groupements hydroxyles.

1.4.2. Caractéristiques microbiologiques

Les margines ne posent aucun problème hygiéno-sanitaire, car des études microbiologiques, effectuées sur plusieurs échantillons, ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes (RANALLI, 1991a ; ZAIER et al., 2017). Les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries (AISSAM et al., 2002). En effet, les micro-organismes fongiques tolèrent des valeurs de pH acide caractéristiques des margines et résistent mieux aux substances phénoliques comparés aux bactéries. La flore fongique est représentée essentiellement par des souches d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria sp*, on y trouve aussi des levures comme *Trichosporium cutaneum*, *Cryptococcus albidus* ainsi que les genres *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.* (RAMOS-CORMENZANA, 1986 ; GHARSALLAH, 1993 ; AISSAM et al., 2002 ; FADIL et al., 2003). La flore bactérienne comporte des bactéries résistantes aux polyphénols, le genre *Pseudomonas sp.* ainsi que *Bacillus megaterium* ont été rapportés (AISSAM, 2003).

1.4.3. Impacts des sous-produits oléicoles sur l'environnement

La caractérisation des margines et des grignons montre bien qu'ils procèdent une composition biochimique intéressante constituée de CP, acides organiques, éléments minéraux, pectines et polysaccharides prébiotiques avec de variables distributions selon le type de procédé d'extraction employé et les pratiques agronomiques utilisées (GALANAKIS et al., 2010a, b ; DERMECHE et al., 2013 ; NADOUR et al., 2015).

Souvent disposées dans des bassins d'évaporation, ou déversées vers divers récepteurs environnementaux, les margines étant les principaux SPO par rapport aux grignons posent d'importants problèmes écologiques pour les pays producteurs, essentiellement ceux du bassin

méditerranéen. Les grignons sont généralement stockés à côté des moulins avant qu'ils soient brûlés, ce qui pose par conséquent moins de problèmes environnementaux.

En effet, parallèlement à l'extraction de l'huile, des quantités importantes de margines sont générées chaque année entre le mois d'octobre et le mois de mars et posent de plus en plus de soucis environnementaux. C'est le cas en Algérie, où les industriels de l'huile d'olive commencent à prendre conscience des effets néfastes des margines sur l'environnement d'où la mise en place de bassins de décantation.

Les margines génèrent de fortes odeurs nuisibles et sont responsables de la contamination des sols, l'inhibition de la croissance des plantes, la pollution des cours d'eau naturels ainsi que de graves effets pour la faune aquatique et par conséquent, un déséquilibre écologique s'installe (KOMNITSAS *et al.*, 2016). Cet impact négatif sur l'environnement (figure 8), s'explique par leur charge élevée en matières organiques toxiques (particulièrement les CP peu biodégradables), leur demande chimique en oxygène (DCO) et demande biologique en oxygène élevées jusqu'à 320 g/L et à plus de 132 g/L respectivement, leur forte charge saline et pH acide (STASINAKIS *et al.*, 2008 ; DERMECHE *et al.*, 2013).

1.4.3.1. Pollution de l'atmosphère

Cette pollution est généralement causée par la décomposition des margines. Les fortes teneurs en sels, en charge organique des margines ainsi que leur acidité sursaturent le milieu récepteur et provoquent des conditions d'anaérobioses propices aux dégagements d'odeurs désagréables liées à l'émission de méthane et d'autres gaz irritants tels que le sulfure d'hydrogène H₂S (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2004). Les mauvaises odeurs posent aussi des problèmes de pollution par le taux élevé d'ammoniaque lors de la fermentation de ces effluents.

Le grignon humide présente également une source polluante pour l'environnement, notamment en printemps et en été. En effet, pendant le séchage de ces déchets solides de mauvaises odeurs sont libérées (SOUILEM *et al.*, 2017). De plus, des études ont montré que les principaux constituants des odeurs dégagées sont des composés gras, des acides organiques (acides butyrique, caproïque, valérique et isobutyrique) et des composés de faible poids moléculaire en particulier le 4-éthylphénol (LE VERGE, 2004 ; RUIZ-MENDEZ *et al.*, 2013).

1.4.3.2. Pollution des ressources en eaux et effet sur la vie aquatique

L'un des effets polluant le plus visible des margines est la décoloration, en d'autres termes, la coloration brune des cours d'eau et des rivières. Ce changement de couleur et

principalement associé à l'oxydation et une subséquente polymérisation des tannins donnant lieu à la couleur brune des phénols (HAMDI, 1993 ; NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006). En effet, les margines sont rejetées le plus souvent dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun contrôle préalable et nuisent fortement à leur qualité et changent leur aspect visuel. Ces effluents diminuent la disponibilité de l'oxygène pour d'autres organismes vivants, ce qui entraîne un déséquilibre de l'écosystème aquatique qualifié d'eutrophisation (DANELAKIS et *al.*, 2011).

En raison de leur forte charge en CP et matière organique, les margines sont des effluents récalcitrants et résistants à la biodégradation (ZIREHPOUR et *al.*, 2014). En effet, elles montrent une faible biodégradabilité et une forte phytotoxicité attribuées principalement aux CP. De même, la présence de sucres réducteurs peut stimuler la respiration microbienne et par conséquent, réduire l'oxygène dissout dans l'eau pour les autres organismes (MCNAMARA et *al.*, 2008). Par ailleurs, Le phosphore stimule également la croissance des algues et favorise ainsi le phénomène de l'eutrophisation.

FIorentino et *al.* (2004), ont conclu que les CP ont un fort potentiel toxique sur les systèmes aquatiques, tandis que JUSTINO et *al.* (2012) ont indiqué que les margines sont hautement toxiques non seulement sur les micro-organismes mais aussi pour les plantes et les algues. Ce phénomène entraîne donc une dégradation de la qualité des eaux de surface. Par conséquent, la capacité d'autoépuration naturelle serait limitée.

Par ailleurs, les lipides des margines forment un film impénétrable sur la surface de l'eau, ce qui empêche la pénétration des rayons lumineux et de l'oxygène, inhibant ainsi la croissance des plantes aquatiques (KAPPELLAKIS et *al.*, 2006). De nos jours, il est clair que la préservation des ressources naturelles en eau, tant quantitativement que qualitativement est capitale, d'où la nécessité de traiter ces effluents afin de surmonter les problèmes environnementaux qu'ils peuvent engendrer.

1.4.3.3. Pollution du sol

La pollution par les margines touchent le sol en induisant des effets négatifs sur la croissance des plantes et leur germination (phytotoxicité), sur l'activité microbienne et les propriétés physico-chimiques des sols (PAREDES et *al.*, 1987 ; EL HADJOUJJI et *al.*, 2007). Leurs pH acides et la salinité élevée ainsi que leur abondance en CP provoquent la destruction de la microflore du sol et induisent des effets toxiques aux cultures végétales (effets herbicides). Ceci entraîne un déséquilibre dans la symbiose entre la microflore du sol et les plantes. Par conséquent, l'utilisation agricole par épandage direct a de mauvaises répercussions sur les

eaux et les sols. À côté de leurs impacts négatifs, en raison de leurs concentrations élevées en matières organiques et des nutriments minéraux, les margines pourraient être un engrais prometteur pour les cultures. L'application à court terme peut engendrer des effets négatifs sur les propriétés chimiques et biologiques du sol, mais on peut le considérer comme négligeable après une période appropriée avant les cultures (DI BENE *et al.*, 2013).

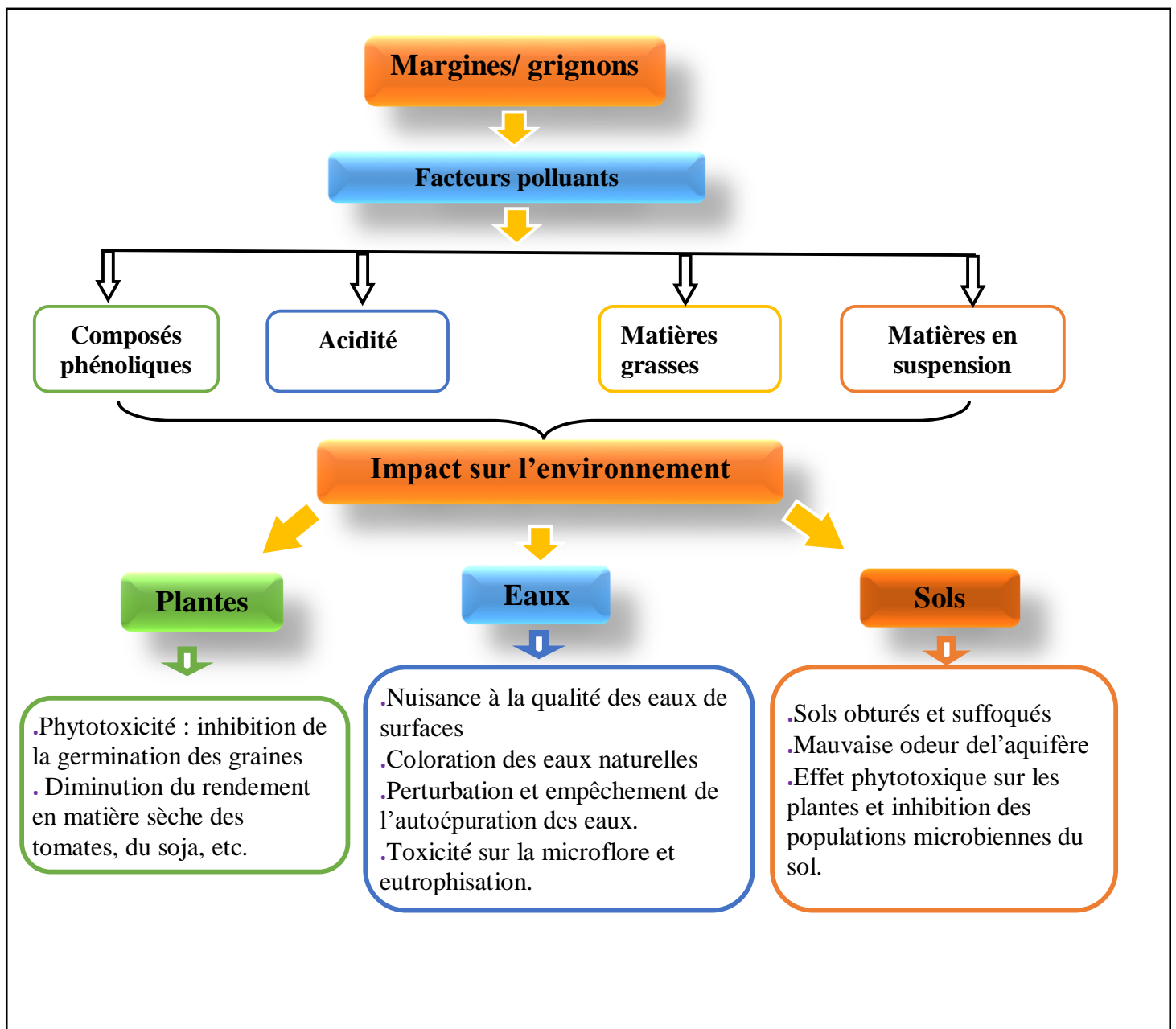


Figure 8. Conséquences écologiques des rejets de margines dans le milieu naturel.

II-Valorisation biochimique

II. Valorisations biochimique des margines et des grignons

Une prise en charge efficiente des margines apparaît comme une nécessité compte tenu des problèmes environnementaux. De surcroît, en dépit des sérieux problèmes de pollution que peuvent engendrer les margines, ces dernières représentent actuellement non seulement une précieuse ressource en composés naturels et intéressants à récupérer mais également un substrat valorisable par bioconversion (HAMZA et SAYADI, 2015; NADOUR et *al.*, 2015 ; SKALTSOUNIS et *al.*, 2015 ; GALANAKIS, 2017). La figure 9 donne un aperçu global sur les différentes voies de valorisation des SPO répertoriées à partir de plusieurs travaux de recherches. Ces voies de valorisation sont décrites dans les parties qui suivent.

2.1. Extraction de biomolécules et leurs applications potentielles

2.1.1. Composés phénoliques des margines et des grignons

Plusieurs techniques ont été utilisées en vue de récupérer les CP des SPO telles que l'extraction par solvant, l'hydrolyse enzymatique (HAMZA et SAYADI, 2015), la séparation membranaire, l'adsorption sur des polymères, micro et ultrafiltration, la centrifugation et des méthodes chromatographiques (GALANAKIS, 2017). L'extraction par solvant est la technique la plus couramment utilisée pour extraire les CP et l'acétate d'éthyle demeure le solvant le plus efficace dans des conditions acides (ALLOUCHE et *al.*, 2004). Citons l'exemple des travaux de KHOUFI et *al.* (2011), lesquels ont démontré qu'après hydrolyse par une préparation enzymatique d'*Aspergillus niger* cultivée sur la paille de blé, les margines sont une source potentielle de CP bioactifs, en particulier hydroxytyrosol libéré par suite à l'hydrolyse, avec des applications prometteuses. HAMZA et SAYADI (2015), ont également pu récupérer des phénols de haute valeur biologique en utilisant l'hydrolyse enzymatique (β -glucosidase) et la technologie de filtration sur membrane. D'autres travaux, comme ceux de ABDEL-SHAFY et *al.* (2015), ont aussi rapporté l'utilisation d'un système membranaire pour la récupération et la concentration des phénols des margines suivie de l'hydrolyse enzymatique (β -glucosidase) et acide afin de libérer de grandes concentrations en hydroxytyrosol pure.

Après extraction de l'huile une grande fraction de CP de la pulpe d'olive se retrouve dans les margines. Bien que le système de centrifugation à deux phases produit une huile d'olive plus riche en CP, la majorité de ces composés (environ 98%) demeure dans le grignon humide (LESAGE-MEESSEN et *al.*, 2001 ; VIERHUIS, SERVILI et *al.*, 2001). Les CP les plus abondants dans les grignons humides sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol ainsi que l'acide p-coumarique (FERNANDEZ- BOLÁNOS et *al.*, 2002). À un degré moindre, l'acide vanillique est également présent dans ce sous-produit (LESAGE-MEESSEN et *al.*, 2001).

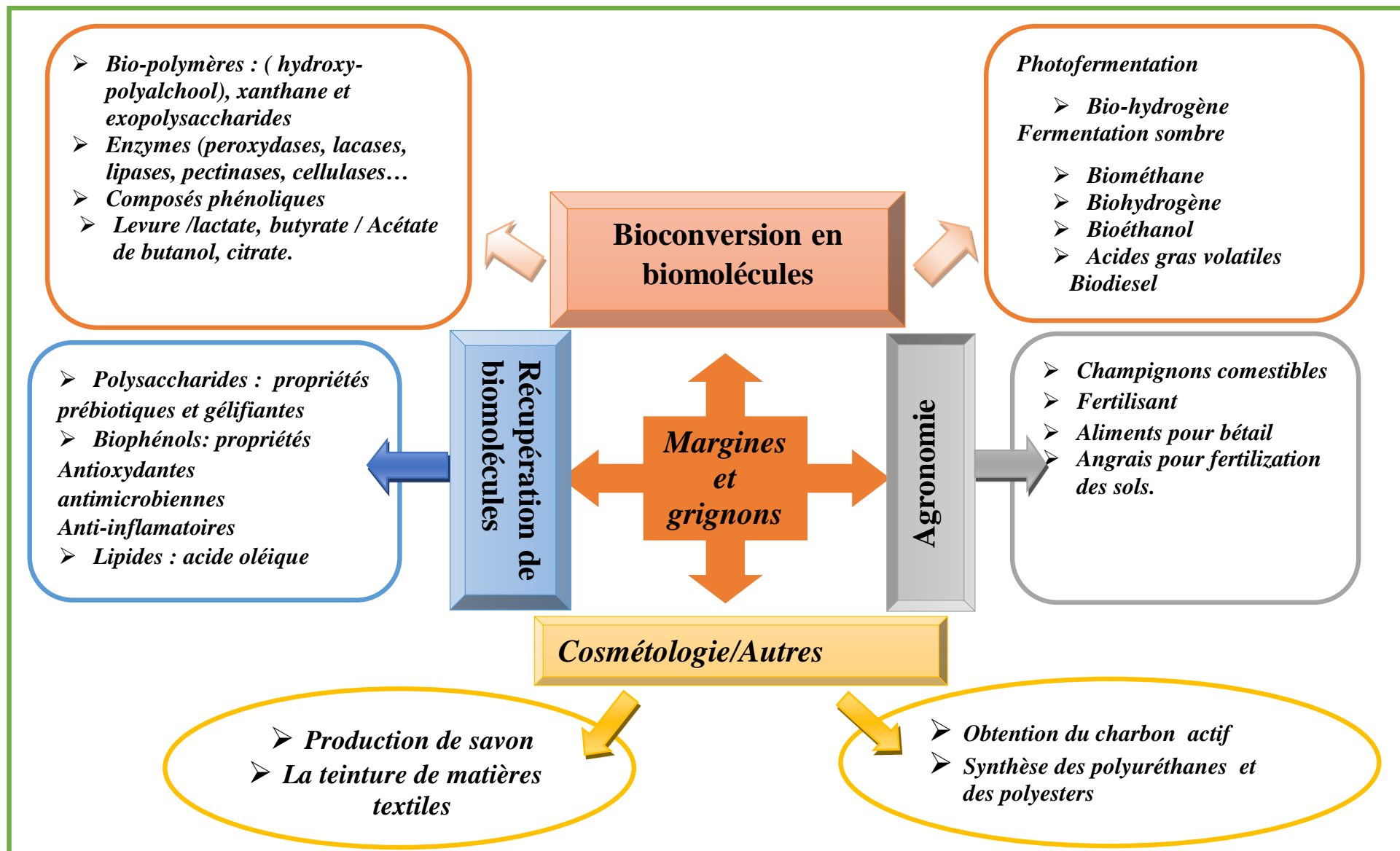


Figure 9. Diagramme général représentant les différentes voies de valorisation biotechnologiques des sous-produits oléicoles.

D'autres composés mineurs ont également été décrits à l'exemple de la rutine, de l'acide caféoylquinique, de la lutéoline-4- glucoside, de la lutéoline-7-rutinoside et de l'oléoside.

La composition phénolique des margines varie fortement entre les études. Comme démontré par BIANCO *et al.* (2003), la fraction phénolique des margines est caractérisée par une grande complexité, où ils ont identifié 20 CP différents. Les CP hydrophiles y sont logiquement prédominants et regroupent les alcools phénoliques, les acides phénoliques, les dérivés de sécoiridoïde, les flavonoïdes (lutéoline, lutéolin-7-glucoside) et les lignanes. D'après, VISIOLI *et al.* (2002), l'oleuropéine, un ester d'acide élénolique et d'hydroxytyrosol, est un composé majeur des margines.

Par ailleurs et récemment, ROILA *et al.* (2019a) ont signalé une structure di-aldéhydique de l'oleuropéine aglycone, un autre dérivé de sécoiridoïde, comme étant prédominante dans les margines (72,5% du total des CP identifiés). La figure 10 résume les principaux CP des margines comme rapporté par la littérature.

La variabilité dans les profils en CP des margines, des grignons et des huiles d'olives, réside dans la différence de stade de maturation des olives ainsi que par la dégradation enzymatique naturelle (PERES *et al.*, 2017). Citons à titre d'exemple, l'oleuropéine qui peut être dégradée en acide élénolique et en hydroxytyrosol par l'action d'une estérase durant l'extraction de l'huile d'olive (AMIOT *et al.*, 1989 ; VISIOLI *et al.*, 2002).

2.1.2. Récupération des lipides, polysaccharides et pectines d'intérêts

2.1.2.1. Lipides

Malgré les traitements que subissent les margines tout au long du procédé d'extraction, ces effluents contiennent encore un résidu huileux très important lequel est considéré comme un déchet. Dans une étude menée sur des margines marocaines, l'acide oléique, un produit de grande valeur, a été extrait avec une pureté de 95,49%. Ce dernier peut trouver des applications comme la production de savons, comme glycérine de bonne qualité produite par la réaction de saponification et de trans-estérification (ELKACMI *et al.*, 2016).

2.1.2.2. Polysaccharides

Les margines ont été aussi rapportées en tant que bioressource de polysaccharides intéressants (GALANAKIS 2010 a ; NADOUR *et al.*, 2015). Les principaux polysaccharides identifiés dans les SPO sont la cellulose, l'hémicellulose et les pectines (CARDOSO *et al.*, 2003 a, b ; GALANAKIS *et al.*, 2010a ; NADOUR *et al.* 2015). Les polysaccharides solubles ont été identifiés dans la pulpe et dans les margines, tandis que les polysaccharides

insolubles ont été décrits dans les grignons.

Les pectines se trouvent principalement dans la pulpe d'olive, elles sont transférées dans les margines et les grignons humides lors du procédé d'extraction de l'huile d'olive. Les analyses compositionnelles ont indiqué que le glucose est le monosaccharide principal des pectines des olives, en plus du galactose, de l'arabinose, du rhamnose et de l'acide galacturonique.

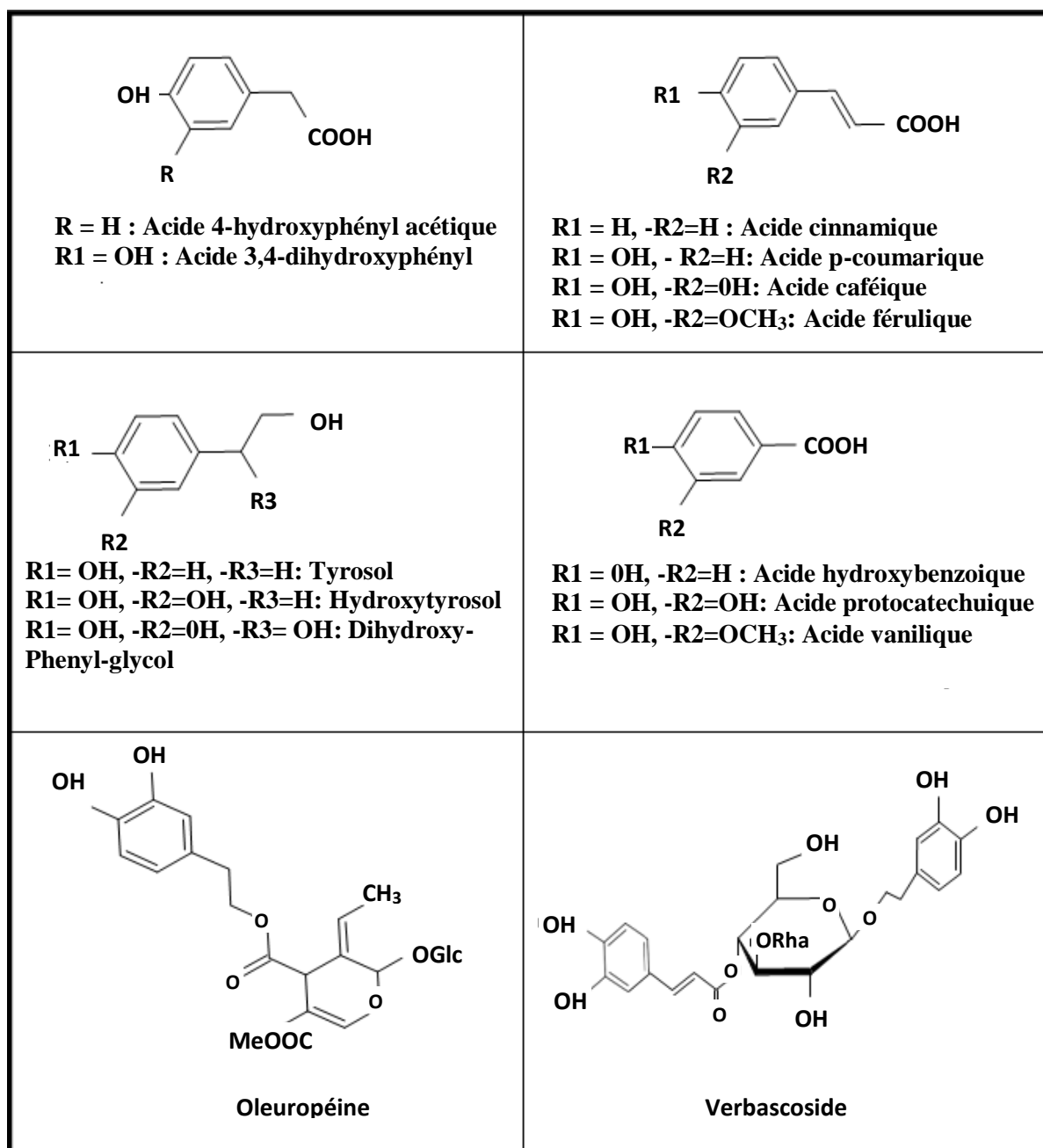


Figure 10. Structure des principaux composés phénoliques des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive. Me : CH₃ ; Glc : glucose ; Rha : Rhamnose. DERMECHE et al. (2013).

VIERHUIS *et al.* (2003) et GALANAKIS *et al.* (2009 ; 2010 a, c) ont aussi mis en évidence une fraction pectique dominante dans les margines. CARDOSO *et al.* (2002 ; 2003a) ainsi que VIERHUIS *et al.* (2003) ont mis en évidence la présence de pectines dans les grignons d'olive, ils ont démontré que les sucres présents dans les fractions riches en pectines, extraites des grignons, étaient essentiellement l'arabinose et les acides uroniques à raison de 75% des grignons.

Les grignons sont caractérisés par des teneurs élevées en lignine, cellulose et d'hémicellulose. Les principaux composants détectés sont la cellulose dans le noyau et l'hémicellulose dans la graine (VIERHUIS *et al.*, 2003, RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

Dans une étude menée par RUBIO-SENENT *et al.* (2015), le grignon humide traité par chauffage a servi pour l'isolement de polysaccharides solubles dans l'eau. Le matériau pectique présentait une taille moléculaire élevée. En comparaison avec les pectines commerciales, les extraits ont montré une meilleure capacité de rétention d'huile et une activité émulsifiante similaire à celle des pectines d'agrumes. En plus, les polysaccharides bruts, riches en CP, présentaient une activité antioxydante plus forte que celle observée pour les pectines d'agrumes et de pommes. Les extraits polysaccharidiques des grignons traités thermiquement, riches en CP, ont non seulement des propriétés émulsifiantes appropriées pour des utilisations commerciales, mais aussi des propriétés bioactives intéressantes similaires à celles des fibres alimentaires antioxydantes.

Les activités prébiotiques et antioxydantes des fractions polysaccharidiques de margines algériennes, ont été aussi évaluées par NADOUR *et al.* (2015). Les résultats auxquels sont parvenus ces auteurs, ont prouvé leur capacité de piégeage envers le 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (valeur IC_{50} de 89,43 $\mu\text{g} / \text{mL}$) et les radicaux hydroxyles (valeur IC_{50} de 158,70 $\mu\text{g} / \text{mL}$), leur résistance au suc gastrique humain artificiel et leurs capacités à être fermentés par des souches de lactobacilles (NADOUR *et al.*, 2015).

Les pectines, récupérées à partir de margines et de grignons humides, ont montré des propriétés rhéologiques et fonctionnelles intéressantes comme la rétention de l'eau, leur capacité de gélification et d'échange de cations. Ainsi, ces pectines peuvent trouver des applications en confiserie par exemple (VIERHUIS *et al.*, 2003 ; GALANAKIS *et al.*, 2010 a, b, c). Malgré ces applications prometteuses, les margines et les grignons humides ne contiennent pas de quantités élevées en fibres solubles dans l'eau par rapport à d'autres ressources (pommes et oranges). La conception d'une méthodologie unique pour leur récupération n'est principalement pas réalisable du point de vue économique. Cependant, leur

récupération pourrait être menée comme un procédé secondaire d'une méthode primaire ciblant la récupération des phénols des margines (GALANAKIS et KALI KOTSIU, 2017).

2.2. Avancées récentes sur les bioactivités des margines et leurs extraits phénoliques

De nos jours, l'utilisation de plantes médicinales ainsi que de produits naturels, comme les margines et les polyphénols en générale, a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt dérive du fait que ces produits naturels sont une source de substances bioactives qui offrent une médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Dans ce contexte, plusieurs travaux se sont focalisés sur l'évaluation des activités biologiques des polyphénols. Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (GALANAKIS et *al.*, 2017). D'après les multiples études attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention de maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou comme suppléments alimentaires.

2.2.1. Propriétés antioxydantes des polyphénols

Les CP sont bien réputés pour leurs propriétés antioxydantes bénéfiques pour la santé humaine, prometteuses pour une utilisation comme additifs dans les denrées alimentaires et les cosmétiques (GALANAKIS, 2012 ; RODRIGUES et *al.*, 2017 ; DI MAURO et *al.*, 2019). Leurs activités antioxydantes assurent une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. En effet, l'une des bioactivités les plus établies pour les CP des margines réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres (*In vitro* et *in vivo*) (GALANAKIS et KOTSIU, 2017). Cette capacité est appréciée par l'utilisateur de différents composés générateurs de radicaux tels que les radicaux 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH •) (LESAGE-MEESSEN et *al.*, 2001), et le 2,2'-asinobis (3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique) diammonium (ABTS+) (DE MARCO et *al.*, 2007) ou l'anion superoxyde (VISIOLI et *al.*, 1999). Les CP des margines ont également montré le pouvoir à piéger l'acide hypochloreux (HClO) (VISIOLI et *al.*, 2002) et à réduire le fer (MCDONALD et *al.*, 2001, NADOUR et *al.*, 2012).

2.2.2. Propriétés physiologiques

De nombreux travaux ont démontré que les polyphénols participent à la prévention des maladies anti-inflammatoires (BEDOUHENE et *al.*, 2014 et 2017), antidiabétique (HAMDEN

et *al.*, 2009 ; SENANI-OULARBI et *al.*, 2016) et anti-allergènes (MWAKALUKWA et *al.*, 2019). Ces derniers ont signalé l'activité antiallergique de six CP provenant de margines. Par ailleurs, PLASTINA et *al.* (2019) ont rapporté que l'hydroxytyrosyl oléate, un CP extrait de margines, est une structure anti-inflammatoire et une forme de réserve dans laquelle siège l'hydroxytyrosol. Quant aux travaux de SENANI-OULARBI et *al.* (2016) et BEDOUHENE et *al.* (2014), ceux-ci ont démontré les activités biologiques testées avec des margines algériennes brutes, concentrées et leurs extraits phénoliques. Des molécules pures, commerciales, comme le tyrosol et l'hydroxytyrosol ont aussi fait l'objet de l'étude de leurs activités anti-inflammatoires, menée par BEDOUHENE et *al.* (2017).

Des études ont fait preuve aussi des effets protecteurs de l'oleuropéine et de son métabolite l'hydroxytyrosol contre le stress oxydatif, le cancer et les maladies neurodégénératives. Certains auteurs ont même décrit les modes d'action par lesquels ces molécules exercent leurs activités biologiques (RAFEHI et *al.*, 2012 ; BARBARO et *al.*, 2014; ANDREADOU et *al.*, 2015 ; GINER et *al.*, 2016).

2.2.3. Potentiel antimicrobien

Les contaminations microbiennes sont une préoccupation majeure dans l'industrie alimentaire, car elles peuvent entraîner des changements indésirables dans l'apparence, la texture, la saveur et l'odeur qui réduisent la qualité des aliments provoquant ainsi une perte alimentaire et économique considérable. Il convient de rappeler que plusieurs micro-organismes jouent un rôle dans la détérioration des aliments, plus particulièrement la viande, la volaille, le lait et le poisson, dont l'importance est étroitement liée au commerce alimentaire et aux normes d'hygiène.

2.2.3.1. Préservation des aliments et santé

Au cours des dernières décennies, la recherche a montré une exploitation potentielle des produits végétaux en tant que source de CP bioactifs d'intérêt médicale et industriel. En effet, des efforts considérables ont été déployés pour minimiser l'utilisation de conservateurs chimiques et ce, en raison de la préférence des consommateurs envers des produits plus naturels, plus sains et qui pourraient être bénéfiques pour la santé. Par conséquent, un intérêt scientifique croissant s'installe en vue de la recherche de composés antimicrobiens naturels en tant que bio-préservateurs comme rapporté par BRANCIARI et *al.* (2015) dans leurs travaux sur les polyphénols des margines.

Plusieurs auteurs ont rapporté que les sous-produits dérivés du procédé d'extraction de l'huile d'olive pourraient être une source alternative de phénols biologiquement actifs et

attractifs pour l'industrie alimentaire (ROILA et al., 2016 ; GALANAKIS, 2017 ; GIANLUCA et al., 2017 ; ROILA et al., 2019 a, b ; SILVAN et al., 2019).

Parmi les micro-organismes responsables de la détérioration des aliments, *Pseudomonas spp* et plus précisément *Pseudomonas Fluorescens* a été étudiée sur sa sensibilité vis-à-vis des polyphénols de margines (ROILA et al., 2016). Plusieurs études témoignent aussi sur l'activité antimicrobienne des CP des olives contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus Cinerea*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (BOSKOU, 2006 b ; OBIED et al., 2007b ; YANGUI et al., 2010). Il a été déjà démontré que l'oleuropéine peut inhiber la production de l'entérotoxine B par *Staphylococcus aureus* (TRANTER et al., 1993), la croissance de *Salmonella Enteritidis* (TASSOU et NYCHAS, 1995) et la germination de spores de *Bacillus cereus* (TASSOU et al., 1991).

D'autres récents travaux, dont ceux de DACRORY et al. (2019), ROILA et al. (2019 a, b) et SILVAN et al. (2019), ont rapporté l'effet antimicrobien des CP des margines. D'après ces deux derniers auteurs, des fractions phénoliques de margines riches en sécoiridoïdes et plus particulièrement en oleuropéine aglycone di-aldéhydique (ROILA et al., 2019 a), se sont avérées efficaces contre des souches de *Campylobacter*. De même, SILVAN et al. (2019) ont montré qu'une fraction présentant une teneur élevée en CP et sécoiridoïdes avait une activité antibactérienne pertinente, dose dépendante, contre toutes les souches de *Campylobacter* testées.

Par ailleurs, ROILA et al. (2019 b) ont aussi exploité les extraits polyphénoliques de margines, à raison de 250 µg/mL et 500 µg/mL, pour améliorer la conservation du fromage « Fior di latte » pendant son stockage. Les CP des margines ont alors efficacement retardé la croissance de *Pseudomonas fluorescens* et d'*enterobacteriaceae*, en agissant principalement sur la phase de latence de ces micro-organismes.

SENNANI-OULARBI et al. (2018) ont également testé l'activité antifongique des margines concentrées (par séchage) et de leurs extraits phénoliques. La procédure entreprise consiste à incorporer les grains de maïs broyés, préalablement inoculés de spores d'*Aspergillus flavus*, avec différentes concentrations de margines et de leurs extraits. Après incubation pendant 7 jours, les résultats ont montré que la croissance mycélienne était réduite de plus de 50 % avec 800 mg/L et 16 g/kg, une inhibition complète a été obtenue à 1000 mg/kg et 20 g/kg, respectivement pour les margines et les extraits phénoliques.

De nos jours, les chercheurs visent à trouver des moyens ou des voies d'applications non couteux, tout en conservant les structures et par conséquent, le maintien de bioactivités efficaces des polyphénols des margines. Dans ce contexte, SISTI et al., (2019) ont formulé un composite

antimicrobien à base margines enrobées dans un biopolymère, lequel s'est avéré efficace contre la croissance de souches pathogènes. DI MAURO et *al.* (2019) ont développé un hydrogel antiseptique oculaire à base d'antioxydants anti-inflammatoires extraits de margines avec une application *in vivo* prometteuse et économique. Quant à DACRORY et *al.* (2019), ces chercheurs ont préparé un hydrogel antimicrobien à base de fibres de cellulose extrait de grignons d'olive et incorporé dans des nanoparticules d'argent. Ce dernier avait une activité antimicrobienne efficace contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Une autres approche intéressante, développée par AKRETCH et *al.*, (2019), consistent en la production de polymères comme film antioxydant à base de margines algériennes.

DI MAURO et *al.* (2017) ont également rapporté, dans leurs études *in vitro* et *in vivo*, des applications prometteuses en cosmétologies pour des formulations stables à base de margines riches en sucres et en minéraux. Ces auteurs ont souligné que l'utilisation de ces formulations n'a pas d'effets négatifs, mais plutôt aurait pour effet de bien améliorer l'hydratation de la peau, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'exploitation de ces sous-produits.

Enfin, d'autres travaux sur les activités antimicrobiennes des margines sont regroupés plus loin et ont fait l'objet de la discussion des résultats parvenus par la présente thèse, à propos des margines algériennes.

2.2.3.2. Préservation des plantes et des cultures

Plusieurs études ont rapporté l'exploitation des propriétés phytotoxiques et antimicrobiennes des margines en les utilisant en agriculture comme bio-pesticides pour la protection des cultures. En effet, les chercheurs les ont testées comme alternative aux herbicides, insecticides et fongicides chimiques, en vue d'évincer de nombreuses maladies affectant les plantes et ainsi les cultures (KOTSOU et *al.*, 2004 ; YANGUI et *al.*, 2010 ; LARIF et *al.*, 2013, ESMAIL et *al.*, 2015). Dans ce contexte, les margines, provenant d'une huilerie moderne avec un système de centrifugation à trois phases localisée au sud de la Grèce, ont été appliquées au sol (à raison de 400 mL/kg MS de sol) inoculé avec *Rhizoctonia solani* (6 g / kg sol). La croissance de ce dernier était inhibée (KOTSOU et *al.*, 2004).

Une autre stratégie de lutte biologique, consiste en l'incorporation des margines dans le sol comme une alternative écologique aux fumigants pour la protection des cultures à l'encontre de *Verticillium dahliae* Kleb. Ce dernier est un champignon tellurique responsable des symptômes de jaunisse et de flétrissement verticillien chez diverses plantes hôtes. L'expérience était conduite en pot sur une culture de tomates dans des conditions de terrain (YANGUI et *al.*,

2011). L'activité protectrice des margines serait probablement attribuée à l'effet fongicide des CP. VAGELAS et al. (2009 a, b) ont également montré que des margines filtrées et vaporisées sur des fruits et légumes contaminés par des moisissures ont inhibé la sporulation de *Botrytis* et *Penicillium spp*, ainsi que la croissance de pathogènes du sol *Fusarium oxysporum f. sp.* et *lycopersici*. Des graines de tomates étaient incubées en présence de spores (10^6 spores / mL) des deux espèces fongiques (*Fusarium oxysporum f. sp.* et de *lycopersici*), préalablement traitées avec des margines (5 mL spores / 100 mL de margines).

2.2.3.3. Mécanismes antimicrobiens des composés phénoliques

L'action antimicrobienne des phénols est associée à leur capacité à dénaturer les protéines et plus particulièrement les enzymes. Leur action conduirait à la fuite des constituants cellulaires tels que les protéines, le potassium et le phosphate des bactéries. Ces effets pourraient être attribués à la destruction du peptidoglycane ou aux dommages de la membrane cellulaire, ainsi qu'à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes. La perméabilité de la membrane se trouve alors altérée, ce qui conduit à la perte (fuite) des organites intracellulaires. De plus, les propriétés hydrosolubles et lipophiles des CP sont en faveur de cet effet antibactérien (DOMINECO et al., 2005). Ces activités sont aussi attribuées à leurs effets antioxydants, relatif à leurs propriétés redox, jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (PULIDO et al., 2000 ; NIJVELDT et al., 2001).

***III-Valorisation par
bioconversion***

III. Bioconversion et/ou dépollution des sous-produits oléicoles

3.1. Biodépollution

La biodégradation anaérobie des SPO présente des difficultés en raison de la teneur élevée en matière organique peu dégradable et en substances toxiques qui les composent, comme les phénols, les acides gras à longues chaînes, les tanins, etc (BENITEZ et *al.*, 1997 ; AZBAR et *al.*, 2009 ; CAMARILLO et RINCON, 2012). La croissance lente caractéristique des communautés microbiennes anaérobies est très sensible aux conditions inhibitrices (MCNAMARA et *al.*, 2008). Afin de surmonter ces limites de biodégradation, diverses méthodes physico-chimiques et biologiques, seules ou combinées, ont été proposées. La dilution, le chauffage, les ultrasons, le traitement chimique avec des acides, des bases et de sels, l'oxydation chimique avancée et les traitements biologiques sont toutes des méthodes de prétraitement déjà appliquées aux SPO et autres déchets (DERMECHE et *al.*, 2013 ; RINCON et *al.*, 2013, 2014 ; GHIMIRE et *al.*, 2015a).

Les polyphénols sont phytotoxiques et résistants à la dégradation biologique et une réduction de leur concentration à 65,8% peut diminuer la toxicité des margines à environ 33% (KHOUMI et *al.*, 2006 ; KALLEL et *al.*, 2009). Un prétraitement aérobie peut améliorer la productivité d'un procédé en biométhane (Bio-CH₄) par élimination des substances toxiques, ceci serait en faveur d'une biodégradation efficace de composés complexes comme les tanins des margines et la cellulose des grignons (DERMECHE et *al.*, 2013).

Des prétraitements aérobies ont été largement utilisés pour l'élimination sélective des CP des margines. En revanche, une diminution de la DCO réduit le potentiel de bioconversion en Bio-CH₄. Les méthodes aérobies peuvent être facilement appliquées à des températures ambiantes (20-35°C), mais l'ajustement du pH est crucial pour la réussite du bioprocédé. GONZALEZ-GONZALEZ et CUADROS (2014) ont soumis les margines à la biodégradation aérobie avec leurs microflore autochtones. Par conséquent, une réduction de 56% des polyphénols était enregistrée après seulement le premier jour de l'aération atteignant, par la suite, 90% au 7^{ème} jour. Dans une subséquente fermentation, l'aération avait comme effet une nette amélioration du rendement en Bio-CH₄ avec un facteur de 2,4 par suite à une élimination efficace de la DCO.

Comme le retrace le tableau II, plusieurs chercheurs ont aussi réussi à éliminer des concentrations considérables de DCO et de CP des margines et ce, grâce aux champignons tels que *Geotrichum candidum* et *Aspergillus terreus* (BORJA et *al.*, 1995). En effet, *Geotrichum candidum* était capable d'éliminer 75% de la DCO des margines tandis que *Phanerocheate*

chryso sporium était plus efficace pour la dégradation de polyphénols de faibles poids moléculaires tout en réduisant la DCO de 20-50% et la toxicité de 5% (GHARSALLAH et al., 1999 ; SAYADI et al., 2000 ; GONZALEZ-GONZALEZ et CUADROS, 2014). Des bactéries et des microalgues ont été aussi exploitées (AOUIDI et al. 2009 ; MOSTAFA et al. 2019).

Tableau II. Déphénolisation des sous-produits oléicoles par des traitements microbiens (DERMECHE et al., 2013). Tableau modifié.

Sous-produits / Souche	Réduction de la DCO (%)	Réduction des CP (%)	Réduction de la toxicité et leurs effets	Références
Champignons filamenteux				
Margines / <i>Trametes versicolor</i>	-	78	-	ERGUL et al. (2009)
Margines/ <i>Aspergillus terreus</i>	63	64	-	GARCIA GARCIA et al. (2000)
Margines/ <i>Penicillium sp</i>	65	65	-	AISSAM et al. (2007)
Margines/ <i>Aspergillus niger</i>	78	73	-	AISSAM et al. (2007)
Margines/ <i>Coriolus versicolor</i>	65	90	-	YESILADA et al. (1997)
Grignon humide/ <i>Coriopsis rigida</i>	-	89	Pas d'inhibition de la croissance	SAMPEDRO et al. (2007)
Margines/ <i>Funalia trogii</i>	70	93	-	YESILADA et al. (1997)
Margines/ <i>Lentinula edodes</i>	-	88,5	-	D'ANNIBALE et al. (1998)
Margines <i>Lentinula edodes</i>	67	88	Amélioration de la germination du blé	D'ANNIBALE et al. (2004)
Margines <i>Lentinula edodes</i>	-	75	-	LAKHTAR et al. (2010)
Grignon humide <i>Coriopsis rigida</i>	-	73	Diminution de la phytotoxicité	ARANDA et al. (2006)
Grignon humide/ <i>Phanerochaete flavido-alba</i>	-	70	Amélioration des taux de germination	LINARES et al. (2003)
Grignon humide/ <i>Phlebia radiata</i>	-	95,7	-	SAMPEDRO et al. (2007)
Grignon humide/ <i>Pleurotus ostreatus</i>	-	90	-	SAAVEDRA et al. (2006)
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> et <i>Irpex lacteus</i>	-	>90	-	(ZERVA et al. (2017).

Suite du tableau II. Déphénolisation des sous-produits oléicoles par des traitements microbiens (DERMECHE et al., 2013). Tableau modifié.

Sous-produits / Souche	Réduction DCO (%)	Réduction CP (%)	Réduction de la toxicité	Références
Levures				
Margines/ <i>Candida holstii</i>	-	39	Amélioration de la germination de l'orge	BEN SASSI et al. (2008)
Grignon humide/ <i>Candida boidinii</i>	-	57,7	-	GIANOUTSOU et al. (2004)
Margines/ <i>Geotrichum candidum</i>	51	46	-	AISSAM et al. (2007)
Margines/ <i>Candida oleophila</i>	55	83	Amélioration de la germination des grains	AMARAL et al. (2012)
Margines/ <i>Candida tropicalis</i>	62,8	51,7	-	FADIL et al. 2003
Grignon humide/ <i>Saccharomyces spp</i>	-	61	-	GIANNOUTSOU et al. (2004)
Margines/ <i>Natural microflora</i>	-	75	Réduction de la génotoxicité	EL HAJJOUJI et al. (2007)
Margines / <i>Geotrichum candidum</i>	75	-	-	ASSAS et al. (2009)
Margines/ <i>Yarrowia lipolytica</i>	20-40	<30	-	LANCIOTTI et al. (2005)
Bactéries				
Margines/ <i>Lactobacillus plantarum</i>	-	46	-	AYED et al. (2003)
Margines / <i>Lactobacillus paracasei</i>	-	50	-	AOUIDI et al. (2009)
Microalgues				
Margines / <i>Ankistrodesmus braunii- Scenedesmus quadricauda</i>	-	50	-	PINTO et al. (2003)
Margines/ <i>Nostoc muscorum, Anabaena oryzae et Spirulina platensis</i>	-	50-80	-	MOSTAFA et al. (2019)

3.2. Bioconversion en biomolécules d'intérêt

D'après la littérature scientifique, les SPO représentent un substrat candidat potentiel pour la production de Bio-H₂, de Bio-CH₄ et de bioéthanol pour leur consistance et richesse en sucres, acides volatiles, polyalcools et lipides. Leur faible teneur en azote en fait un bon substrat convenable pour la production photo-fermentative du Bio-H₂. En effet, des concentrations élevées en NH₄⁺ inhibent la synthèse et l'activité de la nitrogénase impliquée dans le procédé fermentaire. Par ailleurs, plusieurs travaux de recherche se sont focalisés sur la production de Bio-CH₄ à travers la biodigestion anaérobie des margines (FEDORAK et HRUDEY, 1984 ; RINCÓN et *al.*, 2009 ; AL AFIF et *al.*, 2019a, 2019b). L'application du bioprocédé aux margines permet de transformer environ 80% des substances organiques en biogaz (65 à 70% de méthane). Ainsi, la fermentation méthanique permet la dépollution des margines tout en produisant de l'énergie (AISSAM., 2003). Par ailleurs, des travaux ont été aussi réalisés et orientés vers la génération du bioéthanol (MASSADEH et MODALLAL, 2008 ; ASLI et QATIBI, 2009 ; HAAGENSEN et *al.*, 2009). D'autres se sont focalisés sur la production du Bio-H₂ par des procédés photo-fermentaires (EROGLU et *al.*, 2004 ; EROGLU et *al.*, 2009a) et via la fermentation sombre (FS) ou dark fermentation (KOUTROULI et *al.*, 2006 ; NTAIKOU et *al.*, 2009). La figure 11, montre les voies de fermentations, les cultures impliquées et leur produits respectifs.

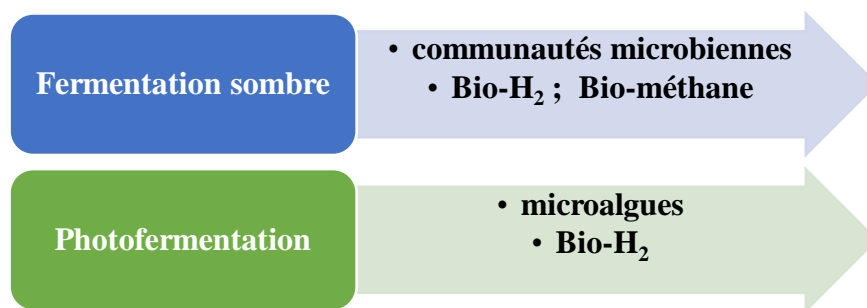


Figure 11. Voies fermentaires possibles et micro-organismes impliqués.

Les CP peuvent ralentir ou empêcher la fermentation anaérobie réduisant ainsi le rendement énergétique produit, par conséquent, ils diminuent l'intérêt économique du bioprocédé. A cet effet, les bioprocédés de prétraitement préalables à la fermentation de ces composés sont cruciaux et essentiels comme souligné par RUGGERI et *al.* (2015), lesquels ont évalué une variété de prétraitements afin d'améliorer le rendement en Bio-CH₄. Avec le véritable développement du domaine de la bioénergie, le coût de biomasses végétales et de la

matière organique fermentescible, va augmenter d'une manière significative dans un avenir proche et pourrait rivaliser avec d'autres domaines industriels. Avant de décrire les voies de bioconversion énergétiques des SPO, il convient de faire un rappel sur la biodigestion anaérobie.

3.2.1. Etapes de la bio-digestion anaérobie

La fermentation de la biomasse selon la filière dite « sombre » peut mettre en jeu soit des souches de microorganismes isolées, soit des associations de microorganismes (consortia). Il conviendra de choisir entre ces deux options suivant la stratégie de production, les produits ciblés et suivant la simplicité où complexité du substrat envisagé.

La digestion anaérobie de substrats complexes, est un procédé faisant intervenir de nombreuses réactions biologiques, elle est divisée en quatre étapes faisant intervenir différentes populations microbiennes qui se développent dans de spécifiques conditions (figures 12 et 13).

3.2.1.1. Hydrolyse de la biomasse organique

Il s'agit de la première étape de bioconversion qui consiste en une phase d'hydrolyse où la matière organique complexe est fractionnée en unités plus simples, monomériques ou oligomériques, de sucres, lipides et protéines grâce aux enzymes microbiennes. Ces unités sont ensuite hydrolysées, respectivement, en monosaccharides, acides gras à longues chaînes et en acides aminés par d'autres enzymes extracellulaires et pourront ensuite être transportés à travers la membrane cellulaire. Dans la cellule, ces molécules simples peuvent être utilisées comme source d'énergie pour le métabolisme (TRABLY et *al.*, 2013). Au cours de cette phase, interviennent des bactéries avec un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif et forment un ensemble phylogénétique hétérogène regroupant de nombreux groupes bactériens.

3.2.1.2. Acidogenèse et production de biohydrogène

Au cours de cette étape, les monomères résultants de l'hydrolyse, ainsi que les composés dissous, vont servir de substrats pour des microorganismes digesteurs qui les convertissent principalement en acides de faibles poids moléculaires comme les acides gras volatils (AGVs) tels que l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate, en alcools tels que le méthanol, l'éthanol et en gaz carbonique et en hydrogène. Les figures 12 et 13 illustrent, respectivement, la structure des principaux AGVs et les voies de biodigestion anaérobie.

Les microorganismes opérant lors de l'acidogenèse peuvent aussi bien être anaérobies facultatifs (genres *Acetobacter* ou *Streptococcus*) qu'anaérobies stricts (*Clostridium sp.*). Ainsi,

vue leur taux de croissance plus rapide que les autres microorganismes anaérobies, des composés intermédiaires comme l'hydrogène voient leurs accumulations (TRABLY *et al.*, 2013).

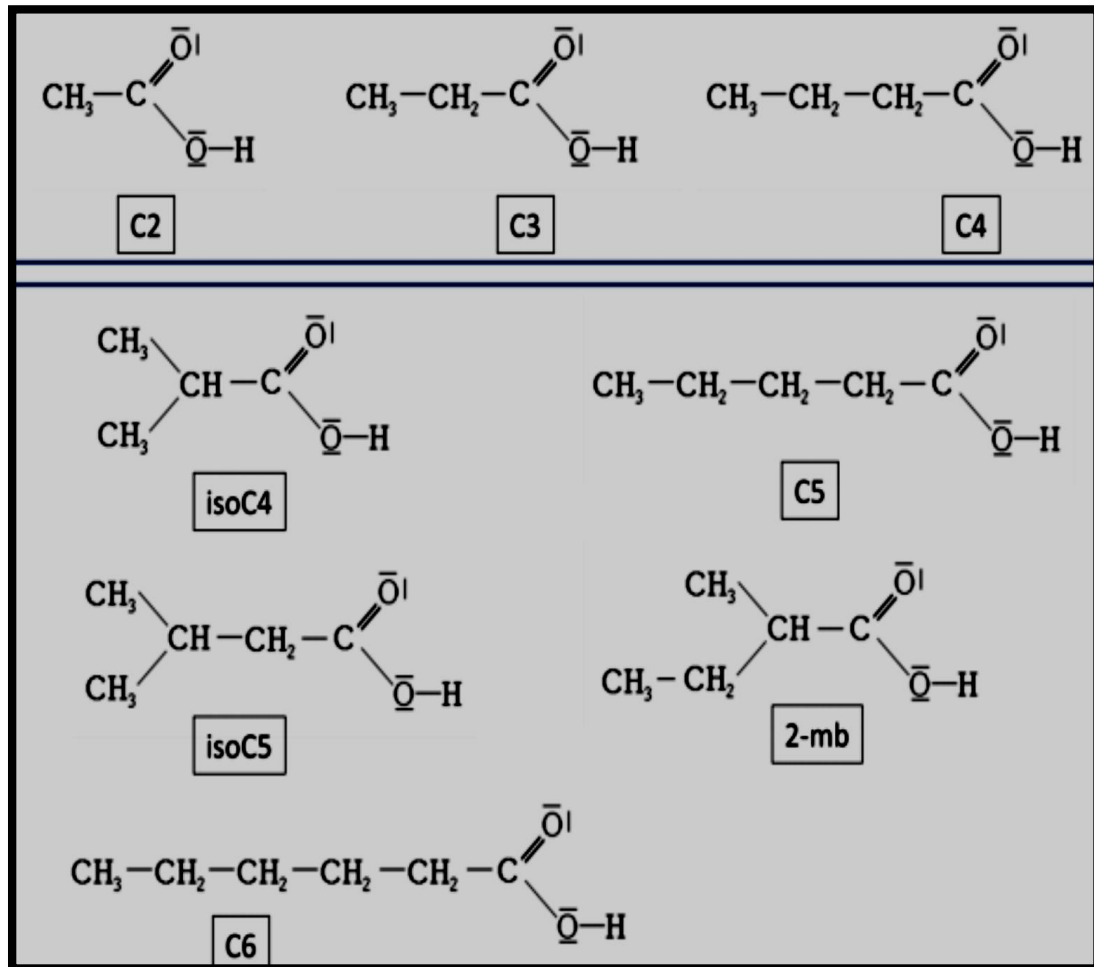


Figure 12. Structure des AGVs (SAKAKI, 2014).

Acétate (C2), Propionate (C3), Butyrate (C4), Isobutyrate (iC4 ou isoC4), Valérate (C5), Isovalérate (iC5 ou isoC5), 2-méthyl butyrate (2-mb), Caproate (C6). La différence entre IsoC4 et C4, (IsoC5 et 2-mb) et C5 qui ont un même nombre de carbone, d'hydrogène et d'oxygène est le fait que pour les iso AGVs (iso C4, iso C5, 2-mb), la chaîne carbonée n'est pas linéaire.

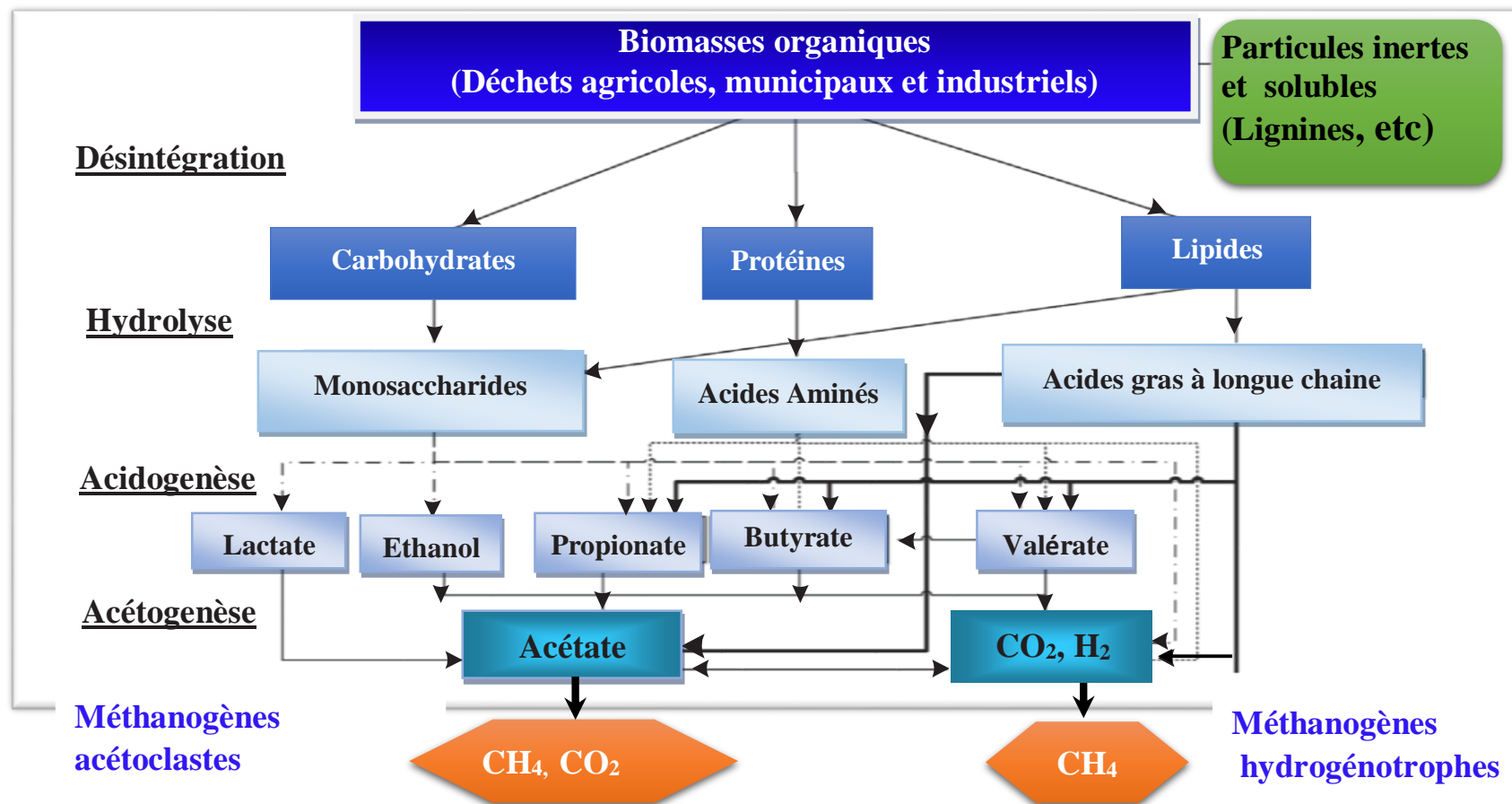


Figure 13. Etapes de biodégradation et les voies microbiologiques impliquées dans la fermentation de déchets agro-industriels (MEGONIGAL et al., 2004 ; GHIMIRE et al., 2015a).

3.2.1.3. Biométhanisation

La biométhanisation est assurée grâce à des microorganismes anaérobies strictes du domaine des Archaea. Ces derniers utilisent l'acétate, le formiate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène pour produire du méthane. La biométhanisation est alors assurée par deux grandes catégories d'Archaea méthanogènes :

- Les méthanogènes hydrogénéophiles ou hydrogénotrophes, ceux ci produisent du méthane à partir de la réduction du CO₂ ou de l'acide formique par l'hydrogène ;
- Les méthanogènes acétoclastes utilisant l'acétate pour produire du biométhane.

Les Archaea méthanogènes hydrogénéophiles vivent en association syntrophique avec les bactéries fermentaires leur fournissant continuellement le dioxyde de carbone et l'hydrogène. Elles jouent un rôle important dans le maintien d'une faible pression partielle en hydrogène, favorisant ainsi la croissance de bactéries acétogènes (GHIMIRE *et al.*, 2016).

3.2.2. Voies biochimiques et microorganismes impliqués dans la production de biohydrogène

Le glucose représente un substrat modèle pour la fermentation sombre (FS), les bactéries productrices de Bio-H₂ transforment le glucose en pyruvate via la voie glycolytique produisant de l'adénosine triphosphate (ATP) à partir de l'adénosine di-phosphate (ADP) et la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) (LI et FANG, 2007).

Le pyruvate est ensuite oxydé en acétyl coenzyme A (acétyl-CoA), dioxyde de carbone (CO₂) et en Bio-H₂ par la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase et l'hydrogénase. Selon le type du microorganisme et les conditions environnementales, le pyruvate peut aussi être convertit en acétyl-CoA et formiate lequel pourrait ensuite être biotransformé en H₂ et CO₂. L'acétyl-CoA pourrait aussi être convertis en acétate, butyrate et éthanol (LI et FANG, 2007)

La FS de carbohydrates complexes par des cultures microbiennes mixtes où microbiotes anaérobies peut fournir une large variété de métabolites intermédiaires et de sous-produits. Ces derniers dépendent des paramètres opérationnels tel que le type de substrat, la vitesse et la charge organique en substrat, le pH, la température et d'autres conditions environnementales pouvant influencer la structure des communautés microbiennes dans les réacteurs.

Les voies biochimiques de production du Bio-H₂ (tableau III) peuvent être assurées par des microorganismes anaérobies stricts (*Clostridia*, méthylotrophes, bactéries ruminales, bactéries méthanogéniques, archea, etc.), anaérobies facultatifs (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), et aussi des bactéries aérobies (*Alcaligenes*, *Bacillus*) (LI et FANG,

2007). L'acétate et le butyrate sont les produits les plus communs de la FS (HWAKES et al., 2007).

Les principales réactions biochimiques entreprises par les microorganismes anaérobies facultatifs durant la FS sont représentées dans le tableau III. Quand les voies métaboliques sont en faveur de la production de l'acétate, le rendement stœchiométrique d' H_2 est de 4 mol par mole de glucose (544 mL H_2 /g hexose à 25°C). Lorsque le produit final est le butyrate, le rendement d' H_2 est de 2 mole/ mole de glucose (272 mL H_2 /g hexose à 25°) (LI et FANG, 2007). Cependant, les rendements expérimentaux en Bio- H_2 sont plus faibles que les rendements théoriques vu qu'une partie de substrat est consommée pour la production de la biomasse microbienne. De surcroît, la biodégradation du substrat pourrait aussi suivre d'autres voies biochimiques sans production du Bio- H_2 (HALLENBECK et BENEMANN, 2002 ; NATH et DAS, 2004).

Parmi les espèces de clostridium les plus étudiées, *Clostridium butyricum* laquelle est impliquée dans la production du butyrate comme produit majeur de la FS en association avec la production de l'acétate et de Bio- H_2 (HWAKES et al., 2007). Les clostridium ont été identifiés comme des microorganismes dominants dans la production de Bio- H_2 durant la FS dans des cultures mixtes mésophiles au pH 5,5 (FANG et ZHANG, 2002). Ces derniers, en se basant sur l'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr, ont pu identifier et trouver que 64,6% de la totalité des microorganismes étaient affiliés aux trois espèces de *Clostridium* (*Clostridiaceae*), 18,8% aux *Enterobacteriaceae*, et 3,1% aux *Streptococcus bovis* (*Streptococcaceae*).

Il est bien établi que lors de l'acidogénèse, les métabolites intermédiaires générés sont biotransformés en précurseurs de biométhane : l'acétate, l'hydrogène et le dioxyde de carbone. Deux groupes de bactéries acétogènes se distinguent. Les bactéries productrices obligatoirement d'hydrogène ou OHPA (« Obligate Hydrogen Producing Acetogens »), ce sont des anaérobies stricts utilisant les métabolites issus de l'acidogénèse tels que le propionate ou le butyrate pour produire l'acétate, H_2 et le CO_2 . Les réactions issues de ces bactéries acétogènes sont thermodynamiquement défavorables ($\Delta G_0 > 0$) et ne sont possibles que si l'hydrogène est immédiatement consommé localement par d'autres micro-organismes lors d'une association symbiotique (STAMS et PLUGGE, 2009). De ce fait, la présence d'espèces permettant le maintien de la pression partielle de l'hydrogène basse (les méthanogènes) est nécessaire pour leur croissance (GODON, 2008).

Par ailleurs, il est important de noter qu'il existe également des bactéries acidogènes dites non-syntrophes. Ces dernières, réorientent leur métabolisme et produisent des acides

organiques sans coproduction d'hydrogène (genres *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Ruminococcus*) (TRABLY et al., 2013). Les bactéries acétogènes non syntrophes, dont le métabolisme est orienté vers la production de l'acétate, se développent dans un milieu riche en CO₂. Selon l'origine de l'acétate, elles se divisent en deux groupes. Les homoacétogènes produisant de l'acétate par la réduction du H₂ et CO₂ et les homoacétogènes consommateurs d'AGVs et d'alcool pour produire l'acétate (GODON, 2008).

Tableau III. Diversité physiologique des voies de production de bio-hydrogène (DERMECHE et al., 2013).

Réactions métaboliques générales	Souches microbiennes	Références
Voies uniques		
Hétérotrophes		
Production du H₂ à partir de la biomasse (Fermentation à l'obscurité)	Bactéries hétérotrophes (<i>Clostridium sp</i>)	KOTAY et DAS. (2008) ; LIN et al. (2007)
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$		
$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2$		
$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$		
Production d'H₂ à partir du CO	Bactéries photosynthétiques	KOTAY et DAS. (2008)
$CO + H_2O \longrightarrow H_2 + CO_2$		
Photo-hétérotrophes		
Production d'H₂ par bio-photolyse (Directe/Indirecte)	Micro-algues vertes (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	KATAOKA et al. (1997) ; MAHYUDIN et al. (1997) ;
$12H_2O \longrightarrow 12H_2 + 6O_2$	Cyanobactéries (<i>Anabaena sp</i>)	TANISHO et al. (1998)
Photo-production du H₂ à partir de la biomasse (photo-décomposition des composés organiques)	Bactéries phototrophes (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	KOTAY et DAS. (2008) ;
$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 12H_2$	(<i>Rhodopseudomonas palustris</i>)	ENA et al. (2010) ; EROGLU et al. (2010)
Voies combinées		
Étapes I : fermentation à l'obscurité	Anaérobies facultatives	KOTAY et DAS. (2008) ; EROGLU et al. (2006)
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$		
Étapes II : photo-fermentation	Bactéries photosynthétiques (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	
$2CH_3COOH + 4H_2O \longrightarrow 8H_2 + 4CO_2$		

3.2.3. Microorganismes consommateurs de biohydrogène

Certains microorganismes indésirables, diminuant la production du Bio-H₂, peuvent exister dans les communautés microbiennes mixtes et ce aussi bien que par la consommation de l'H₂ produit que par le détournement des voies biochimiques de synthèse de l'H₂ (LI et FANG, 2007).

Les bactéries principales consommatrices incluent les méthanogènes, homoacétogènes et les bactéries sulfato-réductrices. L'activité de ces bactéries consommatrices du Bio-H₂ peut être contrôlée par des méthodes de prétraitement des inocula ou par les conditions opératoires du bioréacteur (WANG et WAN, 2009a ; GUO et *al.*, 2010). Sous certaines conditions, les voies métaboliques conduisent vers la production de l'éthanol et d'acétate, réduisant ainsi le rendement stœchiométrique en hydrogène en 2 mole d'H₂ au lieu de 4 mole par mole de glucose (LI et FANG, 2007).

Une autre voie fermentaire consiste en la production du propionate par des *Clostridium articum*, laquelle est une voie consommatrice du Bio-H₂. Dans le même sens, les voies métaboliques produisant de l'éthanol et du lactate comme par les *Clostridium barkeri* ne génèrent pas de Bio-H₂ (KHANAL et *al.*, 2003). Certains homoacétogènes appartenant au genre *Clostridium* peuvent diminuer le rendement du Bio-H₂ en convertissant l'H₂ et le CO₂ en acétate ou bien en convertissant les hexoses directement en acétate (KIM et *al.*, 2006 ; HWAKES et *al.*, 2007). Toutefois, l'analyse des métabolites solubles peut renseigner sur la voie fermentaire et la performance du système. D'autres espèces comme *Bacillus spp.* et *Lactobacillus spp.* réduisent le rendement en Bio-H₂ en réorientant le métabolisme vers l'accumulation de l'acide lactique.

3.2.4. Produits de valeur issus de la production de biohydrogène

La production photobiologique du Bio-H₂ à partir des margines par des bactéries phototrophes pourpres non sulfureuses génère des produits de valeur tels que les polyhydroxyalcanoates (PHA) et des pigments caroténoïdes (EROGLU et *al.*, 2004, NTAIKOU et *al.*, 2009). Les pigments caroténoïdes peuvent avoir des utilisations commercialement viables comme anticancéreux, colorants alimentaires et antioxydants naturels ou, alternativement, comme une source de provitamine A. Les PHAs peuvent avoir d'importantes applications industrielles, en particulier dans le domaine de la biodégradation des matières en plastique. Ces granules de polyester intracellulaires sont produits par certaines bactéries pour stocker le carbone et l'énergie grâce au métabolisme des acides gras (KESSLER et *al.*, 2001). En outre, NTAIKOU et *al.* (2009) ont montré la faisabilité d'une production combinée de Bio-H₂ et de biopolymères à partir des margines en utilisant un bioprocédé à deux étapes.

3.2.5. Facteurs pouvant moduler la production de biohydrogène

Des méthodes de prétraitements de substrat ou d'enrichissement en bactéries productrices et d'inhibition de consommatrices d'hydrogène peuvent être envisagées (figures 14 et 15). Dans

ce sens, le traitement thermique demeure la méthode la plus utilisée et est basée sur les propriétés de sporulation des *Clostridium*s. Des temps de séjours hydrauliques courts, dans des systèmes continus, sont aussi appliqués et visent à assurer un lessivage des bactéries les plus lentes et consommatrices d'hydrogène, notamment les méthanogènes (ZHANG et al., 2006).

Une autre méthode consiste à utiliser des pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 10 afin d'enrichir le consortium en microorganismes producteurs d'hydrogène (CHEN et al., 2002). Une combinaison de ces méthodes est envisageable dans le but d'obtenir une meilleure sélection en micro-organismes producteurs d'hydrogène à partir de nombreux types de substrats organiques (LI et FANG, 2007).

3.2.5.1. Inoculum et méthodes d'enrichissement en vue de la production de biohydrogène

Différentes espèces de clostridium et d'entérobactéries ont été utilisées en culture pure (SYDNEY, 2013). LEE et SHOW (2011) et ELSHARNOUBY et al. (2013) ont rapporté dans leur revue, des études conduites en FS avec des cultures pures. Les bactéries synthétisant l' H_2 existent communément dans des environnements variés comme le sol, les boues des eaux usées et les compostes. Toutes ces sources microbiennes peuvent être utilisées comme inoculum en vue d'une production fermentaire du Bio- H_2 (LI et FANG, 2007). En effet, le fumier de vache, boues anaérobies, déchets solides municipaux, sol et compostes sont des sources de culture microbiennes mixtes les plus courantes.

3.2.5.2. Traitements chimiques et aération

Les traitements acides ou basiques sont fondés sur la notion dictant que l'activité des microorganismes méthanogènes diminue nettement aux valeurs de pH inférieurs à 6 ou proche de 7,8 (LI et FANG, 2007), alors que les activités des *Clostridia sp.* et d'autres producteurs de Bio- H_2 ne sont pas affectées au pH acide (< pH 6).

D'autres méthodes de prétraitements chimiques et d'aération sont orientées vers une sélective inhibition des microorganismes méthanogènes présents dans les boues anaérobies, lesquels sont très sensibles aux changements de conditions environnementales. En plus de leur nature anaérobie stricte, les méthanogènes sont aussi sensibles à divers produits chimiques (LI et FANG, 2007). En effet, l'oxygène peut inhiber leur activité durant l'aération (ZHU et BELAND, 2006 ; WANG et WAN 2008). WANG et WAN (2008) ont par exemple exposé l'inoculum de boues à l'aération durant 24 h afin d'inhiber les méthanogènes.

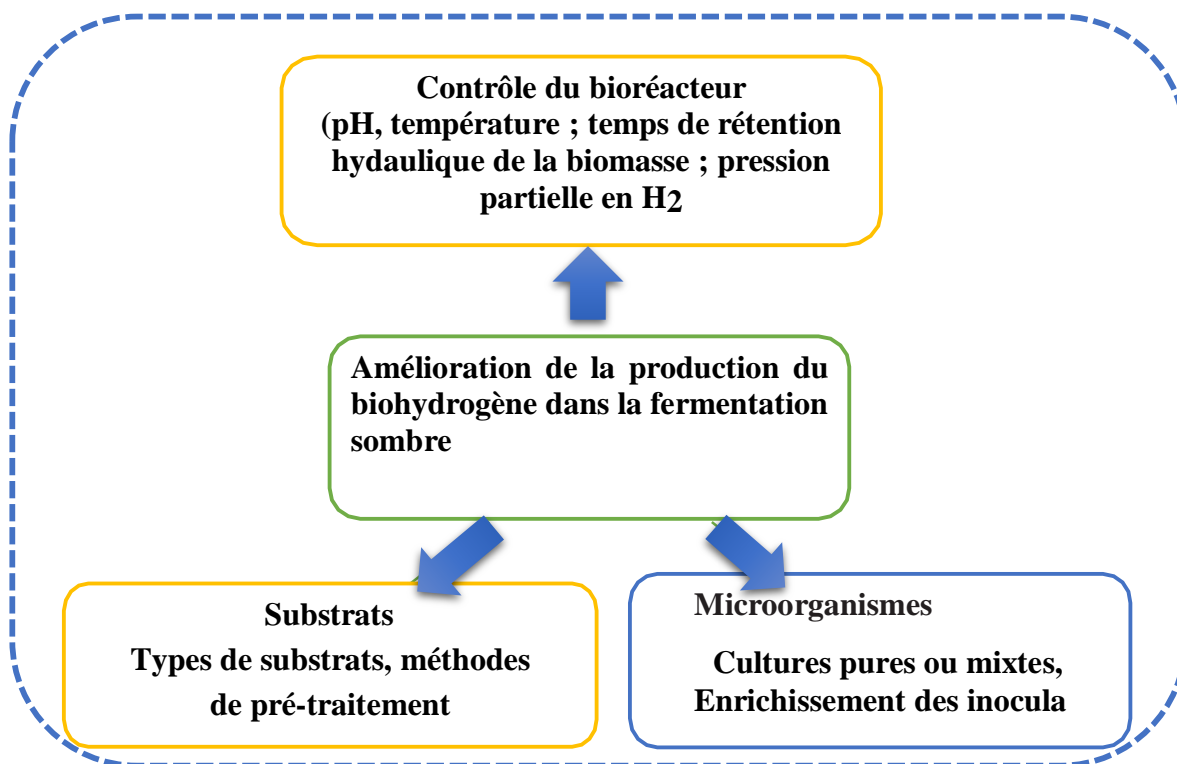


Figure 14. Stratégies employées pour l'amélioration du rendement en biohydrogène durant la voie fermentaire sombre de substrat organiques (GHIMIRE *et al.*, 2015a).

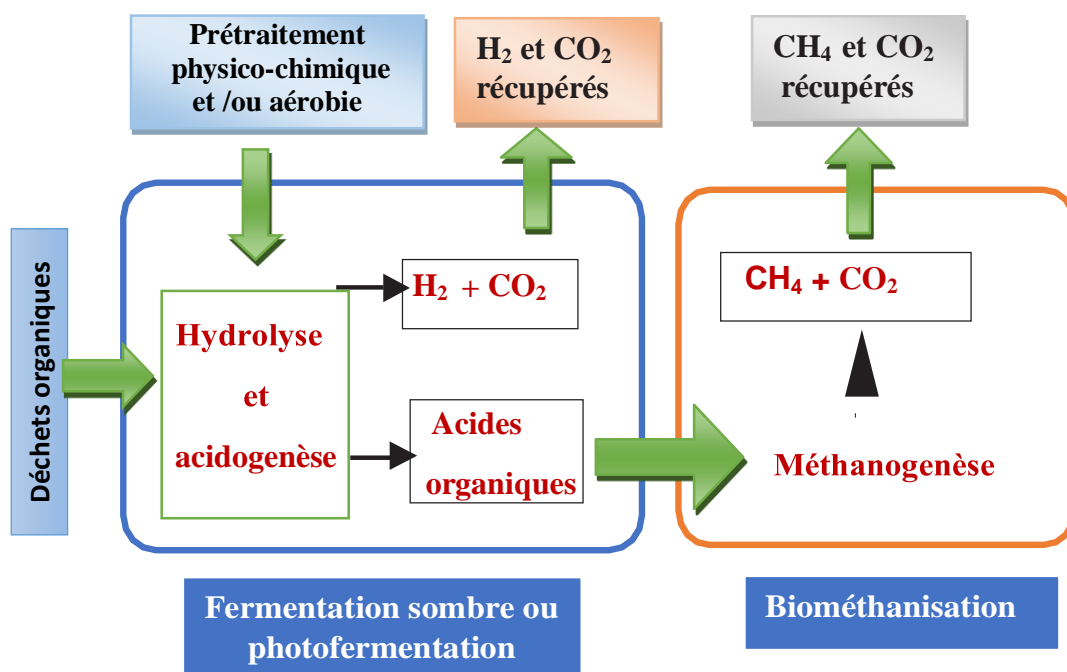


Figure 15. Bioprocédé en deux étapes pour la production de biohydrogène et du biométhane à partir de déchets organiques (GHIMIRE *et al.*, 2015a). Figure modifiée.

Des produits chimiques inhibiteurs de méthanogènes comme le iodopropane, chloroforme et acétylène, ont été rapportés dans la littérature (ZHU et BELAND, 2006 ; LI et FANG, 2007 ; VENKATA et *al.*, 2008 ; WANG et *al.*, 2011a ; GONCALVES et *al.*, 2014b ; GHIMIRE et *al.*, 2015b). Toutefois, afin de sélectionner la méthode de prétraitement pour une culture à grande échelle « scaled-up », plusieurs paramètres doivent être pris en considération tels que le couts d'opération, la faisabilité et la complexité de la méthode, le temps de l'enrichissement des producteurs de Bio-H₂ et l'utilisation des résidus de la FS dans un autre procédé ou post-traitement (GHIMIRE et *al.*, 2015d).

Il est à noter que le prétraitement acide ou un choc par une haute charge organique peuvent être appliqués à grande échelle pour sélectionner des inocula producteurs de Bio-H₂ sans consommation nette et importante d'énergie (GHIMIRE et *al.*, 2015c).

Certaines études en FS ont été aussi menées avec la microflore autochtone ou intrinsèque des substrats sans ajout d'inoculum exogène (KIM et *al.*, 2009 ; FAVARO et *al.*, 2013). Ainsi la production du Bio-H₂ prenait plus de temps comparée aux tests réalisés avec ajout d'inoculum.

Le prétraitement de l'inoculum est particulièrement important pour les tests en batch ou lors des premiers essais de fermentation. Des communautés microbiennes productrices de Bio-H₂ très performantes peuvent être développées en bioréacteur avec des conditions opératoires convenables (CASTELLO et *al.*, 2009 ; LEE et *al.*, 2008 ; ZAHEDI et *al.*, 2014).

3.2.5.3. Effet du potentiel d'hydrogène

Plusieurs études ont démontré que des valeurs de pH acides (< 6) sont inhibitrices surtout vis-à-vis du déroulement de la biométhanisation aussi bien qu'en conditions mésophiles que thermophiles. Cependant, l'inhibition des activités homoacétogéniques consommatrices du Bio-H₂ ne peut être assurée que sous conditions thermophiles à un pH initial de 5,5 (LUO et *al.*, 2011). En effet, le contrôle du pH et de la température au cours du bioprocédé fermentaire, joue un rôle important pour un meilleur rendement de bioconversion en Bio-H₂, ceci en minimisant l'activité des microorganismes consommateurs du Bio-H₂.

Le pH représente l'un des paramètres clés qui peut avoir un effet sur les voies métaboliques et pouvant aussi affecter directement l'activité hydrogénase, une enzyme ferrique, qui joue un rôle majeur dans la FS (DABROCK et *al.*, 1992). Un pH acide affecte non seulement l'activité de l'hydrogénase mais joue aussi un rôle important dans l'inhibition des méthanogènes dans les systèmes de cultures microbiennes mixtes.

3.2.5.4. Pression partielle en biohydrogène

La pression partielle en Bio-H₂ siégeant dans le bioréacteur peut affecter la production du Bio-H₂ via la FS. En effet, une faible pression partielle dans l'espace libre du bioréacteur facilite le transfert du Bio-H₂ de la phase liquide vers la phase gazeuse (MANDAL *et al.*, 2006 ; BASTIDAS-OYANEDEL *et al.*, 2012).

3.2.5.5. Prétraitement du substrat en vue d'augmenter le rendement en biohydrogène

La production de Bio-H₂ à partir de substrats lignocellulosique est souvent limitée par l'hydrolyse biochimique (MONLAU *et al.*, 2013). Les substrats organiques complexes tels que les biomasses lignocellulosiques, notamment le grignon ou autres substrats comme les margines riches en composés récalcitrants, requièrent souvent des prétraitements physiques, chimiques, biologiques ou bien la combinaison de ces traitements afin d'améliorer leur biodégradation, la performance du système et ainsi la production du biogaz. Ces prétraitements réduisent la cristallinité de la cellulose et augmentent la surface du matériau pour améliorer la séparation des fractions lignine et hémicellulose (SARATALE *et al.*, 2008). Ils peuvent aussi réduire les composés toxiques aux microorganismes comme ceux communément retrouvés dans les margines (DERMECHE *et al.*, 2013). Les méthodes de prétraitements ont en générale des impacts positifs sur le rendement en Bio-H₂ du fait qu'il soit dépendant de la fraction soluble des sucres et des hydrates de carbone.

Les prétraitements physiques incluent les méthodes de prétraitements mécaniques (découpage, broyage), d'irradiation aux rayons gamma, micro-ondes, traitement hydrothermiques, haute pression de vapeur ou pyrolyse. Ils sont efficaces dans la destruction de la cristallinité, augmentant ainsi la surface accessible à la dégradation biologique et réduisant le degré de polymérisation (TAHERZADEH *et KARIMI*, 2008). Les méthodes chimiques, comme l'ozonolyse, hydrolyse acide, extraction par solvant, explosion sous pression de vapeur d'ammoniaque ou de CO₂, sont efficaces dans l'augmentation de la surface et la délignification. Elles réduisent aussi la cristallinité aboutissant à une hydrolyse partielle ou complète d'hémicellulose. Ces traitements physico-chimiques peuvent être prometteurs pour des applications industrielles en raison de leur rapidité. Toutefois, ces méthodes sont consommatrices d'énergie. Par ailleurs, les substrats peuvent être traités biologiquement par des microorganismes fongiques et des actinomycètes pouvant engendrer une délignification et une partielle hydrolyse de la cellulose. D'autres enzymes (hémicellulases et cellulases) peuvent contribuer à l'hydrolyse et à la dégradation de matériaux complexes ou lignocellulosiques (MUSSOLINE *et al.*, 2012).

3.3. Valorisation bio-énergétique des margines et des grignons

Plusieurs travaux ont pu démontrer que différents bioprocédés peuvent être appliqués aux SPO qui peuvent être exploités pour la récupération des polyphénols (MONTI *et al.*, 2013), pour la fermentation anaérobie et la production de biofuels (DERMECHE *et al.*, 2013) tels que le biométhane (GONCALVES *et al.*, 2014b ; AL-MALLAHI *et al.*, 2015; GONZALEZ-GONZALEZ *et al.*, 2015 ; KHOUFI *et al.*, 2015 ; PINTO-IBIETA *et al.*, 2016; SICILIANO *et al.*, 2016 ; AL AFIF *et al.*, 2019) et le Bio-H₂ (GONCALVES *et al.*, 2014b; GHIMIRE *et al.*, 2015b; PAGLIACCIA *et al.*, 2015 ; GHIMIRE *et al.*, 2016).

Grignons et margines sont riches en matière organique comme décrit ci-dessus, ils contiennent des substances complexes et inhibitrices, les polyphénols, qui peuvent ralentir ou empêcher la fermentation anaérobie. A cet effet, un prétraitement biologique, chimique ou physique de ces substrats oléicoles est essentiel afin de réussir un procédé fermentaire, comme décrit dans le travail de RUGGERI *et al.* (2015), lesquels ont évalué une variété de prétraitements afin d'améliorer le rendement en biométhane. Des procédés fermentaires combinés, pour deux type de molécules, ont été aussi investigués.

3.3.1. Biohydrogène

L'hydrogène est considéré comme un vecteur d'énergie idéale et propre. Les avancées récentes dans le domaine de la biovalorisation énergétique de la biomasse et de résidus organiques d'origine agricole et industriel, laissent entrevoir une place non négligeable pour la production de biohydrogène par fermentation de substrats riches en hydrates de carbone. Un tel bioprocédé permet de coupler l'épuration d'une charge organique et la production d'énergie renouvelable.

La production de biohydrogène a été observée dans de nombreux écosystèmes aérobies et anaérobies. L'hydrogène est en effet un sous-produit soit de la photosynthèse, soit de la photofermentation, soit des voies fermentaires bactériennes (« dark fermentation ») (Lee *et al.*, 2013 ; GHIMIRE *et al.*, 2015a). Dans ce dernier cas, des microorganismes anaérobies utilisent des substrats organiques pour leur croissance tout en générant de l'hydrogène. Dans la nature, ces substrats peuvent être utilisés par d'autres microorganismes pour produire des composés organiques sans production d'H₂ (lactate, éthanol, propionate, etc.), ce qui tend à réduire le rendement de conversion vers l'hydrogène. Enfin, l'hydrogène étant une molécule de transfert d'électrons entre espèces microbiennes, il est facilement utilisé par de nombreux microorganismes pour leur propre métabolisme, comme les bactéries homoacétogènes.

Les bioprocédés à une ou deux étapes de fermentation (figure 15 et tableau IV) ont été développés pour la production de Bio-H₂ à partir des margines et des grignons. Le biohydrogène peut être produit à partir des SPO aussi bien par FS simple ou en deux étapes, que par photofermentation (EROGLU et *al.*, 2006). D'autre part, le procédé en deux étapes pour la production de biogaz a été appliqué, où le Bio-H₂ a été produit dans la première étape et le biométhane dans la seconde (DERMECHE et *al.*, 2013). Des procédés en deux étapes thermophiles aussi bien que la production fermentative mésophile de Bio-H₂ à partir de la pulpe olive a été étudié. GONZALEZ-GONZALEZ et CUADROS (2015) ont conduit leurs expériences de digestion anaérobie en utilisant des margines, préalablement aérées comme substrat de fermentation, ayant donné comme résultat une production de biométhane.

La production de BioH₂ à travers une FS de grignons humides dilués (1/4) a été démontré comme faisable avec des productions de 2,8-4,5 mmol de Bio-H₂ par gramme de glucides consommés (KOUTROULI et *al.*, 2006 ; KOUTROULI et *al.*, 2009).

Avec un bioréacteur en continu sous agitation ou CSTR (completely stirred tank reactor), il est bien évident que l'un des principaux facteurs modulant le rendement de Bio-H₂ est le HRT (KOUTROULI et *al.*, 2006 ; NTAIKOU et *al.*, 2009). A titre d'exemple, comme rapporté par ces derniers, des HRT compris entre 27 et 33 h se sont avérés favorables en termes de l'acidification totale des eaux usées et la production de propionate, tandis qu'une valeur HRT de 14,5 h favorisait à la fois la production de Bio-H₂ et le rapport butyrate /acétate (NTAIKOU et *al.*, 2009).

Dans leur étude, EROGLU et *al.* (2006) ont également travaillé sur un bioprocédé à deux étapes où une FS par des cultures de boues activées a été combinée avec une photofermentation par *Rhodobacter sphaeroides* dans des réacteurs discontinus. Le rendement le plus élevé (29 L/L margines) de la post-photofermentation a été obtenu en utilisant les margines diluées (50%, v/v) issues de l'étape de la FS comme substrat. Le BioH₂ et le bio-méthane ont été également produits dans un procédé à deux étapes où le BioH₂ a été produit dans la première étape et le biométhane dans la seconde (KOUTROULI et *al.*, 2009).

3.3.2. Acides gras volatils

D'autres travaux ont aussi montré la production de biomolécules telles que les AGVs par des biodigesteurs anaérobies sur les margines (MONTI et *al.*, 2013; GAMEIRO et *al.*, 2015 ; SCOMA et *al.*, 2016 ; YARIMTEPE et *al.*, 2017). Ces derniers sont des composés aliphatiques à courte chaîne linéaires, qui représentent des précurseurs appropriés pour la production de biopolymères, les produits chimiques réduits (esters, cétones, aldéhydes, alcools et alcanes) et le biodiesel.

Tableau IV. Bioconversion des sous-produits oléicoles en biométhane et en biohydrogène par un procédé unique et / ou combiné (DERMECHE et al., 2013).

Procédé en une seule étape de fermentation					
Substrat	Culture	Microorganismes	Produit	Rendement	Références
Margines	Photofermentation	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Bio-H ₂	16L/L	EROGLU et al. (2008)
Margines diluées			Bio-H ₂	13,9L/L	EROGLU et al. (2004)
Margines diluées			Bio-H ₂	0,05L/L	EROGLU et al. (2010)
Margines diluées	FS	Boues anaérobies	Bio-CH ₄	108L/Kg DCO	FOUNTOULAKIS et al. (2008)
Margines/ Effluents d'abattoirs	FS	Boues anaérobies	Bio-CH ₄	184L/Kg DCO	FOUNTOULAKIS et al. (2008)
Margines/ résidus vinicoles	FS	Boues anaérobies	Bio- CH ₄	214L/Kg DCO	FOUNTOULAKIS et al. (2008)
Grignon	FS	-	Bio- CH ₄	93,5% de DCO	CABRERA et al. (2019)
Grignon humide	FS	Grignon/ fumier (75/25)	Bio- CH ₄	112,40L/ Kg VS	RUBIO et al. (2019)

Suite du tableau IV. Bioconversion des sous-produits oléicoles en biométhane et en biohydrogène par un procédé unique et / ou combiné.

	Procédé en deux étapes				
Substrat	Etape 1 : type de culture et microorganismes	Etape 2 : type de culture et microorganismes	Produit	Rendement	Références
Margines diluées	Fermentation anaérobie (boues activées) dans CSTR	Culture aérobie (<i>Pseudomonas</i>) dans un SBR	Bio-H ₂ PHAs	0,33L/L 0,089g/g de biomasse	NTAIKOU et al. (2009)
Margines	Culture aérobie (<i>Candida tropicalis</i>) dans un réacteur discontinu	Co-digestion anaérobie (boue activée) dans un FBR	Bio-CH ₄	29L/L	MARTINEZ-GARCIA et al. (2009)
Margines fumier	Acidogenèse (microflore indigène) dans CSTR	Méthanogenèse dans un CSTR	Bio-CH ₄	0,91L/Jour	DAREIOTI et al. (2010)
Grignon humide	Acidogenèse (boue anaérobie) dans CSTR	Méthanogenèse dans un CSTR	Bio-CH ₄	261L/Kg de DCO	RINCÓN et al. (2009)
Grignon solide	Microorganismes acclimatés (40 jours)	Méthanogenèse dans (CSTR)55° C	Bio-CH ₄	8%	AL AFIF et LINKE (2019)
Grignon solide	Microorganismes acclimatés (40 jours)	Méthanogenèse dans (CSTR)55° C et traitement enzymatique	Bio-CH ₄	Elévation de 10%	AL AFIF et LINKE (2019)
Margines	Prétraitement par l'argile	Photo-fermentation <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Bio-H ₂	31,5 L/L	EROGLU et al. (2008)
Margines diluées	Prétraitement par filtration	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> dans un PBR	Bio-H ₂	0,15L/L	FARALONI et al. (2011)
Margines diluées (25%)	Prétraitement par charbon actif (déphénolisation)	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. S16-FVPT5	Bio-H ₂	4,55 L/L	CARLOZZI et al. (2019)

Le grignon humide a été rapporté idéal pour des productions mésophiles et thermophiles (55°C) de biométhane (KOUTROULI et al., 2009). Il a été démontré que la production de bio-H₂ dans des conditions thermophiles était plus efficace que le procédé mésophile en termes du taux et du rendement de production (CLAASSEN et al., 1999).

Les fermentations à deux étapes ont été également signalées en utilisant les microalgues et les margines comme substrat (SANCHEZ VILLASCLARAS, 1996 ; PINTO et al., 2003). En effet, FARALONI et al. (2011) ont aussi proposé la photoproduction du Bio-H₂ par la souche de *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.3.3. Biométhane

Dans les bioprocédés de méthanisation des SPO on peut distinguer ceux à deux étapes de traitement aérobie-anaérobie et ceux à deux phases de digestion anaérobie (tableau IV).

Les champignons ont été largement utilisés pour prétraiter les SPO avant la digestion anaérobie (HAMDI et al., 1992 ; BLIKA et al., 2009). Le prétraitement des margines avec *Aspergillus niger* avait pour effet un dédoublement de la production du biométhane dans la subséquente digestion anaérobie (HAMDI, 1991 a, b).

D'autres travaux menés sur la digestion anaérobie des margines après un prétraitement avec la même souche, ont montré une élimination de plus de 60% de DCO, entraînant des rendements élevés en biométhane (HAMDI et al., 1992 ; HAMDI et ELLOUZ, 1993). De même, des études utilisant *Aspergillus terreus* ont prouvé que le prétraitement aérobie pouvait réduire significativement la concentration en CP et améliorer la production du biométhane jusqu'à 23% (BORJA et al., 1995).

Les levures, particulièrement *Candida tropicalis*, ont été aussi utilisées sous des conditions aérobies pour le prétraitement des margines avant la co-digestion anaérobie (MARTINEZ-GARCIA et al., 2009). Un tel système combiné a entraîné une réduction de la DCO et une biodégradation du contenu en CP des margines en plus d'une bonne amélioration de la production du biométhane.

Les études menées par RINCON et al. (2010) ont démontré que deux phases de digestion anaérobies offrent une alternative intéressante à la digestion anaérobie à une seule phase. Dans la première phase, les matières organiques complexes, glucides, protéines, lipides, acides aminés et acides gras à longues chaînes, sont hydrolysés puis convertis par des bactéries acidogènes en des intermédiaires tels que les AGVs et les alcools. Dans la deuxième phase, ces métabolites seront métabolisés et bio-transformés en CH₄ et CO₂ par les méthanogènes.

Appliquée au grignons humides, la digestion anaérobie fournit des effluents bien stabilisés et un rendement élevé en biométhane (0,268 L CH₄ / g DCO éliminée).

Une autre approche intéressante est la co-digestion des margines avec d'autres substrats déchets comme le fumier, les eaux usées d'abattoirs, le fumier bovin liquide, fournissant des rendements attractifs en biométhane (GELEGENIS *et al.*, 2007 ; FOUNTOULAKIS *et al.*, 2008 ; DAREIOTI *et al.*, 2010 ; RUBIO *et al.*, 2019).

Enfin, d'autres travaux relatifs aux SPO, entrepris dans des conditions plus ou moins similaires de celles de la présente thèse, sont résumés dans un tableau réservé pour la partie discussion des résultats.

3.3.4. Lipides pour biodiesel

La bioconversion des margines en lipides de haute valeur contenant des acides gras polyinsaturés, en parallèle avec une élimination de la teneur en CP par des souches sélectionnées de Zygomycètes, est rapportée pour la première fois par BELLOU *et al.* (2014). Ces auteurs ont montré que les zygomycètes (telles *T. elegans* et *Z. moelleri*) sont capables de croître sur des margines et d'accumuler des lipides riches en acides gras polyinsaturés. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la gestion et la valorisation des margines. Les acides oléiques et palmitiques ont été les acides gras prédominants. Des pourcentages élevés en acide gamma-linolénique (jusqu'à 17,7% p/p) ont été enregistrés parmi les lipides de *Z. moelleri*. De même, l'adaptation de *Yarrowia lipolytica* dans des milieux à base de margines a favorisé la biosynthèse des acides gras cellulaires insaturés, principalement les acides oléique et palmitoléique (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008).

Certaines études ont été également conduites à propos de la bioconversion des SPO en biodiesel. Il s'agit des travaux de YOUSUF *et al.* (2010), lesquels ont rapporté que *Lipomyces starkeyi* pourrait être une souche de levure prometteuse pour la conversion des margines en lipides pour une production ultérieure de biodiesel. Ils ont démontré que cette levure est capable de proliférer en présence de margines brutes, non diluées et sans enrichissement, tout en réduisant leurs teneurs en CP totaux. Néanmoins, comparativement aux margines brutes, une réduction de la teneur en CP et une augmentation significative du rendement lipidique était observée (28,6% contre 22,4%) sur les margines diluées à 50% avec de l'eau distillée. Les profils d'acides gras obtenus ont montré une prévalence de l'acide oléique, ce qui confirme le potentiel de cette levure à stocker des lipides appropriés à la production de biodiesel.

Quant à SARRIS *et al.* (2017), leur étude consistait à évaluer la croissance de *Yarrowia lipolytica* sur des milieux commerciaux enrichis en glucose et en margines concentrées (c.-à-d.

en grandes teneur en CP). Les résultats auxquels sont parvenus ces auteurs ont révélé la capacité de la souche à croître et à produire de la biomasse riche en lipides et ce, malgré la présence d'une forte concentration en CP. L'ajout de margines dans le milieu avait pour effet de favoriser l'accumulation de lipides de stockage. Les fermentations avec limitation en azote et en carbone avaient comme résultat une décoloration remarquable et une réduction non négligeable des CP.

3.4. Bioconversion en biopolymères et autres biomolécules

3.4.1. Bioéthanol

MASSADEH et MODALLAL (2008) ont évalué la capacité d'une souche de *Pleurotus sajor-caju* à dégrader les CP des margines. Au vu des résultats obtenus, le prétraitement par *Pleurotus sajor-caju* a permis une amélioration de la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* sur les margines. Le rendement le plus élevé, de l'ordre de 14,2 g/L, a été obtenu après 48 h de fermentation sur des margines diluées à 50% et traitées thermiquement.

SARRIS et al. (2014) ont également testé *Saccharomyces cerevisiae* MAK-1 pour le traitement de margines et la production simultanée de composés de valeur ajoutée. Dans des conditions aérobies, les cultures dans des milieux à base de mélasse ont été additionnées de margines. Comparativement aux expériences témoins, c.-à-d. les cultures sans supplémentation en margines, aucune diminution significative dans la production de l'éthanol (34,3 g/L) ou de biomasse (7,3 g/L) n'a été observée. Cependant, dans des conditions en bioréacteurs aérés, la production de biomasse avait diminué (5,7 g/L) tandis que le rendement en éthanol a été nettement amélioré (jusqu'à 41,8 g/L).

3.4.2. Polysaccharides

De nombreuses équipes de recherches ont traité les margines par voie microbienne pour produire des polysaccharides (RAMOS-CORMENZA et al., 1995 ; LOPEZ et RAMNOS-CORMENZANA, 1996 ; MORILLO et al., 2007 ; AGUILERA et al., 2008 ; MORILLO et al., 2008a). Les margines ont été proposées comme un substrat de faible coût pour la production de xanthane par *Xanthomonas campestris*. La mise en culture sur les margines diluées (30 à 40%), comme unique source de nutriment, a donné un rendement de 4,4 g/L de xanthane. Un enrichissement avec de l'azote et/ ou de sels a montré une augmentation considérable dans les rendements en xanthane, jusqu'à un maximum de 7,7 g / L (LOPEZ et al., 2001).

Différentes souches de *Paenibacillus jamilae* ont également été exploitées pour la production d'exopolysaccharides en utilisant les margines comme sources de carbone et

d'énergie, réduisant ainsi leur toxicité. Le rendement le plus élevé était de l'ordre de 5,1 g / L avec les margines à 80% (MORILLO et al., 2007 ; AGUILERA et al., 2008).

Avec du grignon humide (extrait aqueux de 20%, p/v) utilisé comme substrat, le rendement maximum obtenu en exopolysaccharide était de 2g /L (MORILLO et al., 2006). Ces exopolysaccharides sont proposés pour être appliqués comme des biofiltres de métaux lourds qui contaminent les eaux (MORILLO et al., 2008b). Enfin, il a été aussi démontré que les souches de *Pseudomonas sp.* peuvent proliférer et accumuler des rhamnolipides sur les margines (MERCADÉ et al., 1993).

3.4.3. Biosurfactants

Une autre approche étudiée par MOYA et al. (2015), consiste en la production d'un biosurfactant par culture de deux espèces bactériennes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* sur des margines comme seule source de carbone. *Bacillus subtilis* s'est avérée capable de produire un lipopeptide ou surfactine à une concentration maximale de 3,12 mg/L à 2% (p/v) de margines. Cette valeur diminue à 0,57 mg/L à 10% de margines. En revanche, *Pseudomonas aeruginosa* a montré une production de 8,78 mg/L de rhamnolipides avec les margines à 2% qui s'élève à 191,46 mg/L avec celles à 10%. Ces résultats confirment que les margines sont un substrat potentiel pour la production de biosurfactants.

3.4.4. Acide citrique

Plusieurs travaux, comme ceux de DOUROU et al. (2016) et PAPADAKI et al. (2019), ont été menés sur la production de l'acide citrique. DOUROU et al. (2016) ont démontré la bioconversion de margines diluées enrichies en glycérol en acide citrique et ce, par *Yarrowia lipolytica*. Quant à PAPADAKI et al. (2019), ils visaient à optimiser la production de l'acide citrique, par fermentation avec *Aspergillus niger B60*, sur des margines espagnoles enrichies en sucres issus du marc de raisin blanc. La teneur maximale en acide citrique était de l'ordre de 85g/L, soit un rendement de 0,56g/g, obtenu suite à l'addition de saccharose et de NH_4NO_3 (100g/L et 1,1g/L, respectivement). Des réductions concomitantes de 78% et 64%, ont été enregistrées respectivement pour la DCO et la teneur en CP.

Dans les travaux de SARRIS et al. (2017), avec *Yarrowia lipolytica* sur de fortes concentrations en margines, des quantités satisfaisantes en acide citrique ont été enregistrées avec des teneurs limitées en azote dans les milieux, tandis qu'une production non négligeable de biomasse a été observée dans des milieux à teneurs limitées en carbone.

3.4.5. Protéines et champignons comestibles

Les margines peuvent être utilisées pour obtenir des champignons comestibles, en particulier les espèces *Pleurotus*, *Lentinula* et *Agaricus* (ALTIERI et al., 2009 ; KOUTROTSIOS et al., 2016). KALMIS et al. (2008) ont cultivé *Pleurotus ostreatus* sur un mélange de substrat de paille de blé avec de l'eau et des concentrations croissantes de margines. Avec une concentration de 25% (v/v), les résultats expérimentaux ont montré des effets positifs sur la croissance des champignons. L'augmentation de la concentration en margines a eu des effets négatifs, notamment une déformation de la forme du corps du fruit. LAKHTAR et al. (2010) ont aussi sélectionné quatre souches de *Lentinula edodes* parmi d'autres en raison des rendements plus élevés en biomasse obtenus avec des margines à 20% (v/v). Dans une étude récente (KOUTROTSIOS et al., 2016), le mycélium le plus abondant d'*Hericium erinaceus* a été obtenu avec des margines à 50 %, atteignant $154,80 \pm 8,45$ mg/100 mL.

La production de protéines d'organismes unicellulaires s'est avérée aussi possible sur des margines après déphénolisation par microfiltration, condensation par l'osmose inverse, et l'ajout de sources minérales et d'azotes. GIAVASIS et PETROTOS (2016), ont cultivé *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* et *Pleurotus ostreatus* sur des margines en flacons agités et en bioréacteur de 15 litres, sous des conditions opératoires contrôlées. Les résultats auxquels ils sont parvenus ont confirmé que *Pleurotus ostreatus* est un bon producteur de protéines à partir de margines tout en réduisant sa charge organique. Quant aux levures, une productivité plus élevée en protéines est obtenue avec *Candida utilis* et des concentrations appréciables en protéines sont produites par les deux autres levures, cependant le procédé nécessite la déphénolisation des margines (GIAVASIS et PETROTOS, 2016).

3.4.6. Bioconversion en enzymes

Les enzymes industrielles peuvent être produites par des levures et des champignons filamenteux en utilisant les SPO comme substrats de culture (AGUILERA et al., 2008). Les principales enzymes obtenues par le traitement fongique sont les lipases, les peroxydases Mn-dépendante, les laccases et les pectinases.

Les laccases et les peroxydases Mn-dépendantes ont été aussi produites par *Panus tigrinus* et les pectinases par *Cryptococcus var albidus* (CROGNALE et al., 2006). Les lipases ont été obtenues par culture de *Candida cylindracea* et de *Yarrowia lipolytica* (LANCIOTTI et al., 2005 ; D'ANNIBALE et al., 2006 ; BROZZOLI et al., 2009 ; GONCALVES et al., 2010). Ces lipases microbiennes trouvent leur application dans les industries laitières, les produits pharmaceutiques, les détergents et d'autres industries (CORDOVA et al., 1999).

D'autres travaux, comme ceux de LEITE et *al.* (2016), visaient à améliorer la production des enzymes lignocellulolytiques par fermentation solide sur des grignons prétraités par ultrasons. Des grignons brutes et épuisés par traitement ont été exploités en vue de produire des xylanases et des cellulases. Les grignons prétraités donnent lieu à des activités enzymatiques plus élevées après fermentation par *Aspergillus Niger*. Le traitement aux ultrasons avait comme effet une augmentation de l'activité xylanolytique d'un facteur de 3 contre une diminution de l'activité cellulolytique.

KOUTROTSIOS et *al.* (2016) ont évalué le potentiel de conversion des margines (12,5 %, 25 % et 50 % v/v) en enzymes, notamment les laccases et Mn-peroxydases par le champignon *Hericium erinaceus*. L'activité maximale enregistrée pour les laccases étaient de 134 U/L sur 28 jours de culture sur des margines à 50%. Bien que dans une moindre mesure, le MnP a également été produite lors de la première semaine de culture et a diminué pendant la deuxième semaine pour deux des trois traitements (plus de 20 U/L et ≥ 10 U/L en margines 12,5% et 50%, respectivement). La peroxydase indépendante du manganèse a également été générée vers la fin de la croissance, mais avec une faible activité sur la plus forte dilution (~ 15 U/L dans 12,5% margines).

ZERVA et *al.* (2017) et VAIDYA et *al.* (2019) ont récemment exploité les margines pour la production d'enzymes laccases et peroxydases par des champignons et ce, sous des conditions d'optimisation. Dans les travaux réalisés par ZERVA et *al.* (2017), deux souches ligninolytiques, *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684 et *Irpex lacteus* LGAM 238, ont été testées pour leur capacité de biodégradation des margines. Quant à l'étude de VAIDYA et *al.* (2019), il s'agit d'une souche de *Trametes ochracea*.

Le traitement des margines (25% v/v) a été mené dans plusieurs conditions de culture, à savoir différents pH, vitesse d'agitation, ainsi que des suppléments à base d'azote et leur concentration. Les paramètres choisis étaient le pH 6, la vitesse d'agitation de 150 tr/min et l'addition de 30 g/L de liqueur de maïs comme source d'azote pour *Pleurotus citrinopileatus* et 20 g/L de tartrate diammonium pour *Irpex lacteus* (ZERVA et *al.*, 2017).

Les margines ont alors servit pour la production d'enzymes de valeur biotechnologique, les laccases ($1048,9 \pm 2,9$ U/L ; $57,4 \pm 2,2$ U/L) peroxydases Mn-dépendantes ($303,7 \pm 15,2$ U/L ; $100,2 \pm 5,0$ U/L) et peroxydases Mn-indépendantes ($735,0 \pm 4,27$ U/L et $674,9 \pm 33,0$ U/L), et ce respectivement et par ordre des valeurs pour *Pleurotus citrinopileatus* et *Irpex lacteus* (ZERVA et *al.*, 2017). Il est à souligner que ce bioprocédé porte aussi un intérêt du point de vue écologique, car il est aussi accompagné par une détoxification simultanée de l'effluent à la bioconversion (plus de 90% de réduction de la couleur et des CP en 24 jours).

Enfin, en comparaison avec les données de la littérature, comme rapporté par VAIDYA et al. (2019), la productivité de leur souche, *Trametes ochracea*, pour les peroxydases Mn-dépendante dans le milieu à base de fractions de haut poids moléculaires de margines demeure la plus élevée parmi les souches de type sauvage. Les pics de production atteints pour les peroxydases et les laccases sont respectivement de $16\,856 \pm 1070$ UI/L et $14\,967 \pm 907$ UI/L.

3.5. Utilisations agricoles des sous-produits oléicoles

3.5.1. Margines brutes

L'amendement du sol avec les margines est bien connu pour ses effets antimicrobiens et suppressifs de microorganismes phyto-pathogènes (BRENES et al., 2011 ; YANGUI et al., 2010, 2013). D'après les données scientifiques, les margines peuvent être utilisées en agriculture pour lutter contre les infections des plantes et ce, sous réserve de tenir compte des doses limites préconisées par certains travaux de recherche. De surcroît, les effets négatifs observés à courts terme tendent à devenir négligeables après une période de temps (DI BENE et al. 2013). BELAKZIZ et al. (2016) recommandent un apport de margines six mois avant la culture du maïs afin que leur toxicité soit atténuée. AYOUB et al. (2014) ont recommandé des doses de 10 L/m^2 de margines pour améliorer la fertilisation des sols et les performances des oliviers sans avoir de répercussions négatives sur la qualité de l'huile. Les teneurs en potassium, matière organique, CP et la flore microbienne total augmentent significativement dans le sol traité aux margines (AYOUB et al., 2014). Les margines brutes ont montré un effet inhibiteur sur la germination du blé et de l'haricot blanc. Par contre, les dilutions de 50%, 25% et 12,5% ont stimulé la germination et la croissance de ces derniers. De plus, les margines prétraitées à la chaux (réduction des CP) et diluées donnent de meilleurs résultats (ELAYADI et al., 2019).

3.5.2. Margines issues des bioconversions

La teneur élevée en eau, matière organique et en nutriments font des margines déphénolisées un bon substrat pour leur bioconversion en engrais. Les traitements biologiques aérobie ou anaérobies, respectivement avec des microorganismes fongiques et des mixtes microbiens, ont émergés comme des méthodes de biofertilisation appropriées car ils conduisent à des résidus de moindre toxicité.

Dans leur étude, BATUECAS et al. (2019) ont rapporté que la digestion anaérobie pourrait être une alternative envisageable permettant de produire du biogaz et de réduire ainsi leur impact négatif sur le sol. Dans le même contexte, RASHAD et al. (2019) ont conclu qu'il

était possible d'économiser 1/4 ou 1/2 de la dose recommandée en engrais NPK pour la croissance des céréales et ce, en utilisant le produit issu de la fermentation des margines, par des cyanobactéries, comme engrais bio-organique.

3.5.3. Compostage

Le compostage est également l'une des technologies assurant la transformation des margines en fertilisant. Le compostage de déchets organiques est un procédé bio-oxydant impliquant la minéralisation et l'humification partielle de la matière organique (HADDADIN et *al.*, 2009).

Le compostage permet de transformer les margines en produits riches en matières organiques, non phytotoxiques et potentiellement bénéfiques aux plantes, vue leur richesse en macro et micronutriments. Sous forme liquide, les margines ne parviennent pas à être directement compostées en raison de plusieurs obstacles tels que leur humidité excessivement élevées (>90% pour les margines), la présence de composants récalcitrants à la biodégradation, de lipides et de polyphénols dotés de propriétés antimicrobiennes (RAMOS-CORMENZANA et *al.*, 1995). De plus, leur texture dense et visqueuse (particulièrement le grignon humide), rend difficile le maintien des conditions d'aérobiose lors du compostage.

Par contre, les margines et les grignons peuvent servir pour produire des composts de qualité par combinaison avec la sciure de bois, feuilles de l'olivier, les boues d'épuration domestiques, le fumier, la paille de céréales et d'autres substrats solides dans un procédé appelé " co-compostage " (PAREDES et *al.*, 2002 ; GARCIA-GOMEZ et *al.*, 2003 ; CYUELA et *al.*, 2004 ; ALBUQUERQUE et *al.*, 2006 ; AKRATOS et *al.*, 2017). Le co-compostage des margines s'est avéré remarquablement intéressant pour la fertilisation des cultures horticoles (ALBUQUERQUE et *al.*, 2006), des oliviers (CYUELA et *al.*, 2004) et aussi comme substrats ou milieux de culture pour des plantes ornementales (GARCIA-GOMEZ et *al.*, 2003).

Une autre approche impliquant le co-compostage des grignons et des margines a été rapportée comme efficace (FILIPPI et *al.*, 2002 ; MARI et *al.*, 2003 ; AVIANI et *al.*, 2010). Les composts résultants ont été démontrés comme étant des substrats de haute valeur agronomique pour un amendement au sol (ALBURQUERQUE et *al.*, 2007 ; AVIANI et *al.*, 2010).

Le compost est considéré comme engrais intéressant pour son pouvoir fertilisant, il stimule l'échange cationique, stimule l'activité microbienne et ainsi la dégradation de pesticides et d'autres substances organiques synthétiques (CERDA et *al.*, 2018). ZENJARI et *al.* (2006) ont trouvé que la dégradation des CP des margines avait atteint 95% et que la toxicité avait

complètement disparu après deux mois de compostage. Enfin, de nos jours la plupart des pays, producteurs de l'huile d'olive, a adopté des procédés de compostage pour le traitement de leurs effluents oléicoles toxiques.

3.5.4. Fibres alimentaires

Les SPO contiennent des polysaccharides résiduels de la paroi cellulaire de la pulpe des olives. Ils ont été proposés comme source de pectines, hémicelluloses, cellulose, lignine, ainsi que d'autres produits comme des gélifiants et de substituts de graisse (GALANAKIS, 2010a ; NADOUR *et al.*, 2015). Bien que tous ces polysaccharides soient présents dans les SPO, la co-présence de composés phénoliques et d'autres matières organiques entrave leur extraction et leur purification est coûteuse.

Des champignons ligninolytiques ont été utilisés pour améliorer les propriétés nutritionnelles des grignons additionnés à d'autres aliments destinés aux animaux (son de blé, grains d'orge, farine de blé et haricots des champs). Les CP ont été éliminés de 50% et 90% et la teneur en protéines a augmenté de 7 à 29% après 6 semaines (BROZZOLI *et al.*, 2010).

Récemment, MANNELLI *et al.* (2019) ont proposé l'incorporation des grignons humides comme additifs dans l'alimentation des ruminants, ce qui avait pour effet une amélioration des caractéristiques nutritionnelles du lait. Les résultats de GERASOPOULOS *et al.* (2015a) ont montré que les poulets de chair recevant des aliments additionnés de retentât ou de perméat de margines, obtenues après filtration, avaient des niveaux d'oxydation de protéines et de peroxydation lipidique significativement plus bas avec une capacité antioxydante totale plus élevée dans le plasma et les tissus et ce, par rapport au groupe témoin.

2^{ème} partie

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. MATERIEL ET METHODES

Le travail expérimental de la présente thèse a été effectué au sein des laboratoires suivants :

-Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ;

-Institut Pascal (UMR CNRS 6602) de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand (France) ;

-Laboratoire Microorganismes Génomes et Environnement (LMGE) de Clermont Ferrand ;

-Institut de Recherche sur la Catalyse et l'Environnement Biovert IRCELYON, CNRS Lyon.

Le diagramme ci-dessous retrace les différentes voies investiguées au cours de cette thèse.

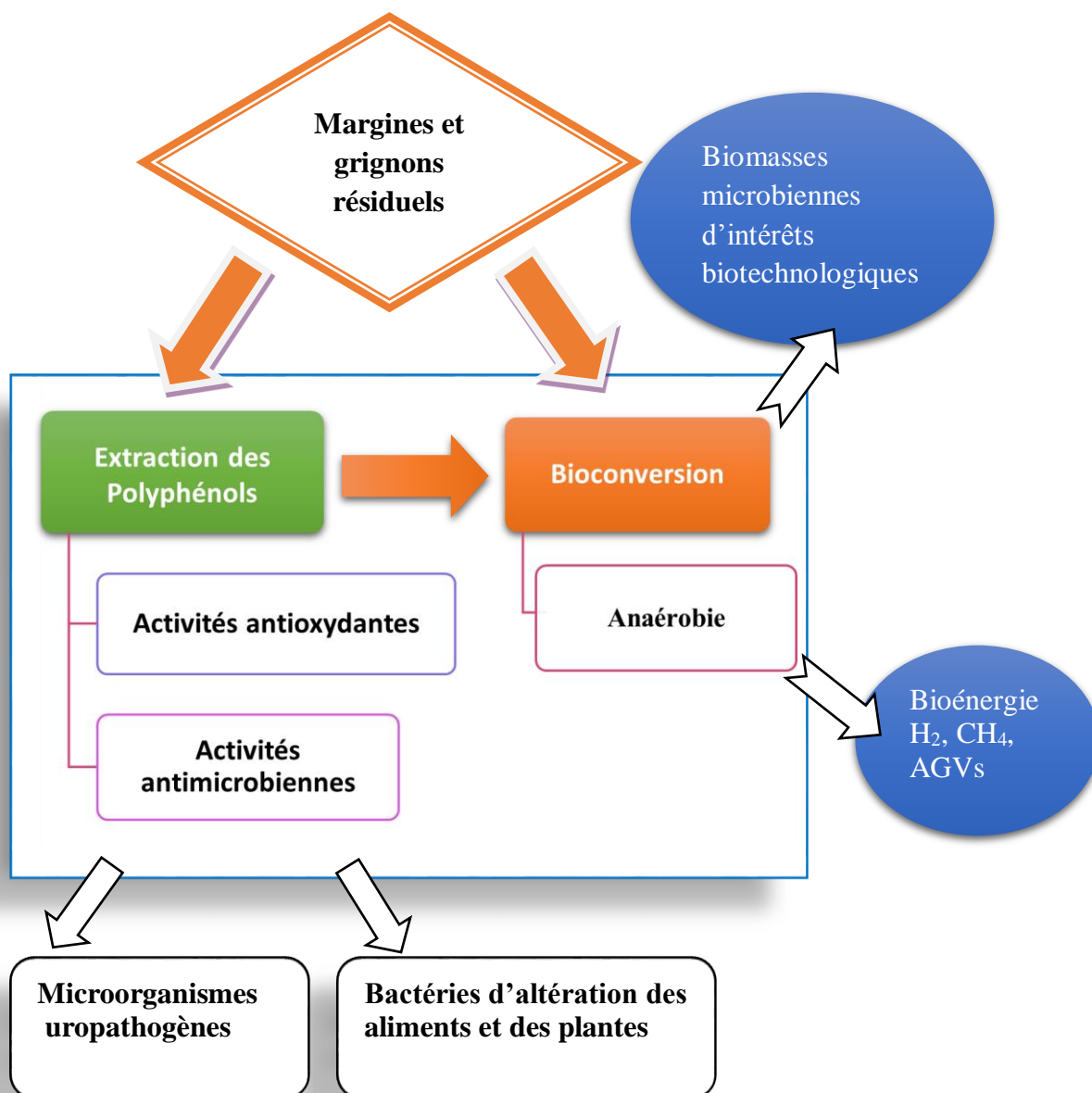


Figure 16. Diagramme retraçant les différentes voies investiguées au cours de cette thèse.

1.1. Matériel

1.1.1. Appareils

Les appareils utilisés sont les suivants :

- Agitateurs (Ika, Hanna, Heidolph Hei, Labinco) ;
- Autoclave de paillasse (PB International) ;
- Bain-Marie (Memmert) ;
- Balances (Precisa, Kern) ;
- Bioréacteurs (Bioprocess) ;
- Centrifugeuse non réfrigérée (max 16000 g, Sigma) et réfrigérée (max 28000 g, Sigma) ;
- Chromatographie haute performance échangeuse d'anions (HPAE-PAD) (Dionex, USA) ;
- Chromatographie liquide haute pression (HPLC) (Agilent 1100 séries) ;
- Electrophorèse verticale (TTGEK-2401-220, C.B.S. Scientific)
- Etuves (Memmert) ;
- Evaporateur rotatif (IKA-Dest et Buchi) ;
- Four à moufle (Nabertherm);
- Four Pasteur (Binder);
- Incubateur de culture rotatif ;
- Lyophilisateur (Heto modèle power dry PL6000) ;
- Micro-chromatographe phase gazeuse (micro-GC) (Agilent 3000) ;
- Microscope photonique (Motic) ;
- NanoDrop (Thermo Scientific) ;
- pH mètre (Hanna-instruments) ;
- Réacteur de méthanisation, Système automatique pour le test du potentiel de méthanisation (AMPTS) (Automatic Methane Potentiel Test System).
- Spectromètre Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR) (Bruker Vector 22) ;
- Spectrophotomètre UV Visible (Schimadzu, Japon) ;
- Thermocycleur (PTC-200 MJ RESEARCH).

1.1.2. Consommable

Boîtes de Pétri, capsules en aluminium, écouvillons, filtres à 0,22 et 0,45 µm, flacons de culture pour anaérobiose, micropipettes, micro-seringues, microplaques 96 puits, papier Wattman N° 40, pipettes Pasteur seringues en plastique et en verre (5-60mL), tubes de cryo-conservation, tubes eppendorfs, tubes Hungate, verrerie.

1.1.3. Réactifs, produits chimiques et milieux de cultures

➤ Acides et bases

Acide sulfurique (H₂SO₄), acide chlorhydrique (HCl), acide phosphorique (H₃PO₄) ; hydroxyde de sodium (NaOH), hydroxyde de potassium (KOH).

➤ Solvants

Ethanol, acétate d'éthyle, butanol, diéthyl ether, méthanol, diméthylsulfoxyde (DMSO), n-hexane, chloroforme, isopropanol.

➤ Produits et réactifs

Rézasurine (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one), désoxy-adénine tri-phosphate, cétyl triméthyl-ammonium bromide, cystéine-HCl, ZnSO₄, Ba(OH)₂, cristal violet, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), protéines et enzymes (protéinase K, Taq polymérase), tween 80, réactif de Folin-Ciocalteu, acide gallique, chlorure de sodium (NaCl), chlorure de calcium (CaCl₂), chlorure de potassium (KCl), chlorure de magnésium (MnCl₂), trizma-base, éthylène diamine tétra- acétique, carbonate de sodium (NaHCO₃), phénol, glucose, glycérol, extrait de levure, cristal violet.

➤ Milieux de culture

Les milieux de culture sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau V. Milieux de culture utilisés.

Milieu	Référence	Utilisation
Bouillon Man-Rogosa-Sharpe (MRS)	CONDA	Revivification des Lactobacilles
Gélose MRS		Dénombrement des Lactobacilles
Gélose (PDA) Potato dextrose agar	Préparer au laboratoire	Repiquage et conservation des levures
Gélose extrait de malt	CONDA	Dénombrement des levures
Bouillon bread heart infusion (BHIB)		Revivification des souches bactériennes
Gélose nutritive (GN)	Fluka Biochimika	Repiquage des souches bactériennes
Gélose Mueller Hinton (MH)	CONDA	Activité antimicrobienne

1.1.4. Substrats de culture (margines et grignons)

Les margines et les grignons utilisés ont été collectés à partir d'unités industrielles de production de l'huile d'olive situées dans la région de la Kabylie, Tizi-Ouzou, lesquelles opèrent avec le procédé d'extraction par centrifugation à trois phases (marges des compagnes

2010, 2012 et 2015) et semi-moderne par presse (margines de la campagne 2016). Les échantillons de margines sont notés, margines 1 (M1), margines 2 (M2), margines 3 (M3) et margines 4 (M4), respectivement aux années de collecte. Le grignon est de la campagne 2010 et 2015.

Les margines et les grignons ont été récupérés juste après extraction de l'huile d'olive et acheminés rapidement au laboratoire. Les margines ont été réparties en aliquotes de 500 mL puis conservées au congélateur à - 40 °C jusqu'à leurs utilisations ultérieures. Quant aux grignons, ils ont été conservés à température ambiante après séchage à l'abri de la lumière.

1.1.5. Micro-organismes utilisés

1.1.5.1. Souches microbiennes et consortia utilisés lors des bioconversions

Les souches de références utilisées pour les fermentations (lactobacilles et levures) sont toutes de la collection de culture ATCC (American Type Culture Collection, Rockville), fournies par l'Institut Pascal de Clermont Ferrand. Des consortia microbiens ont été aussi développés à l'Institut Pascal et au Laboratoire de Microorganismes Génome et Environnement (LMGE) de Clermont Ferrand.

1.1.5.3. Souches utilisées pour les activités antimicrobiennes

Les souches de références utilisées sont de la collection de culture ATCC. Des souches microbiennes uropathogènes d'origine hospitalière ont également servi pour les tests antimicrobiens.

1.2. Méthodes

1.2.1. Caractérisation des margines et des grignons

1.2.1.1. Détermination de la matière sèche totale

La matière sèche totale (MST) est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines. Elle est déterminée selon le protocole standard, dans des capsules en aluminium ou en porcelaine. Un volume de margines (10mL) est introduit dans chaque capsule et est laissé sécher à l'étuve à 105 ±2°C. Les capsules sont ensuite retirées de l'étuve et placées dans un dessiccateur avant de procéder à la pesé. L'opération est répétée jusqu'à obtention d'un poids sec constant. La teneur en matière sèche est déterminée par la formule suivante :

$$\text{MST}=(\text{Mt1}-\text{Mt0}) /\text{VM}$$

- **Mt0** : Masse de la capsule vide (g).
- **MST** : Teneur en matière sèche (g/L).

- **Mt1** : Masse de la capsule et des margines après séchage (g).
- **VM** : volume des margines (L).

1.2.1.2. Teneur en cendres et en matières organiques

Elle est déterminée par calcination de la matière sèche. Les capsules contenant un même volume de margines sont portées dans un four à moufle réglé à 550°C pendant 4h. Les capsules sont ensuite retirées du four et portées dans un dessiccateur avant de procéder à la pesé. La teneur en cendre représente la fraction minérale sèche des margines. Elle est donnée par la formule suivante :

$$[\text{TC}](\text{g/L}) = (\text{Mt2}-\text{Mt0}) \text{ VE}$$

TC : teneur en cendre

Mt0 : Masse de la capsule vide (g).

Mt2 : Masse de la capsule après calcination à 550 °C (g).

VE : Volume des margines (L).

La teneur en matière organique ou bien en matière sèche volatile (MSV) est calculée comme suit :

$$\text{MSV (g/L)} = (\text{MST}-\text{TC})$$

1.2.1.3. Demande chimique en oxygène

La DCO est la quantité d'oxygène, exprimée en mg ou en g, consommée par les matières oxydables contenues dans un litre d'échantillon. Elle a été mesurée par une méthode colorimétrique à l'aide d'un kit de réactifs Hach (0-1,500 mg/L) comme décrit dans l'annexe 5. C'est une méthode d'analyse simple et rapide en tubes prêts à l'emploi donnant des résultats précis et répétables puisqu' elle minimise la manipulation des produits.

Le principe de la technique standard utilisée consiste à oxyder 0,2mL de la matière organique de l'échantillon à 150°C, pendant deux heures, par un excès de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). La réaction se produit en milieu acide (H_2SO_4) en présence de sulfate de mercure et le sulfate d'argent (AgSO_4) comme catalyseur de l'oxydation. Les composés organiques oxydables réduisent l'ion dichromate (Cr^{6+}) en ion chrome (Cr^{3+}) vert. La quantité de Cr^{3+} produite est mesurée. Après refroidissement des tubes, les DCO correspondantes aux échantillons convenablement dilués, sont données par un lecteur étalonné et conçu spécialement à cet effet.

1.2.1.4. Dosage des composés phénoliques

La concentration en CP a été déterminée en utilisant la méthode spectrophotométrique de Folin Ciocalteu (SINGLETON et ROSSI, 1965).

- **Principe**

L'ensemble des CP est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (RIBEREAU-GAYON., 1968). Cette coloration bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en CP présents dans le milieu, donne un maximum d'absorption à 750 nm.

- **Protocole**

Le dosage des CP des margines est déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu modifiée par MACHEIX et *al.* (1990) (figure 17). La gamme étalon est réalisée dans une gamme de 0 à 10 mg/L d'acide gallique. La teneur en polyphénols totaux des extraits est exprimée en équivalent (g/L) de ce dernier.

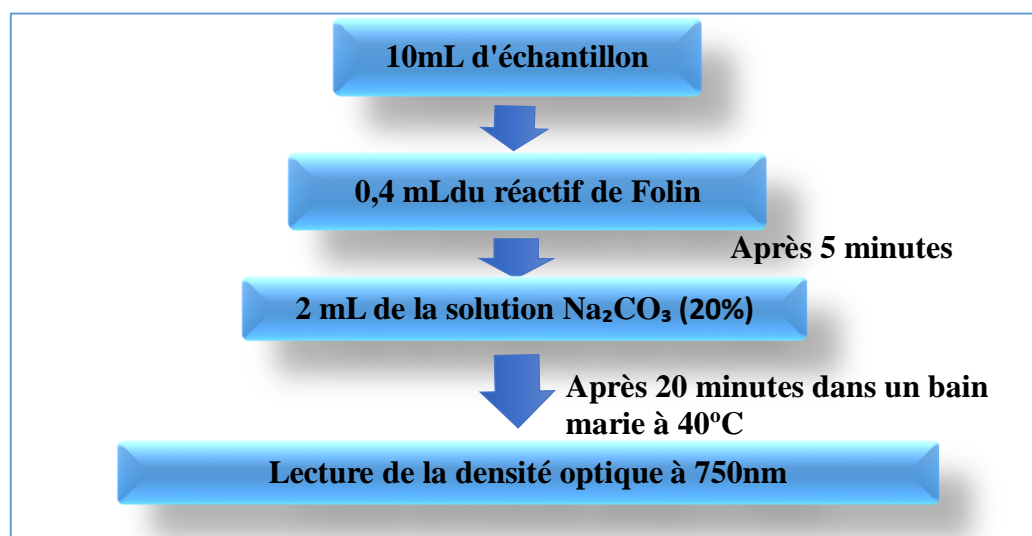


Figure 17. Protocole de dosage des polyphénols des margines (MACHEIX et *al.*, 1990).

1.2.1.5. Analyse de la composition du grignon en biopolymère

L'analyse du grignon est réalisée après hydrolyse acide avec de l' H_2SO_4 dans un bain marie et un réacteur, spécialement conçus pour l'analyse (figure 18 et 19). Après refroidissement, filtration et lyophilisation des échantillons, la composition est déterminée suite à l'analyse des sucres contenus dans l'hydrolysat et de la lignine résiduelles après hydrolyse.

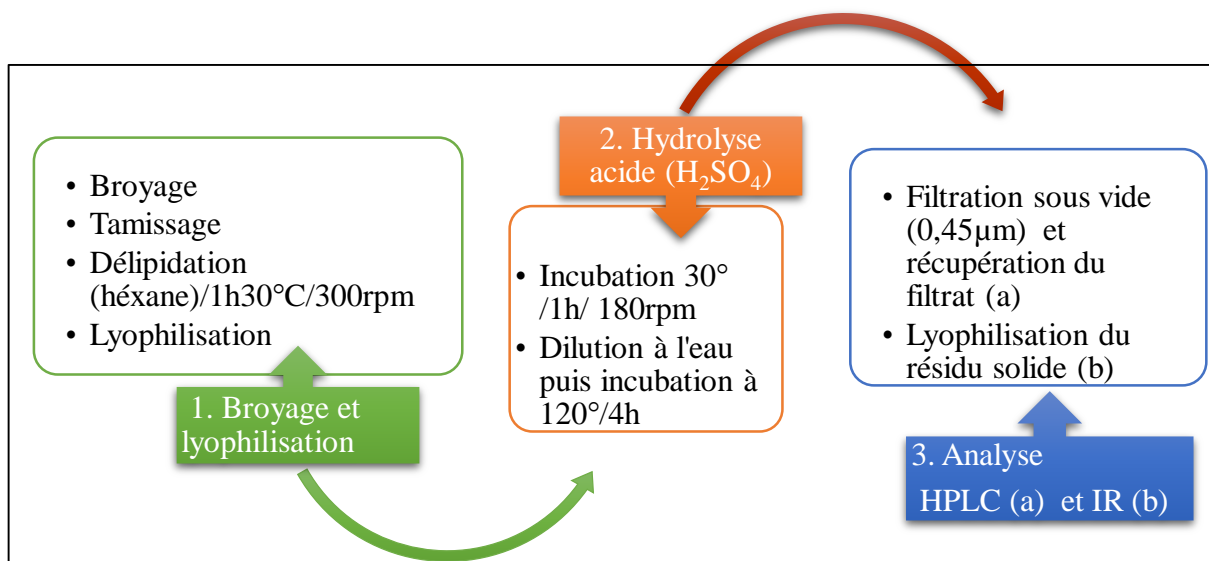


Figure 18. Diagramme descriptif de l'ensemble des étapes entreprises pour l'analyse de la composition des grignons d'olive.

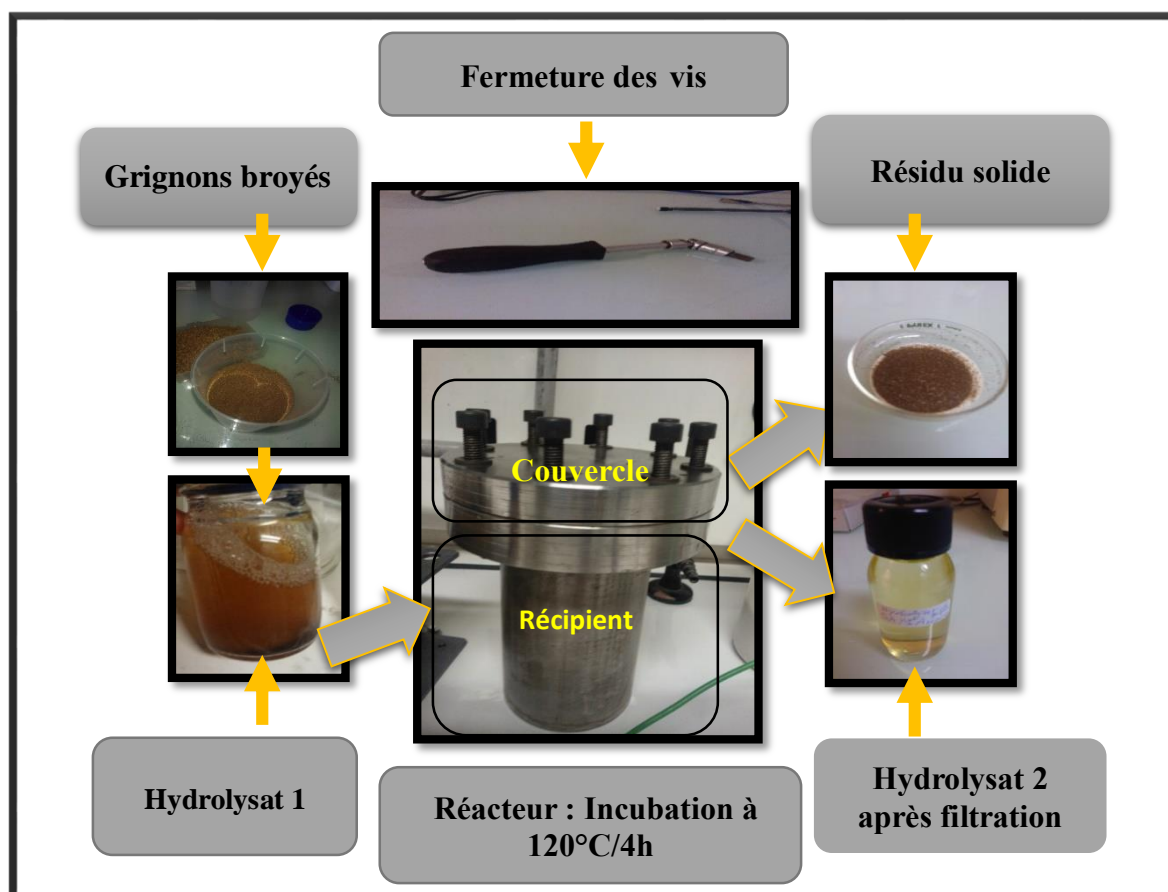


Figure 19. Photographie du réacteur d'hydrolyse et des hydrolysats du grignon d'olive. Refroidissement sous l'eau du robinet après traitement à 120°C à l'étuve. Hydrolysats 1 est issu de la première hydrolyse à 30°C dans un incubateur agité pendant 1h, il est complété avec 100mL d'eau distillées. Hydrolysats 2 est obtenu après deuxième hydrolyse à 120°C.

Une masse de grignon (0,3g) est broyée, délipidée à l'hexane et est ensuite lyophilisée dans un montage de lyophilisation (annexe 3). Le lyophilisat est alors hydrolysé avec de l' H_2SO_4 à 72%. L'hydrolyse de l'échantillon, contenu dans un flacon bien fermé, est initiée d'abord dans un bain marie agité à 180rpm et porté à 30°C pendant 1h. L'échantillon est ensuite complété avec de l'eau distillée (environ 100mL) pour poursuivre la seconde hydrolyse dans un réacteur en batch réservé à cet effet. Ce dernier est rempli d'un niveau d'eau pour éviter la pression sur la paroi du flacon d'hydrolyse. L'échantillon, porté dans le réacteur bien fermé, est incubé à 120°C/4h. Après réaction, l'échantillon est refroidi et filtré.

➤ **Analyse des fractions récupérées après hydrolyse**

• **La fraction liquide**

L'hydrolysate obtenu est analysé par HPLC Dionex, équipée d'un détecteur RID et d'une colonne Coregel 107H. L'élution est réalisée avec une solution d' H_2SO_4 0,01M à 40°C, avec un débit 0,6mL/min pendant 30 min.

• **Le résidu solide**

Le résidu solide, récupéré par filtration, est lyophilisé puis pesé et préparé pour l'analyse infrarouge (IR) afin de confirmer la présence de la lignine. L'échantillon est alors préparé par homogénéisation, dans un mortier, de 2 mg de résidu sec avec du KBr à raison de 0,2g. Des pastilles sont alors préparées à l'aide d'outils et d'un appareil conçus pour cette analyse.

L'analyse IR est une méthode permettant l'identification des groupements fonctionnels de la lignine. Le principe consiste à exposer l'échantillon à un rayonnement IR dont la fréquence varie de 400 à 4000 cm^{-1} . Sous l'effet du rayonnement IR, les molécules vont subir des changements d'état vibrationnel à des fréquences de vibration caractéristiques de chaque groupement moléculaire, permettant ainsi leur identification. Le Tableau en annexe 3 expose quelques longueurs d'onde caractéristiques des groupements fonctionnels de la lignine.

1.2.2. Mise en route des fermentations anaérobies

1.2.2.1. Inocula microbiens pour les fermentations anaérobies

La faisabilité de la bioconversion des SPO, par fermentation anaérobie, a été évaluée par quatre souches bactériennes pures et neufs différents consortia. L'objectif était de sélectionner les biodigesteurs les plus performants et d'explorer la diversité de biomolécules qu'elles peuvent générer par le bioprocédé fermentaire. Deux souches pures de référence : *Clostridium butyricum* ATCC 8260, *Clostridium saccharoper butylaceticum* ATCC 27021 et deux

isolats : clostridium (C6) et *Ruminococcus sp* (RA) (isolés à partir du rumen bovin) ont été testés lors des essais expérimentaux préliminaires.

Les consortia utilisés sont les suivants : VINA obtenu directement par incubation anaérobie de vinasses pures supplémentées de saccharose (SYDNEY *et al.*, 2014) ; MAR (développé à partir de la microflore des margines) ; LCM (obtenu à partir de fumier bovin) ; MR (développé à partir de la microflore des margines additionnée au LCM) et RM (microbiote ruminal).

D'autres consortia nommés PBR (Développé à partir de la zone the anoxique du Lake Pavin (Auvergne, France) AC (développé à partir microflore du jus de rumen), LBM et LMBA (récupérés à partir de fumier liquide d'animaux d'élevage), ont été fournis par la société Afyren au LMGE de Clermont Ferrand, France. PBR a été préalablement caractérisé microbiologiquement lors d'une précédente étude menée par PESSIOT *et al.* (2012) sur le développement d'un procédé d'acidogénèse avec un autre substrat.

1.2.2.2. Conditions opératoires

La figure 20 donne un aperçu global sur l'ensemble des tests et analyses réalisés, au cours de la conduite des différents biodigesteurs anaérobies, en vue de produire du biogaz comme le Bio-H₂ et des AGVs.

1.2.2.3. Préparation des milieux

Les margines, aussi bien que les milieux contenant les grignons d'olive ou des mixtures des grignons et de margines, ont été utilisés après l'ajustement du pH à 6,8 avec du KOH à 4N. Les grignons sont soumis à un broyage dans un broyeur électrique. La procédure pour réaliser une culture anaérobie est basée sur la technique de BALCH *et al.* (1979). Afin d'assurer les conditions d'anaérobiose, la désoxygénation est réalisée en faisant chauffer les milieux sous flux de CO₂ sous l'addition de la cystéine-HCl à raison de 1g/L à 65°C et de 5g / L de NaHCO₃ à 85 °C en tant qu'agents réducteurs abaissant le potentiel redox des milieux (figure 21).

La rézasurine est un indicateur de la désoxygénation, il vire de la couleur bleue, rose puis en jaune jusqu'à disparition de la couleur suivant la progression de la réaction. Etant donné que les margines sont de couleur sombre et opaque, la rézasurine est utilisée dans les solutions de dilution ou d'enrichissement des margines et des grignons.

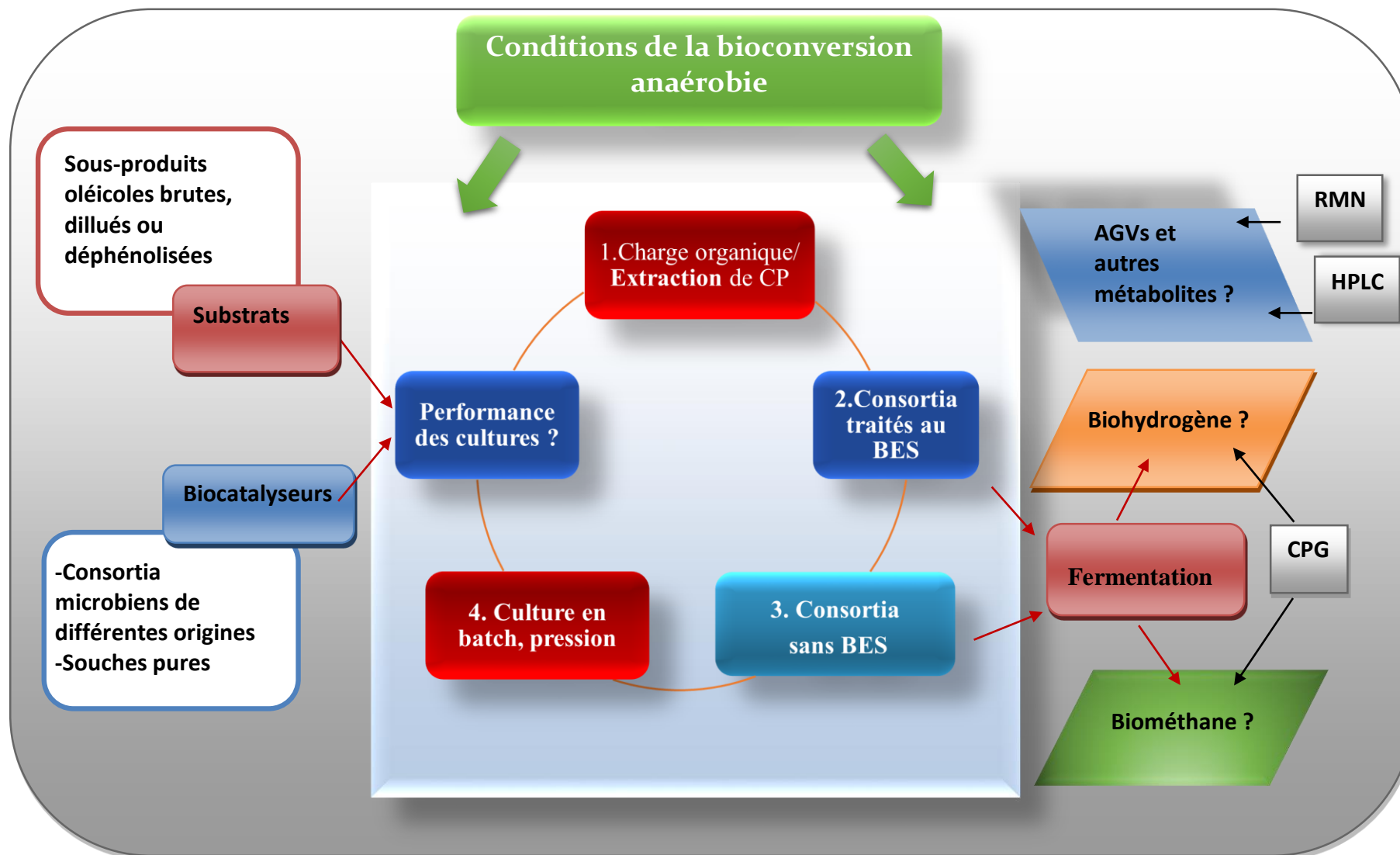


Figure 20. Récapitulatif de l'ensemble des tests et analyses réalisé pour la fermentation anaérobie des SPO.

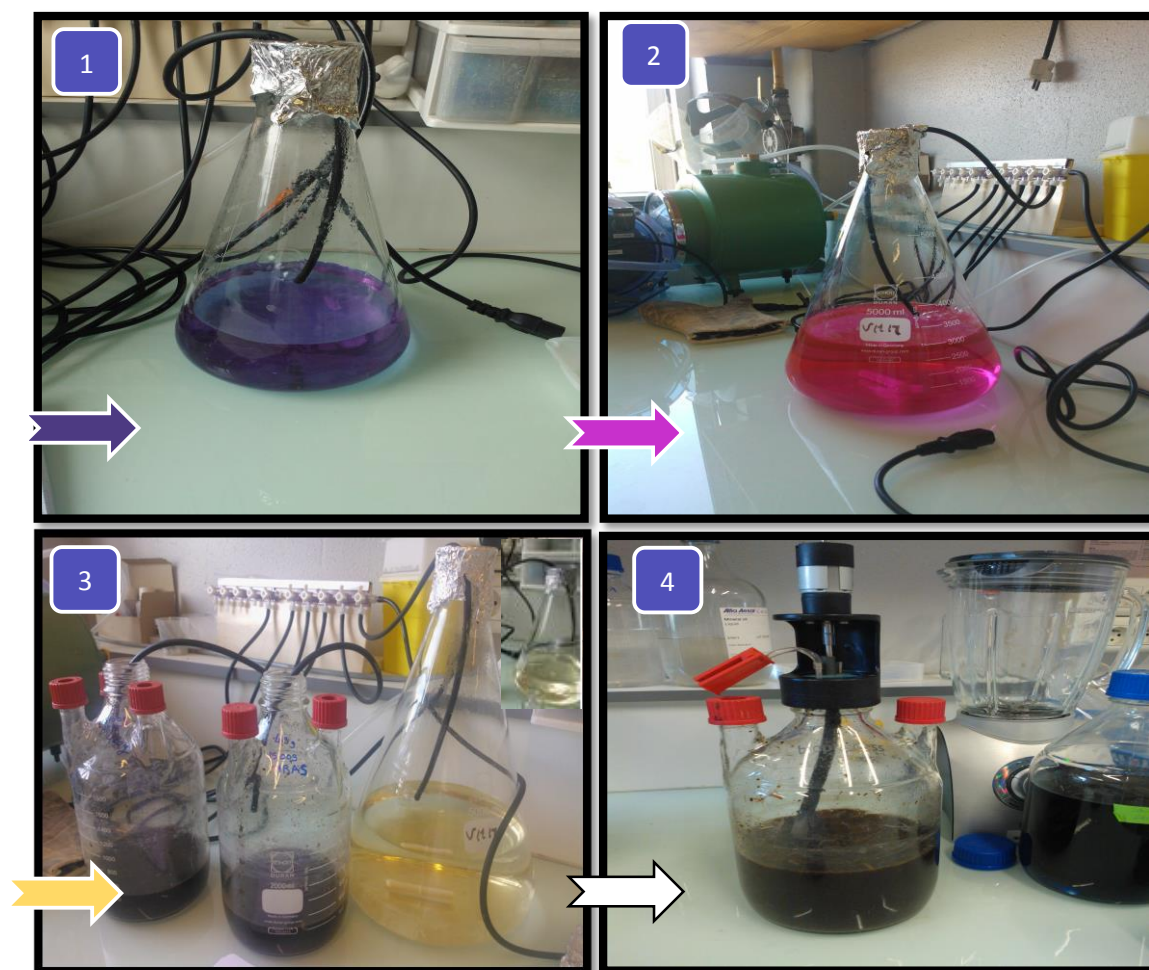


Figure 21. Photographies montrant la préparation des milieux à base de margines pour la méthanisation. 1, 2 et 3 : réduction des milieux sous flux de CO₂ en présence de la rézasurine. 3) rézasurine jaune clair qui vire après vers le blanc transparent ; dilution et inoculation. 4) Réacteur prêt à l'incubation). La procédure de préparation est la même que ce soit pour les cultures en bouteilles, que pour celles conduites en bioréacteurs.

1.2.3. Potentiel biochimique en biohydrogène (BHP)

L'objectif de cette partie d'étude est de sélectionner des microorganismes ayant l'aptitude à fermenter les margines et les grignons en vue de produire du biogaz et particulièrement, le Bio-H₂. Les principales démarches entreprises à cet effet étaient les suivantes :

- Sélection des biodigesteurs sur margines diluées (phase d'adaptation) ;
- Exposition des consortia sélectionnés à de plus fortes concentrations ;
- Effet de la pression partielle ;
- Cultures sur des margines après extraction des polyphénols ;
- Essais en Bioréacteur de 5 litre.

1.2.3.1. Consortia microbiens reconstitués sans méthanogènes

Les SPO ont été fermentés avec trois consortia microbiens différents reconstitués sans méthanogènes, comme décrits ci-dessus, nommés : PBR, AC et LCM (tableau VI). La simplification du réseau trophique consiste en l'inhibition de bactéries méthanogènes par l'addition de 10mM de bromoéthane-sulfonoate (BES), un analogue du coenzyme M réductase. Ce dernier étant un élément clé de la méthanogenèse. Le BES est ainsi employé comme inhibiteur sélectif des bactéries méthanogènes, car c'est un inhibiteur de la méthyl-réductase (ZHU et BELAND, 2006 ; VENKATA et *al.*, 2008).

Tableau VI. Récapitulaif de l'ensemble des souches et consortia utilisés

Inoculum	Nom /code	Origine/référence	Traitement au BES
Souches pures de références et isolats	<i>Clostridium butyricum</i>	ATCC 8260	-
	<i>Clostridium saccharoper butylaceticum</i>	ATCC 27021	-
	C6	Isolat du rumen	-
	RA	Isolat du rumen	-
consortia	VINA	Vinasses	-
	AC	Microflore du jus de rumen	+
	MAR	Microflore des margines + rumen	-
	LCM	Fumier bovin	+
	MR	Microflore des margines + LCM	-
	RM	Microbiote ruminal	-
	PBR	Zone anoxique du Lake Pavin	+
	LBM, LBMA	Fumier liquide	-

(-) : non traité ; (+) traité.

1.2.3.2. Expérimentation en tubes Hungate et en flacons en verre

Les microorganismes fermentatifs sont extrêmement sensibles à l'oxygène et exigent donc une anaérobiose stricte. C'est pourquoi, leurs cultures nécessitent des méthodes particulièrement bien adaptées et une grande précaution quant à l'absence totale d'oxygène dans les tubes. Pour cela, la technique en tube de Hungate est utilisée ; elle consiste à préparer, répartir et inoculer les milieux sous une atmosphère de CO₂. Les cultures ont été effectuées dans des tubes Hungate de 15 mL de volume et des bouteilles en verre de 50 et 100 mL, contenant respectivement un volume de 6 mL, 25 ou 50 mL. Les tubes et les flacons sont scellés

avec des bouchons à vis en bakélite, munis de taquets en caoutchouc autoclavables (figure 22 et 23).

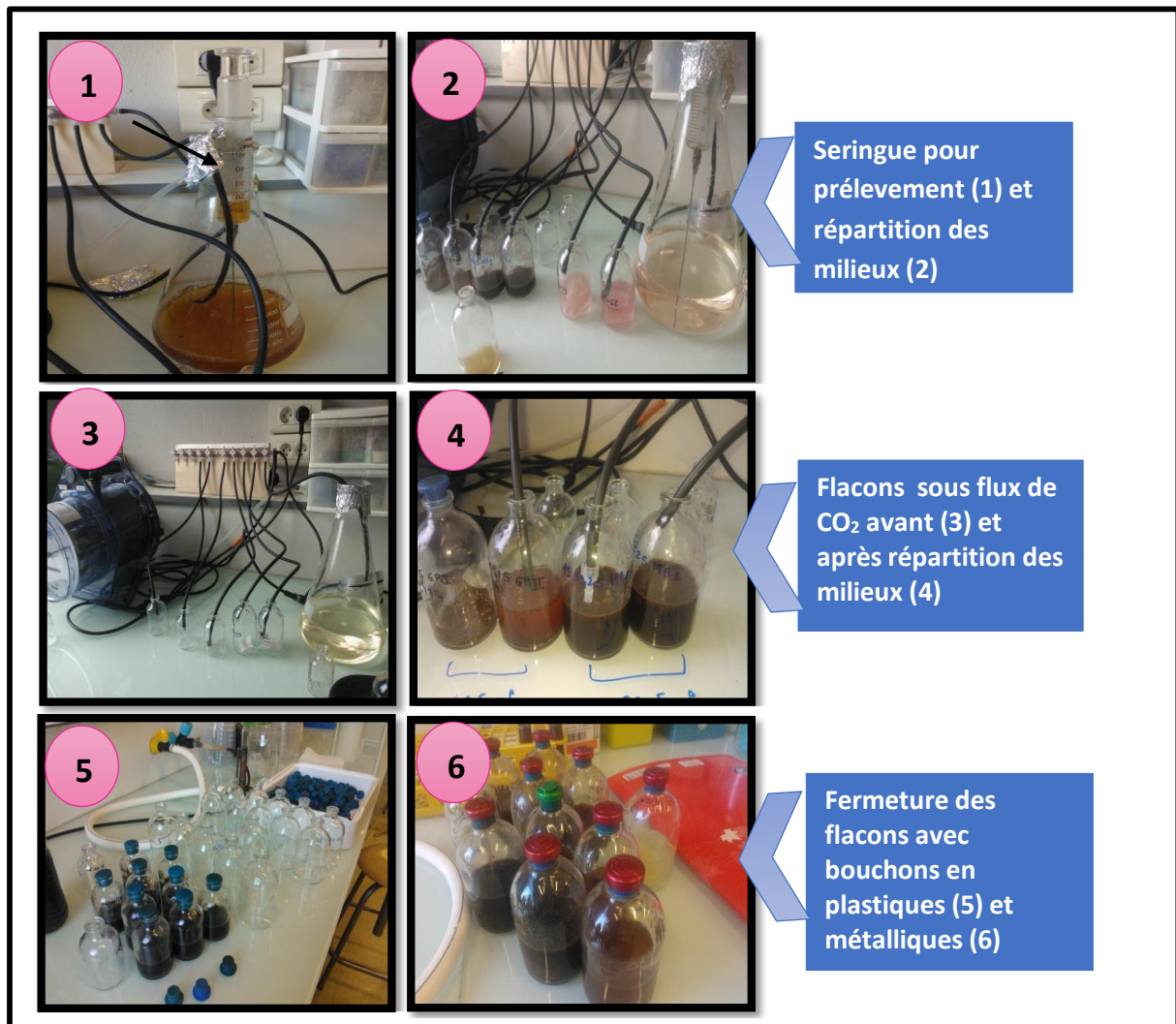


Figure 22. Photographies montrant la préparation et répartition des milieux en flacons.



Figure 23. Photographies montrant la répartition des milieux à base de margines en tubes Hungate sous flux de CO₂.

La digestion a été conduite dans un incubateur à 37 °C sous une douce agitation de 80 rpm. Le pH du milieu est ajusté à 6,8 avec du KOH. Les cultures sont incubées pendant une semaine et vont ensuite servir pour inoculer un nouveau milieu et ainsi de suite. Des digestions anaérobies ont été effectuées avec les souches pures (ATCC 8260, ATCC 27021 et C6) et les consortia microbiens (VINA, PBR, AC, LCM, LBM, MAR et RM et MR), décrits ci-dessus, à différentes concentrations en substrat avec ou sans traitement au BES.

Trois types de milieux ont été employés : margines brutes, margines diluées avec de l'eau distillée, margines diluées additionnées de grignons broyés (1/3). Chaque semaine (7 jours), des cultures en cascades ont été menées en transférant 5 % du milieu de culture initial vers un autre milieu neuf comme inoculum de départ.

1.2.3.4. Cultures sous évacuation continue de biogaz dans les flacons

Des cultures en batch, sous l'élimination continue de biogaz, sont menées dans des bouteilles contenant des volumes de 50 mL. Le système d'évacuation du biogaz produit est confectionné d'un tuyau reliant la sortie du biogaz sur un côté et de l'autre côté, il sert pour le déplacement du liquide dans une éprouvette graduée, inversée dans un bain d'eau. La production de biogaz correspond au volume relatif à l'eau déplacée vers le haut de l'éprouvette comme schématisé sur la figure 24. Cet essai est réalisé en vue d'optimiser les productions.

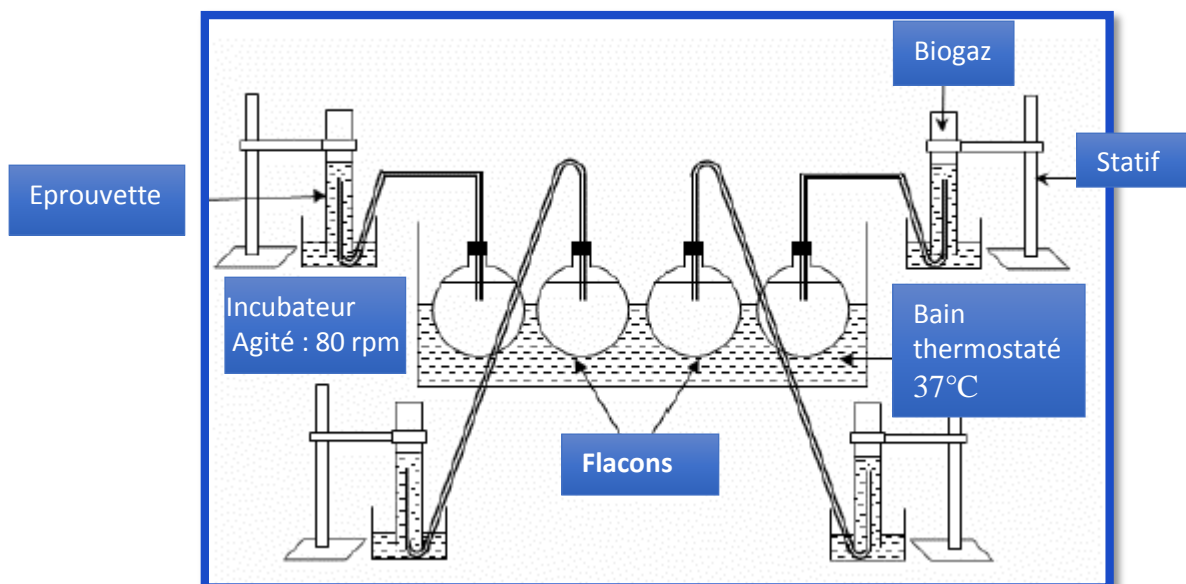


Figure 24. Schéma du montage de mesure des volumes de biogaz sous éprouvettes.

1.2.3.5. Expériences conduites en bioréacteur de 7 litres

La digestion anaérobie a été également testée dans un bioréacteur de 7,5 L, avec une mixture de margines et de grignons à 2% (p/v), en utilisant le consortium PBR à 38 °C. Le bioréacteur (figure 25) est équipé d'un analyseur de gaz (Micro-chromatographe Agilent 3000) et d'un compteur de débit volumétrique (Ritter MGC-1), piloté par une unité de commande liée à différentes sondes : redox, pH, pCO₂ et température. Les conditions initiales étaient un pH à 6,8 ; potentiel redox -350 mV et une agitation à 100 rpm. L'installation anaérobie du bioréacteur était conduite comme décrit par LATRILLE et *al.* (2011). Un volume de la phase liquide est retiré tous les 24h du bioréacteur afin de déterminer la concentration en AGVs durant 239 heures de culture. Quand le milieu de culture est acidifié, le pH est ajusté avec du KOH.

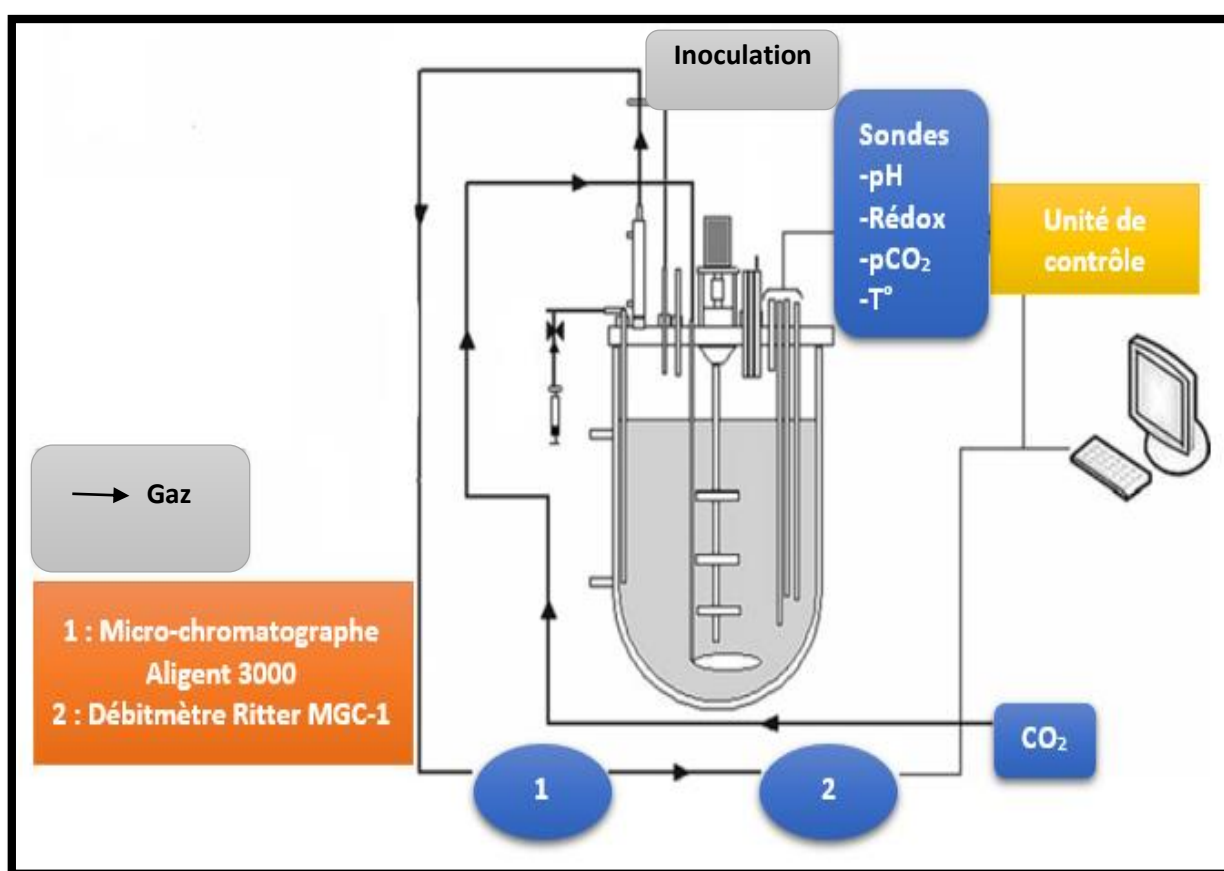


Figure 25. Schéma du bioréacteur anaérobie de 7 litres.

1.2.3.6. Culture du microbiote ruminal sur margines après extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols est effectuée suivant la méthode d'extraction par solvant en utilisant l'acétate d'éthyle. Les extraits à l'acétate d'éthyle (EE), notés EE1 et EE2, ont été obtenus après acidification des margines avec de l'acide chlorhydrique (HCl) ou phosphorique (H₃PO₄), respectivement. Après évaporation au rotavapor, les extraits solubilisés dans du

DMSO ou de l'éthanol sont destinés à l'évaluation des activités biologiques. Les fermentations des margines diluées (MD) et de celles résiduelles après extraction de CP, notées ME1 et ME2, sont menées en tubes Hungate suivant les mêmes conditions précédentes. Lorsque ces milieux sont additionnés de grignons ou de sa pulpe résiduelle (2%), ils sont notés respectivement, MDGR, ME1GR, ME2GR, MDPR, ME1PR et ME2PR. L'analyse du biogaz est effectuée après 96 et 168 h d'incubation.

1.2.4. Potentiel biochimique de biométhanisation (BMP)

1.2.4.1. Biométhanisation en bouteilles

Les cultures ont été réalisées dans des bouteilles de 50 à 100 mL, conçues pour la digestion anaérobie, avec des volumes de 25 à 75 mL en laissant un espace libre qui va recueillir le biogaz produit. Le consortium LMBA est ensemencé dans le milieu contenant les margines et le grignon. Le grignon est broyé à l'aide d'un broyeur électrique. Chaque digesteur est constitué de l'inoculum à raison de 5% (v/v) et du substrat avec 4 à 12% (p/v), dilué dans le milieu à base d'éléments minéraux (MM). La composition du milieu MM est détaillée dans l'annexe 1.

Le pH du milieu demeure sans ajustement au cours de la fermentation, permettant ainsi le déroulement des bioréactions anaérobies sans apport de modification. La durée totale du procédé acidogénique et méthanogénique des SPO est d'environ 121 jours. Chaque expérience est suivie périodiquement en analysant le volume et la composition des biogaz produits. Quand un volume faible est collecté, les cultures sont incubées un plus longtemps pour vérifier si le métabolisme s'est arrêté ou pas. Les cultures sont alors arrêtées lorsqu'aucune production de biogaz n'est pas constatée. La durée des cultures diffère d'un digesteur à l'autre et varie entre 68 et 121 jours.

1.2.4.2. Biométhanisation dans des réacteurs contrôlés par un système automatisé (AMPTS)

Des essais de biodigestion anaérobies des margines ont été également conduits dans des réacteurs contrôlés par un système automatisé, conçus spécialement pour réaliser des tests de méthanisation (AMPTS) (Automatic Methane Potentiel Test System). Les conditions initiales de culture sont comme assigné par le tableau VII. La figure 26 montre le montage dans un incubateur AMPTS avec un exemple de culture sur les margines. Il s'agit d'une co-digestion avec du fumier.

Tableau VII. Paramètres et conditions initiales des cultures réalisées en AMPTS avec les margines. Qsp : quantité suffisante pour.

Paramètre Inoculum	pH	Potentiel Rédox	MST introduite g/L	Inoculum mL	Milieu MM
LBMA	6,5±0,1	-225±7	25	25	qsp 1 L

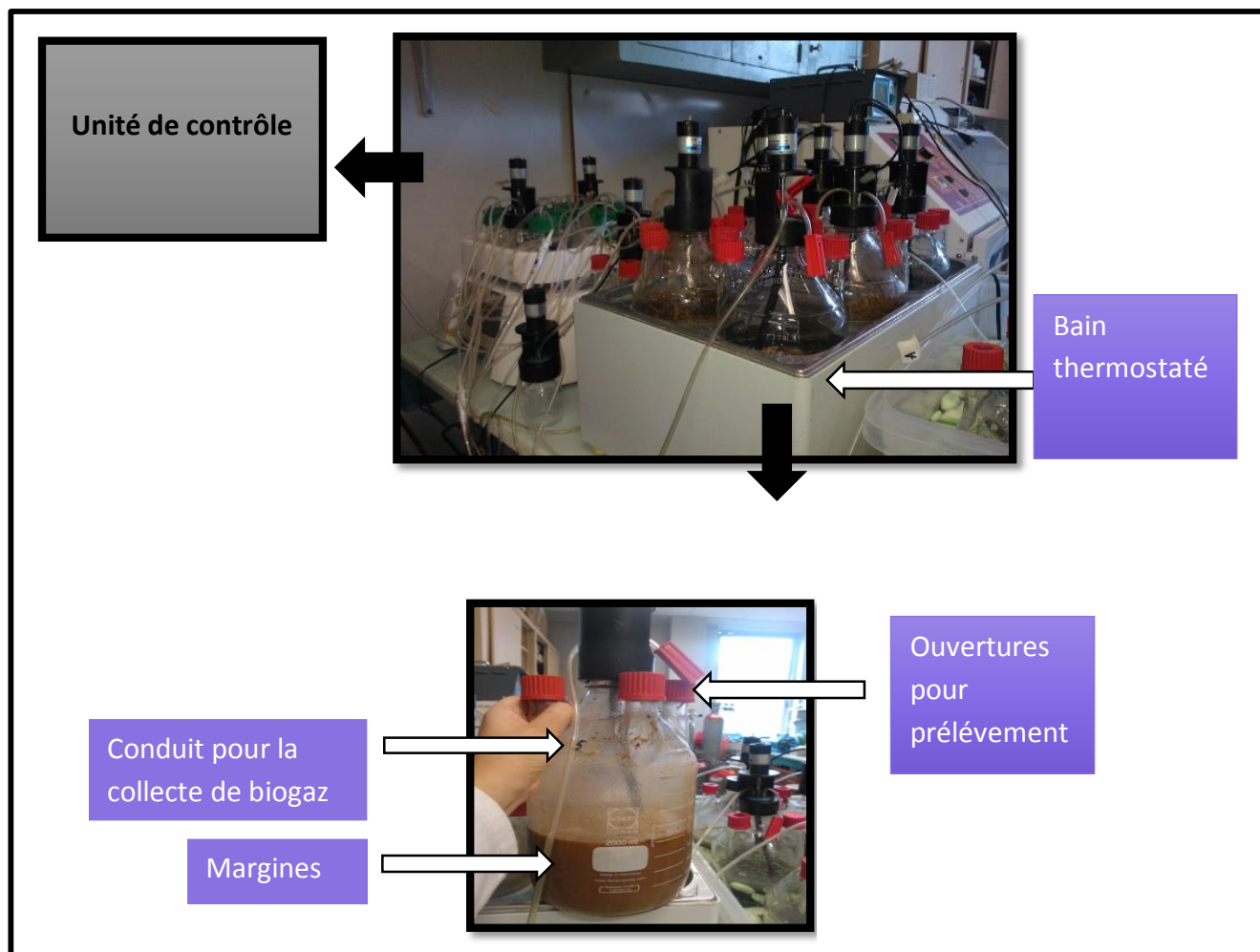


Figure 26. Photographie montrant la fermentation en réacteur de méthanisation AMPTS.

1.2.5. Analyse des produits issus des fermentations anaérobies

1.2.5.1. Analyse qualitative et quantitative des biogaz

La production de biogaz, dans les cultures en tube de Hungate et les bouteilles en verre, est mesurée périodiquement à l'aide de seringues en plastique de 60 mL (figure 27). Le volume recueilli correspond au déplacement du piston de la seringue sous la pression du biogaz, provenant du tube ou du flacon et traversant l'aiguille.

L'analyse chromatographique en phase gazeuse des biogaz produits est effectuée tous les 24h, dans les cultures considérées exemptes de pression en H₂. L'analyse est effectuée deux fois par semaine (4^{ème} et 7^{ème} jours de culture) pour les cultures considérées soumises à haute pression. L'analyse de la composition du biogaz dans chaque essai (H₂, O₂, CH₄, CO₂ et N₂) est réalisée à l'aide du micro-chromatographe (micro-GC) (Agilent 3000). Ce dernier est équipé de deux détecteurs thermiques et deux colonnes, 1.Oul BF Molsieve 10m/PPU ; 3m GC (90°C) et VAR PPU 8m GcModule (60°C), utilisant respectivement, l'argon et l'hydrogène comme gaz vecteur. Ainsi, le potentiel biochimique de biométhanisation (BMP) aussi bien que le potentiel biochimique d'hydrogène (BHP) des substrats ont été évalués.

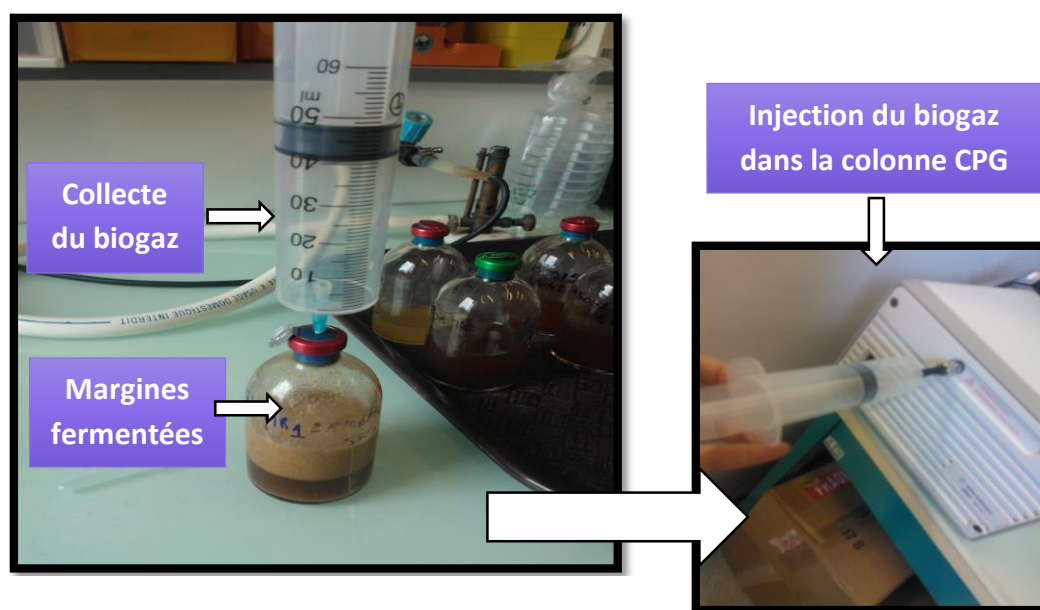


Figure 27. Photographies illustrant la collecte et l'analyse directe du biogaz produit.

Dans le cas des cultures BMP, les essais sont arrêtés quand la production de biogaz est arrêtée comme décrit aussi par RUGGERI et *al.* (2015). Toutes les expériences sont conduites en duplicata ; les valeurs moyennes en Bio-CH₄ sont calculées et exprimées en mL/gMSV ou en normaux mL/gMSV (NmL/gMSV). Les rendements en biogaz, Bio-H₂ et Bio-CH₄ de chaque essai, sont calculés en divisant le volume cumulé en biogaz par la masse en MST ou bien en MSV présente dans le biodigesteur.

1.2.5.2. Analyse de la phase liquide

La présente analyse se focalise sur l'identification et la quantification de métabolites solubles produits lors des expériences en batch tels que l'éthanol, l'acétate et le butyrate. Elle permet d'évaluer une variation possible dans le métabolisme en fonction des conditions opératoire.

➤ Chromatographie Liquide Haute Performance

Les produits solubles (AGVs et alcools) ont été analysés par HPLC (Agilent 1100 séries) avec la colonne capillaire, Rezex 8u 8% H Org Acid, en utilisant le mode isocratique (0,7 mL/min). La figure 28 résume les étapes de préparation des échantillons pour l'analyse.

Afin de faire précipiter les protéines et d'éviter l'encrassement de la colonne, les échantillons (2 mL) ont été traités avec 0,25 mL de baryte ($\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3 M) et 0,25 mL d'une solution de sulfate de zinc (ZnSO_4 5% p/v), ils sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 10000 g. Les échantillons ainsi obtenus sont filtrés à l'aide de filtre seringue de 0,2 μm afin d'éliminer les microorganismes et d'éviter l'obstruction de la colonne par les solides en suspension. Les échantillons sont ensuite transférés dans des vials et sont ainsi prêts à être analysés (figure 28). Cette méthode permet de quantifier le glucose, le citrate, le lactate, l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate et l'isovalérate, pour lesquels des gammes étalons ont été préalablement établies.

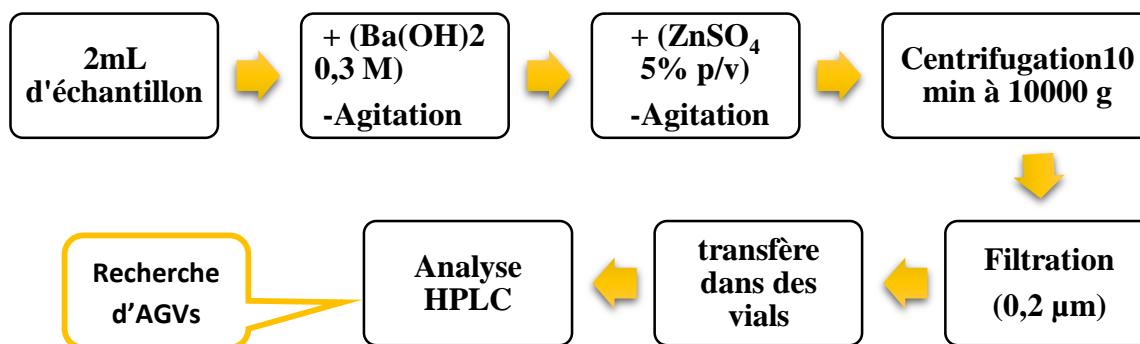


Figure 28. Préparation des échantillons pour la recherche d'AGVs par analyse HPLC.

➤ Résonance Magnétique Nucléaire

En vue de confirmer les résultats obtenus pour les analyses HPLC des AGVs, des mesures de spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectuées à 27 °C sur un spectromètre de 300 ou 500 MHz, Avance Bruker, équipé d'une sonde de 5mm TXI 1H, 13C, 15N avec une détection inverse. Les échantillons ont été centrifugés (10000 g, 10min) et 540 μL du surnageant et 60 μL d'une solution TSP-d4 (2,08 mL TSP-d4 10mM + 7,92mL D_2O) sont utilisés comme référence interne pour la quantification chimique.

1.2.5.3. Analyse de la diversité des populations microbiennes

Les ADN et ARN ont été extraits des culots récupérés sur 5mL de milieu de culture, centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 min, via un protocole d'extraction classique au phénol-

chloroforme (annexe 5). Les dosages d'acides nucléiques ont été réalisés à l'aide d'un Nanodrop. Les ADNr 16S ont été amplifiés à partir des ADN précédemment extraits via des amorces bactériennes universelles 968FGC et 1401R avec l'appareil PTC-200 MJ RESEARCH.

Le Gel d'Electrophorèse à Gradient Temporel de Température (TTGE) (urée 7M et Bis-acrylamide 8%) a été effectué selon le protocole de MUYZER et *al.*, (1998) sur l'appareil TTGEK-2401-220 (C.B.S. SCIENTIFIC). Pour chaque point (trois générations de culture), 400 ng de fragments PCR amplifiés ont été déposés dans chacun des puits du gel. Le dosage est réalisé via le logiciel d'analyse d'images ImageJ.

1.2.6. Essais de bioconversion en biomasse oléagineuse et probiotiques

Les souches de levures et de bactéries utilisées sont assignées sur le tableau VIII ci-dessous. Cette partie est réalisée en vue de réduire la charge polluante des margines via la culture et la production de biomasses microbiennes, non pathogènes et d'intérêt biotechnologiques.

Tableau VIII. Microorganismes fongiques et bactériens utilisés pour la fermentation des margines

Bactéries probiotiques	T° optimale de croissance	Levures oléagineuses	T° optimale de croissance
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243 (<i>L. gasseri</i>)	37	<i>Yarrowia lipolytica</i> MUCL 28849 (<i>Y. lipolytica</i>)	28
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 (<i>L. acidophilus</i>)			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103 (<i>L. rhamnosus</i>)			
<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011 (<i>L. casei</i>)	30	<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 (<i>C. curvatus</i>)	28
<i>Lactobacillus brevis</i> DSM 20054 (<i>L. brevis</i>)			
<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>subsp paracasei</i> DSM 20312 (<i>L. paracasei</i>)			

L. : *Lactobacillus*, *C. curvatus* : *Cryptococcus curvatus*, *Y. lipolytica* : *Yarrowia lipolytica*.

1.2.6.1. Levures oléagineuses

Les milieux à base de margines sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes. Les séries d'unités d'expériences pour les levures ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL, contenant chacun 100 mL de milieu et fermé avec du coton. Les essais expérimentaux ont été conduits sur des margines brutes (M), Margines diluées (MD) et / ou enrichies avec du glucose (M-Glc, MD-Glc) ou du glycérol (M-Gly, MD-Gly) à 3% dans les deux cas, comme rapporté par DOUROU *et al.* (2016).

1.2.6.2. Bactéries probiotiques

Concernant les bactéries probiotiques, les fermentations ont été effectuées dans le bouillon MRS (MRSB) enrichi avec des margines brutes. Il devrait être souligné que dans cette série d'expériences avec les bactéries probiotiques, les deux échantillons de margines, M3 (issues du système d'extraction de l'huile d'olive par centrifugation à trois phases) et M4 (issue du système d'extraction par presse) ont été utilisés. La croissance cellulaire, pour les six souches de bactéries probiotiques employées, est suivie sur l'échantillon M3 durant 72 h d'incubation.

1.2.6.3. Production des inocula

Pour la production des inocula, des précultures de levures ou de bactéries probiotiques sont effectuées sur milieu MEA et MRSA, respectivement. Après 24 h, des cellules sont transférées des boîtes vers leurs bouillons respectifs MEB et MRSB, ces derniers sont ensuite incubés pendant 18h.

Les bouillons de cultures chargés de cellules, ont été soumis à centrifugation pour la récupération et le lavages (trois fois) des cellules. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues ont servi d'inocula (figure 29). Cette suspension est agitée au vortex pendant quelques secondes pour assurer une bonne homogénéisation, la densité optique à 600 nm doit être proche de 0,4. Un volume de cette suspension est utilisé pour inoculer des margines.

1.2.6.4. Evaluation de la croissance cellulaire

En raison de l'aspect opaque des margines, la mesure de la croissance des micro-organismes par densité optique est impossible. Par conséquent, le dénombrement cellulaire par unités formant colonies (UFC) des microorganismes est utilisé. La méthode est réalisée par l'étalement d'une série de dilutions successives sur milieu gélosé en boîte de Pétri pour les différents milieux testés (dénombrement initial et final).

Le dénombrement des micro-organismes est ainsi déterminé à partir de séries de dilution (10^{-1} à 10^{-10}) dans de l'eau physiologique stérile, pour les différents milieux inoculés. Ainsi, un volume de 100 μ L de chaque dilution est étalé sur milieu MEA ou MRSA (figure 29).

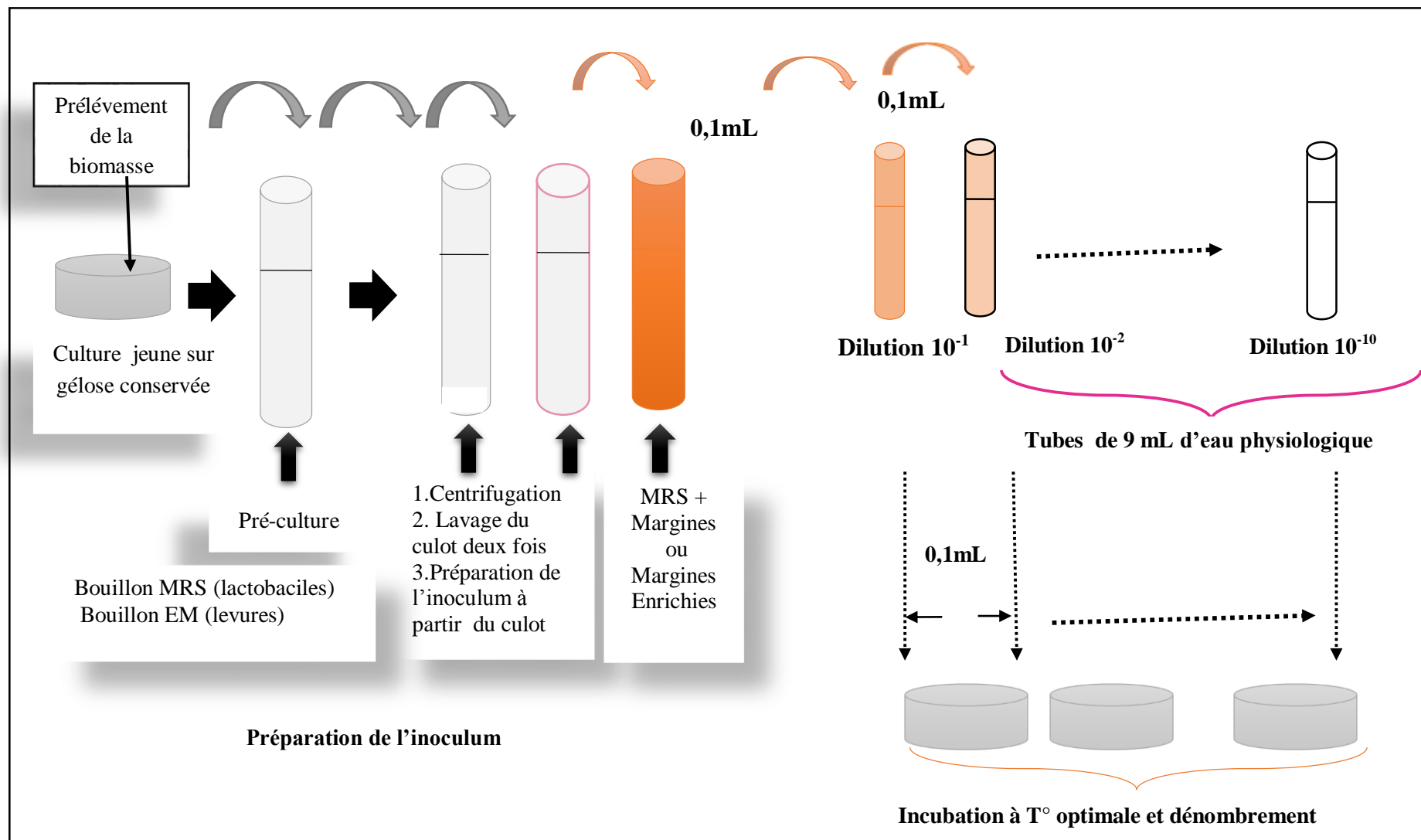


Figure 29. Etapes de culture et de dénombrement des souches.

1.2.7. Extraction des polyphénols des margines

1.2.7.1. Préparation des extraits organiques (acétate d'éthyle et diéthyle éther)

- **Extraction sans délipidation**

Un volume de margines est additionné de solvant (acétate d'éthyle ou diéthyle éther) (v/v), le mélange est ensuite versé dans un flacon de 500 mL, sous une agitation magnétique pendant 2h et à température ambiante. L'ensemble est centrifugé à 4°C, à une vitesse de 4000g/5min. Après centrifugation, le mélange est complètement séparé en deux phases : le solvant riche en polyphénols (surnageant) et les margines (résidus). Le surnageant est récupéré et séché à 40°C jusqu'à évaporation du solvant. L'extrait sec est récupéré dans un volume minimum de DMSO ou d'éthanol (figure 30).

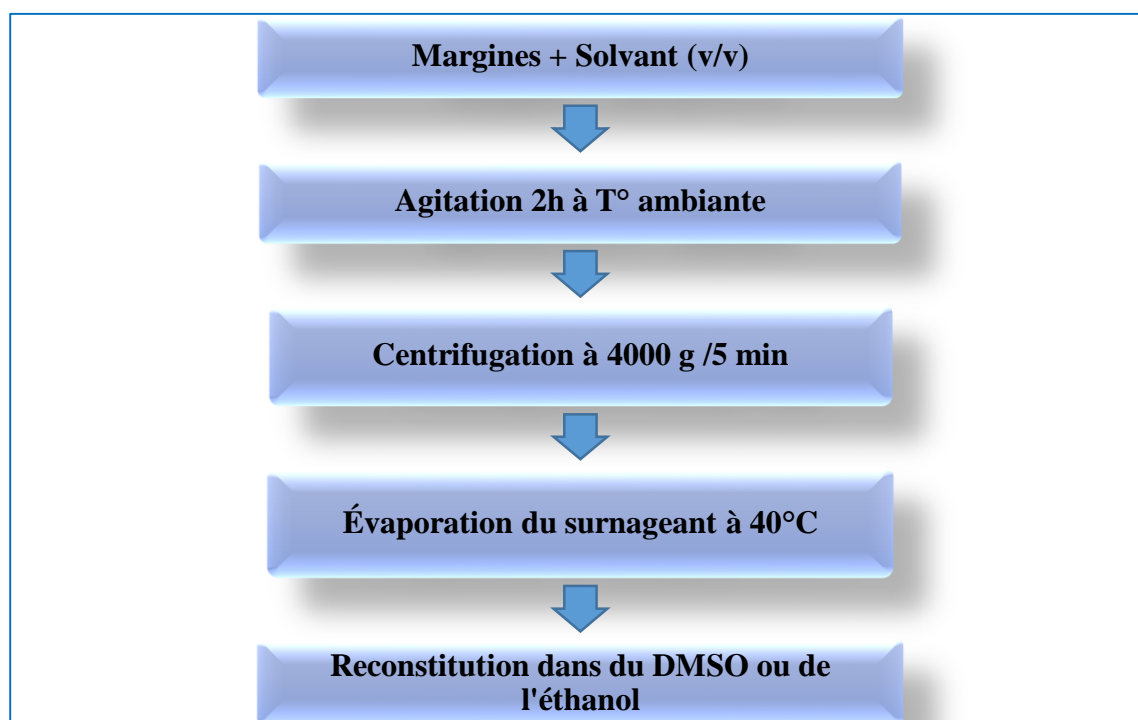


Figure 30. Protocole d'obtention des polyphénols à partir des margines.

- **Extrait d'acétate d'éthyle après délipidation**

Un volume de margines est additionné à un volume d'hexane. Le mélange est ensuite versé dans un flacon de 500 mL sous une agitation magnétique pendant 2h et à température ambiante. Après agitation, l'ensemble est centrifugé à 4°C à une vitesse de 4000 g/5min. Après centrifugation le mélange est complètement séparé en deux phases : l'hexane riche en lipides et les margines. Les résidus de margines sont traités par l'acétate d'éthyle (figure 31). Certains

extraits sont évaporés sous flux d'azote (figure 32). Il s'agit de ceux destinés aux activités antibiofilm.

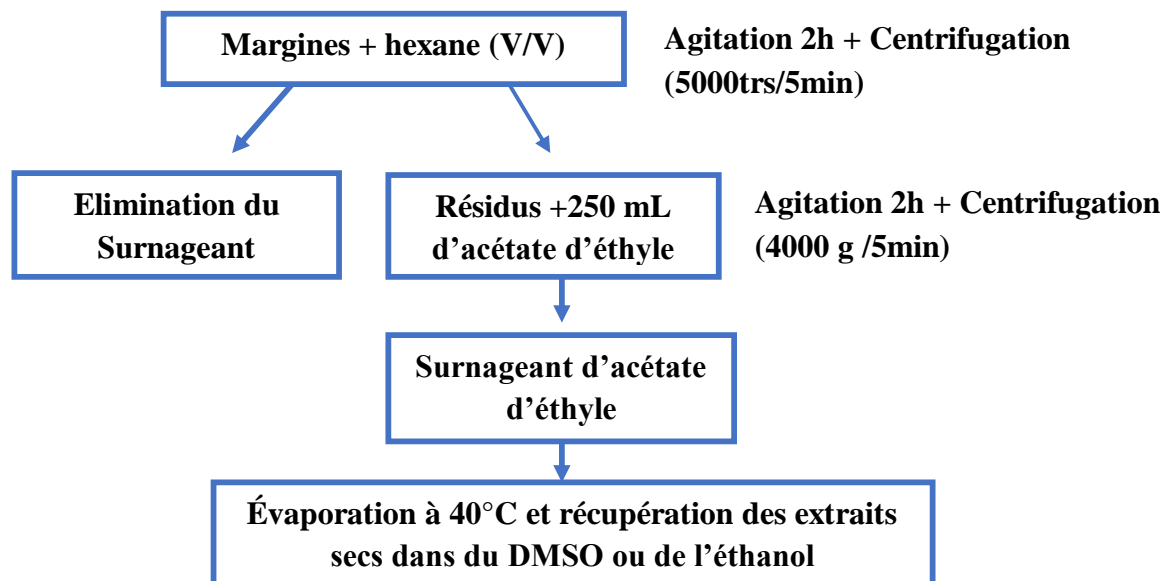


Figure 31. Protocole d'extraction des polyphénols des margines après délipidation

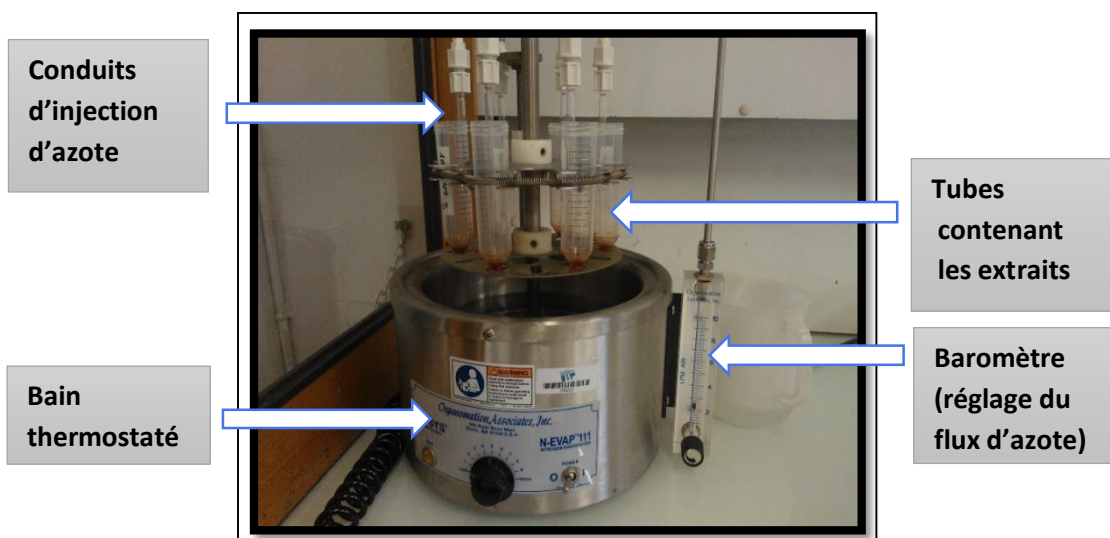


Figure 32. Dispositif d'évaporation des solvants d'extraction sous flux d'azote (extraits destinés aux activités antibiofilm).

1.2.8. Activités biologiques des fractions phénoliques extraites de margines

Après extraction des fractions phénoliques précédentes, celles-ci ont fait l'objet d'évaluation de leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes (figure 33).

Les extraits récupérés dans le DMSO sont destinés aux activités antimicrobiennes, les autres récupérés dans l'éthanol sont utilisés pour le teste de l'activité antioxydante.

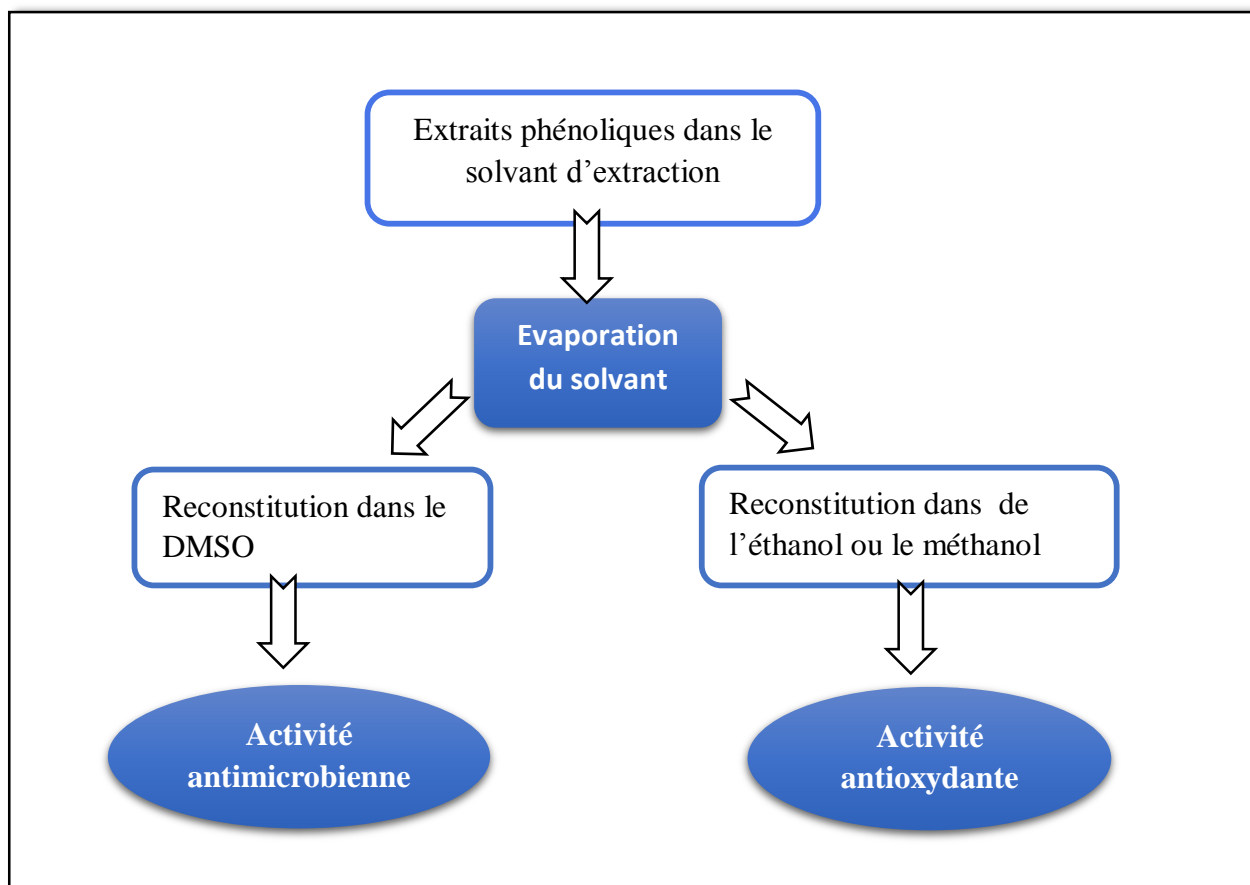


Figure 33. Récupération des composés phénoliques en vue de tester leurs bioactivités.

1.2.8.1. Mise en évidence de l'activité antioxydante

- Test de piégeage du radical DPPH•

Cette méthode utilisant le DPPH•, un radical libre, coloré, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs. Il présente un maximum d'absorption à 517 nm. En présence d'un antioxydant, le DPPH• est réduit en DPPH, sa réduction se traduit par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune. Ceci conduit à la diminution de l'absorbance du radical libre à 517nm. La structure ainsi que la réaction impliquant le DPPH• se résume dans la figure 34.

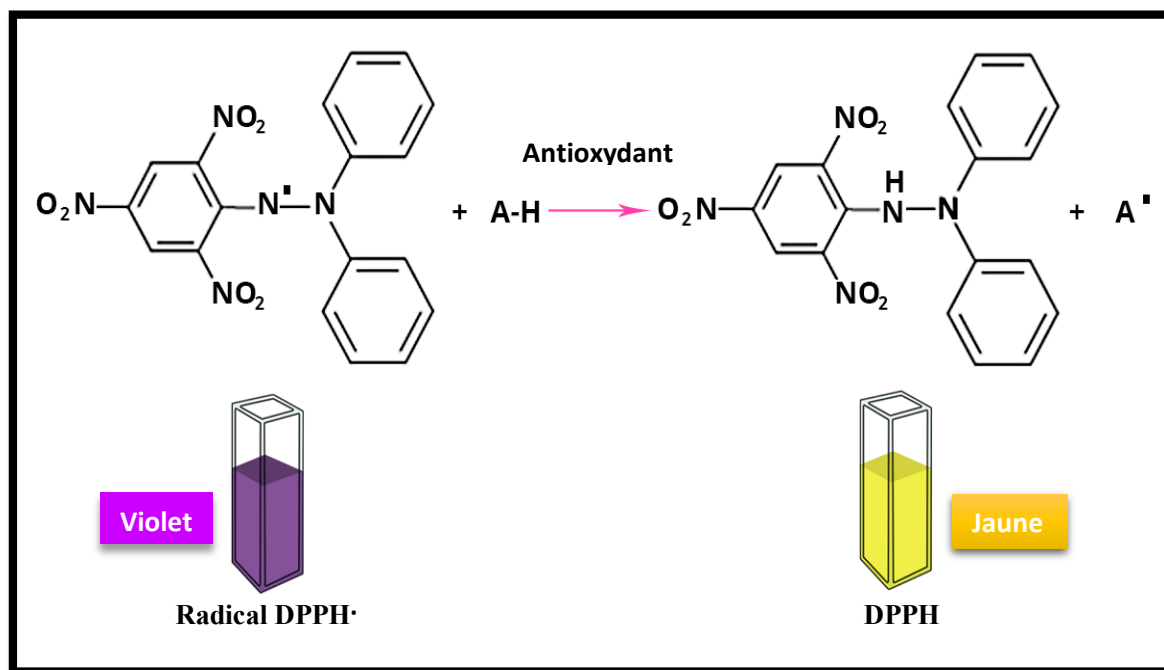


Figure 34. Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO *et al.*, 2007).

- **Protocole expérimental**

La capacité de piégeage du DPPH· est déterminée suivant la méthode décrite par BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). Brièvement, 2 mL d'une solution de DPPH·, 0,1mM dans de l'éthanol, sont additionnés à 20µL de l'extrait à tester. Le mélange est ensuite bien agité au vortex. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH·. L'activité de piégeage du radical DPPH· est calculée en utilisant la formule ci-dessous.

$$\text{Le \% de piégeage du radical DPPH}\cdot = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Où :

A_0 est l'absorbance du contrôle à temps $t = 0$ en absence des extraits à tester.

A_1 est l'absorbance de l'échantillon à temps t (30min).

1.2.8.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne

Pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des différents extraits phénoliques, trois méthodes ont été employées (figure 35) :

- La méthode de diffusion en milieu gélosé, qui permet la mise en évidence et le screening de l'activité antimicrobienne ;
- La méthode de micro-dilution, qui a pour objectif de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture ;

-La méthode antibiofilm détermine le pourcentage d'inhibition de la formation des biofilms, autrement dit, il s'agit de l'activité anti-adhérentielle des microorganismes à un support.

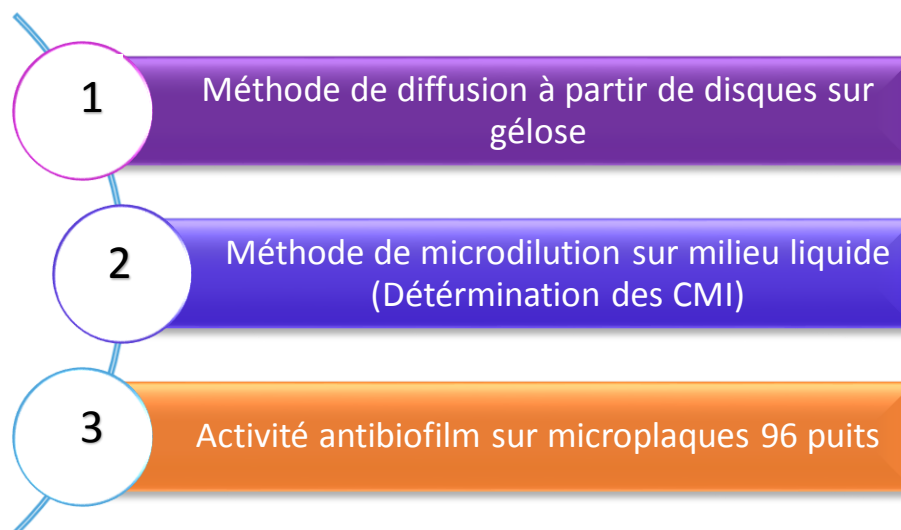


Figure 35. Méthodes utilisées pour l'étude des activités antimicrobiennes.

- **Souches microbiennes testées au cours de cette série d'expériences**

- **Souches pathogènes de référence**

Pour l'évaluation des activités antimicrobiennes des polyphénols des margines, les extraits issus des margines destinées à la fermentation (tests BHP) ont été utilisés. Les souches pathogènes testées sont représentées par le tableau IX.

- **Souches uropathogènes**

Pour l'étude des activités antimicrobiennes et antibiofilm, les différents extraits de margines ont été aussi testés vis-à-vis de souches uropathogènes représentées dans le tableau X. Les souches uropathogènes proviennent du service de microbiologie de l'établissement public hospitalier de DRAA-EL-MIZANE de Tizi-Ouzou, elles furent récupérées et identifiées (galeries biochimiques) sur une durée de trois mois. Elles proviennent de personnes hospitalisées au niveau de différents services. L'étude consiste à évaluer l'adhérence des isolats uropathogènes et à tester l'activité antibactérienne ainsi que l'effet antibiofilm des extraits organiques de margines.

- **Préparation des pré-cultures**

Des repiquages successifs sont effectués à partir des milieux de conservation des souches de référence. Ils sont réalisés sur des boîtes de gélose nutritive (ensemencement par stries) après revivification dans des bouillons de culture à 37°C/24h, (30°C/24h pour *B. thermosphacta*).

Tableau IX. Souches bactériennes de référence utilisées lors des tests antimicrobiens.

Groupes	Souches	Codes
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 9885
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	CIP 103251
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 0409
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25322
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	DSM 13124

Tableau X. Souches uropathogènes testées pour leurs sensibilités vis-à-vis des extraits de margines.

Groupes	Souches	Code	Origine
Bactéries Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	1	Patient sondé (homme)
	<i>Escherichia coli</i>	2	
	<i>Escherichia coli</i>	3	
	<i>Escherichia coli</i>	4	Enfant ayant une malformation urinaire
	<i>Escherichia coli</i>	5	
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	Femme diabétique
	<i>Proteus mirabilis</i>	2	Homme diabétique + insuffisance rénale
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	Enfant
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	Patient sondé (homme)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	Femme diabétique
Levures	<i>Candida albicans</i>	1	Patient sondé (homme)
	<i>Candida albicans</i>	2	Femme enceinte
	<i>Candida albicans</i>	3	Prélèvement extérieur d'une femme
	<i>Candida.spp</i>	1	Patient sondé (homme)
	<i>Candida.spp</i>	2	
	<i>Candida.spp</i>	3	Prélèvement extérieur d'une femme

- **Préparation de la suspension bactérienne**

À partir de cultures bactériennes jeunes, des colonies sont prélevées et remises en suspensions dans de l'eau physiologique stérile. Une agitation au vortex est ensuite effectuée pendant quelques secondes afin de bien disperser les cellules.

La standardisation de la suspension est immédiatement réalisée après homogénéisation et ce, à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm. Selon MAC FARLAND, on admet qu'une densité optique (DO) comprise entre 0,08-0,1 correspond à 10^7 - 10^8 germes/mL.

1.2.8.2.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé

- **Ensemencement et dépôt des disques**

La méthode d'ensemencement, réalisée sur boîtes de Pétri, est celle de l'écouvillonnage. La procédure consiste à tremper l'écouvillon dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant délicatement sur la paroi interne du tube. Un étalement de haut en bas en stries serrées est effectué avec l'écouvillon sur la totalité de la surface du milieu gélosé. À l'aide d'une pince stérile, des disques imprégnés de 20 μ L d'extraits sont déposés fermement sur la surface de la gélose précédemment inoculée. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées pendant 18 à 24 h à 37°C (30°C/24h pour *Brochotrix thermosphacta*).

- **Lecture des résultats**

La lecture est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition formées autour des disques. Chaque essai est réalisé deux fois et les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. La sensibilité aux différents extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition (MOREIRA et al., 2005) comme suit :

- Non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ;
- Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm ;
- Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm et extrêmement sensible (++++) pour le diamètre plus que 20 mm.

1.2.8.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Une progression géométrique à raison de 1/2 des concentrations d'extraits de margines est réalisée dans 200 μ L du BHIB. Un volume d'inoculum est par la suite ensemencé. Les témoins sont réalisés comme suit :

- Témoin négatif : extrait brut + milieu de culture ;
- Témoin positif : inoculum bactérien + milieu de culture.

Les cultures ont été incubés pendant 24h à 37 °C à l'exception de *Brochotrix thermosphacta* qui a été incubée à 30°C/24h. Après incubation, la CMI est déterminée comme étant la plus faible concentration ayant inhibé toute croissance visible.

1.2.8.3. Screening de souches formatrices de biofilm

L'aptitude d'adhérence des souches sur microplaque à 96 puits est vérifiée en ayant déposé un inoculum de 200 µL de suspension bactérienne neuve, préparée dans du BHIB. Ensuite, la microplaque est incubée à 37°C pendant 24 heures.

La formation d'un biofilm est révélée par la méthode de coloration au CV (1%). Celle-ci consiste à vider la microplaque des bactéries planctoniques, effectuer un lavage au tampon phosphate salin (PBS), remplir les puits de la microplaque avec la solution de CV puis laisser agir 15 minutes. Après coloration, trois lavages au PBS sont effectués afin de retirer l'excès du CV.

1.2.8.4. Évaluation de l'activité antibiofilm

La méthode entreprise pour évaluer l'activité antibiofilm est celle de la microplaque de polystyrène à 96 puits. Comme préalablement expliqué, ce test est précédé d'une préparation de précultures et de suspensions bactériennes. L'objectif est de quantifier l'adhésion formée en 24 h par des bactéries en contact ou non avec des extraits. La formation du biofilm bactérien est révélée par coloration au CV à 1 % pendant 15 min. Un volume de 200 µL d'éthanol est additionné dans chaque puits. Le contenu des puits est ensuite exploité pour une éventuelle lecture de DO au spectrophotomètre à 595 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{\text{DO du contrôle négatif} - \text{DO du test}}{\text{DO du contrôle}} \times 100$$

1.2.9. Analyse des données

Les résultats sont exposés sous forme de tableaux, d'histogrammes ou de courbes représentant les moyennes ± l'écart type de deux ou trois mesures. Une analyse de la variance est effectuée pour analyser si les différences sont significatives. Les données sont analysées en utilisant logiciel statistica 6 et microsoft excel.

Résultats et discussion

*Bioconversion anaérobies
des SPO*

II. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Quelques caractéristiques physico-chimiques des substrats utilisés pour les fermentations

2.1.1. Margines

Différents échantillons de margines ont fait l'objet de substrats pour les bioconversions assignées à la présente étude. À cet effet, l'analyse de certains paramètres physico-chimiques était indispensable. D'une part, ils servent à bien entreprendre les essais expérimentaux et d'autre part, fournissent des informations importantes pour mieux interpréter les résultats. Le tableau XI, représente les différents paramètres évalués pour les échantillons de margines étudiées.

Tableau XI. Quelques caractéristiques physicochimiques des margines employées pour les bioconversions.

Substrat (marges)	M 1	M 2	M3	M 4
Système d'extraction de l'huile	Par centrifugation à trois phases			Par presse
Culture concernée	BHP		BMP lactobacilles	Levures et lactobacilles
MST (g/L)	36 ± 2,2	65 ± 2,1	95 ± 4	88,47 ± 3,5
MSV (g/L)	32 ± 0,9	57 ± 1,1	84,9 ± 2	83,35 ± 2,95
TC (g/L)	4 ± 1,3	8 ± 1	10,1 ± 2	5 ± 0,52
PPT (g/L)	2,1 ± 0,5	4,4 ± 0,5	4,2 ± 0,4	3,8 ± 0,3
DCO (g/L)	55 ± 2	95 ± 0,6	ND	ND
pH	4,8 ± 0,1	5,2 ± 0,2	6,2 ± 0,1	4,9 ± 0,2

BHP : Potentiel en biohydrogène ; BMP : Potentiel de biométhanisation ; PPT : polyphénols totaux ; DCO : Demande chimique en oxygène ; MST : Matières sèche totales ; MSV : Matières solides volatiles totales ; Non déterminé (ND).

2.1.1.1. Matière sèche totale, organique et teneur en cendre

Les teneurs en matière sèche (MS), enregistrées pour les différents échantillons, s'étalent sur une gamme de 36 à 88,5 g/L. Les valeurs trouvées sont inférieures comparativement à celle rapportée par OULARBI-SENANI et al. (2018) qui est de 118,5 g/L. ESRA et al. (2001) ont rapporté pour des margines turques une valeur de 78,2 g/L, laquelle se situe dans la fourchette précédente.

Le contenu des margines en matière organique (MSV) est variable entre les échantillons, il varie de 32 à 83,3 g/L. Ces valeurs sont plus élevées que celle rapportée par SABBAAH et al.

(2009) pour des margines de la région de Marrakech (Maroc) et qui est de l'ordre de 11 g/L. Il en est de même pour la valeur enregistrée par IBOUKHOULEF (2014) sur les margines collectées en Kabylie (9,17 g/L). Cependant, le résultat rapporté par OULARBI-SENANI (2018), dont la valeur était de l'ordre de 106,76 g/L, est nettement supérieur comparativement à celui de la présente étude. La teneur trouvée par HAMDI (1993), pour des margines issues d'une huilerie localisée à Sfax (Tunisie) qui est de l'ordre de 55 g/L, se situe dans la gamme enregistrée. En effet, les résultats confirment la richesse des margines en MSV, faisant d'elles un bon substrat pour la fermentation. Les différences notées entre les échantillons, y compris ceux des autres auteurs, résultent principalement de la variabilité au niveau des procédés d'extraction, des paramètres de malaxation, de la qualité variétale des olives.

2.1.1.2. Demande chimique en oxygène et acidité

Une différence significative est notée pour les valeurs de la DCO enregistrées pour les margines M1 et M2. Elles sont respectivement de l'ordre de 55 ± 2 et $95 \pm 0,6$ g/L. Ces résultats confirment l'aspect polluants de ces résidus liquides toxiques pour l'environnement et concordent avec ceux de la littérature (DERMECHE et *al.*, 2013). La valeur trouvée par IBOUKHOULEF (2014), laquelle est de l'ordre de 75 g/L, se situe dans la gamme trouvée par la présente étude. Par contre, la valeur rapportée par GHIMIR et *al.* (2016) pour des margines italiennes est nettement plus importante, elle est de l'ordre de $114,5 \pm 13$ g/L.

La différence constatée pour les valeurs de la DCO est associée à la variabilité des volumes d'eau utilisés lors du procédé d'extraction de l'huile d'olive, la charge en matière organique oxydable, la maturation des olives et des facteurs climatiques. Quant aux valeurs trouvées pour le pH, celles-ci oscillent entre 4,8 et 6,2. En effet, il est bien établi que les margines sont des effluents acides et ce, pour leur contenance importante en acides organiques (DERMECHE et *al.*, 2013). Des valeurs proches ont été enregistrées par IBOUKHOULEF (2014) et OULARBI-SENANI et *al.* (2018), lesquelles sont de l'ordre de 4,6 et 4,88 respectivement. De même pour GHIMIR et *al.* (2016), une valeur acide de 4,6 est enregistrée pour des margines italiennes issues du système d'extraction par presse.

2.1.1.3. Teneur en polyphénols

Plusieurs études, avec différents contextes, témoignent de la richesse des margines en molécules antioxydantes et particulièrement les polyphénols. Cette richesse est déterminée par la méthode de dosage au réactif de Folin, laquelle a révélé des concentrations appréciables en CP contenus dans l'ensemble des échantillons de margines utilisées. Les teneurs en CP

enregistrées varient entre $2,1 \pm 0,5$ et $4,4 \pm 0,4$ g/L. Cette gamme de concentration est inférieure à celle rapportée par GONÇALVES *et al.*, (2010), laquelle est comprise entre 5 et 12 g/L. Par contre, les concentrations obtenues pour les margines M2, M3 et M4 ($3,8 \pm 0,3$ à $4,4 \pm 0,4$ g/L) sont avoisinantes de celle trouvée par NADOUR *et al.* (2015), dont la valeur est de l'ordre de 3,8 g/L. Il en est de même comparativement à la teneur enregistrée par EL-ABBASSI *et al.* (2011), laquelle est de $4 \pm 0,6$ g/L pour des margines marocaines.

Les teneurs en CP enregistrées pour les margines de la même région, la Kabylie, s'étalent sur une large gamme allant de 112 mg/L, rapportée par BEDOUHENE (2018), à une valeur de 6,27 g/L enregistrée par SENANI-OULARBI *et al.* (2018). MOSTAFA *et al.* (2019) ont également souligné la même observation pour des margines de l'Egypte, dont les valeurs varient de 0,294 à 4,8 g/L.

Cette variabilité au niveau des concentrations pourrait être associée aux paramètres climatiques et géologiques, à des variations botaniques, au stade de maturation des olives, la saison de récolte, au type de procédé d'extraction de l'huile d'olive et aux conditions d'extraction aux laboratoires.

2.1.2. Grignons

2.1.2.1. Matière sèche et teneur en cendre

Les contenus en matière sèche totale, organique et minérale des grignons sont respectivement de l'ordre de 91,3%, 87% et 4,3 %. Ces résultats ne sont pas loin de la gamme citée dans la littérature (DERMECHE *et al.*, 2013). Les teneurs répertoriées se situent dans la gamme de 1,7-4% pour la composition minérale et dans les intervalles de 87,1-94,4% et 85-95,5% pour la matière sèche et organique, respectivement. Comme pour les margines, la différence constatée dans les résultats, comparativement aussi à ceux des autres travaux (DERMECHE *et al.*, 2013), est due à plusieurs paramètres notamment l'origine botanique et le système d'extraction de l'huile d'olive.

2.1.2.2. Biopolymères

Les résultats de l'analyse HPLC de l'hydrolysate final (tableau XII), indique la présence de galactose, mannose, xylose et arabinose dans l'hydrolysate des grignons, avec un contenu important en glucose (21%). Un contenu élevé en glucose dans des fractions solubles et insolubles dans l'eau, obtenues à partir des grignons, a été aussi signalé par NADOUR *et al.* (2015). Ce résultat s'explique par la présence de glucanes comme la cellulose (annexe 3).

Il est bien établi que les hémicelluloses (annexe 3) sont des hétéropolysaccharides ramifiés représentant 20 à 30 % de la masse sèche du bois. Elles sont composées principalement

de saccharides à 5 et 6 carbones comme le xylose, l'arabinose, le galactose, le glucose, le mannose et les acides uroniques.

Les glucoro-mannanes et glucorono-xylanes font partie de la structure de l'hémicellulose chez certains végétaux, mais on peut trouver également des galactogluco-mananes et arabinoglucuronoxylanes dans d'autres espèces (DIOP, 2014 ; FOURNIER, 2016). Ainsi la présence de xylose, arabinose, galactose et mannose implique la présence de la structure de l'hémicellulose (19,4%).

Le résidu solide insoluble résultant de l'hydrolyse acide en batch, implique la présence la lignine insoluble pour laquelle la teneur est de 35,9%, son profil IR est vérifié par analogie à la littérature (annexe 3). Le profil IR obtenu avant et après traitement, ainsi que les principales valeurs de bandes d'analyse IR des lignines, sont représentés en annexe 3.

La lignine possède plusieurs propriétés, telles que sa richesse en groupement hydroxyles OH (aliphatiques et aromatiques) et donc en groupements phénoliques (annexe 3). Sa structure lui confère aussi une résistance vis-à-vis des agents chimiques et de la biodégradation (FOURNIER, 2016).

Tableau XII. Résultat de l'analyse qualitative et/ou quantitative des teneurs en biopolymères, matière organique et minérale contenues dans les grignons.

Composé/ paramètre	Temps de Rétention (min)	Biopolymères correspondants	Teneur (%)
D-Glucose	8,59	Glucanes (Cellulose)	21,2
Galactose	9,08	Galactanes } Xylanes } Hémicellulose Mannanes }	19,4
Xylose	9,12		
Mannose	9,15		
D-Arabinose	9,84	Arabinanes	0,8
Insoluble	-	Lignine	35,6
MST	-	-	91,3± 0,7
MVS	-	-	87± 0,9
TC	-	-	4,3±0,2

La littérature rapporte également la présence de teneurs élevées en cellulose, hémicellulose et en lignines dans les grignons d'olives (VIERHUIS et *al.*, 2003, RODRIGUEZ et *al.*, 2008). Les valeurs trouvées se situent dans les gammes de 29,79 à 34,35 % et de 21,45 à 27,64 %, respectivement pour la cellulose et l'hémicellulose (RODRIGUEZ et *al.*, 2008). Quant à la lignine (35%), sa teneur dépasse la gamme indiquée par le même auteur (20,63-25,11 %).

2.2. Bioconversion des sous-produits oléicoles en biohydrogène

2.2.1. Fermentations anaérobies en tubes Hungate et sélection des biodigesteurs

Des séries d'expériences préliminaires ont été menées dans l'objectif d'une pré-sélection et d'autre part, comme étape d'acclimatation des consortia aux substrats avant de les exposer à de plus fortes concentrations. Comme décrit précédemment les SPO, plus particulièrement les margines, sont des effluents récalcitrants à la biodégradation et leurs impacts sur l'environnement peuvent engendrer de sérieux problèmes écologiques. De nos jours, la gestion de ces effluents, pour les pays producteurs de l'huile d'olive, est un défi et compromis entre des perspectives économiques et environnementales.

De par leur composition biochimique intéressante riche en sucres, pectines, lipides, alcools et acides organiques (DERMECHE et *al.*, 2013 ; NADOUR et *al.*, 2015), les SOP peuvent présenter une source potentielle d'énergie pour les pays producteurs de l'huile d'olive (AL-MALLAHI et *al.*, 2015). Ils contiennent également des substances inhibitrices simples et complexes qui peuvent ralentir ou empêcher la fermentation anaérobie. En effet, le principal verrou identifié pour la conduite de ce bioprocédé fermentaire réside dans l'incapacité des consortia à se développer directement sur des margines brutes, concentrées en polyphénols (2,1-4,4 g/L). Pour cette raison, les premières fermentations ont été conduites avec des margines diluées (DCO : 23 g/L) afin d'adapter les consortia microbiens à leur nouvel substrat et écosystème. Des cultures avec des souches pures ont été également testées. D'après les résultats représentés par le tableau XIII et la figure 36, la production du Bio-H₂ en employant la voie fermentaire anaérobie sombre, est réalisable aussi bien pour les cultures pures que pour les consortia microbiens, cependant, avec différentes performances.

2.2.1.1. Biomolécules produites par les fermentations

Comme assigné par le tableau XIII et figure 36, les deux souches ATCC 27021 et ATCC 8260 ainsi que l'isolat C6 de genre *Clostridium* se sont avérés capables de produire du Bio-H₂ et des AGVs à partir des margines diluées comme substrat. En revanche, il est bien remarquable que la distribution ou la composition en AGVs de la phase liquide est différente entre les bactéries et les consortia fermentatifs. Les principaux métabolites solubles (éthanol, lactate, acétate, succinate, formiate, propionate et butyrate) ont été recherchés par analyse HPLC à la fin de la fermentation (168 h).

Pour les deux souches ATCC 27021 et ATCC 8260, l'acétate, le butyrate et le propionate sont enregistrés comme les principaux AGVs produits. Les valeurs obtenues (g/L), sont de l'ordre de $1,22 \pm 0,33$ et $0,99 \pm 0,06$ pour l'acétate et de $0,94 \pm 0,09$ et $0,59 \pm 0,02$ pour le butyrate,

respectivement pour les deux souches. Le pourcentage en Bio-H₂ varie de 5,33 à 8,79% pour les cultures pures ou mono-cultures. Les BHP enregistrés (mL/gMST) sont de l'ordre de (3,86±0,7), (5,05±1,2) et (6,28±0,8), respectivement pour les souches ATCC 8260, ATCC 27021 et l'isolat C6.

Tableau XIII. Production d'AGVs et d'autres biomolécules à partir de margines diluées

Biomolécules phase liquide (g/L)	Consortia microbiens				Souches bactériennes pures		
	PBR	AC	VINA	MAR	C6	ATCC 27021	ATCC 8260
Succinate	1,22	1,55	1,45	0,33	0,18	-	0,12
Formiate	0,25	0,11	0,47	-	1,36	0,73	0,71
Acétate	2,30	1,98	1,46	0,52	1,26	1,22	0,99
Propionate	0,32	0,20	0,19	0,22	0,23	0,24	0,30
Ethanol	0,41	0,66	1,30	0,95	0,57	-	-
Butyrate	1,99	1,50	0,90	0,34	-	0,94	0,59
Lactate	0,11	0,30	0,82	0,88	-	-	0,42

- DCO : 23 ± 0,77 g /L ; Inoculum 3% (v/v) ; Agitation 80 rpm ; Incubation à 37°C ; pH : 4,9.

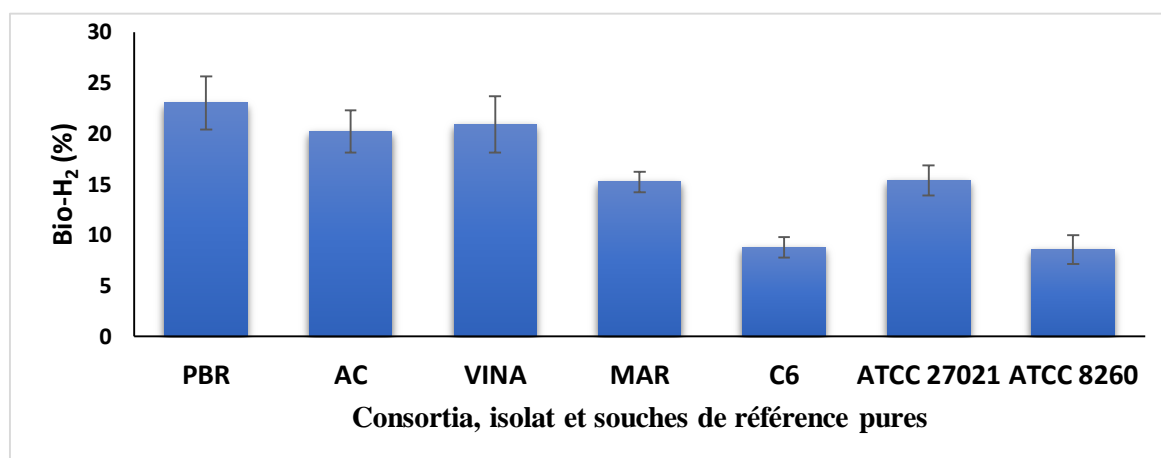


Figure 36. Pourcentage en Bio-H₂ produits à partir des fermentations.

Les meilleurs résultats de production en Bio-H₂ et AGVs, notamment le butyrate et l'acétate, ont été obtenus avec les consortia microbiens. Comme il est constaté sur le tableau XIII, l'acétate et le butyrate sont les principaux produits générés par les consortia notés VINA, AC et PBR. Les valeurs (g/L) enregistrées pour l'acétate et le butyrate sont respectivement pour les consortia de l'ordre de 1,46±0,14 à 2,30±0,15 et 0,90±0,05 à 1,99±0,02. De l'éthanol est également produit. Du formiate, propionate, succinate ainsi que des concentrations infimes d'isovalérate et isobutyrate ont été également détectés.

La figure 37 montre les résultats concernant les rendements obtenus en Bio-H₂ (mL/gMST), ils sont respectivement de l'ordre de $8,71 \pm 0,84$ et $13,40 \pm 1,97$ pour VINA et AC. Quant au consortium PBR, un rendement en Bio-H₂ plus important au précédent est enregistré, lequel est de l'ordre de $18,3 \pm 0,2$ mL/gMST.

La figure 36 montre que la concentration en pourcentage du Bio-H₂ comprise dans le biogaz varie de 8,79 à 23 % selon la culture concernée. Des valeurs plus basses en BHP ($< 0,1$ NmL/gMSV) avec des concentrations inférieures à 0,2 % ont été également signalées par CORNELI et al. (2016) en utilisant du grignon ensilé, issu du système d'extraction à trois phases, comme substrat.

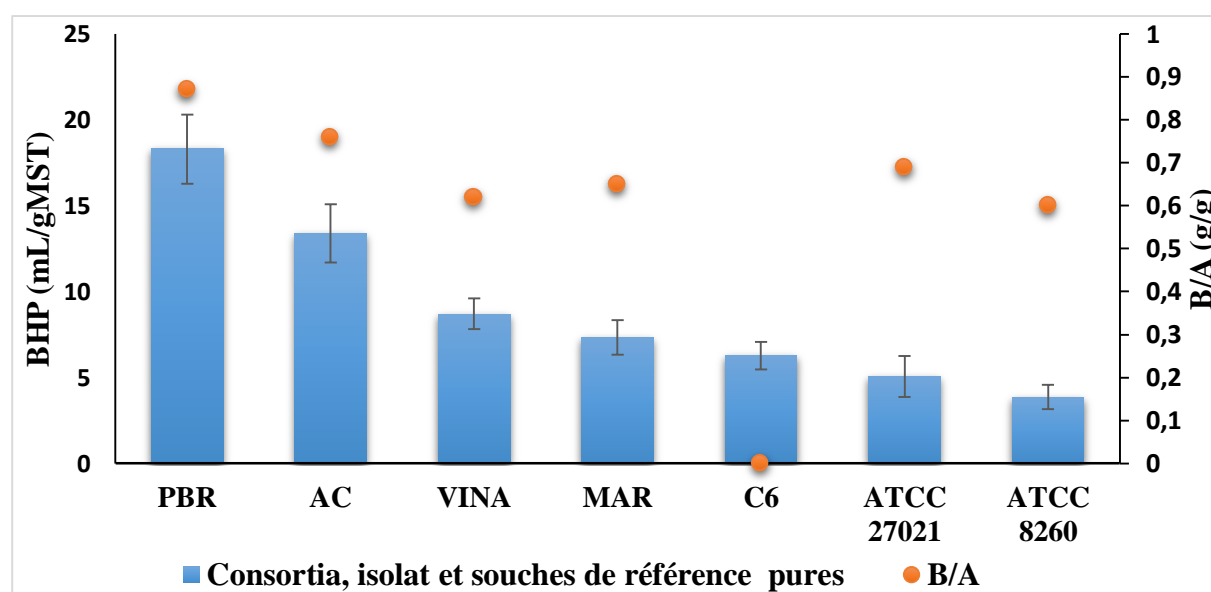


Figure 37. Potentiel de bioconversion des margines diluées en Bio-H₂ par les consortia microbiens, les souches de références et les isolats.

B/A : Butyrate/Acétate ; BHP : potentiel de bioconversion en Bio-H₂ ; DCO : $23 \pm 0,77$ g/L ; Inoculum 3% (v/v) ; Agitation 80 rpm ; Incubation à 37°C ; pH : 4,9.

Souvent, les taux les plus élevés en acétate expliquent les rendements les plus élevés en Bio-H₂, puisque la voie acétate procure généralement plus de molécules d'H₂ par mole de glucose comparée à la voie butyrate.

L'utilisation des cultures microbiennes mixtes est généralement préférable par rapport aux cultures pures (mono-culture) et ce, d'une part, pour leur facilité de culture avec un coût réduit n'exigeant pas d'environnement aseptique. D'autre part, les consortia représentent des écosystèmes riches en interactions syntrophiques dans les communautés microbiennes au profit de la biodégradation et par conséquent la bioconversion en biomolécules d'intérêt (JOBAR et al., 2014 ; GHIMIRE et al., 2016 a). Les cultures pures sont bien connues pour être plus efficaces et spécialisées dans la bioconversion de substrats simples, tel que le glucose, en

biomolécules d'intérêt bien distinctes et à de grandes concentrations (JOBARD *et al.*, 2014). Cependant, dans la bioconversion anaérobie de sous-produits complexes tels que les SPO, en utilisant les cultures à voies métaboliques uniques, la biodégradation de la biomasse ne peut être que partielle. En effet, un seul micro-organisme ne peut pas avoir toutes les enzymes indispensables pour la digestion de tous les substrats complexes et existants (JOBARD, 2014) ; ce qui justifie en effet les productions faibles issues des cultures pures par opposition aux cultures mixtes (consortia).

Notons que les rendements faibles en biomolécules sont probablement liés à la sensibilité des souches pures et des consortia aux inhibiteurs, tels que les CP (1,2g/L), menant à une décomposition restreinte de la biomasse. Les rendements faibles ou élevés en Bio-H₂, obtenus au cours des essais, sont bien soutenus par l'analyse HPLC des voies métaboliques. Celle-ci peut fournir d'importantes informations sur les voies fermentatives mises en route lors de la production de Bio-H₂. En effet, la présence de l'acétate et de butyrate confirme la production de Bio-H₂. Par ailleurs, puisque les voies métaboliques menant à l'acide lactique ne sont pas favorables à la production du Bio-H₂, l'accumulation du lactate pourrait probablement expliquer la différence dans les rendements enregistrés pour le Bio-H₂.

Les meilleures valeurs en BHP sont enregistrées pour les trois consortia (VINA, AC PBR). Ceci serait probablement lié à l'existence de communautés microbiennes constituées d'une grande diversité de micro-organismes, ayant comme atout une augmentation dans les populations ou de souches résistantes aux biomolécules inhibitrices et/ou récalcitrantes et réduisant ainsi leur impact sur l'ensemble du bioprocédé. Cette diversité de microorganismes assure une complémentarité des fonctions métaboliques menant ainsi à une biodégradation efficace (JOBARD *et al.*, 2014).

Le choix des micro-organismes est un point crucial dans le développement d'un bioprocédé de production de Bio-H₂ ou d'AGVs (SYDNEY *et al.*, 2014). Dans ce sens, le meilleur consortium a été choisi parmi plusieurs essais en tubes pour être ensuite exposé à une charge organique plus élevée. Il est à noter que la stabilité métabolique du bioprocédé était difficile à maintenir dans tous les essais préliminaires.

2.2.1.2. Analyse RMN des phases liquides après fermentation

En vue de s'assurer de la production d'AGVs, l'analyse RMN a été effectuée, les résultats sont représentés par la figure 38. Ces derniers, confirment la présence de faibles concentrations en AGVs dans les margines et les grignons, avant fermentation. Les teneurs en acétate sont de l'ordre de 0,38 et 0,34 g/L pour les grignons et les margines, respectivement. Comme il peut

être constaté sur la figure 38, le consortium AC et la souche RA produisent des concentrations appréciables en AGVs sur les grignons et les margines. Les meilleurs résultats sont enregistrés pour les cultures sur les margines, comparativement à celles conduites avec les grignons. Les valeurs obtenues, pour l'acétate, sont de l'ordre de 1,3 et 1,39 g/L respectivement pour le consortium AC et la souche RA. Des concentrations de l'ordre de 1,2 et 0,98 g/L sont enregistrées pour le butyrate, respectivement pour AC et RA.

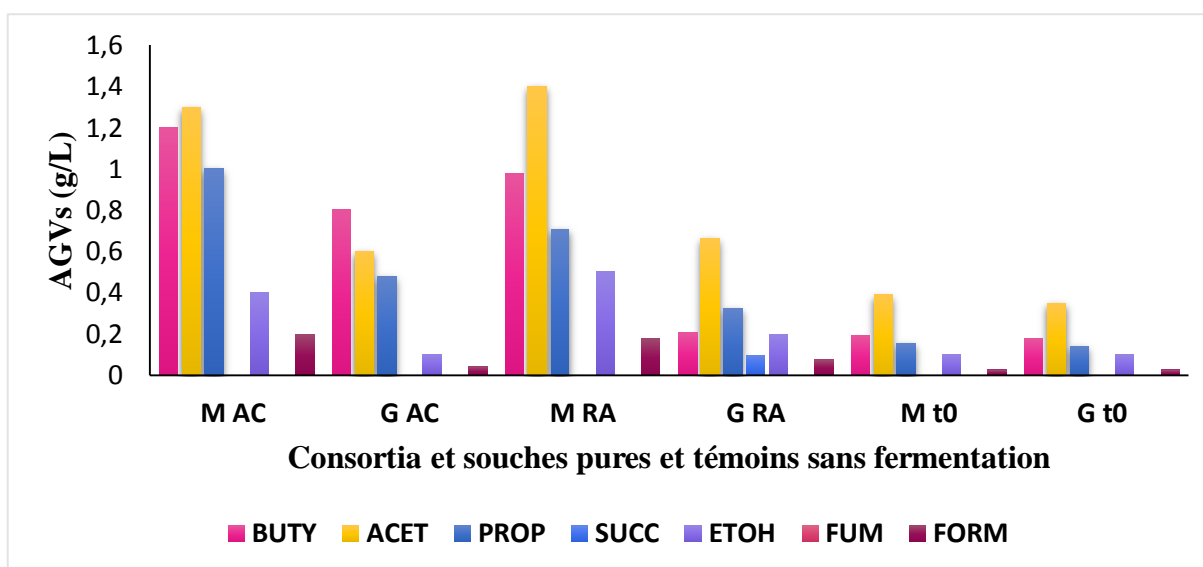


Figure 38. Résultat de l'analyse qualitative et quantitative par RMN des AGVs produits par le consortium AC et la souche pure RA cultivés sur le grignon et les margines.

M : margines ; G : grignon ; Mt0 : margines avant fermentation ; Gt0 : grignon avant fermentation ; AGVs : acides gras volatils ; Acét : acétate ; But : butyrate ; Fum : fumarate ; Suc : succinate ; EtOH : éthanol. Margines diluée ($23 \pm 0,77$ g_{DCO}/L) ; inoculum 5% (v/v) ; agitation 80 rpm ; incubation à 37°C à pH : 4,9.

2.2.1.3. Sensibilité des consortia sélectionnés aux margines brutes

Les consortia, préalablement sélectionnés en tubes Hungate, ont été exposés au substrat plus concentré (une DCO plus élevée). Tous les consortia ont exprimé la même réponse concernant leur sensibilité aux substrats bruts. Des charges organiques élevées dans une gamme de 55-95g_{DCO}/L, et plus particulièrement des concentrations importantes en CP (2,1- 4,4 g/L), se sont nettement avérées pour entraver le bon fonctionnement de la bioconversion anaérobie, faisant ainsi des SPO des substrats à potentiel récalcitrants à la biodégradation. Par conséquent, les SPO bruts ou concentrés en polyphénols ne semblent pas être convenables comme seul substrat pour la production de Bio-H₂ (MILANESE et al., 2014). Des résultats similaires ont été déjà signalés par plusieurs chercheurs comme SABBAAH et al. (2004), GONÇALVES et al. (2014b) et SICILIANO et al. (2016). En effet, aucune biotransformation remarquable de la

matière organique n'est observée dans les biodigesteurs en batch, opérant sur les SPO avec des valeurs de DCO supérieures à 50g/L. En outre, la réduction du contenu en CP, par simple dilution du substrat à l'eau, a considérablement amélioré la production en biogaz tout en permettant une adaptation aux microorganismes.

2.2.1.4. Sélection des consortia acclimatés

Une grande variété de substances inhibitrices, comme celles contenues dans les margines, peut mener le digesteur anaérobie à l'échec. Cette série d'expériences vise à améliorer la résistance des microbiotes anaérobies aux CP et la sélection des plus performants, comme AC et PBR, suite à l'acclimatation à une forte concentration (DCO : 38g/L). Les Figures 39, 40 et les tableaux XIV, XV, XVI montrent les résultats obtenus dans cette série d'expériences sur milieux à base de margines additionnées ou non de grignons. La figure 39 montre les résultats moyens de Bio-H₂ cumulés sur trois digesteurs anaérobies successifs (DA1, 2 et 3).

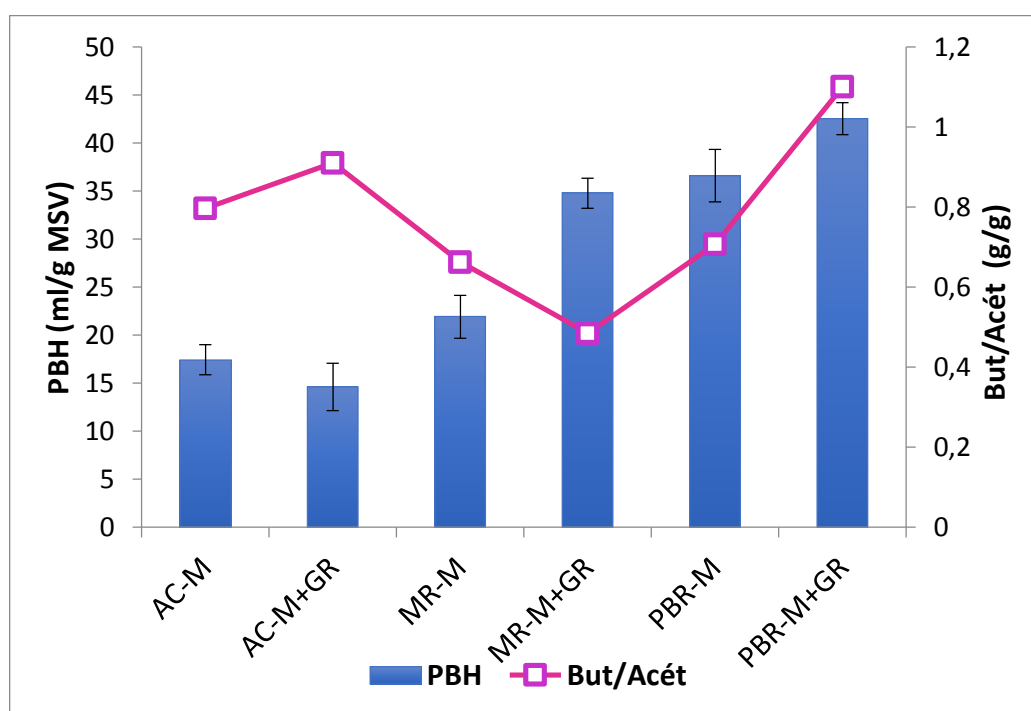


Figure 39. Potentiel de production en biohydrogène et en AGVs (butyrate/acétate) sur des margines concentrées à $38 \pm 1,9$ g DCO /L.

En accord avec les résultats obtenus par GHIMIRE *et al.* (2015b, 2016) et CORNELI *et al.* (2015), un rapport butyrate /acétate (But/Acét) élevé, excepté pour les consortia MAR et VINA, donne un rendement plus élevé en Bio-H₂ (figure 39). En revanche, il est bien constaté sur la figure 39, qu'un rapport B/A plus élevé n'est pas systématiquement toujours couplé à de plus grands rendements en Bio-H₂. En effet, la dégradation des substrats pourrait suivre d'autres

voies biochimiques sans production de Bio-H₂ générant ainsi de faibles rendements de ce dernier.

Tableau XIV. Profil en AGVs et autres biomolécules solubles produits par le consortium MR sur des margines concentrées à $38 \pm 1,9$ g DCO /L.

Consortium-milieu	Profil en AGVs dans la phase liquide (g/L)										
	Succ	Lac	For	Ac	Pro	Eth	Isobut	But	Isoval	Val	But/Ac
M											
DA1	0,43	0,36	0,00	1,38	0,11	0,46	0,11	0,99	0,00	0,30	0,72
DA2	0,41	0,48	0,00	1,12	0,13	0,44	0,12	0,70	0,00	0,12	0,63
DA3	0,46	0,10	0,00	0,78	0,11	0,62	0,32	0,48	0,00	0,11	0,62
MGR											
DA1	0,29	0,21	0,00	1,20	0,12	0,00	0,70	0,48	0,00	0,23	0,40
DA2	0,40	0,11	0,00	0,92	0,26	0,00	0,52	0,58	0,00	0,00	0,63
DA3	0,04	0,15	0,00	1,34	0,14	0,41	0,34	0,62	0,00	0,00	0,46

DA : digestion anaérobie ; M : margines ; MGR : margines+ grignon.

Tableau XV. Profil en AGVs et autres biomolécules solubles produits par le consortium AC, préalablement acclimaté, sur des margines concentrées à $38 \pm 1,9$ g DCO /L.

Consortium-milieu	Profil en AGVs dans la phase liquide (g/L)										
	Succ	Lac	For	Ac	Pro	Eth	Isobut	But	Isoval	Val	But/Ac
M											
DA1	0,84	0,00	0,00	1,66	0,41	0,00	0,00	1,70	0,22	0,30	1,03
DA2	0,60	1,00	1,11	1,73	0,07	1,65	0,00	1,30	0,11	0,22	0,75
DA3	0,46	1,24	0,00	1,56	0,00	0,90	0,00	0,94	0,00	0,13	0,61
MGR											
DA1	0,51	0,00	0,00	1,58	0,43	0,00	0,00	1,81	0,10	0,23	1,15
DA2	0,56	0,40	1,02	1,40	0,14	1,86	0,00	0,86	0,00	0,40	0,62
DA3	0,39	0,33	0,00	1,28	0,00	0,78	0,00	1,21	0,21	0,42	0,95

Tableau XVI. Profil en AGVs et autres biomolécules solubles produits par le consortium PBR, préalablement acclimaté, sur des margines concentrées à $38 \pm 1,9$ g DCO /L.

Consortium-milieu	Profil en AGVs dans la phase liquide (g/L)										
	Succ	Lac	For	Ac	Pro	Eth	Isobut	But	Isoval	Val	But/Ac
M											
DA1	0,00	0,00	0,47	2,70	1,04	0,00	0,32	1,86	0,00	0,30	0,69
DA2	0,49	0,00	0,36	2,37	0,36	0,00	0,30	2,29	0,00	0,37	0,97
DA3	0,79	0,15	0,71	2,39	0,47	0,00	0,91	1,13	0,00	0,20	0,47
MGR + M											
DA1	0,51	0,03	0,00	1,53	0,51	0,00	0,11	1,93	0,00	0,12	1,26
DA2	0,64	0,45	0,00	1,51	0,31	0,00	0,12	1,50	0,00	0,24	0,99
DA3	0,96	0,20	0,00	1,73	0,29	0,00	0,13	1,82	0,00	0,27	1,05

2.2.1.5. Comportement des biodigesteurs libres où traités au BES

Du biogaz et des AGVs sont détectés dans les digesteurs anaérobies sans prétraitement au BES (VINA, MAR), par contre aucune trace de Bio-CH₄ n'est enregistrée avec des concentrations en SPO correspondant à une DCO de 23 et 38 g/L et seul le Bio-H₂ est noté.

Concernant le consortium MR cultivé sur une DCO de 38 g/L, un taux d'AGVs important est souligné comparativement aux biodigesteurs conduits à de basses concentrations (23g_{DCO}/L), ce qui révèle que les bactéries produisant le Bio-H₂ ont une activité métabolique plus élevée et dominante contre les bactéries méthanogènes. Ces dernières, seraient probablement inhibées par la charge organique élevée et par conséquent la concentration en CP (1,5 g/L). Les valeurs obtenues pour les BHP sont de l'ordre de 21,09 ±1,09 à 34,77 ±1,57mL/gMVS respectivement pour les margines additionnées de grignon et les margines seules (figure 39). Dans le même contexte, les expériences en batch entreprises par OKAMOTO *et al.* (2000) sur des déchets ménagers, tels que le chou, la carotte et le riz, ont donné des valeurs en BHP de l'ordre de 26,3 à 96 mL/gMSV.

Il est à noter, qu'aucune trace de Bio-CH₄ n'a été détectée durant plus de 60 jours de culture et seul le Bio-H₂ est détecté. Il en ressort des résultats, que le métabolisme du consortium MR est nettement orienté sur la voie du Bio-H₂ et des AGVs, sans production ultérieure de méthane, où les bactéries méthanogènes ne sont plus fonctionnelles ou opérationnelles. Par conséquent, les substrats complexes et polymères dans le biodigesteur ont été réduits en biomolécules plus simples, principalement en chaînes courtes d'acides organiques (AGVs). Ces derniers, peuvent être exploités en tant que substrats nutritionnels pour l'alimentation d'une subséquente phase de méthanisation sous un contrôle de pH et d'autres paramètres, suivant le procédé qui pourrait être envisagé.

Il est important de souligner que la dynamique de la biométhanisation est sous un contrôle crucial de la production de l'acétate et sa reconsommation. Ce dernier sert de substrat pour la méthanogénèse acétoclastiques, tandis que les homoacétogènes lesquels sont de potentiels compétiteurs pour l'H₂ avec les méthanogènes hydrogénotrophes, peuvent priver les méthanogènes d'une partie significative de la concentration globale en acétate produit (DRAKE *et al.*, 2009 ; YE *et al.*, 2014). À cet effet, l'accumulation de l'acétate laisse suggérer que les méthanogènes acétoclastiques et hydrogénotrophes, tous les deux, sont sensibles aux CP comparés aux homoacétogènes.

2.2.1.6. Réponse des biodigesteurs préalablement traités au BES

En tenant compte des BHP auxquels est parvenue la présente étude, les résultats vont dans le même sens que ceux rapportés par certaines études (SCHIEVANO *et al.*, 2014 ; GHIMIRE

et *al.*, 2015b ; CORNELI et *al.*, 2016). Cependant, une comparaison directe ne peut être effectuée en raison de la différence dans les conditions opératoires.

La charge organique élevée implique une augmentation de la disponibilité des substrats facilement hydrolysables, aboutissant alternativement à une accumulation d'AGVs, acidification du milieu et à une subséquente inhibition de la biométhanisation anaérobie. Par conséquent, la présente partie d'expériences met en relief la faisabilité de la production de Bio-H₂ et de l'accumulation d'AGVs sur des concentrations plus élevées en SPO. Les résultats sont nettement meilleurs comparés à ceux obtenus sans acclimatation où seulement des traces d'H₂ sont détectées. En effet, la présence de différentes souches offre au consortium la faculté d'adaptation aux substrats complexes après acclimatation, offrant ainsi le privilège de l'intervention de micro-organismes compétents au cours de toutes les étapes métaboliques (PESSIOT et *al.*, 2012).

Au cours de leurs travaux menés sur la fermentation des résidus oléicoles solides, SCHIEVANO et *al.* (2014) ont constaté que les BHP varient de 0,1 à 13,0 NmL / g MSV, tandis que la présente étude souligne des valeurs de BHP plus élevées et variant de 28,01 à 42,52 mL/gMSV comme résumé dans le tableau XVII. GHIMIRE et *al.* (2015b) ont rapporté une valeur plus élevée en BHP, égale à 54,9 NmLg/MSV à partir de SPO dans des expériences entreprises dans des conditions mésophiles en batch avec des boues traitées chimiquement.

PAGLIACCIA et *al.* (2015) ont souligné l'importance du prétraitement du substrat pour la production de Bio-H₂. Après prétraitement thermique d'un mélange de déchets alimentaires et de pulpe de grignon solide, la production était significativement supérieure à celle obtenue sans prétraitement, ce qui serait probablement dû à la solubilisation de la matière. Leur résultat a alors atteint 87 NmL/g MSV, une valeur parfaitement supérieure au potentiel de Bio-H₂ de la présente étude.

Afin d'améliorer et d'orienter le métabolisme microbien vers la production de Bio-H₂ à partir de sous-produits agro-industriels, l'activité des micro-organismes consommateurs de Bio-H₂, comme les archaea méthanogènes et les bactéries homoacétogènes, devrait être inhibée. En revanche, cette étude met en relief la possibilité d'obtenir des résultats significatifs pour le Bio-H₂ et les AGVs et ce, non seulement par les consortia traités au BES tels que PBR, AC et LCM mais également avec les biodigesteurs comme VINA, de MAR et MR non prétraités au BES. Cette observation, sur l'indépendance de la production de Bio-H₂ vis-à-vis de suppresseurs méthanogéniques dans les marges fut rapportée par GONÇALVES et *al.* (2014b). De surcroît, la présence de concentrations plus élevées en acétate indique la prévalence de l'activité homoacétogéniques réduisant les rendements en Bio-H₂ (GHIMIRE et *al.*, 2016).

Tableau XVII. Résumé de différents rendements en biohydrogène et biométhane obtenus à partir de substrats (margines et grignons), en conditions similaires à celles de la présente étude. Tableau adapté par GHIMIRE et al. (2016) et modifié.

Substrats	Système de culture et conditions	BHP NmL/gMSV	BMP NmL/gMSV	Références
Margines	Batch, bouteilles, agitation magnétique, mésophile (35°C) sous différentes concentrations en CP(g/L) :			CALABRO et al. (2018)
	-0,5		419	
	-1	–	243	
	-2	–	45	
	-1 (après adaptation)	–	419	
	-2 (après adaptation)	–	170	
Grignon + boues activées	Batch (flacons de 250mL) ; 35°C ; (pH 7,8).		258,65	PELLERA et al. (2016)
-Grignon	Biomasse ensilée Substrat /inoculum (2/1) ; réacteur batch stationnaire (2 L) ; 37 C°, pH non contrôlé	–	020,70	CORNELI et al. (2016)
-Grignon		< 0,1	–	
-Maïs, <i>Zea mays</i>		13,8	–	
-Son de blé		18,9	–	
Margines	70% margines+30% LPM. Batch (120 mL bouteilles en verre) 37C°, pH 7,2. Substrat /inoculum (MSV) à (1/1)	–	55,10 ^a	KHOUIFI et al. (2015)
Grignon	Grignon broyé ; réacteur en fed batch mésophile ; pH 7-7,5	–	180	ALAGOZ et al. (2015)

a) mL/g MTS ; b) mL/gMSV ; LPM : “liquid ploutry manner” ou fumier liquide

Suite du tableau XVII. Résumé de différents rendements en biohydrogène et biométhane obtenus à partir de substrats (margines et grignons), en conditions similaires à celles de la présente étude. Tableau adapté par GHIMIRE *et al.* (2016) et modifié.

Substrats	Système de culture et conditions	BHP NmL/gMSV	BMP NmL/g MSV	Références
Grignon+ Margines	Digestion mésophile en batch ; bouteilles de 250-500 mL ; Grignon/margines (1:2) -Pas de prétraitement	–	2,00 ^b	RUGGERI <i>et al.</i> (2015)
	-Diluées à l'eau	–	104 ^b	
	- Prétraitement au CaCO ₃	–	193 ^b	
Margines	Batch 900cm ³ volume, 35°C margines (40%) + déchet de porc (60%)		480	KOUGIAS <i>et al.</i> (2010)
Margines	Batch, agitation magnétique, 35°C , margines (40%) + fumier de porc (60%)	–	370	KOUGIAS <i>et al.</i> (2014)
Ensilage de maïs + Grignon	Réacteur semi-continues ; conditions thermophiles : fumier de porc (inoculum)	0,10-13,00	–	SCHIEVANO <i>et al.</i> (2014)
Ensilage de maïs		12,5- 120,9	–	
Grignon	Batch, boues anaérobies + BES, 35°C; sans contrôle de pH (7, 3).	54,90 ^b	–	GHIMIRE <i>et al.</i> (2015b)
Margines	Boues anaérobies+ BES 35 ± 1 C°; sans contrôle de pH(6,9).	46,00 ^b	–	
Margines	Boues activées (traitées thermiquement), pH contrôlé (4-5); système continu.	192,2	–	NTAIKOU <i>et al.</i> (2009)
Margines	Boues activées, culture en Batch 55 °C ; pH (6,0).	033,1	–	GHIMIRE <i>et al.</i> (2016)
Grignon + déchets alimentaires	Flacons (0,3 L); pH 7 ;	087,00	–	PAGLIACCIA <i>et al.</i> (2016)

À partir des résultats auxquels est parvenue la présente partie d'étude, il peut être également conclu que l'avantage principal d'exploiter des digesteurs traités au BES réside dans la production intéressante et directe de Bio-H₂ et d'AGVs et plus particulièrement à de faibles charges en matières organiques qui seraient mieux convenables pour la méthanogénèse.

La bioconversion de concentrations élevées exigerait un consortium plus adapté aux CP utile pour l'obtention de meilleurs rendements en biomolécules. À de faibles concentrations, le métabolisme microbien est également dirigé vers la production de Bio-H₂ et d'AGVs, néanmoins, avec de faibles rendements. Au cours de la présente étude, la biométhanisation des SPO, n'est mise en évidence qu'avec des consortia sans prétraitement au BES et plus particulièrement avec des consortia méthanogéniques spécialisés et performants tels que LBM et LBMA (tableau XVII). De plus, dans les digesteurs anaérobies, les méthanogènes et les homoacétogènes sont les consommateurs principaux de Bio-H₂, les méthanogènes ont généralement tendance à dominer (YE *et al.*, 2014) mais seulement en conditions qui leurs sont favorables.

Dans les biodigesteurs traités au BES (PBR, AC, LCM), la consommation du Bio-H₂ aux concentrations faibles et élevées par les méthanogènes hydrogéntrophiques a été parfaitement inhibée. Puisque l'inhibition du BES sur les archaea méthanogènes a été bien exercée, aucune production de Bio-CH₄ n'a été notée et donc l'objectif assigné à cette étude est bien atteint. L'accumulation élevée de l'acétate à la fin de la fermentation à l'intérieur des biodigesteurs traités au BES aussi bien que pour les biodigesteurs non traités au BES (les tableaux XIV, XV et XVI), est probablement liées à la consommation du Bio-H₂ par les bactéries homoacétogéniques qui produisent de l'acétate à partir du CO₂ et du dihydrogène H₂. Cette réaction serait aussi probablement favorable sous la haute pression partielle à l'intérieur des réacteurs en raison de l'absence d'une évacuation continue de biogaz, mais est considérée comme thermodynamiquement défavorable sous une faible pression partielle (YE *et al.*, 2014).

L'amélioration de l'acétogénèse pourrait se produire quand la méthanogénèse est inhibée par le BES. De plus, les bactéries méthanogènes limitent l'acétogénèse réductrice en abaissant la pression partielle de l'H₂ au-dessous du niveau nécessaire pour l'absorption de l'H₂. Les bactéries homoacétogéniques sont des anaérobies très versatiles et peuvent non seulement bioconvertir l'H₂ et le CO₂ en acétate, mais aussi bioconvertir d'autres hexoses et divers substrats en acétate en tant que produit final et majeur (HAWKES *et al.*, 2007). En raison de l'augmentation de la concentration en AGVs pendant la digestion, le pH diminue à la fin des cultures et les AGVs prédominants sont l'acétate et le butyrate.

Les résultats révèlent aussi qu'avec une charge élevée en SPO, les archaea méthanogéniques semblent être sensibles à la concentration élevée en AGVs et de CP puisque

dans tous les biodigesteurs aucune biométhanisation subséquente à l'acidogénèse n'est observée. Selon les résultats répertoriés à partir de l'ensemble des cultures, le Bio-H₂ et/ou les AGVs peuvent être une cible intéressante pour la biovalorisation des SPO concentrés et suivant d'autres optimisations possibles.

2.2.1.7. Comportement des biodigesteurs sous l'effet de la pression du biogaz

Le biogaz et les AGVs ont été analysés au cours des digestions anaérobies en batch, conduites ou pas avec l'inhibiteur de méthanogènes, avec une collecte quotidienne des échantillons de biogaz produits dans les digesteurs, (figure 40 et tableau XVIII).

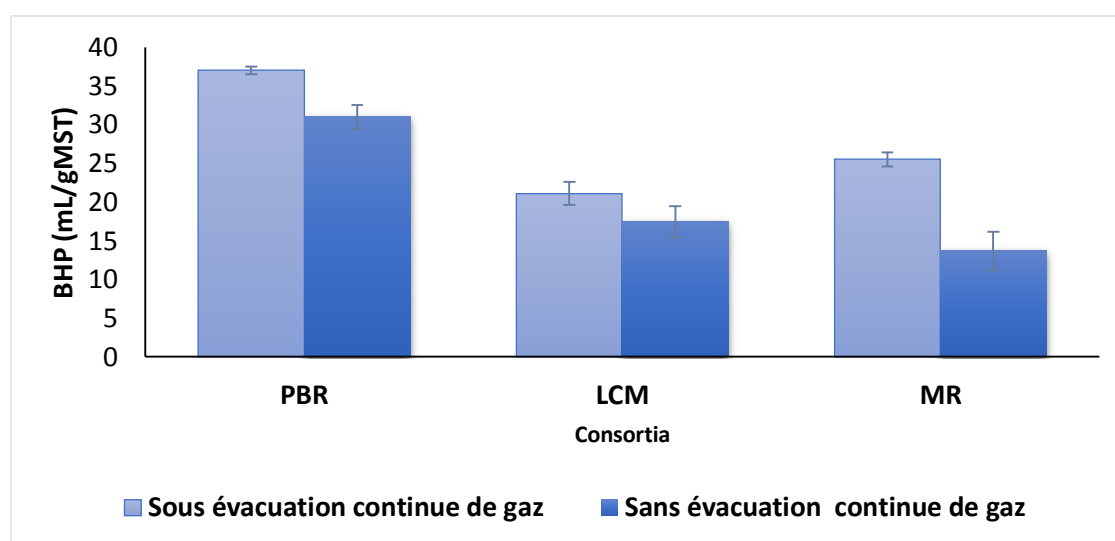


Figure 40. Résultats des BHP obtenus en fin de fermentation avec ou sans évacuation continue du biogaz.

Le procédé de bioconversion en utilisant les consortia précédemment acclimatés : PBR, MR, et LCM, a été expérimenté sur des mixtures de margines et de grignons broyés (DCO : 38g/L). L'analyse des résultats aussi bien pour ceux des cultures menées à l'intérieur des bouteilles que ceux dans le bioréacteur, montre une accumulation d'AGVs tels que le butyrate et l'acétate, notée en fin de la fermentation. Cependant, l'accumulation importante de l'acétate dans les deux cas pourrait être une indication de la voie homoacétogène, qui est une voie consommatrice de Bio-H₂ réduisant sa production comme déjà expliqué dans la série précédente.

L'acidité siégeant dans les réacteurs (4,7 et 5,8) est une bonne indication sur la difficulté dans la biométhanisation avec les consortia non traités au BES. Une baisse de pH est attribuée à l'augmentation et l'accumulation d'AGVs, lors de la première étape de la fermentation, plus particulièrement lorsque les bactéries productrices de Bio-H₂ procèdent une activité métabolique plus rapide que les bactéries méthanogènes. En accord avec ces résultats, SILVA

et *al.* (2013) ont également constaté que des pH acides sont en faveur de la production d'acides gras à longues-chaînes tels que les acides butyriques et valériques.

Tableau XVIII. Biomolécules produites, en phase liquide en fin de fermentation avec ou sans évacuation continue du biogaz.

Biomolécules dans la phase liquide	Condition	Consortia microbiens		
		PBR	MR	LCM
Acétate	(a)	2,96	2,56	1,70
	(b)	2,89	2,13	1,56
Propionate	(a)	0,32	0,25	0,49
	(b)	0,67	0,11	0,66
Ethanol	(a)	-	0,13	0,33
	(b)	-	0,86	0,30
Butyrate	(a)	2,85	2,49	1,90
	(b)	1,88	2,10	2,13
Lactate	(a)	0,18	0,11	0,12
	(b)	0,30	0,74	1,28
pH final		4,84	5,31	5,88

a) Évacuation continue du biogaz
b) Évacuation non continue du biogaz

En raison de la présence de quantités non négligeables de lactate de l'ordre de 0,74 et 1,28g/L respectivement pour MR et LCM et d'éthanol à 0,86 g/l pour MR, les fermentations sont vouées à l'échec et les BHP se trouvent inférieurs par rapport à PBR. Comme précédemment rapporté par MANDAL *et al.* (2006) et BASTIDAS-OYANEDEL *et al.* (2012), la pression partielle en Bio-H₂, à l'intérieur des enceintes de cultures anaérobies ou réacteurs, peuvent influencer la production de Bio-H₂ par fermentation sombre. Il est bien connu, que les enzymes hydrogénases peuvent réduire les protons en Bio-H₂, neutralisant les électrons issus de l'oxydation des composés organiques (GHIMIRE *et al.*, 2015a).

Les voies biochimiques de production de Bio-H₂ sont fortement sensibles à la pression partielle en H₂ qui demeure comme un facteur limitant principal, particulièrement dans les bioprocédés de la fermentation anaérobie sombre. En fait, sous une forte pression partielle en H₂ l'activité hydrogénase (transfert d'un électron à partir d'un porteur intracellulaire d'électron à un proton H⁺) est susceptible de diminuer en raison d'une rétro-inhibition (CHANDRASEKHAR *et al.*, 2015). L'acétate et le butyrate sont produits parallèlement au Bio-H₂ et leur consommation peut être inhibée par la pression partielle élevée. L'accumulation des produits finaux pourrait donc inhiber leur propre production. L'augmentation de la pression

partielle en Bio-H₂ redirige l'activité métabolique des bactéries vers la biosynthèse de produits plus réduits, notamment le lactate, aboutissant de ce fait à un abaissement dans la production globale en Bio-H₂.

Les profils en AGVs, dressés dans le tableau XVIII, obtenus avec ou sans évacuation continue de biogaz sont relativement différents. L'inhibition de la méthanogenèse, dans le cas des consortia non traités par le BES, par pression partielle d'H₂ est bien documentée, car l'acétogenèse est thermodynamiquement défavorable quand la pression partielle en H₂ est élevée. Cette dernière mènerait non seulement à l'accumulation des AGVs, mais également aux changements dans leur distribution. Ensuite, le pH acide résultant de l'accumulation de ces AGVs pourrait avoir un impact considérable sur les méthanogènes.

Une pression partielle relativement basse dans l'espace libre des bioréacteurs faciliterait non seulement le transfert de masse du Bio-H₂ de la phase liquide vers la phase gazeuse (MANDAL *et al.*, 2006 ; BASTIDAS-OYANEDEL *et al.*, 2012 ; GHIMIRE *et al.*, 2015a) mais permet également une bonne solubilisation du CO₂ qui pourrait participer à l'acétogenèse consommatrice de Bio-H₂ produit. D'autre part, la concentration en Bio-H₂ dissoute dans la phase liquide, occupant une partie dans la pression partielle en Bio-H₂, est l'un des principaux facteurs affectant les voies métaboliques microbiennes durant la production fermentative anaérobie du Bio-H₂ (SHOW *et al.*, 2011).

Une amélioration significative ($P < 0.05$) du BHP est enregistrée sous l'évacuation continue du biogaz comparé aux cultures conduites sous pression de biogaz. En effet, la production de Bio-H₂ est moins favorable lorsque la pression d'hydrogène se trouve élevée d'autant plus avec de faibles espaces libres dans les réacteurs (1/3 approximativement). Afin de maintenir stable une production de Bio-H₂, l'évacuation continue de ce dernier (sous un bon contrôle de pression) constitue un paramètre important (SHOW *et al.*, 2011). Plusieurs études ont confirmé qu'une réduction de la pression partielle de Bio-H₂ pouvait induire une amélioration considérable de la production de Bio-H₂ (SHOW *et al.*, 2011).

PBR et LCM ont présenté une faible inhibition concernant la production de Bio-H₂ (variant de $37 \pm 0,5$ à $31,12 \pm 1,5$ mL/gMST et de $21,1 \pm 1,5$ à $17,43 \pm 2$ mL/gMST, respectivement) sous l'effet de la pression partielle en Bio-H₂ comparée à MR (de $25,5 \pm 0,88$ à $13,26 \pm 2,5$ mL/gMST). Ce comportement pourrait être avantageux, car il faciliterait le bioprocédé à grande échelle (SYDNEY *et al.*, 2014).

Au cours de la fermentation anaérobie, il est bien établi que l'enzyme hydrogénase est impliquée dans l'oxydation et la réduction réversible de la ferrédoxine. En présence d'une pression élevée dans le système biodigester, on assiste à une augmentation de la concentration

en Bio-H₂ dans la phase liquide. Dans ce cas précis, l'oxydation de la ferrédoxine devient moins favorable et sa réduction prend alors place (CHONG *et al.*, 2009), abaissant de ce fait, la production du Bio-H₂. Les méthanogènes peuvent consommer le Bio-H₂ et le CO₂ et les convertir en Bio-CH₄. En revanche, aucune production de Bio-CH₄ n'a été observée pour MR sans évacuation continue du biogaz.

➤ Expériences conduites en bioréacteur de 7 litres

La figure 41 montre les résultats expérimentaux lors d'un essai en bioréacteur de 7 litres à $45 \pm 0,88 \text{g DCO/L}$, contenant des margines et des grignons et employant le consortium PBR. Des AGVs et du Bio-H₂ ont été enregistrés avec des teneurs qui ne s'éloignent pas de celles obtenues en tubes ou en flacons. Le BHP était de l'ordre de 28mL/gMSV, quant aux valeurs enregistrées pour l'acétate et le butyrate, elles sont respectivement de l'ordre de 54 et 31,8 mg/gMSV. Le pH diminue de 6,7 pour atteindre 4,7 à 65h, c'est le résultat de l'acidogénèse. Après ajustement du pH, le biohydrogène augmente pour atteindre 35%, toutefois, la production volumique est n'est pas aussi élevée. Cette observation pourrait être associée aux inhibitions exercées par les acides organiques.

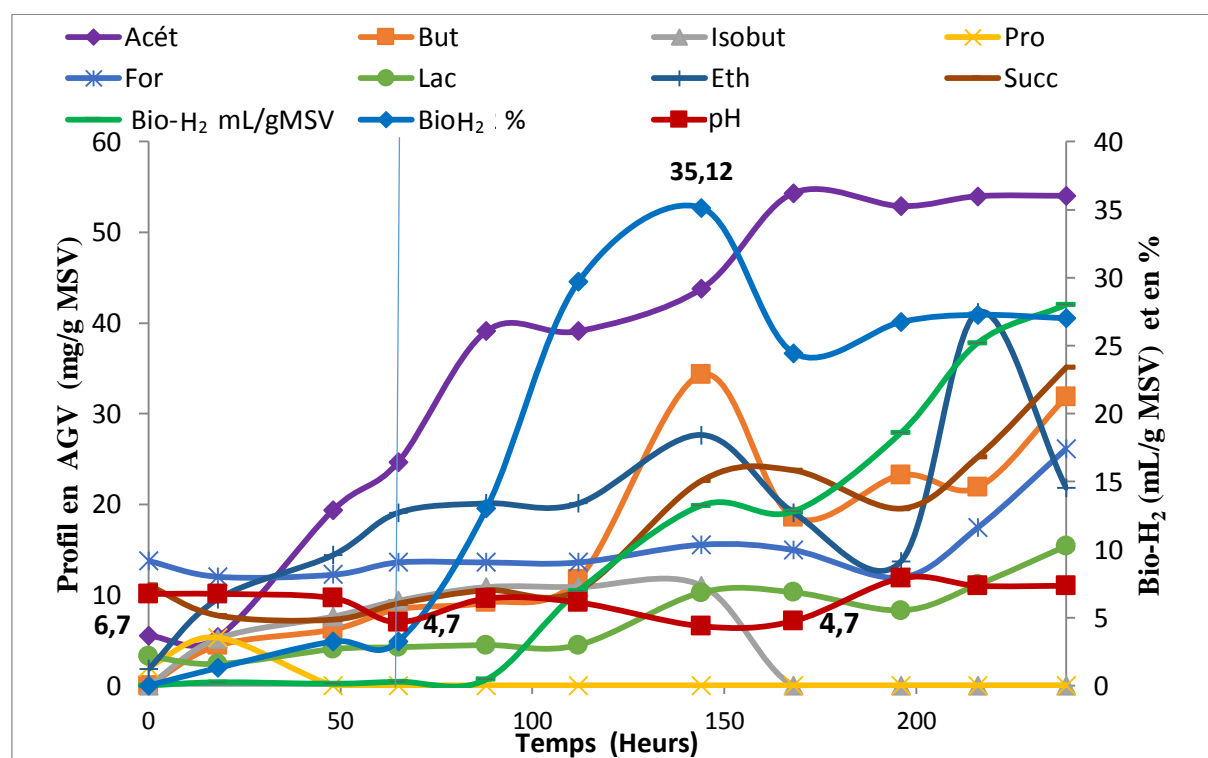


Figure 41. Cinétique de production de biomolécules en Bioréacteur.

Face à un stress ou à de nouvelles conditions, les interactions métaboliques mises en place pour l'adaptation d'une communauté, font souvent que le phénotype de cette communauté ne correspond pas au génotype des éléments qui la constituent.

Enfin, la production du Bio-H₂ par fermentation anaérobie sombre à partir des SPO est un biosystème complexe et sensible à un certain nombre de paramètres tels que la concentration en substrat, le type d'inoculum, le prétraitement du substrat, la méthode d'enrichissement en inoculum et le système de bioconversion mis en œuvre. Des optimisations de paramètres peuvent être envisagées en vue de déterminer si les rendements en biogaz et d'AGVs peuvent être améliorés pour l'ensemble des biodigesteurs testés.

2.2.1.8. Discussion à propos de la diversité dans les acides gras volatils et autres biomolécules d'intérêt

Du fait que divers consortia étaient exploités comme biocatalyseurs pour la bioconversion des SPO en biomolécules d'intérêt, une diversité dans les produits générés est observée. D'un point de vue global autour des résultats, il en ressort que l'exploitation de ces consortia comme biocatalyseurs pour la production d'AGVs, de Bio-H₂ ou de Bio-CH₄ à partir de SPO présente une des options intéressantes pour leur valorisation. Plusieurs études ont été menées sur l'utilisation des SPO comme biomasse de base pour la production d'AGVs via des bioprocédés de fermentation acidogènes mais dans différentes conditions opératoires par rapport à la présente étude (GONÇALVES *et al.*, 2014b ; MARTINEZ *et al.*, 2015 ; GAMEIRO *et al.*, 2015 ; SCOMA *et al.*, 2016). Par conséquent, comme pour le biogaz, il s'est avéré difficile de faire une comparaison directe entre nos résultats et ceux rapportés par d'autres chercheurs.

Le profil des produits de fermentation est étroitement relié à la production de Bio-H₂, puisque les AGVs les plus prononcés étaient l'acétate et le butyrate, cependant avec différents rapports selon le type de digesteur. Précisons qu'il s'est avéré que les méthanogènes peuvent non seulement être inhibés sous l'effet du BES mais également sous l'effet de la charge organique élevée, des CP, de l'acide oléique et du pH acide. Ce qui suggère ainsi que l'homoacétogénèse pourrait être probablement la voie principale consommatrice de Bio-H₂ aussi bien que lorsque les méthanogènes ne sont pas inhibés par le BES ou bien inhibés par la charge organique.

Les concentrations élevées en acétate ne seraient pas directement liées à une production élevée en Bio-H₂ si l'homoacétogénèse n'est pas complètement inhibée lors des essais en batch (GUO *et al.*, 2014). Ceci suggère d'une part, que les bactéries homoacétogéniques soient moins sensibles aux inhibiteurs toxiques (phénoliques et/ou BES) comparées aux méthanogènes. D'autre part, l'homoacétogénèse pourrait être stimulée en conséquence de l'inhibition exercée sur les méthanogènes (XU *et al.*, 2010).

Comme rapporté par CORNELI *et al.* (2016), les concentrations élevées en acétate enregistrées à la fin des digestions anaérobies (tableaux XIV, XV, XVI et figure 41), aussi bien que lorsque le substrat avait donné un faible rendement en Bio-H₂, pourraient également être associées à une activité homoacétogéniques importante lorsque les méthanogènes ont été inhibés (LUO *et al.*, 2011 ; GONÇALVES *et al.*, 2014b).

Les données rassemblées dans le tableau XVI, démontrent que les meilleures valeurs ont été détectées avec PBR et sont respectivement de l'ordre de 2,7 ; 2,09 et 1,04 g/L pour l'acétate, le butyrate et le propionate. Du fait que les fermentations étaient conduites sans aucun contrôle de pH, celui-ci dépendait systématiquement des conditions métaboliques siégeant naturellement dans les biodigesteurs, les AGVs s'accumulent et ainsi le pH diminue parallèlement. Les résultats auxquels on est parvenu coïncident avec ceux précédemment rapportés sur des margines portugaises dans les travaux de GONÇALVES *et al.* (2014b) réalisés en batch malgré les différentes conditions opératoires.

De l'éthanol, du valérate, de l'isovalérate, de l'isobutyrate et du formiate ont été également détectés à l'intérieur des digesteurs. Le valérate et l'isobutyrate ont été détectés avec de faibles quantités. La production d'éthanol est probablement issue d'un shunt métabolique provoqué par la pression partielle en Bio-H₂ par suite à l'absence d'une évacuation continue de biogaz. Comme déjà expliqué par GUNAY et KARADAG (2015), un bioprocédé anaérobie en une seule étape peut être facilement déstabilisé par l'accumulation d'AGV, principalement en absence de produits chimiques tampons. En effet, le pH est un paramètre clé influant sur la production d'AGVs au cours de la fermentation anaérobie (RODRIGUEZ *et al.*, 2006 ; INFANTES *et al.*, 2011). La production d'acide acétique est notamment favorisée lorsque le pH est égal à 4 tandis que la production d'acide butyrique est plus importante à pH 5 (INFANTES *et al.*, 2011). D'autres paramètres peuvent être utilisés afin d'augmenter les teneurs finales en AGVs. Cependant une concentration trop élevée d'AGVs dans le milieu de culture anaérobie impacte négativement la production d'hydrogène (BÉLIGON, 2016)

Le lactate est aussi produit en quantité significative et plus particulièrement dans le digesteur MR et LCM, ce qui suggère que le métabolisme de l'acétyle Co-A, et par conséquent du Bio-H₂ et des AGVs, serait bien inhibé. La production du lactate pendant la fermentation lors d'un procédé visant la production de Bio-H₂ avait été déjà signalée par KAPDAN et KARGI (2006) sur les SPO, mais aussi par SYDNEY *et al.* (2014) sur des vinasses. En effet, des espèces différentes de lactobacilles tel que *L. paracasei*, *L. fermentoshensis* et *Enterococcus durans* peuvent être présentes dans des consortia microbiens et sécréter des bactériocines, des peptides antimicrobiens menant à l'inhibition de la production de Bio-H₂. De surcroît, comme

souligné aussi par KHANAL *et al.* (2003), les voies métaboliques menant seulement à la production de l'éthanol et la production d'acide lactique par *Clostridium barkeri* ne produisent pas de Bio-H₂.

À travers l'ensemble des expérimentations (le tableau XIV, XV et XVI), la variation du rendement en Bio-H₂ et/ou des valeurs et la distribution des AGVs a bien été constatée entre les différentes générations, un tel comportement pourrait être dû à des variations au sein des communautés microbiennes dominantes et opérationnelles.

Comme rapporté par GHIMIRE *et al.* (2015a), le rendement en Bio-H₂ pourrait être amélioré en présence de certaines espèces comme *E. coli* et ce, en réorientant les voies métaboliques vers les voies d'acétate et de butyrate générant ainsi du Bio-H₂. Par ailleurs, d'autres communautés microbiennes telles que *Bacillus spp.* et *Lactobacillus spp.* peuvent rediriger les voies génératrices de Bio-H₂ vers l'accumulation du lactate menant à cet effet à la diminution du rendement en Bio-H₂.

Il est bien évident, que sans contrôle de pH, la logique est que ce dernier diminue pendant le bioprocédé fermentatif, atteignant des valeurs au-dessous de 6 à la fin de l'expérimentation, en conséquence de la dissociation des molécules d'AGVs et d'autres intermédiaires libérant des protons. Les valeurs de pH atteintes dans les biodigesteurs déterminent alors la composition du mélange en AGVs jouant un rôle important dans l'inhibition des activités métaboliques issues des biocatalyseurs (DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2008).

Dans des conditions non favorables au bon déroulement du bioprocédé fermentaire, la production de biomolécules organiques relativement réduites tels que l'éthanol, le lactate et le propionate permettant leur accumulation, peut engendrer une inhibition de la production de Bio-H₂, par conséquent leur production devrait être évitée. RUBIO *et al.* (2019) ont signalé une diminution de la production de Bio-CH₄ sur un mélange de grignon humide et de fumier (85/15) en raison de la concentration élevée en acide propionique, qui est un inhibiteur de la méthanogenèse.

Un autre métabolite détecté est le succinate, comme décrit par THAKKER *et al.* (2012), c'est un produit précurseur biochimique intéressant pour différents produits chimiques industriels. Plusieurs compagnies ont apporté sur le marché le succinate produits par bioprocédé fermentatif (HARMSSEN *et al.*, 2014). Les mixtures produites constituées de formiate, du succinate et de l'éthanol pourraient être liées à la présence d'*Escherichia coli* qui représente un outil microbien commercialement convenable pour la génération du succinate (ALONSO *et al.*, 2014).

À travers cette série d'expériences, il peut être conclu qu'au lieu d'extraire les CP inhibiteurs toxiques par prétraitement, un procédé d'acclimatation donnera une bonne tolérance des consortia envers la concentration en substrats menant ainsi à une amélioration de la production des biomolécules cibles. Par suite à la récupération énergétique et/ou d'AGVs des SPO par bioconversion, la fraction restante non toxique aux bactéries méthanogènes peut servir pour une application agricole ultérieure ou subir un traitement de biodégradation aérobie avant qu'elle soit déchargée dans les réseaux d'égouts ou des rivières.

Le résidu de fermentation riches en AGVs représente aussi une source convenable comme précurseurs de biopolymères (esters, cétones, aldéhydes, alcools et alcanes) et la production de biofuels (NTAIKOU et al., 2009 ; MARTINEZ et al., 2015 ; GAMEIRO et al., 2015 ; SCOMA et al., 2016). Comme déjà exploré par NTAIKOU et al. (2009) et MARTINEZ et al. (2015), les margines acidifiées riches en AGVs pourraient être converties en polyhydroxy-alcanoates ou polyhydroxy-butyrates par culture pure de *Pseudomonas putida* et *Cupriavidus necator* respectivement comme biocatalyseurs. Une autre approche intéressante consiste aussi en une biovalorisation des AGVs par leurs biotransformations en lipides microbiens grâce à des levures oléagineuses telle que *Yarrowia lipolytica* comme décrit dans les travaux de FONTANILLE et al. (2012).

Les résultats auxquels on est parvenu, prouvent la faisabilité de production de Bio-H₂ et d'AGVs à partir des SPO via la voie fermentaire anaérobie sombre par les consortia. Il a été observé que dans les margines brutes, une forte inhibition est exercée sur les communautés microbiennes et est attribuée aux CP qui sont connus pour être inhibiteurs pour plusieurs types de micro-organismes. Cependant, la dilution et l'acclimatation ont permis de surmonter cet effet inhibiteur, ayant pour résultat une nette amélioration en production de biogaz. Cet effet positif de l'adaptation, s'explique par le fait que l'équipement enzymatique des cellules adaptées soit déjà stimulé et prêt à dégrader à nouveau le substrat.

Comme décrit ci-dessus, les résultats ont démontré que les AGVs, qui peuvent être convertis en d'autres composés de haute valeur, pourraient être les métabolites à viser pour ce bioprocédé sous des concentrations relativement élevées mais avec des valeurs limites.

2.2.1.9. Biodigestion anaérobie des margines après extraction des polyphénols

La présence de molécules toxiques dans les margines vis à vis des consortia microbiens fermentatifs apparaît comme obstacle crucial pour le bon déroulement de la digestion anaérobie des margines (ZEMA et al., 2018). À cet effet, la dilution des margines ou bien l'extraction de leurs polyphénols constitutifs pourrait offrir une double opportunité et ce, par la récupération

de biomolécules actives et par la réduction de la toxicité des polyphénols pour de meilleurs subséquentes digestions anaérobies ou de bioconversions en batch. La figure 42 illustre la stratégie d'une valorisation possible pour les margines et les grignons.

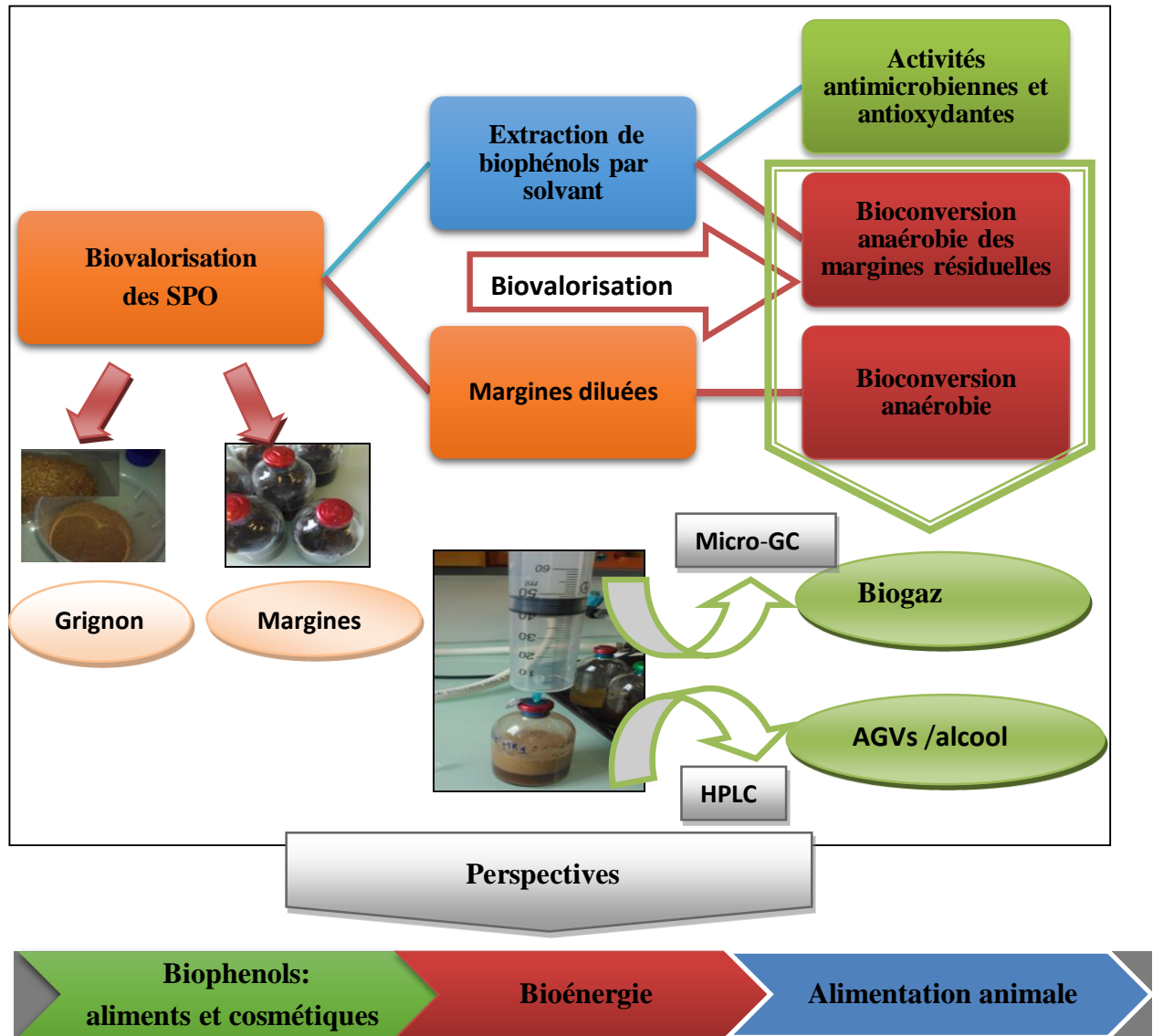


Figure 42. Diagramme regroupant la stratégie de couplage entre extraction de CP et la fermentation des margines résiduelles.

Les séries d'expériences entreprises *in vitro* révèlent une production de biogaz (figure 43, 44) et un potentiel de conversion intéressant des margines en AGVs qui serait étroitement lié à la forte charge en matière organique. Le consortium RM s'est avéré capable de fermenter les margines diluées (seules ou en mixture avec du grignon) aussi bien que les margines brutes exemptes de polyphénols après extraction de ces derniers. Les BHP obtenus sont de l'ordre de

23,46 et 28,23 mL/gMST respectivement pour les margines diluées et les margines diluées additionnées de pulpe de grignons. Concernant les cultures sur les margines après extraction des polyphénols les BPH sont moins importantes comparativement aux margines brutes et sont de l'ordre de 10,07 et 16,29 mL/gMST.

Comme il peut être constaté à travers le tableau XIX, le consortium RM génère divers AGVs et d'autres métabolites qui pourraient trouver des applications en industries alimentaires tels que des conservateurs (BAUMANN et WESTERMANN, 2016). De surcroît, les AGVs ont une large exploitation pour la production de matériaux chimiques et pharmaceutiques. Il est à noter que les margines brutes exercent une complète inhibition contre la croissance de la communauté microbienne du consortium RM, celle-ci serait probablement due à la forte charge en polyphénols. De plus, aucune trace de méthane n'a été décelée sur les margines diluées de 50%, un tel comportement pourrait résulter d'une éventuelle interruption dans la consommation des AGVs, préalablement produits, par les microorganismes méthanogènes. Lorsque le méthane est produit, il représente une considérable perte énergétique pour les ruminants et contribue ainsi dans l'émission de gaz à effet de serre qui aurait un potentiel de réchauffement planétaire.

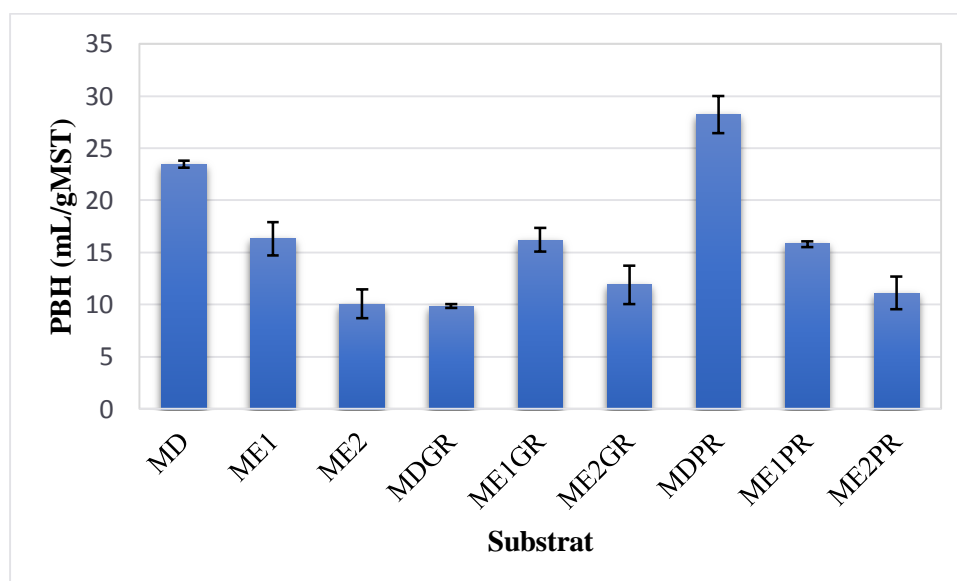


Figure 43. Rendement en Bio-H₂ produit par digestion anaérobie des margines diluées et des margines déphénolisées par le microbiote ruminal (RM). MD : margines diluées ; ME1 : margines après extraction des CP (acidification avec HCL) ; ME2 : margines après extraction des CP (acidification avec H₃PO₄) ; MDGR : margines diluées + grignon, ME1GR : ME1+ grignon ; ME2GR : ME2 + grignon ; MDPR margines diluées + pulpe résiduelle du grignon, ME1PR : ME1+ pulpe résiduelle du grignon ; ME2PR : ME2 + pulpe résiduelle du grignon ; Culture en batch, 37°C agitation 80rpm.

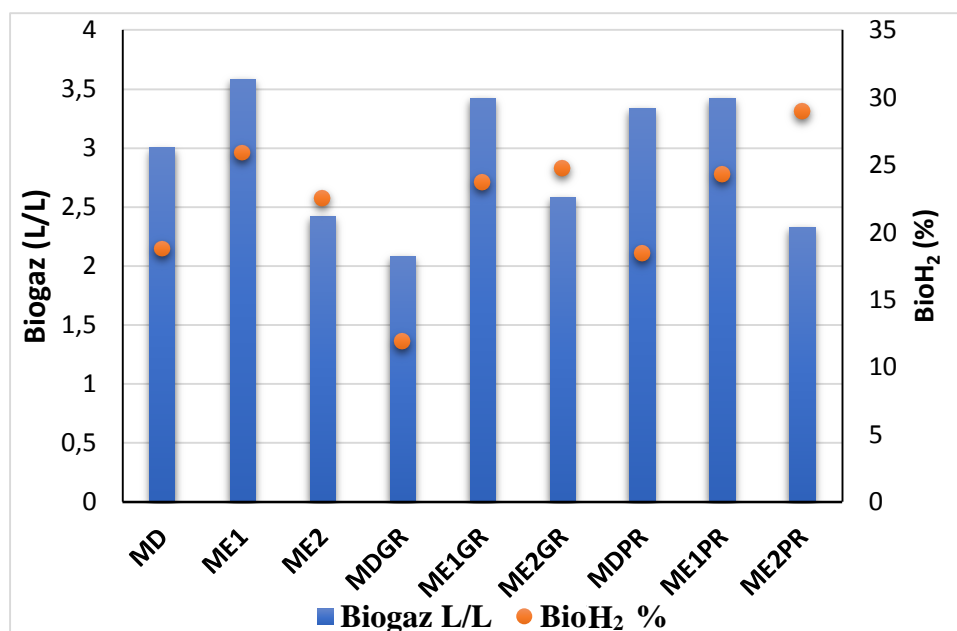


Figure 44. Pourcentage en Bio-H₂ et rendement en biogaz produit par digestion anaérobie des margines diluées et des margines déphénolisées par le microbiote ruminal RM.

Au vu des résultats auxquels est parvenue cette partie d'études, cela laisse suggérer qu'en plus de la biovalorisation énergétique, les margines diluées ou celles résiduelles après extraction des polyphénols pourraient être proposées comme additif alimentaire pour les animaux.

D'après la littérature scientifique, un grand intérêt est porté par les nutritionnistes et microbiologistes, spécialisés sur le rumen, en vue de l'exploitation d'extraits de plantes comme additifs alimentaires pour l'amélioration de la fermentation ruminale vers la production d'AGVs et l'inhibition de la méthanogenèse (PATRA *et al.*, 2011).

Les produits de la fermentation à l'exemple du butyrate sont bien dotés d'effets bénéfiques pour la santé animale. Le butyrate est une préférable source énergétique pour les colonocytes. Dans le lumen intestinal, le butyrate est produit via le métabolisme microbien de fibres carbohydrates générant ainsi une large variété d'effets bénéfiques pour la fonction intestinale (HAMER *et al.*, 2008). Il est à souligner que les stratégies d'association de substrat diététiques, comme les margines diluées, affectant la production et la consommation de Bio-H₂ et réduisant par conséquent l'émission du Bio-CH₄ est d'un grand intérêt comme rapporté par GUYADER (2015). Ainsi, le potentiel anti-méthanogène des margines est intéressant car la réduction de l'émission du Bio-CH₄ ruminal par les margines, pourrait améliorer leur propre potentiel digestif diminuant ainsi les impacts environnementaux négatifs. Toutefois, la présente investigation est une preuve de concept qui nécessite de futures études *in vivo*.

Tableau XIX. AGVs et autres métabolites détectés dans la phase liquide (g/L) après digestion anaérobie des margines diluées et des margines déphénolisées par le microbiote ruminal RM.

Condition de culture	Lactate	Formiate	Propionate	Ethanol	Isobutyrate	Butyrate	Isovalérate
MD/1	-	1,36±0,09	0,04±0	0,14±0,01	-	0,89±0,5	0.21±0.03
MD/2	-	1,49±0,56	0,1±0	0,73±0,06	0,32±0,07	1,76±0,12	-
ME1/1	-	0,7±05	-	1,36±02	-	1,94±0,14	-
ME1/2	0,07±0	0,88±0,2	-	2,13±0,11	0,41±0,02	1,95±0,22	-
ME2/1	-	-	-	1,99±0,22	-	1,51±0,12	-
ME2/2	0,85±0,2	0,98±0,2	1,78±0,14	-	-	1,82±022	-
MDGR/1	0,13±0,02	0,51±0,12	-	0,66±0,1	0,32±0,01	1,43±0,5	-
MDGR/2	0,44±0,1	0,74±0,11	-	0,52±0,12	0,29±0,02	1,23±0,09	-
ME1GR/1	-	-	-	1,37±0,23	0,2±0,02	1,99±0,21	-
ME1GR/2	0,04±0,85	0,94±0,12	-	2,11±0,11	0,38±0,04	1,6±0,14	-
ME2GR/1	-	-	-	2,18±0,1	-	1,57±0,2	-
ME2GR/2	0,12±0,05	0,65±0,12	-	2,77±0,40	-	0,91±0,1	-

MD ; margines diluées ; ME1 : margines après acidification à l'HCl et extraction des CP ME2 : margines après acidification à l'H₃PO₄ et extraction des CP ; MDGR : margines diluées + grignon ; ME1GR : margines après acidification à l'HCl et extraction des CP + grignon ; ME2GR : margines après acidification à l'H₃PO₄ et extraction des CP + grignons. Les chiffres 1 et 2 correspondent aux numéros de génération 1 et 2.

2.2.1.10. Mise en évidence et contrôle de la diversité des consortia microbiens

Afin d'étudier la complexité de la communauté microbienne dans les digesteurs (PBR, AC, MR) l'analyse par TTGE de produits de la PCR ont été étudiés sur trois générations acidogéniques (1, 2 et 3) qui composent le consortium. Les produits de la PCR de l'ADN extrait de digesteurs à chaque génération ont été soumis à une TTGE et seulement de légères variations sont détectées dans les communautés microbiennes.

Les profils ci-dessous (figure 45) mettent en évidence plusieurs bandes pour chaque consortium, ainsi que l'apparition ou la disparition de certaines autres bandes. Entre les cultures 1 et 3 les profils des consortia montrent des différences. Cependant, la bioconversion survenue au sein de ces générations est stable et ces bandes devaient correspondre aux micro-organismes responsables de cette bioconversion spécifique. Certaines bandes absentes dans une génération précédente, apparaissent dans la suivante. Les résultats montrent que la composition des communautés bactériennes peut être légèrement modifiée en fonction de la concentration en SPO. La structure globale de la communauté bactérienne semble présenter des bandes similaires entre les consortia PBR et AC. Ces variations au niveau des populations correspondent généralement à une simplification ou à un équilibrage de la structure génétique bactérienne puisque les profils présentent des communautés plus ou moins complexes en fonction du milieu et de la génération.

La grande diversité de micro-organismes dans les consortia peut conduire à des fonctions de synergie métaboliques augmentant le potentiel de bioconversion de molécules complexes (JOBARD et *al.*, 2014, 2015). Cette diversité de micro-organismes permet également aux souches sensibles de s'adapter au substrat inhibiteur et laisse proliférer les groupes résistants et les plus importants menant à une biodégradation de molécules récalcitrantes et inhibitrices.

En accord avec les résultats de PESSIOT et *al.* (2012), la présente étude met en relief la complexité microbienne de ces consortia et leur sensibilité vis-à-vis des modifications environnementales telles que la concentration en substrat. Au travers de trois générations de culture, la variation de la communauté bactérienne ne semble pas avoir d'effet significatif sur la production d'AGVs. En ce qui concerne le consortium PBR, PESSIOT et *al.* (2012) ont déjà caractérisé cette communauté microbienne. Ces consortia présentent une grande flexibilité et sont capables de s'adapter aux conditions de culture en modifiant les espèces dominantes. On tenterait de dire que même les espèces minoritaires peuvent également jouer un rôle très important dans le processus de bioconversion. En effet, RAFRAFI et *al.* (2013) ont rapporté que les espèces sub-dominantes, en dépit et malgré leur faible abondance, peuvent avoir un impact important sur la performance du bioprocédé de production de Bio-H₂. En effet, la

présence de certaines espèces comme *Escherichia coli*, pourrait contribuer à l'amélioration de la production de Bio-H₂ en réorientant les voies métaboliques vers les voies acétate et butyrate fournissant l'hydrogène.

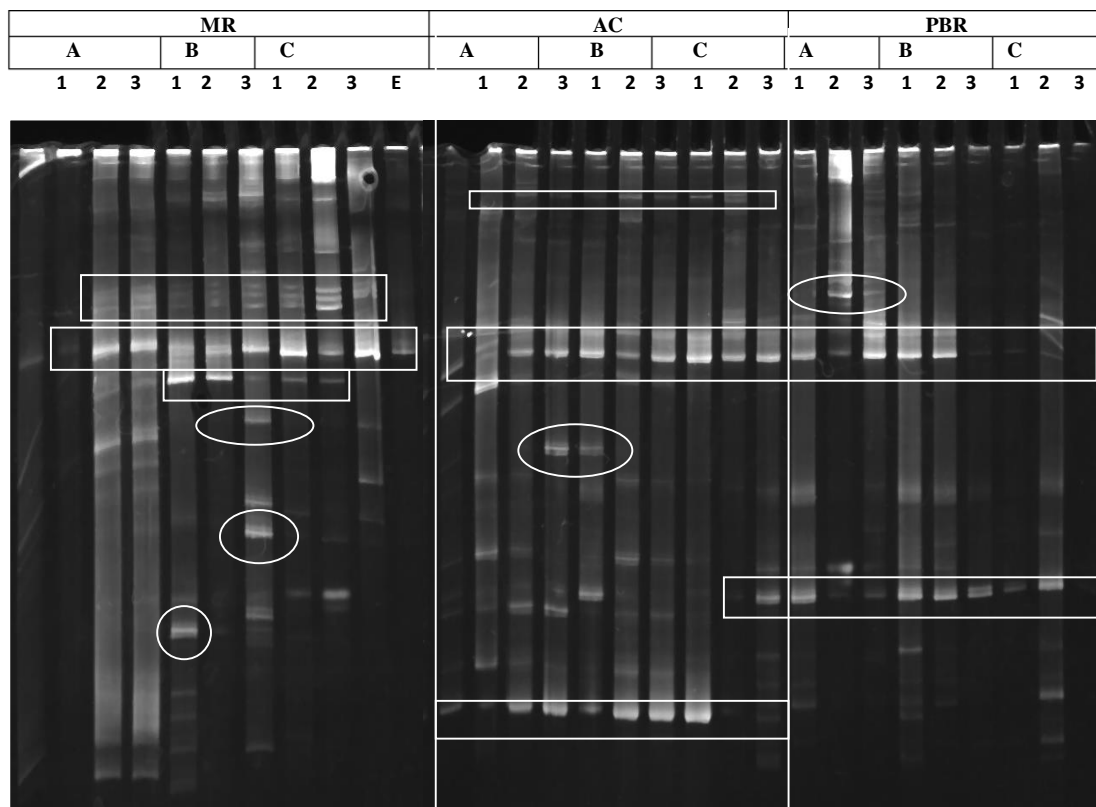


Figure 45. Profil sur gels TTGE obtenus pour les consortia (AC, PBR et MR) au cours des cultures conduites en tubes Hungate.

Chaque génération est inoculée avec 3% d'une culture précédente ; Incubation à 37°C, agitation 80rpm Cercles : apparition de bandes ; rectangle : variation de la densité des bandes et bandes conservées entre les générations. A) margines diluées ; B) grignons + margines diluées ; C) margines brutes.

2.3. Potentiel biochimique de la biométhanisation des sous-produits oléicoles

2.3.1. Culture en flacons

Le but principal de la présente partie de travail est focalisé sur l'analyse du potentiel biochimique en Bio-CH₄ (BMP) produit sur des concentrations variables en SPO. Sur le tableau XX figurent les valeurs moyennes de production cumulées en Bio-CH₄ dans tous les essais expérimentaux effectués avec le consortium LBM. À la différence des autres consortia (Bio-CH₄, 0%), le consortium développé à partir de la communauté acclimatée du biodigester LBM, paraît être le plus approprié à la biométhanisation des SPO.

Il apparaît également sur le tableau XX, que l'augmentation de la concentration est accompagnée par l'apparition de faibles productions en biogaz. Ce qui a pour effet de retarder

ou d'inhiber la méthanisation. Les BMP obtenus pour les margines avec 4,5 % et 6% de MSV sont de l'ordre de 136 et 68,43NmL/g, respectivement.

Concernant les grignons, les BMP s'élèvent de 112,2 et 165,05 à 202,04 NmLCH₄/g, respectivement pour le grignon et grignon broyé. Les faibles rendements sont probablement dus aux propriétés physico-chimiques de la structure chimique lignocellulosique complexe des grignons tels que les dimensions particulières.

De meilleurs résultats sont obtenus avec le digesteur contenant le résidu du grignon broyé, car le broyage aurait pour effet une destruction des structures chimiques complexes de la lignine et de la cellulose de la pulpe olive et des grignons. Par conséquent, le broyage conduit à une augmentation de la surface spécifique disponible à la dégradation microbienne, accessible aux enzymes. En effet, comme rapporté par LATRILLE et *al.* (2010), la production d'hydrogène à partir de résidus agricoles est limitée par l'activité hydrolytique des micro-organismes. Généralement, lors de la digestion anaérobie de résidus agricoles, pour libérer des composés monomériques plus simples, l'action des enzymes sur la structure microcristalline et hétérogène de composés lignocellulosiques est particulièrement longue à réaliser (LATRILLE et *al.*, 2010). Ces réactions dépendent étroitement du prétraitement appliqué à la biomasse ainsi que des microorganismes présents dans le milieu. Dans leurs travaux sur la codigestion des grignons avec du fumier de vache, AL AFIF et *al.* (2019) ont trouvé que le rendement en méthane augmentait avec l'augmentation de la teneur en grignon. L'adjonction d'enzymes avait pour effet une nette amélioration du rendement en méthane.

Aucune biométhanisation n'est observée à une charge organique > 9 %, ceci pourrait être dû à l'effet inhibiteur des CP et également de l'acide oléique comme signalé par AL-MALLAHI et *al.* (2015). Un inoculum élevé de 10% améliore la production pour les grignons à faible concentration. Par contre, pour les margines aucun effet n'est observé avec un inoculum plus élevé, car leur concentration est élevée.

Les rendements en Bio-CH₄ obtenus dans la présente étude sont dans la gamme de ceux rapportés par d'autres auteurs, lesquels ont étudié des substrats similaires ou différents (tableau XVII). RUGGERI et *al.* (2015) ont rapporté des BMP de l'ordre de 193NmL/gMSV, sur des mélanges de margines et de grignons dilués et prétraités chimiquement, proches de ceux obtenus dans la présente étude sans prétraitement. À la différence des résultats rapportés par CORNELI et *al.* (2016), où le BMP était de 20,7 NmL/g MSV pour un substrat similaire, le BMP enregistré pour les grignons à 4,5% de MSV est plus élevé. De surcroît, les BMP obtenus peuvent être améliorés davantage par optimisation.

Tableau XX. Biométhanisation des margines avec le consortium LBM (Valeurs moyennes).

	Condition de culture		Composition du biogaz (mL)					BHP	BMP	CH ₄ (%)
	LBM % v/v	MSV initiale % p/v	Biogaz total	H ₂	N ₂	CO ₂	CH ₄	mL/g	mL/g	Intervalle faible-élevé
-Grignon	5	4,6	271,91	0,01	2,82	146,57	122,51	0,004	120,22	0,8-61,4
-Grignon broyé	5	4,5	292,93	0,00	5,02	134,37	153,54	0,00	176,89	2,53-69,91
	10	4,5	348,97	0,00	2,43	158,44	188,11	0,00	216,47	5,23-65,3
	5	9	70,99	0,39	1,25	65,84	3,52	0,22	2,02	0,48-12,6
	10	9	60,08	0,01	1,88	54,68	3,5	0,01	2,02	4,94-10,67
Margines	5	4	365,74	0,56	0,5	210,13	154,54	0,19	146	0,5 -67,2
	5	6	303,82	3,81	2,23	199,24	98,54	1,02	73	1,2-63,8
	5	12	78,19	39,12	1,16	8,17	0,29	6,52	0,4	0-0,40

En effet et en accord aux présents résultats, ALAGOZ et *al.* (2015) ont aussi trouvé une valeur plus élevée de BMP avec les grignons broyés dans un réacteur mésophile en batch, égale à 180 NmL/g MSV. Cette valeur se rapproche de celle obtenue dans la présente étude, laquelle est de l'ordre de 202,04 NmL/g. D'après la littérature, SCHIEVANO et *al.* (2014) n'ont pas obtenu de Bio-CH₄ avec les grignons.

Comme il peut être constaté sur le tableau XX, la production de Bio-H₂ apparaît à une charge organique plus élevée. Notons que les bactéries acidogéniques emploient les composés facilement métabolisables tels que les sucres et les hydrates de carbone, tandis que les méthanogènes qui possèdent un métabolisme plus lent sont bloqués par la présence de composés aromatiques, de polyphénols, d'AGVs et de charge organique élevée en SPO. Ces derniers abaissent la productivité en biogaz (tableau XX).

En accord avec les résultats de GONGALVES et *al.* (2014b) avec une charge élevée en SPO, la méthanogénèse et l'homoacétogénèse sont systématiquement inhibées et seulement la génération du Bio-H₂ est possible. D'autres résultats encore plus élevés de l'ordre de 353 ± 31 et 460 ± 40 mL/g MSV ont été rapportés par PINTO et *al.* (2016) pour les grignons sous l'effet de l'addition du cobalt.

2.3.2. Culture en réacteur type AMPTS

D'après la figure 46, la composition moyenne du biogaz produit par le consortia LMBA présente un pourcentage de 2,7% en méthane, après le 5^{ème} jour de culture, qui tend à augmenter pour atteindre 17,3% vers le 15^{ème} jour de culture. De même pour l'azote, lequel évolue de 4% à 33,9%. Inversement, pour le CO₂, celui-ci tend à diminuer, ce qui reflète sa reconsommation par les méthanogènes pour produire du Bio-CH₄.

Des traces négligeables en hydrogène de l'ordre de 1 et 0,3% apparaissent lors de la première semaine de culture puis disparaissent totalement, la preuve qu'il est consommé immédiatement par la communauté microbienne. Il en est de même pour l'évolution des cinétiques de production volumiques (figure 47, 48).

Comme il est constaté sur le profil en AGVs de la culture (figure 48 et tableau XXI), en plus des concentrations non négligeables en butyrate, valérate et propionate, une quantité importante en acétate est enregistrée au 15^{ème} jour de culture (2,43 g/L).

Ce résultat justifie le blocage de la productivité volumique en biogaz et du potentiel de biométhanisation et par conséquent, l'arrêt de la culture (tableau XXI). Soulignons que la raison pour laquelle les fermentations voient leurs productions vouées à l'échec, est que les microorganismes sont en phase d'adaptation à leur nouvel écosystème riche en CP.

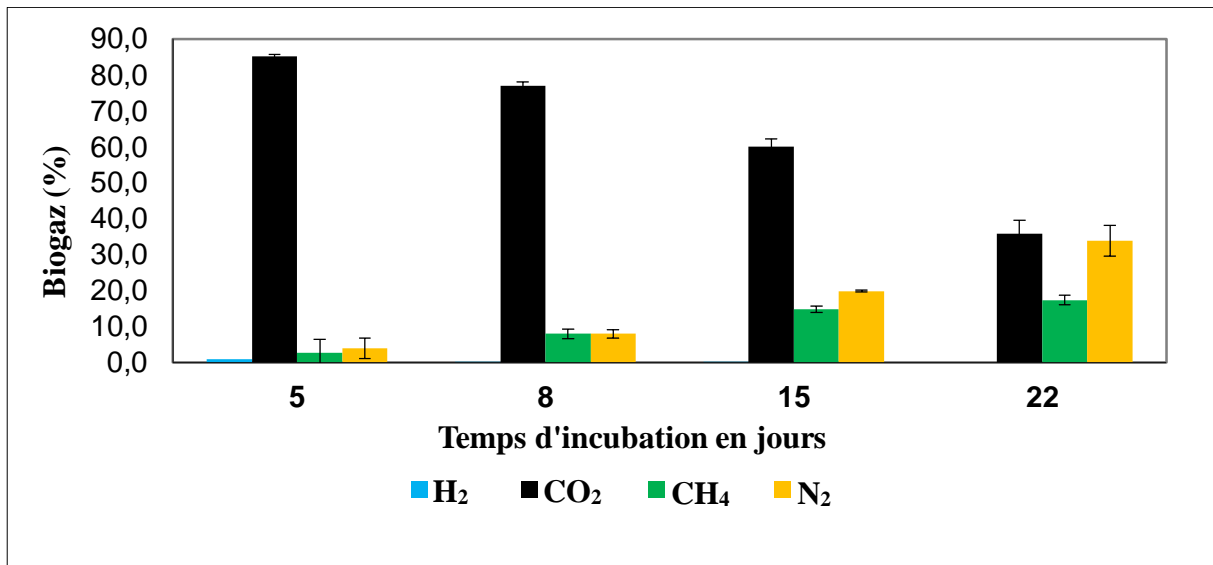


Figure 46. Composition du biogaz du test BMP sur AMPTS.
Inoculum LMBA (fumier) : 25mL ; pH : 6,5 ; MST : 25g/L.

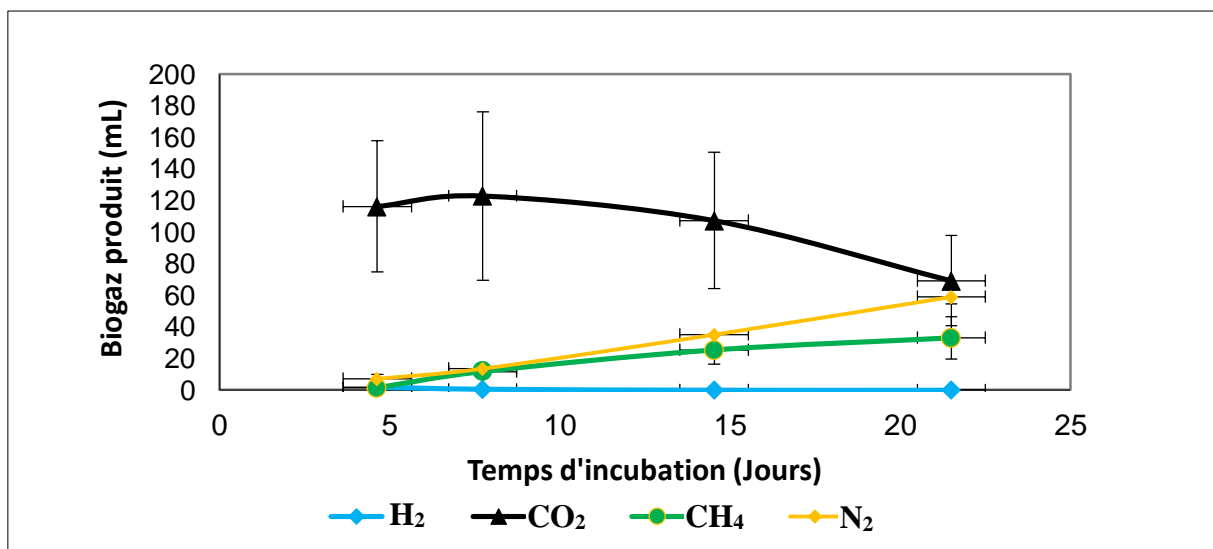


Figure 47. Cinétique de production du biogaz du test BMP sur AMPTS.
Inoculum LMBA (fumier) : 25mL ; pH : 6,5 ; MST : 25g/L.

Tableau XXI. Résultats de l'analyse HPLC de la phase liquide du test AMPTS après 15 jours de culture.

AGVs	Temps de rétention (min)	Quantité (g/L)
Acétate	16,675	2,430
Propionate	19,440	0,526
Isobutyrate	21,922	0,071
Butyrate	23,662	0,615
Isovalérate	27,335	0,451
Propanol	27,904	0,642
Valérate	32,809	0,300
Caproate	49,039	0,230

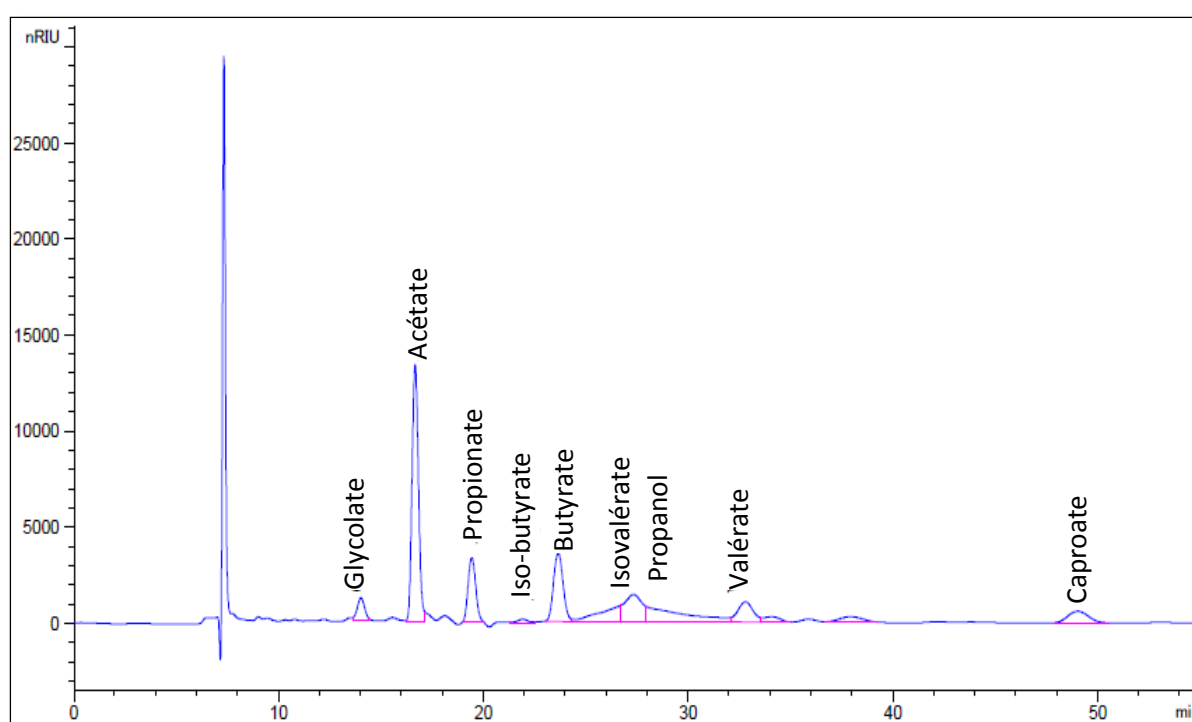


Figure 48. Exemple d'un graphe de l'analyse HPLC des AGVs produits dans la phase liquide. Fermentation en AMPTS avec le consortia LBMA.

La figure 49 montre l'allure des courbes pour les volumes cumulés en biogaz en fonction du temps. Les volumes cumulés en biogaz total et en Bio-CH₄ sont respectivement de l'ordre de 185 ± 55 et $33,12 \pm 9,1$ mL (tableau XXII).

Un BMP faible de l'ordre de $2,92 \pm 0,87$ g MSV/mL est enregistrée pour les margines diluées. En effet, les bactéries anaérobies acidogènes ont la possibilité de s'y développer suite à une surcharge organique et de produire rapidement des d'AGVs. En revanche, l'accumulation de ces derniers exerce une action inhibitrice sur les micro-organismes acétogènes et

méthanogènes, ce qui a conduit certainement à la baisse dans les activités métaboliques, menant ainsi à l'arrêt de la méthanisation (TRABLY *et al.*, 2013).

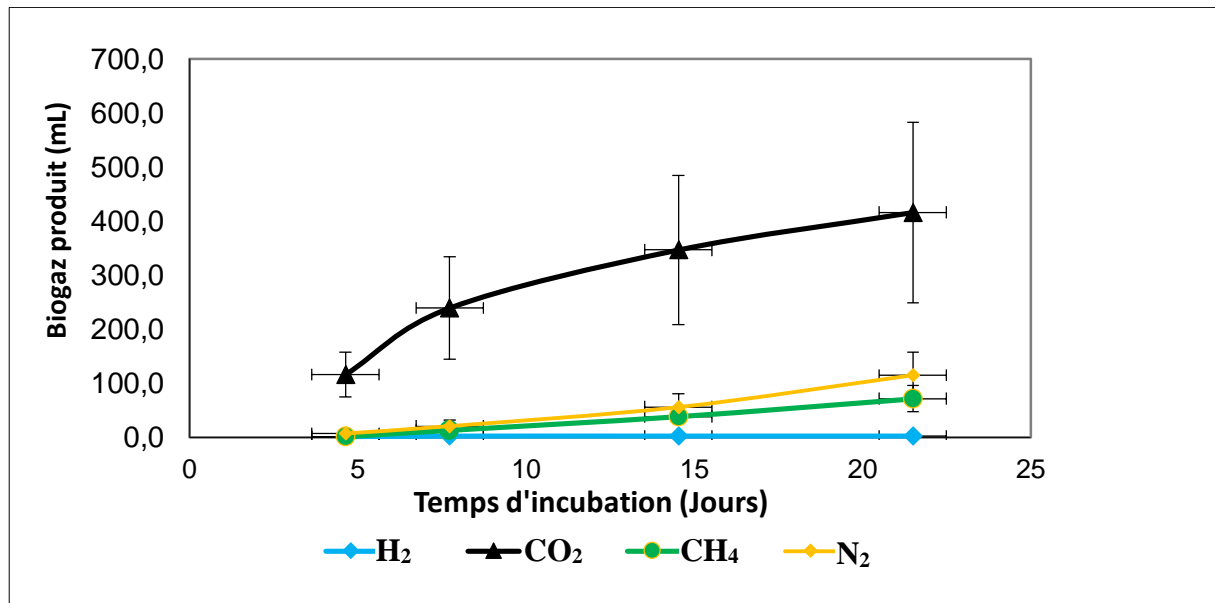


Figure 49. Biogaz cumulé du test BMP sur AMPTS.

Tableau XXII. Volume de biogaz cumulé en fin de la culture et le résultat en BMP.

Biogaz total	Biogaz volume (mL)				Production (mL/gMSV)
	CO ₂	H ₂	N ₂	CH ₄	BMP
185 ± 55	69,23±49	0	59,02±13	33,12±9,1	2,92 ±0,87

*Evaluation de la croissance de
levures oléagineuses et de
lactobacilles sur les margines*

2.4. Evaluation de la croissance de levures oléagineuses et de lactobacilles sur les margines

En plus de leur richesse en polyphénols, les margines sont composées d'une variété de sources de carbone assimilables, à cet effet, elles pourraient être considérées comme une source nutritionnelle valorisable pour la croissance de micro-organismes d'intérêt biotechnologique et à visées médicales. Cette partie expérimentale avait pour objectif de tester la croissance de deux levures oléagineuses, *Yarrowia lipolytica* et *Cryptococcus curvatus*.

2.4.1. Les levures

2.4.1.1. Cultures sur les margines brutes et diluées

Contrairement aux résultats de YOUSUF et *al.* (2010), les levures utilisées se sont avérées incapables de croître sur les margines brutes sans dilution et enrichissement avec d'autres sources de carbone (tableau XXIII, XXIV et XXV). Le nombre de cellules décline après le temps incubation, ce qui est probablement associé au faible taux d'oxygène disponible (asphyxie) et à l'inhibition exercées par la haute teneur en CP (3,8g/L).

Concernant les cultures sur margines diluées sans enrichissement, le nombre de cellules pour *Yarrowia lipolytica* et *Cryptococcus curvatus* augmente pour atteindre des valeurs de l'ordre de $5,6 \times 10^4$ UFC/mL et $5,3 \times 10^5$ UFC/mL, respectivement. Ce résultat mérite d'être optimisé et approfondie pour cibler d'autres métabolites présentant un intérêt biotechnologique, tels que les lipides. De surcroît, les levures oléagineuses, principalement *Yarrowia lipolytica* et *Cryptococcus curvatus*, peuvent avoir plusieurs applications dans l'industrie biotechnologique (FONTANILLE et *al.*, 2012 ; GONÇALVES et *al.*, 2014a ; BELIGON et *al.*, 2015 ; LEDESMA-AMARO et *al.*, 2016 ; BELIGON, 2016). D'après les travaux scientifiques préalablement établis sur les levures, environ 30 souches ont été identifiées comme oléagineuses (RATLEDGE et *al.*, 2002) et les souches signalées comme les plus productives sont : *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* et *Yarrowia lipolytica* (PAPANIKOLAOU et *al.*, 2002 ; BEOPOULOS et *al.*, 2009a ; BEOPOULOS et *al.*, 2009b ; BELIGON et *al.*, 2015 ; BELIGON, 2016).

2.4.1.2. Culture sur les margines enrichies

Comme affiché sur le tableau XXIII dans les expériences entreprises avec les margines brutes et enrichies, le milieu de culture entraîne une diminution du nombre de cellules après le temps d'incubation, de la sorte, seule la survie cellulaire peut être détectée.

Lorsque les margines sont diluées et enrichies en suppléments organiques peu coûteux, tels que le glycérol ou le glucose, la biomasse des levures estimée en nombre d'UFC voie une

legère augmentation. Comparativement à *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica* montre une croissance plus remarquable. La biomasse cellulaire de *Yarrowia lipolytica* et *Cryptococcus curvatus* produite sur les margines diluées et enrichies en glucose est de l'ordre de $1,1 \times 10^5$ UFC/mL et de $0,89 \times 10^5$ UFC/mL, respectivement. Les valeurs enregistrées sur les margines enrichies en glycérol sont de l'ordre de $5,3 \times 10^5$ UFC/mL et de $5,2 \times 10^5$ UFC/mL, respectivement pour les deux souches.

Par ailleurs, l'étude menée par DOUROU et al. (2016) sur des margines diluées enrichies en glycérol et fermentées par *Yarrowia lipolytica* a montré que cette souche consomme préférentiellement le glycérol pour la bioconversion des margines en mannitol et / ou en acide citrique. *Yarrowia lipolytica* est une levure aérobie non pathogène ayant l'aptitude de se développer dans des environnements hydrophobes, lui permettant ainsi de métaboliser les triglycérides et les acides gras en tant que sources de carbone conduisant à la production de la biomasse.

Tableau XXIII. Evaluation de la croissance des levures et des lactobacilles sur les margines M3(*) et M4.

Milieu Culture	Souche	UFC/mL	pH initial	pH Final
M-Glc	<i>Y. Lipolytica</i>	0	4,91	4,1
	<i>C. curvatus</i>	0		4,2
M-Gly	<i>Y. Lipolytica</i>	0	4,85	4,11
	<i>C. curvatus</i>	0		4,2
MD	<i>Y. Lipolytica</i>	$5,6 \times 10^4$	4,9	4,79
	<i>C. curvatus</i>	$5,3 \times 10^5$		4,77
MD-Glc	<i>Y. Lipolytica</i>	$1,1 \times 10^5$	4,77	4,01
	<i>C. curvatus</i>	$8,9 \times 10^4$		4,3
MD-Gly	<i>Y. Lipolytica</i>	$5,3 \times 10^5$	5,77	4,05
	<i>C. curvatus</i>	$5,2 \times 10^5$		4,09
M-MRS	<i>L. rhamnosus</i>	$6,5 \times 10^7$ $8,6 \times 10^{8*}$	5,22	4,02
	<i>L. casei</i>	$2,6 \times 10^6$ $6,7 \times 10^{6*}$	5,22	4
MD	<i>L. rhamnosus</i>	0	5,17	5,1
	<i>L. casei</i>	0	5,17	5,01

Cultures stationnaires ; 24h d'incubation à 28°C pour les levures, 30° et 37°C les lactobacilles. M : margines ; MD : Margines diluées avec l'eau distillée (50% V/V) ; Gly : Glycérol ; Glc : glucose ; *L. rhamnosus* : *Lactobacillus rhamnosus* ; *L. casei* : *Lactobacillus casei*. *Y. Lipolytica* : *Yarrowia lipolytica*, *C. curvatus* : *Cryptococcus curvatus* ; M 3 : système par centrifugation à trois phases ; M4 : système par presse.

La culture de *Yarrowia lipolytica* sur des margines brutes enrichies entraîne une réduction remarquable de la concentration en polyphénols. Cette dernière est de 75,22 % et 76,77 %, respectivement pour les milieux M-Glc et M-Gly. Il est important de signaler que le dénombrement sur les margines brutes c'est avéré difficile à réaliser et ce, en raison de la présence de particules de la pulpe des olives, ainsi les prélèvements sont probablement non représentatifs comparativement aux margines diluées.

Tableau XXIV. Biomasse produite (UFC/mL) par *Yarrowia lipolytica* sur les margines issues du système d'extraction par presse.

Milieu de culture	Biomasse Finale	Biomasse produite
M-Glc	$2,31 \times 10^4$ *	0
M-Gly	2×10^3 *	0
MD	$1,47 \times 10^5$	$0,56 \times 10^5$
MD-Glc	$2,05 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
MD-Gly	$6,5 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$

Cultures stationnaires ; 24h d'incubation à 28°C ; Dénombrement (UFC) sur gélose extrait de malt (MEA). M : margines ; MD : Margines diluées avec l'eau distillée (50% V/V) ; Gly : Glycérol ; Glc : glucose ; (*) Cellules viables.

Tableau XXV. Biomasse produite (UFC/mL) par *Cryptococcus curvatus* sur les margines issues du système d'extraction par presse.

Milieu de culture	Biomasse Finale	Biomasse produite
M-Glc	$1,4 \times 10^4$ *	0
M-Gly	$2,4 \times 10^3$ *	0
MD	$6,15 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$
MD-Glc	$2,02 \times 10^5$	$0,89 \times 10^5$
MD-Gly	$6,3 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$

(*) Cellules viables (même conditions pour *Yarrowia lipolytica*)

La culture des levures est accompagnée par une diminution dans les valeurs du pH et ce, pratiquement dans toutes les cultures (tableau XXIII), celle-ci serait étroitement liée à une acidification ultérieure à la biodégradation. L'acidification du milieu ainsi que l'élimination des polyphénols en absence de la croissance ou dans des conditions de stress, tel est le cas sur les margines brutes, indiquent certainement soit une adsorption des CP par la biomasse et/ou bien la sécrétion d'enzymes responsables de la dégradation de polymères organiques et de polyphénols. Ce qui implique plus particulièrement, la production de glucosidases spécialisées dans la déglycosylation de polyphénols conjugués aux polysaccharides. Cela permet de suggérer que ces activités enzymatiques sont susceptibles de contrecarrer l'effet inhibiteur de

substrats complexes et toxiques. *Yarrowia lipolytica* a montré une croissance en plus de l'élimination des polyphénols sur les margines diluées ou le pourcentage de réduction est de l'ordre de 79,29 %. La réduction des polyphénols est principalement prononcée pour la même souche sur les margines brutes enrichies et diluées sans enrichissement. Des résultats similaires ont été rapportés par DOUROU et al. (2016) avec une élimination du taux de polyphénols remarquable par des souches de *Yarrowia lipolytica* et d'autres telles que *Candida tropicalis* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Cryptococcus curvatus a également diminué la concentration en polyphénols lorsqu'elle est cultivée sur les milieux M-Gly et MD. De plus, l'enrichissement des margines diluées conduit à une production de biomasse mais seulement avec une légère réduction de la concentration en polyphénols.

Tableau XXVI. Pourcentage de réduction des polyphénols après fermentation.

Milieu de culture	Réduction des polyphénols en (%)
M-Glc- <i>Y. Lipolytica</i>	75,22
M-Glc- <i>C. curvatus</i>	22,53
M-Gly- <i>Y. Lipolytica</i>	76,77
M-Gly- <i>C. curvatus</i>	36,70
MD-Gly- <i>Y. Lipolytica</i>	12,21
MD-Gly- <i>C. curvatus</i>	17,52
MD-Glc- <i>Y. Lipolytica</i>	24,95
MD-Glc- <i>C. curvatus</i>	11,92
M-MRS- <i>L. casei</i>	49,98
M-MRS- <i>L. rhamnosus</i>	48,66
MD- <i>L. casei</i>	24,51
MD- <i>L. rhamnosus</i>	09,65
MD- <i>Y. Lipolytica</i>	79,29
MD- <i>C. curvatus</i>	24,95

M : margines brutes ; MD : Margines diluées avec de l'eau distillée (50% V/V) ; Gly : Glycérol ; Glc : glucose ; *C. curvatus* : *Cryptococcus curvatus* ; *Y. Lipolytica* : *Yarrowia lipolytica*. *L. rhamnosus* : *Lactobacillus rhamnosus* ; *L. casei* : *Lactobacillus casei*.

Les résultats indiquent qu'une viabilité ou une légère croissance est enregistrée pour les levures aussi bien que pour les bactéries probiotiques décrites plus loin (tableaux XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII). La croissance des levures est associée à une réduction du contenu en polyphénols. D'après les résultats auxquels est parvenue cette étude, *Yarrowia lipolytica* semble être intéressante pour de futures investigations scientifiques. L'intérêt de cultiver ces souches sur les margines réside dans la production de métabolites de haute valeur couplée à la

réduction de la concentration en polyphénols, permettant ainsi de rejeter ces effluents dans l'environnement sans aucun souci écologique.

2.4.2. Croissance des lactobacilles en présence de margines

2.4.2.1. Expériences conduites sur les margines du système d'extraction par presse

Ces essais expérimentaux décrivent l'effet des margines sur la croissance et la survie de bactéries probiotiques sur une période de culture de 72 h. Comme il est bien établi, les bactéries lactiques se développent bien sur le milieu MRS, en revanche si l'on va s'intéresser à la production de biomasse ou de métabolites à grande échelle, cela nécessitera et imposera un milieu moins coûteux. Par conséquent, l'utilisation de substrats ou de suppléments de croissance peu coûteux, tels que d'autres sous-produits de la transformation des aliments, suscite un grand intérêt. Dans ce contexte, les expériences de YIN et *al.* (2013) indiquent que les déchets cuisiniers pourraient être utilisés pour la production économique de probiotiques. En effet, plusieurs études ont été consacrées à l'optimisation du milieu de croissance de souches probiotiques.

Tableau XXVII. Croissance de *L. rhamnosus* sur les margines (UFC/mL).

Milieu de culture	Biomasse Finale	Biomasse produite
M-MRS	$6,7 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
MD	ND	0

M : margines ; MD : Margines diluées avec l'eau distillées (50% V/V). M-MRS : MRS + 50% de margines. ND : non déterminé. Conditions : cultures stationnaires ; incubation 24h à 37°C ; dénombrement sur gélose MRS.

Tableau XXVIII. Croissance de *L. casei* sur les margines (UFC/mL).

Milieu	Biomasse finale	Biomasse produite
M-MRS	$2,75 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
MD	$1,55 \times 10^{2*}$	0

M : margines ; MD : Margines diluées avec l'eau distillées (50% V/V). M-MRS : MRS + 50% de margines. (*) Cellules viables. Conditions : cultures stationnaires ; 24h d'incubation à 30 °C ; dénombrement sur gélose MRS.

La biomasse des lactobacilles tolère mieux les margines enrichies avec le milieu MRS par rapport au milieu margines sans MRS (tableaux XXIII, XXVII, XXVIII). En plus de la biomasse, une élimination des polyphénols à environ 50% est enregistrée dans un milieu M-MRS (XXVI). Le dénombrement final enregistré pour *L. rhamnosus* est de l'ordre de $6,5 \times 10^7$ UFC/mL et de $2,6 \times 10^6$ UFC/mL pour *L. casei*.

2.4.2.2. Expériences conduites avec les margines du système d'extraction par centrifugation

Comme il est constaté sur la figure 50, les bactéries probiotiques ont l'aptitude à survivre et à proliférer en présence des margines. Il est très bien documenté que ces dernières sont extrêmement récalcitrantes et résistantes à la biodégradation bactérienne et fongique, par conséquent, elles sont difficiles à être exploitées comme milieu de culture (LARIF *et al.*, 2013 ; ZIREHPOUR *et al.*, 2014).

Les résultats auxquels est parvenu la présente étude démontre que les margines peuvent exercer un effet stimulant sur la croissance de bactéries probiotiques sur les deux échantillons, système à trois phases par centrifugation et le système moderne par presse. Ces résultats suggèrent que l'incorporation de margines diluées dans un aliment pourrait être proposée pour ses effets bénéfiques pour la santé humaine, en ce qui concerne la croissance de probiotiques, en plus des activités antioxydantes et antidiabétiques récemment rapportées par SENANI-OULARBI *et al.* (2016) et BEDOUHENE (2018).

RAMOS *et al.* (2013) ont par ailleurs démontré l'effet antiprolifératif sur le cancer du sein d'extraits riches en hydroxytyrosol dérivés de l'huile d'olive. Les résultats présents vont dans le même sens que ceux de GIAVASIS *et al.* (2012). Ces chercheurs ont aussi souligné que les polyphénols de margines exerçaient une nette stimulation sur la croissance de certains lactobacilles. De plus, comme décrit ci-dessous, le processus de bioconversion diminue la teneur en polyphénols, ce qui pourrait être dû soit au changement dans leur profil polyphénolique, à l'adsorption des polyphénols sur la paroi cellulaire ou à leur dépolymérisation par les bactéries probiotiques, conduisant à une valeur nutritionnelle bénéfique pour la santé (TSANGALIS *et al.*, 2002 ; AURA *et al.*, 2008 ; DONKOR *et al.*, 2008 ; GERASOPOULOS *et al.*, 2015b).

Encore plus d'avantages ont été récemment rapportés pour les margines, des effets hypoglycémiques d'autres effets prébiotiques ont été identifiés respectivement pour les margines diluées, les polyphénols et leurs extraits polysaccharidiques purifiés (NADOUR *et al.*, 2015 ; SENANI-OULARBI *et al.*, 2016). NADOUR *et al.* (2015) ont pu démontrer des activités antioxydantes et prébiotiques des fractions polysaccharidiques de margines, ainsi que leur capacité à être fermentées par des lactobacilles. Dans une autre investigation, GERASOPOULOS *et al.* (2015b) ont utilisé un retentât de margines, obtenu par filtration sur membrane, comme ingrédient antioxydant pour l'alimentation des porcelets. Une capacité antioxydante totale plus élevée a été enregistrées dans le sang et les tissus, de surcroît, les

dommages et les stress oxydatifs causés aux lipides et aux protéines étaient inférieurs à ceux du groupe témoin.

L'augmentation de l'activité antioxydante après fermentation par des lactobacilles a déjà été rapportée par KACHOURI *et al.* (2016) où de nouvelles structures de composés aromatiques sont apparues. D'après les résultats obtenus, tels que décrits ci-dessus, il en ressort que les milieux MRS enrichis en margines ne présentent aucune inhibition contre la croissance de bactéries probiotiques, principalement *L. paracasei*, *L. ramosus*, *L. casei*. Il est à noter que la croissance microbienne des souches de *L. paracasei*, *L. ramosus*, *L. casei* est plus prononcée dans le milieu M-MRS comparativement aux témoins, elle atteint respectivement une valeur de $2,69 \times 10^8$ UFC / mL, $3,77 \times 10^{10}$ UFC / mL et $2,47 \times 10^8$ UFC / mL après 24 h d'incubation (figure 50). Ceci est probablement dû à la présence de composants métabolisables ainsi que de polymères prébiotiques qui ont un effet favorable sur le développement des souches, stimulant ainsi leur croissance, ce qui a été préalablement démontré également par nos collègues de laboratoire (NADOUR *et al.*, 2015). En accord avec les présents résultats, certaines études ont montré qu'une action combinée de fibres alimentaires et de CP stimule la croissance de cellules probiotiques et inhibe les souches pathogènes.

De plus, LOPEZ *et al.* (2013) ont confirmé l'effet positif des infusions du thé sur la bactérie probiotique (*L. acidophilus* L10 et *L. paracasei* L26), ce qui pourrait probablement être attribué à leur besoin et capacité à tirer leur énergie de la bioconversion des polyphénols en utilisant les activités β -glucosidase, de la β -galactosidase et / ou de la rhamnosidase pour survivre. Ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme des flavonols glycosylés (LOPEZ *et al.*, 2013 ; SCHNEIDER *et al.*, 1999). Cependant et selon LARA-VILLOSLADA *et al.* (2007), des concentrations élevées en acides phénoliques (1g/mL) pourraient limiter la viabilité *in vivo* des lactobacilles, comme ceci est constaté dans la présente étude en utilisant des margines brutes ou diluées pour la culture de souches probiotiques. En effet, NADOUR *et al.* (2015) ont aussi déclaré que les souches de *L. gasseri*, de *L. acidophilus*, de *L. brevis* et de *L. Paracasei* avaient montré une difficulté à croître sur les fibres ou polysaccharides alimentaires, les résidus insolubles dans l'alcool et la fraction soluble extraite des margines, ce qui est probablement attribué à l'effet bactéricide des résidus phénoliques contenus dans les extraits polysaccharidiques. *L. plantarum* et *L. paracasei* ont également été évalués pour le traitement des margines et ont conduit à une élimination de la teneur en polyphénols à raison de 46% et 50% respectivement (AYED *et al.*, 2003 ; AOUIDI *et al.*, 2009).

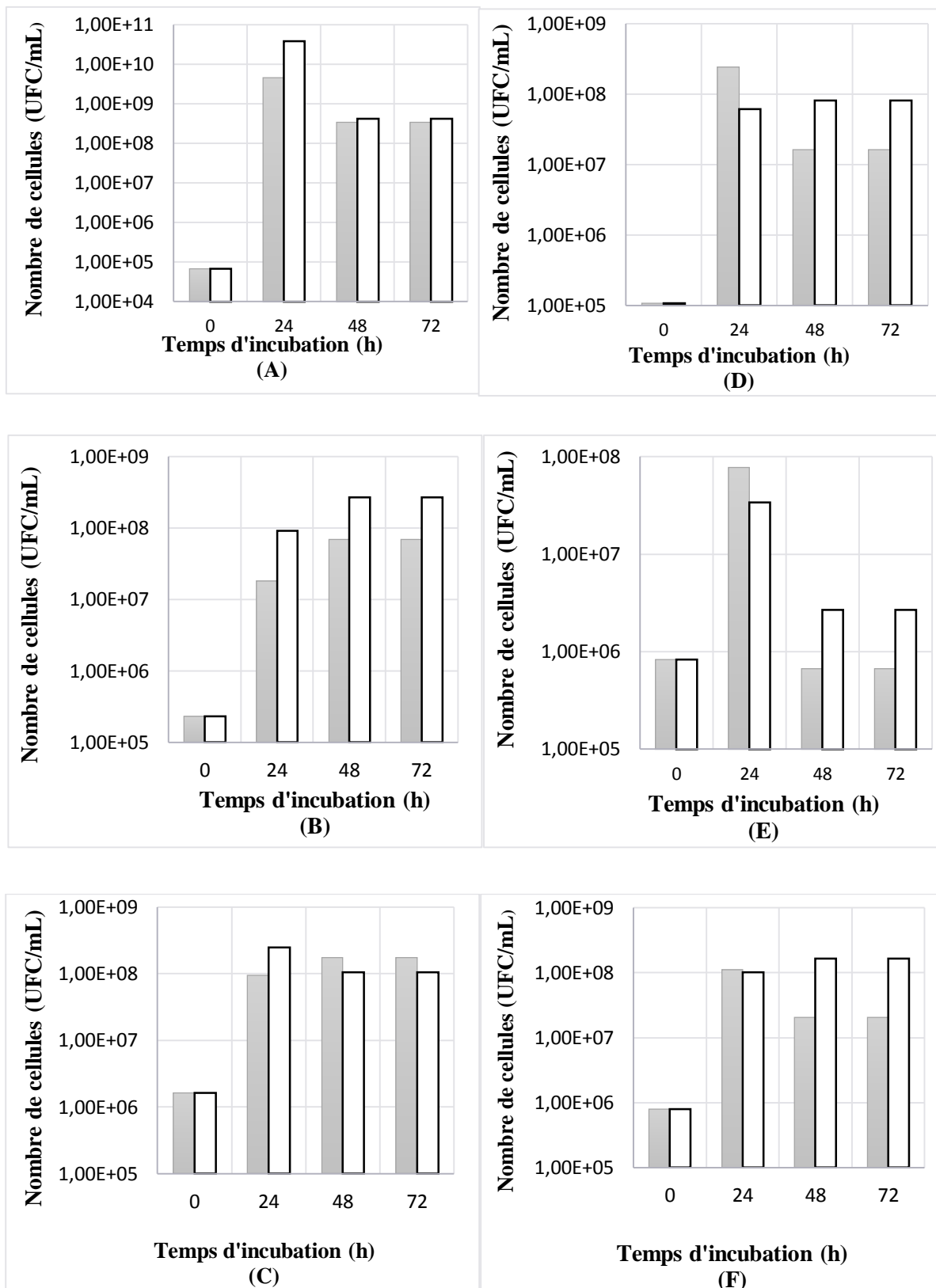


Figure 50. Croissance de bactéries probiotiques sur milieu MRS enrichi avec les margines M4. Graphique à l'échelle logarithmique. MRS contrôle (gris). MRS-M (blanc). (A) *L. rhamnosus* ; (B) *L. paracasei* ; (C) *L. casei* (D) ; *L. brevis* ; (E) *L. acidophilus* ; (F) *L. gasseri*.

Comme rapporté par AVILA et al. (2009), des souches de lactobacilles telles que *L. plantarum* et *L. casei* sont capables de libérer et d'exprimer l'activité β -glucosidase, ce qui pourrait jouer un rôle important dans l'hydrolyse de fibres ainsi que la libération de polyphénols conjugués aux polysaccharides et aux lipides.

En ce qui concerne *L. Bevis*, dans la présente étude le nombre de cellules augmente pour atteindre une valeur de $8,1 \times 10^7$ UFC / mL en phase stationnaire après 48 h dans le milieu M-MRS contre une valeur maximale de $2,41 \times 10^8$ UFC / mL enregistrée après 24 h dans du MRS, laquelle diminue jusqu'à une valeur finale de $1,62 \times 10^7$ UFC / mL. Ce comportement pourrait être associé à l'effet microbiocide des CP libérés de leurs formes conjuguées inactives à la forme libre active. En fait, CUEVA et al. (2010) ont étudié l'activité antimicrobienne des acides phénoliques contre un groupe de lactobacilles (*L. paraplantarum* LCH7, *L. plantarum* LCH17, *L. fermentum* LPH1, *L. brevis* LCH23, *L. coryniformis* CECT 5711, *L. coryniformis* CECT 5711) et de pathogènes (*Staphylococcus aureus* EP167 et *Candida albicans* MY1055). Ces auteurs ont constaté que toutes les souches étudiées présentent une sensibilité aux CP et que seules de légères différences existent entre leurs courbes de croissance établies. À travers ces résultats, il convient de souligner que même si les concentrations en polyphénols se trouvent diminuer, leurs activités biologiques, notamment les activités antibactériennes et antioxydantes, peuvent demeurer intéressantes. Ces bioactivités ne sont pas uniquement liées à la concentration en polyphénols dans les extraits, mais également à leurs effets synergiques et à leurs profils qualitatifs qui pourraient être intéressants après fermentation.

*Activités antioxydantes et
antimicrobiennes des
margines et de leurs extraits
phénoliques*

5.2. Bioactivités des margines et de leurs extraits

Bien que de nombreux antibiotiques soient disponibles pour le traitement des infections bactériennes, l'émergence et la propagation de bactéries résistantes aux antibiotiques présentent un problème à l'échelle mondiale. D'autres part, l'utilisation de conservateurs chimiques toxiques, en industrie alimentaire et cosmétiques, constitue un danger pour la santé humaine.

Une alternative à l'antibiothérapie et aux produits chimiques toxiques devient un besoin imminent. Pour pallier ce problème, l'extraction de nouvelles biomolécules naturelles mieux appréciées par les consommateurs telles que les polyphénols des margines constitue d'une part, une solution pour leur traitement et d'autre part une biovalorisation à visée alimentaire et médicale. C'est dans cette optique, que la présente partie expérimentale a été orientée.

Les contaminations microbiennes sont une préoccupation majeure dans l'industrie alimentaire, car elles peuvent entraîner des changements indésirables dans l'apparence, la texture, la saveur et l'odeur qui réduisent la qualité des aliments et provoquant ainsi de considérables pertes économiques. Plusieurs micro-organismes jouent un rôle dans la détérioration des aliments, plus particulièrement les aliments dérivés d'animaux comme la viande et la volaille, le lait et le poisson, dont l'importance est liée aux normes d'hygiène (ROILA et *al.*, 2016).

Actuellement, des efforts considérables se focalisent pour minimiser l'utilisation de conservateurs chimiques en raison de la préférence des consommateurs envers des produits plus naturels, plus sains et qui pourraient être bénéfiques pour la santé. Par conséquent, un intérêt scientifique croissant s'installe en vue de la recherche de composés antimicrobiens naturels en tant que bio-préservateurs (BRANCIARI et *al.*, 2015). Au cours des dernières décennies, la recherche a montré l'exploitation potentielle des produits végétaux en tant que source de composés bioactifs d'intérêt industriel.

2.5.1. Activités antioxydantes

La forte charge en CP antioxydants et antimicrobiens fait des margines une source attractive de biomolécules pour des applications en industries alimentaires et cosmétiques. Plus loin, il serait recommandé d'utiliser des techniques écologiques et à faible coût pour l'extraction des polyphénols afin de remplacer l'acétate d'éthyle. Une méthode intéressante a été rapportée par SCOMA et *al.* (2011, 2013 et 2015), laquelle emploie une résine non polaire, l'Amberlite XAD16, comme adsorbant.

Les valeurs IC50 enregistrées pour les extraits de margines et de grignons (figure 51), calculées à partir de leurs courbes de tendance respectives (annexe 4), sont de l'ordre de 98,58

$\pm 2,42$ à $152,76 \pm 1,08 \mu\text{g} / \text{mL}$. Comme il est constaté, les meilleures activités sont notées pour les extraits de margines comparativement à l'extrait de grignons. Soulignons que la plus grande fraction de composés antioxydants, contenus dans les olives, passe dans les margines lors du procédé d'extraction de l'huile d'olive. Par conséquent, les margines sont plus riches en CP, ce qui est reflété par les activités antioxydantes appréciables de leurs extraits. L'activité enregistrée pour l'extrait des grignons, quoique moins efficace par rapport aux margines, demeure intéressante. Rappelons que de plus faibles valeurs IC_{50} sont associées à des activités plus efficaces. L'acide ascorbique montre une excellente activité antioxydante ($\text{IC}_{50}=44,56 \mu\text{g}/\text{mL}$). De même, SENANI-OULARBI *et al.* (2018) ont enregistré des activités importantes pour des extraits de margines provenant de la même région située à Tizi-Ouzou. Les valeurs IC_{50} , obtenues par ces auteurs, étaient de l'ordre de $25 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$. Des activités antioxydantes des extraits de margines aussi intéressantes ont été enregistrées par AISSA *et al.* (2017) et BELAQZIZ *et al.* (2017), les valeurs IC_{50} étaient de l'ordre de $10,49 \pm 0,02$ et $32,32 \pm 4,7 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement. Les valeurs IC_{50} des extraits de margines et de grignons dans les régions montagneuses marocaines étaient de l'ordre de $12,1 \pm 5,6$ et $157,7 \pm 34,9 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement, tandis que celles des plaines étaient de l'ordre de $30,7 \pm 4,4$ et $168,0 \pm 48 \mu\text{g}/\text{mL}$ (LEOUIFOUDI *et al.*, 2015).

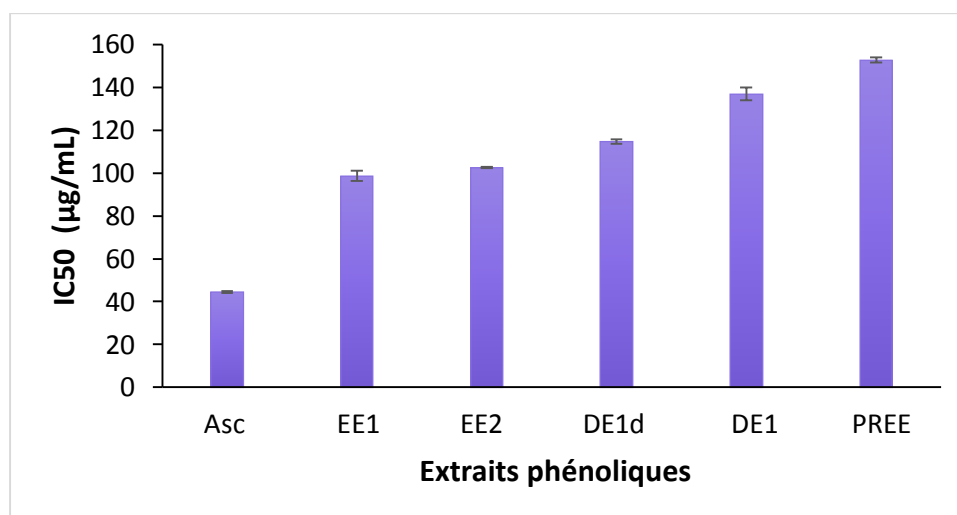


Figure 51. Valeurs IC_{50} obtenues pour différents extraits phénoliques.

Asc : acide ascorbique ; EE1 : Extrait à l'acétate d'éthyle (acidification H_3PO_4) ; EE2 : Extrait à l'acétate d'éthyle 2 (acidification avec de l'HCl) ; DE1 : Extrait au diéther 1 ; DE1d : Extrait au diéther délipidé ; PREE : Extrait de grignon à l'acétate d'éthyle.

2.5.2. Activités antibactériennes des margines et de leurs extraits

Les propriétés antibactériennes des margines et de leurs extraits phénoliques sont démontrées contre la majorité des souches testées et leurs efficacités sont dépendantes des caractéristiques intrinsèques de chaque germe bactérien (tableau XXIX).

2.5.2.1. Margines brutes

Les résultats montrent que *Pseudomonas marginalis* est la souche la plus sensible aux margines brutes lyophilisées avec un diamètre d'inhibition de $16 \pm 1,41$ mm (tableau XXIX). Contrairement aux présents résultats où aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour les margines brutes, ESMAIL et al. (2015) ont signalé des zones d'inhibition comprises entre 15 et 23 mm contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ces auteurs ont aussi démontré les effets antibactériens d'un concentra de margines brutes vis-à-vis de souches uropathogènes et de référence. Cette différence, comparativement aux résultats de la présente étude, serait probablement liée à la variabilité quantitative et qualitative des CP contenus dans les différents échantillons, la technique d'extraction, ainsi qu'une éventuelle utilisation de pesticides et / ou d'engrais (DERMECHE et al., 2013).

Les margines brutes ont été rapportées aussi comme étant très toxiques pour les bactéries phytopathogènes, comme *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi* (Gram-négatif), *Corynebacterium michiganense* (Gram-positif) et *Clavibacter Michiganensis subsp.* Elles ont montré une inhibition de la croissance et une activité bactéricide (CAPASSO et al., 1995 ; ÖZDEMİR et al., 2009). D'autres travaux ont révélé que *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* sont sensibles aux phénols dérivés de plusieurs matrices d'olives, telles que l'huile d'olive, les feuilles de l'olivier et les composés purifiés (MEDINA et al., 2006 ; PEREIRA et al., 2007).

2.5.2.2. Extraits organiques

D'après les résultats obtenus, les microorganismes étudiés ne présentent pas la même sensibilité envers les extraits utilisés à des concentrations identiques pour le même extrait, les diamètres des zones d'inhibition se situent entre 10 et 26,5 mm (tableau XXIX). Les extraits testés montrent une activité antibactérienne à large spectre, laquelle pourrait être expliquée par l'effet synergique d'une grande variété de structures de CP.

En effet, des phénols individuels tels que l'hydroxytyrosol, lutéoléine et l'oleuropéine, ont démontré une activité plus limitée par rapport aux extraits phénoliques de margines (OBEID et al., 2007). Par contre, l'hydroxytyrosol s'est avéré efficace contre les bactéries pathogènes humaines comme *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Staphylococcus aureus* (BISIGNANO et al., 1999).

Tableau XXIX. Diamètres d'inhibition (mm) exercés par les extraits de margines vis à vis des souches testées (moyennes± SD).

Souches bactériennes	Margines/ extraits phénoliques						
	ML	EE1	EE2	EE	EEd	EE1d	DE1d
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-	12±0	15,5±0,7	-	-	-	-
		+	++	+			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	11,5±0,7	16±0	13±0	14±0	15,5±0,7	13,5±0,7
		+	++	+	+	++	+
<i>E. coli</i> ATCC 25322	8,5±0,7	10,5±0,7	12,5±0,7	12,5±0,7	12±0	11,5±0,7	12±0
		+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	-	14,5±0,7	13,5±0,7	11,5±0,7	14±0	16,5±0,7	13,5±0,7
		+	+	+	+	++	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	11±0	11±0	10,5±0,7	11,5±0,7	13,5±0,7	11,5±0,7
		+	+	+	+	+	+
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	16±1,41	11,5±0,7	13,5±0,7	-	-	-	-
		+	+				
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	-	19,5±0,7	20,5±0,7	-	-	-	-
		++	+++	+			
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8,5±0,7	13,5±0,7	14,5±0,7	12,5±0,7	12±0	13,5±0,7	14,5±0,7
		+	+	+	+	+	+

ML : margines lyophilisées ; EE : Extrait à l'acétate d'éthyle ; EEd : Extrait à l'acétate d'éthyle après délipidation des margines ; EE1 : Extrait à l'acétate d'éthyle après acidification des margines à l'HCl; EE1d : EE1 délipidé ; EE2 : Extrait à l'acétate d'éthyle après acidification des margines à l'H₃PO₄ ; DE1d : Extrait au diéthyle éther après délipidation des margines.

Suite du Tableau XXIX. Diamètres d'inhibition (mm) exercés par les extraits de margines vis à vis des souches testées (moyennes± SD).

Souches bactériennes	Margines/ extraits phénoliques						
	ML	EE1	EE2	EE	EEd	EE1d	DE1d
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	-	11,5±0,7 +	13,5±0,7 +	12±0 +	12,5±0,7 +	13±0 +	10±0 +
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	-	12,5±0,7 +	12±0 +	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 0409	-	10±0 +	11,5±0,7 +	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	-	12,5±0,7 +	12,5±0,7 +	13±0 +	13,5±0,7 +	12,5±0,7 +	14±0 +
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-	10,5±0,7 +	12±0 +	11,5±0,7 +	12±0 +	13±0 +	13±0 +
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352	-	12±0 +	12±0 +	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	11,25 ±0,7	26,5±2,12 ++	-	-	-	-	-

ML : margines lyophilisées ; EE : Extrait à l'acétate d'éthyle ; EEd : Extrait à l'acétate d'éthyle après délipidation des margines ; EE1 : Extrait à l'acétate d'éthyle après acidification des margines à l'HCl ; EE1d : EE1 délipidé ; EE2 : Extrait à l'acétate d'éthyle après acidification des margines à l'H₃PO₄ ; DE1d : Extrait au diéthyle éther après délipidation des margines.

BELAQZIZ *et al.* (2017) ont signalé une inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle de margines contre *Staphylococcus aureus* (DPC5246) comprise entre 6 et 11 mm pour une concentration de 125 et 5000 µg/disque, tandis que dans la présente étude les valeurs contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et ATCC 43300 sont respectivement, comprises entre 10,5 et 12,5 et entre 11,5 et 16. AL YAMANI *et al.* (2017) ont trouvé que les polyphénols de margines marocaines avaient un effet inhibiteur contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 13 mm, proche de celui enregistré dans le présent travail.

Les extraits ont exprimé un large spectre d'activité vis-à-vis d'un panel de souches bactériennes (Gram positif et Gram négatif). Cette observation coïncide avec plusieurs résultats rapportés au cours des dernières années. Les différences entre les diamètres d'inhibition sont probablement liées à la variabilité qualitative et quantitative dans la composition des extraits phénoliques ainsi qu'à l'efficacité de diffusion dans la gélose. L'effet antibactérien est généralement plus important chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif, ce qui est principalement lié à la complexité et l'épaisseur des constituants de la paroi cellulaire (OBIED *et al.*, 2007 ; LEOUIFOUDI *et al.*, 2015 ; SILVAN *et al.*, 2018). La perturbation de la membrane cytoplasmique est le mécanisme d'action le plus rapporté pour les extraits phénoliques obtenus à partir des margines (SILVAN *et al.*, 2018).

Comme indiqué dans le tableau XXIX, les bactéries à Gram positif telles que *Brochotrix thermosphacta* et les bactéries sporulantes comme *Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149 sont sensibles aux extraits d'acétate d'éthyle et ce, avec des diamètres plus prononcés et lesquels sont de l'ordre de 20,5 et 26,6 mm, respectivement (annexes 8). Ce comportement peut être dû à la sensibilité intrinsèque propre à chaque souche utilisée. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par LARIF *et al.* (2013) sur des groupes de bactéries similaires, avec des extraits de margines marocaines. Ces derniers ont trouvé une activité antimicrobienne variable contre *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*, en fonction du microorganisme en question. Les diamètres des zones d'inhibition varient de $13,00 \pm 1,73$ à $17,00 \pm 4,58$ et ne sont pas très loin de ceux obtenus dans la présente étude. D'autres résultats de l'activité antimicrobienne avec d'autres extraits organiques sont présentés en annexe 8.

AL YAMANI *et al.* (2017) ont trouvé des zones d'inhibition plus importantes : 19 mm, 16 mm, 30 mm et 32 mm vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, respectivement. Cependant, la zone d'inhibition minimale a été enregistrée contre des souches d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm). Dans une autre étude, JANAKAT *et al.* (2015) ont également étudié l'activité antimicrobienne

d'extraits de margines de la Jordanie contre les souches d'*Escherichia coli* O7: H7 021304 et 02-0628, des isolats de *Listeria monocytogenes* provenant de la viande et de produits laitiers transformés, ainsi que *Salmonella Enteritidis* et *Staphylococcus aureus* 25923 et 26127. L'extrait méthanolique avait donné des zones inhibitrices égales à 9 mm avec toutes les bactéries Gram-négatif et Gram-positif, à l'exception d'*Escherichia coli* O157: H7 02-0628 et de *Staphylococcus aureus* 26127, où les zones inhibitrices étaient de l'ordre de 10 mm et 20 mm, respectivement (JANAKAT et al., 2015). Il est important de signaler que ces deux dernières souches sont résistantes au chloramphénicol et aux tétracyclines.

Comme il est constaté sur le tableau XXIX, un effet inhibiteur plus élevé est observé contre *Brochotrix thermosphacta* (20,5 mm), une bactérie d'altération des viandes. Ainsi, cela suggère une possible application dans l'industrie alimentaire humaine et animale comme déclaré par BRANCIARI et al. (2015). Aussi intéressants, les résultats de FASOLATO et al. (2016) révélant que les concentrât de CP de margines italiennes, peuvent être utilisés comme conservateurs dans certains produits frais. En effet, une pulvérisation de l'extrait de polyphénols sur la poitrine de poulet a nettement modifié la croissance de *Pseudomonas* et d'*Enterobacteriaceae*.

La littérature (tableau XXX) rapporte aussi que ces substances sont prouvées pour inhiber ou retarder la croissance d'une large gamme de bactéries, suggérant ainsi leur application comme additifs alimentaires alternatifs aux produits chimiques toxiques (PEREIRA et al., 2006). Prenons l'exemple des travaux de ROILA et al. (2016) où le potentiel antimicrobien des CP extraits de margines italiennes a été bien démontré contre différentes souches de *Pseudomonas Fluorescens*, responsables de la décoloration de la mozzarella. Dans le même sens, l'utilisation de ces composés bioactifs dans les aliments a entraîné une inhibition de la croissance de différentes souches bactériennes (BRANCIARI et al., 2015). De surcroit, BRANCIARI et al., en 2016, ont aussi investigué l'effet des margines, d'un extrait phénolique de margines et de grignons déshydratés sur la prévalence de *Campylobacter spp* dans le poulet rôti. Leurs résultats ont révélé un potentiel antibactérien intéressant suggérant ainsi une application prometteuse pour les margines contre *Campylobacter spp* dans la volaille.

L'activité antimicrobienne de l'huile d'olive a été aussi testée contre *Helicobacter pylori* ainsi que plusieurs pathogènes alimentaires. Il a été également constaté que des solutions sans sel issues des procédés de production d'olives de table et d'huile d'olive sont riches en ces composés antimicrobiens et qu'elles peuvent exercer une activité bactéricide et antifongique contre les microorganismes phytopathogènes (MEDINA et al., 2013).

Tableau XXX. Résumé sur les différents résultats antimicrobiens d'extraits d'olives, de margines brutes ou de leurs extraits enregistrés dans de similaires ou différentes conditions comparées à la présente étude.

Souches sensibles	Margines, olives ou extrait	Solvant d'extraction	CMI ou CMB (µg/mL)	Zones d'inhibition (mm) (gamme)	Références
Souches utilisées dans la présente étude (tableau XXIX)	Margines	Acétate d'éthyle	103-414,2	7-26,5	La présente étude
<i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>S. typhimurium</i>	Margines	-	32, 76	-	RAJHI et al. (2018)
Souches de <i>Campylobacter</i> (<i>C.jejuni</i> et <i>C. coli</i>)	Extrait	Ethanol après micro et ultrafiltration	430-2000	-	SILVAN et al. (2018)
<i>S. aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Extrait	Acétate d'éthyle	-	23-25	ABU-LAFI et al. (2017)
<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Extrait	Acétate d'éthyle	31,2 - 500 CMB 500- 4000	-	AISSA et al. (2017)
<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Margines -press -3 phases -2 phase	Acétate d'éthyle	102 -205 113-226 320-160	8-32	AL YAMANI et al. (2017)
<i>S. aureus</i> (DPC5246)	Extrait	Acétate d'éthyle	125-5000µg/disque	6-11	BELAQZIZ et al. (2017)
Parasite : <i>Cryptosporidium parvum</i>	Olives (<i>olea europaea</i>)	Ethanol	250-500	-	TEICHMANN et al. (2016)
<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> 25921. <i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i> <i>P. aeruginosa</i> 27853	Margines brutes	-	125-250	15-23	ESMAIL et al. (2015)
<i>E. coli</i> O157:H7, 02-0304 02-0628, <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Enteritidis</i> <i>S. aureus</i> 25923 et 26127	Margines	Méthanol	80 µl/disc MIC (10-37°C) 40 -60 µl 60-80 µl	9-20	JANAKAT et al. (2015)

Suite du tableau XXX. Résumé sur les différents résultats antimicrobiens des margines ou de leurs extraits enregistrés dans de similaires ou différentes conditions comparées à la présente étude.

Souches sensibles	Margines, olives ou Extrait	Solvant d'extraction	CMI ($\mu\text{g/mL}$) concentration	Zones d'inhibition (mm)	Références
<i>E. coli</i> , MBC 1/25 <i>K. pneumoniae</i> <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> <i>Proteus sp.</i>	Margines 3 phases	Acétate d'éthyle	CMI : 1/50 CMI : 1/25	13-17	LARIF et al. (2013)
<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> <i>S. faecalis</i>	-Grignon -Margines margines	-Ethanol -Acétate d'éthyle	2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 5000 $\mu\text{g}/\text{disc}$	21,7-15 12,7-15.85 11,65-12, 65 11,3 11,1	LEOUIFOUDI et al. (2015)
<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> . <i>S. pyogenes</i> , <i>E. coli</i>	margines	Acide gallique combinaison Antisolvant	50/100– 100/100 μg CMI 1000	-	TAFECH et al. (2011)
<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. flexineri</i> , <i>S. aureus</i>	Olives	Méthanol		7-12	PAUDEL et al. (2011)
<i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> <i>S. Typhimurium</i> et <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	Extrait de margines	Traitement membranaire + enzymatique	CMB : 1500-3000 6000- 12000 750	-	FASOLATO et al. (2015)
Inhibition de la croissance <i>P fluorescens</i> responsable de la décoloration de la mozzarella	Extrait de margines	Traitement membranaire + enzymatique	CMI 50 : 5000 CMI 90 : 7000		ROILA et al. (2016)
<i>Campylobacter</i>	Extrait de CP margines riches en sécoiridoides	Traitement membranaire + enzymatique	150 - 300	-	ROILA et al. (2019a)

2.5.2.3. Concentration minimale inhibitrice

Dans cette présente étude, les CMI sont au-dessous de 500 μ g/mL et varient de 103,5 à 414,2 μ g/mL (tableau XXXI). Il est important de souligner que des valeurs de CMI inférieures à 1 mg/mL sont considérées intéressantes pour les extraits naturels en vue d'une application médicale, cosmétique ou alimentaire (RIOS et RECIO, 2005 ; SILVAN et al., 2018). Les résultats rapportés par BRANCIARI et al. (2016) ont révélé une possible utilisation des SPO dans l'alimentation afin de réduire le risque de *Campylobacter spp.* dans la volaille. ROILA et al. (2016) ont mené leur étude sur les activités antibactériennes des extraits phénoliques de margines vis à vis de 64 souches de *Pseudomonas fluorescens* responsables de la décoloration de la mozzarella. Ces auteurs ont noté une valeur de CMI 50 de 5 mg/mL et une valeur CMI 90 de 7 mg/mL. Ces différences dans les CMI sont probablement dues aux différences dans la composition des mixtures polyphénoliques des effluents de margines. Par ailleurs, comme suggéré par TAFECH et al. (2011), des fractions phénoliques spécifiques de margines supplémentées d'ingrédients phénoliques naturels peuvent donner lieu à un effet synergique et être considérées comme source de molécules bioactives vis à vis de bactéries pathogènes.

AL YAMANI et al., (2017) et AISSA et al. (2017) ont trouvé des CMI proches de celles de la présente étude. AISSA et al. (2017) ont rapporté, avec des bactéries Gram-positif, des CMI comprises entre 31,2 et 500 μ g/mL et des CMB entre 500 et 4000 μ g/mL.

Tableau XXXI. Valeurs des CMI enregistrées pour l'extrait de margine à l'acétate d'éthyle.

Souches	CMI (μ g/mL)	CMI/ facteur de dilution
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	103,55	1/32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	103,55	1/32
<i>E. coli</i> ATCC 25322	103,55	1/32
<i>Proteus sp</i>	103,55	1/32
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	414,2	1/8
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	103,55	1/32
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	103,55	1/32
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	103,55	1/32
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	103,55	1/32
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	207,1	1/16
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	207,1	1/16
<i>E. faecalis</i> ATCC 0409	207,1	1/16

AL YAMANI et al. (2017) ont signalé que les polyphénols peuvent inhiber *Escherichia coli* à une concentration de 205 µg/mL, tandis que la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* est inhibée à 102 µg/mL. La CMI enregistrée par les mêmes auteurs précédents, pour les polyphénols issus de margines du système à trois phases, est de l'ordre de 226 µg/mL pour *Escherichia coli* et de 113 µg/mL pour toutes les autres bactéries. Au regard des polyphénols issus des margines du système à deux phases, la plus faible CMI (160 µg/mL) est enregistrée également vis à vis d'*Escherichia coli*, alors que la plus élevée est noté contre *Bacillus subtilis* (320 µg/mL). Ces résultats concordent avec les précédentes observations pour les CMI trouvées dans cette étude (tableau XXXI).

Les CMI rapportées par ESMAIL et al. (2015) pour des concentrât de margines marocaines contre des souches uropathogènes, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Klebsiella pneumoniae* et *E. cloacae* ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* 27853 sont de 250 µg / mL et 125 µg /mL pour *Staphylococcus aureus*. Un effet bactéricide est démontré à 500 µg /mL contre *Escherichia coli*, *E. cloacae* et *Staphylococcus aureus*.

FASOLATO et al. (2015) ont étudié l'activité antibactérienne des phénols extraits de margines contre plusieurs souches de contaminations alimentaires : *Staphylococcus*, *Listeria*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogens* présentaient le niveau de résistance le plus faible (CMB : 1500-3000 µg/mL). En revanche, les souches à Gram négatif telles que *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas spp.* ont été dans certains cas non affectés par les doses testées et les CMB étaient beaucoup plus élevées et se situaient entre 6000 et 12000 µg/mL. La valeur de la CMB pour *Staphylococcus xylosus* était de 750 µg/mL (FASOLATO et al., 2015). Par ailleurs, TEICHMANN et al. (2016) ont décrit un effet antibactérien et antiparasitaire d'un extrait éthanolique de grignons d'olive, qui inhibe un parasite protozoaire *Cryptosporidium parvum* contaminant l'eau potable et provoquant ainsi des diarrhées aux consommateurs (CMI = 250–500µg/mL).

Compte tenu des résultats obtenus ainsi que ceux de la littérature, on tenterait de qualifier l'ensemble des extraits phénoliques testés comme étant des molécules bioactives intéressantes pour une voie prometteuse de lutte biologique contre les bactéries pathogènes. Les sous-produits dérivés du procédé d'extraction de l'huile d'olive pourraient être une source de phénols biologiquement actifs et attractifs pour l'industrie alimentaire (BRANCIARI et al., 2015, 2016 ; FASOLATO et al., 2015 ; ROILA et al., 2016). En Effet, plusieurs études témoignent de l'effet antimicrobien des polyphénols des olives et des margines (BOSKOU et al., 2006 ; OBIED et al., 2007 ; CARRARO et al., 2014 ; JANAKAT et al., 2015 ; ABU-LAFI et al., 2017). Des

activités antifongiques, antimycotoxines (OBIED et al., 2007 ; YANGUI et al., 2010 ; ABU-LAFI et al., 2017 ; LAGROUH et al., 2017 ; SENANI-OULARBI et al., 2018) et antiparasitaires (TEICHMANN et al., 2016) ont été également confirmées.

2.5.2.4. Extraits de margines issues du système semi-moderne par presse

L'effet antibactérien des extraits de polyphénols avant et après fermentation des margines, issues du système moderne par presse, s'est révélé positif contre un panel de souches bactériennes. Les zones d'inhibition présentées dans les tableaux XXXII montrent que les activités antibactériennes des extraits varient entre les différentes souches bactériennes testées. Il faut souligner que les faibles résultats obtenus, avec la méthode de diffusion à partir des disques, pourraient être attribués à une faible diffusion de l'extrait à la surface de la gélose.

Tableau XXXII. Diamètres des zones d'inhibition (mm) exercées par les extraits phénoliques des margines, avant et après fermentation avec les levures et les lactobacilles, contre des bactéries pathogènes et d'altération des aliments (moyennes \pm SD).

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Brochotrix thermosphacta</i>
M	11,5 \pm 0	8,5 \pm 1,5	10 \pm 0	12,5 \pm 0
M-Glc	7 \pm 0,56	10 \pm 0	-	7 \pm 0
M-Glc-Y	7 \pm 0,56	10 \pm 0	7 \pm 0	8 \pm 0
M-Glc-CR	6,5 \pm 0,49	10 \pm 0	-	8 \pm 0
M-Gly	8,5 \pm 0,5	9,5 \pm 0,5	-	7,5 \pm 0,5
M-Gly-CR	8,5 \pm 0,5	8,5 \pm 0,5	-	-
M-Gly-Y	9 \pm 0	9,5 \pm 0,5	-	7 \pm 0
MD-Gly	-	8,5 \pm 0,5	-	-
MD-Gly-CR	-	7,5 \pm 0,5	7 \pm 0	-
MD-Gly-Y	-	7,5 \pm 0,5	-	-
MD-Glc	6,5 \pm 0,49	9 \pm 0	7,5 \pm 0	7,5 \pm 0,5
MD-Glc-Y	6,5 \pm 0,49	7,5 \pm 0,63	7 \pm 0,56	7,5 \pm 0,5
MD-Glc-CR	7 \pm 0,56	9 \pm 0	7,5 \pm 0,63	9 \pm 1
M-MRS-LB ₄	7 \pm 0,56	7,5 \pm 0,5	7,5 \pm 0,63	7,5 \pm 0,63
M-MRS-LB ₅	7,5 \pm 0,63	7,5 \pm 0,5	7,25 \pm 0,60	13,5 \pm 0
MD-LB	7,5 \pm 0,63	10 \pm 0	7,5 \pm 0,63	8 \pm 0
MD-LB ₅	7,5 \pm 0,63	9 \pm 0	7 \pm 0,56	8 \pm 0
MD-LB ₄	7 \pm 0,56	9,5 \pm 0,5	6,75 \pm 0,53	8,5 \pm 0,5
MD	7 \pm 1	10 \pm 0	7,5 \pm 0,5	8,5 \pm 0,5
MD-Y	8,5 \pm 0,5	10 \pm 0	7,75 \pm 2,5	8 \pm 1
MD-CR	6,5 \pm 0,5	9,5 \pm 0,5	6,75 \pm 0,25	8 \pm 1

Suite du tableau XXXII. Diamètres des zones d'inhibition exercées par les extraits phénoliques des margines, avant et près fermentation avec les levures et les lactobacilles, contre des bactéries pathogènes et d'altération des aliments (moyennes \pm SD).

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
M	12 \pm 0	10 \pm 0	9 \pm 0,5	9 \pm 0,5
M-Glc	8,5 \pm 0,5	9,5 \pm 0,5	9 \pm 0	-
M-Glc-Y	10 \pm 0	10 \pm 0	9,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5
M-Glc-CR	11 \pm 1	9,5 \pm 0,5	8,5 \pm 0,6	-
M-Gly	8,5 \pm 0,5	7 \pm 0,5	9 \pm 0	7,5 \pm 0,5
M-Gly-CR	8,5 \pm 0,5	8,5 \pm 0,5	7 \pm 0	7 \pm 0,5
M-Gly-Y	11 \pm 1	9,5 \pm 0,5	9 \pm 1	8,25 \pm 0,75
MD-Gly	7,5 \pm 0,5	8 \pm 0	-	-
MD-Gly-CR	7,5 \pm 0,5	9 \pm 1	-	-
MD-Gly-Y	7,5 \pm 0,5	8 \pm 0	-	-
MD-Glc	9,5 \pm 0,5	8,5 \pm 0,5	-	7,75 \pm 0,25
MD-Glc-Y	8 \pm 0	8,5 \pm 0,5	-	7 \pm 0
MD-Glc-CR	9 \pm 0	9 \pm 0	9 \pm 0	7,75 \pm 0,25
M-MRS-LB ₄	7 \pm 0,5	9,5 \pm 0,5	8 \pm 0	9 \pm 0
M-MRS-LB ₅	8,5 \pm 0,5	8,5 \pm 0,5	8 \pm 0	10 \pm 0,5
MD-LB	9,5 \pm 0,5	9,5 \pm 0,5	8 \pm 0	6,5 \pm 0,5
MD-LB ₅	9 \pm 0	9 \pm 1	8 \pm 0	7 \pm 0,5
MD-LB ₄	8,5 \pm 0,5	8,5 \pm 1,5	7,5 \pm 0,5	6,75 \pm 0,5
MD	7,5 \pm 0,6	9 \pm 0	7 \pm 0	8,5 \pm 0,5
MD-Y	10 \pm 0	9,5 \pm 0,5	7,5 \pm 0,5	8,25 \pm 0,75
MD-CR	9,5 \pm 0,5	9 \pm 1	7,5 \pm 0,5	7,5 \pm 0,5

La méthode de diffusion en milieu gélosé utilisée est une méthode simple et facile à mettre en œuvre, mais son application demeure difficile et limitée avec des quantités importantes d'extrait. Le disque présente une limite par sa surface et son absorbance et ne peut être imprégné d'un grand volume au risque de déborder l'échantillon (la quantité maximale imprégnée est de 25 à 30 μ L). En effet, ce test n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits

En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, les extraits ont exercé une inhibition de 10 mm de diamètre contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, alors qu'elle n'excède pas 9 mm contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. ABU-LAFI et al. (2017) ont enregistré des zones comprises entre 23 et 25 contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. L'extrait de M-MRS fermenté avec *Lactobacillus casei* a donné une inhibition remarquable contre *Brochotrix termosphaeta* avec un diamètre de 13,5 mm.

Plus proches des résultats de la présente étude, les extraits bruts d'olives ont été testés par PAUDEL et al. (2011) contre cinq bactéries pathogènes différentes. Les diamètres

d'inhibition étaient de 10, 10, 10, 9 et 12mm contre *Staphylococcus aureus* (WRHL SA 011), *Escherichia coli* (WRHL EC 007), *Shigella flexineri* (WRHL SF 009), *Pseudomonas aeruginosa* (WRHL PA 003) et *Bacillus subtilis* (WRHL BS011), respectivement. D'autres travaux ont aussi confirmé que les CP peuvent inhiber la croissance d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et de *Staphylococcus aureus* (PASTER et al., 1988 ; AZIZ, 1998). GHOMAR (2015), au cours de son étude expérimentale a démontré que les margines exercent une activité inhibitrice vis-à-vis de souches pathogènes, qui varie d'une souche à une autre avec des diamètres compris entre 10 et 17mm. Les souches les plus sensibles étaient des Gram positif, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, avec des diamètres d'inhibition respectifs de 14 à 16 mm et 12 à 17mm.

2.5.2.5. Activité antibiofilm de l'extrait acétate d'éthyle de margines vis-à-vis de souches uropathogènes.

Dans cette partie d'expériences, 17 microorganismes (11 entérobactéries et 06 Candida), provenant de prélèvements d'examen cyto bactériologique des urines, ont été testés à propos de leur sensibilité vis-à-vis des extraits de margines. Les souches bactériennes sélectionnées sont des souches multirésistantes, responsables d'infections urinaires, leurs profils de résistance sont affichés sur le tableau en annexe 7.

Les souches bactériennes et fongiques testées ont la capacité de former un biofilm sur microplaque à 96 puits, via l'implication de molécules adhésives à savoir des flagelles, fimbriae ou pili (type I), les pilis de conjugaison, les curlis, les polysaccharides de la surface bactérienne (LPS et capsules) et les protéines membranaires.

La capacité des souches uropathogènes et de références à former un biofilm, en présence de l'extrait de margines, est quantifiée sur microplaques à 96 puits grâce au CV. Ce dernier est un colorant basique qui se lie à l'ADN, aux protéines, aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms. Le tableau XXXIX montre les résultats des CMI établies préalablement aux tests antibiofilm. La figure 52 et 53 montrent les pourcentages de l'inhibition exercés par l'extrait de margines vis-à-vis des biofilms.

D'après les résultats, une sensibilité visible est notée pour tous les microorganismes testés à l'encontre des margines, le degré de sensibilité est variable d'une souche à une autre. Les CMI enregistrées pour les souches uropathogènes varient de 1/4 à 1/32 (tableau XXXIV). En revanche, ESMAIL et al. (2015) ont pu démontrer que les margines n'ont aucune efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* testée. De même, aucune activité antifongique des margines,

provenant de deux régions Mission et Frantoio en Australie, n'a été détectée contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger* à une concentration de 5mg/disque par la méthode de diffusion sur disque (OBIED et al., 2007).

Tableau XXXIV. Valeurs de CMI obtenues avec l'extrait acétate d'éthyle de margines vis-à-vis de souches uropathogènes.

Souches	Code	CMI
<i>Escherichia coli</i>	1	1/8
<i>Escherichia coli</i>	2	1/8
<i>Escherichia coli</i>	3	1/8
<i>Escherichia coli</i>	4	1/16
<i>Escherichia coli</i>	5	1/16
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1/32
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1/32
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1/16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1/4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1/4
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1/32
<i>Candida albicans</i>	1	1/16
<i>Candida albicans</i>	2	1/16
<i>Candida albicans</i>	3	1/8
<i>Candida.spp</i>	1	1/8
<i>Candida.spp</i>	2	1/8
<i>Candida.spp</i>	3	1/8

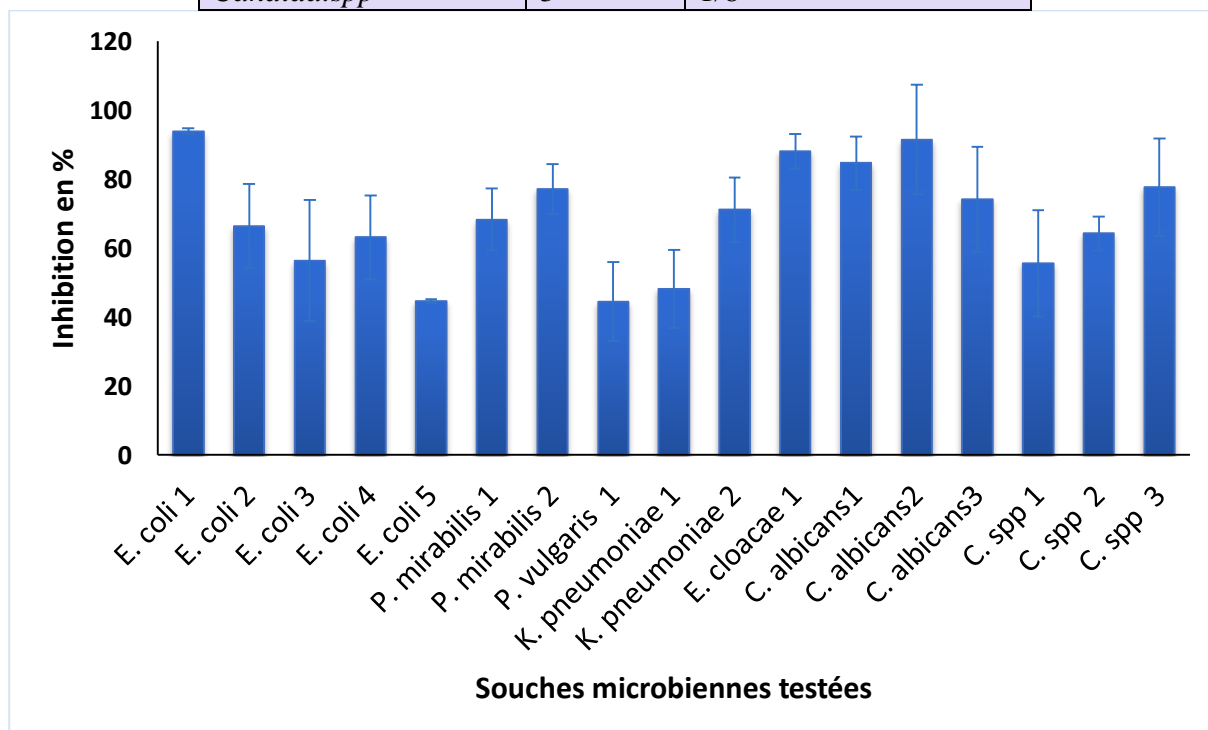


Figure 52. Pourcentages d'inhibition retenus pour l'activité antibiofilm de l'extrait de margines. EE1 : extrait de margines à l'acétate d'éthyle (évaporation : flux d'azote).

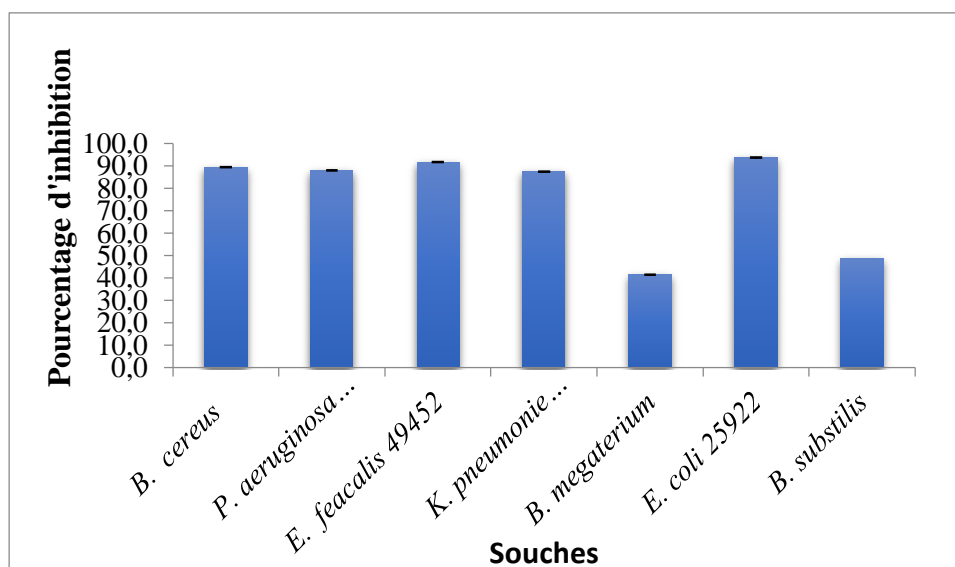


Figure 53. Effet de l'extrait de margines EE1 sur la formation de biofilm par les souches de référence.

Par ailleurs, ESMAIL et *al.* (2015), dans le même contexte que la présente étude, ont pu montrer que les margines possèdent ce pouvoir antimicrobien contre plusieurs souches provenant des infections urinaires. Ces auteurs, ont enregistré une zone d'inhibition de 13 mm contre *E. cloacae*. Les diamètres enregistrés pour *Escherichia coli* ATCC 25921 et *Klebsiella pneumoniae* sont de 15 et 22 mm, respectivement.

Les activités antibactériennes sont en générale associées aux acides phénoliques, en particulier l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique et l'acide 4-hydroxybenzoïque (AZIZ et *al.*, 1998). TAFESH et *al.* (2011) ont souligné que l'utilisation d'une combinaison de polyphénols extraits de margines est efficace contre plusieurs agents pathogènes humains. Les acides phénoliques sont beaucoup moins polaires. Cette propriété peut faciliter le transport de ces molécules à travers la membrane cellulaire. Ils ont la faculté de se complexer avec les protéines extracellulaires solubles et aussi avec les peptidoglycane et engendrer ainsi la rupture de la paroi bactérienne (ARAB et *al.*, 2013), comme c'est le cas des quinones. Les flavonoïdes (plus lipophiles) peuvent également perturber les membranes microbiennes (FIRAS et HASSAN, 2008). La perturbation de la paroi bactérienne entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires (LAMBERT et *al.*, 2001 ; BURT, 2004 ; BAKKALI et *al.*, 2008). En plus, les CP en forte concentration peuvent se fixer sur les enzymes dont l'activité serait affectée et les cellules microbiennes seraient privées de métabolites intermédiaires, ce qui parviendrait à l'inhibition de leur croissance.

Les pourcentages d'inhibition de la formation de biofilms, obtenus avec des concentrations inférieures aux CMI, varient de 44,44 à 93,81% pour l'ensemble des souches testées (figure 52 et 53). Ces résultats concordent avec ceux de CARRARO et al. (2014). Ces auteurs ont travaillé sur une souche d'*Escherichia coli* comme modèle d'étude. Une analyse transcriptionnelle à l'échelle génomique a été effectuée sur *Escherichia coli* K-12 exposée à l'extrait de margines. La répression de gènes de la synthèse des flagelles, ceux liés à la formation du biofilm et à la réponse au stress a été observée. Les concentrations sous-inhibitrices (<CMI) ont réduit de manière significative la formation des biofilms, l'essaimage et la mobilité, confirmant ainsi les données obtenues sur l'expression génétique.

Les résultats de la présente étude s'alignent aussi avec ceux de ROILA et al. (2019), l'extrait avait inhibé la formation de biofilm jusqu'à 83 et 92% contre des souches de *Campylobacter* (ROILA et al., 2019).

Le biofilm est un mode de vie fréquent pour les microorganismes retrouvé dans des environnements variables comme dans le domaine médicale, industriel et alimentaire. Par exemple, une étude réalisée par BELLIFA (2014), qui consistait à évaluer la formation de biofilm par des souches de *Klebsiella pneumoniae*, isolées à partir de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen, a révélé que 51 des souches testées sont de bonnes formatrices de biofilm sur microplaque 96 puits, 35 des souches avec une formation modérée et 20 souches non formatrices de biofilm. Selon REINER et al. (2006), NAVES et al. (2008), HANCOCK et al. (2011), la classification des souches faiblement et fortement productrices du biofilm demeure très arbitraire et variable d'une étude à une autre.

La méthode de quantification du biofilm au CV est une méthode difficile à standardiser, les protocoles utilisés sont très variables notamment la durée, les températures d'incubation, la méthodologie et les solutions de lavage employées, la concentration et la durée de coloration au CV. La comparaison donc des résultats entre les différents travaux de recherche est assez délicate. De surcroît, cette méthode permet d'évaluer la biomasse qui peut être constituée de bactéries vivantes ou de bactéries mortes. Certains auteurs, comme REINER et al. (2006) ; NAVES et al. (2008), ont souligné que le taux de formation du biofilm serait plutôt élevé dans un milieu pauvre en nutriments que dans un milieu riche. Par ailleurs, JAKSON et al. (2002) ont montré que la formation du biofilm diminue par l'addition du glucose tandis que CERCA et JEFFERSON (2008) ont montré un effet positif du glucose sur la formation du biofilm.

Dans l'optique de lutte contre les biofilms, les résultats obtenus sont prometteurs et méritent d'être approfondies avec des méthodes moléculaires plus appropriées.

Discussion générale

2.6. Discussion générale

En guise de discussion générale, tenant compte de nos résultats et de ceux rapportés par l'ensemble des auteurs cités précédemment, on tenterait de souligner quelques points essentiels ci-dessous.

2.6.1. Potentiel inhibiteurs des margines

Les margines sont une ressource de matières organiques et minérales valorisable avec une large gamme d'exploitations biotechnologiques. Leurs potentiels inhibiteurs de microorganismes peuvent être considérés comme étant bénéfiques en tenant compte de leurs :

- Activités antimicrobiennes vis-à-vis de souches pathogènes ;
- Activités antioxydantes ;
- Activités anti-méthanogènes.

D'autre part, cet effet inhibiteur constitue un obstacle pour les bioprocédés fermentaires où il est considéré comme étant négatif. Comme illustré par le diagramme (figure 54), afin de réussir un procédé fermentaire, il est donc primordial de maîtriser le trio substrat/microorganismes/produit.

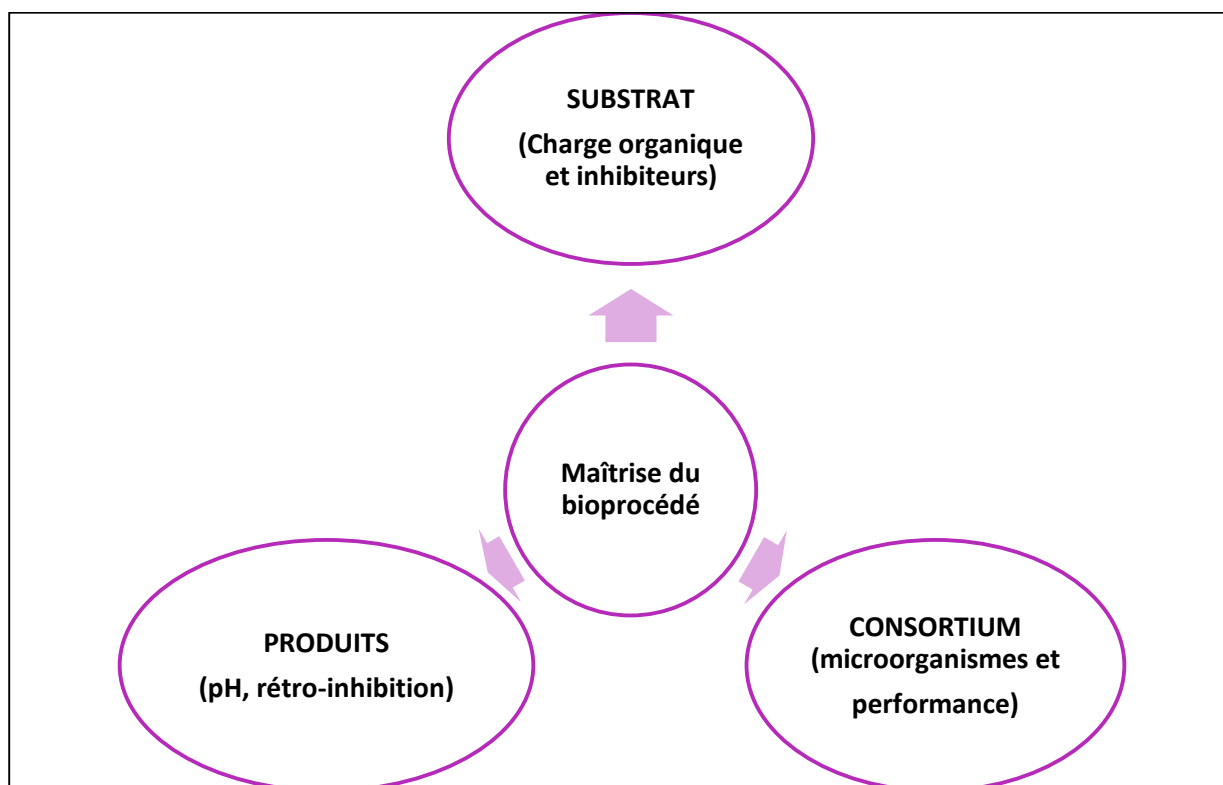


Figure 54. Composantes principales d'un bioprocédé fermentaire.

L'une des limitations majeures du traitement des margines est que ces dernières peuvent inhiber la croissance des microorganismes et même ceux ayant l'aptitude à les dégrader.

D'après l'ensemble des tests réalisés pour l'ensemble des cultures, les résultats auxquels on est parvenu montrent que l'augmentation de la concentration affecte considérablement la croissance et les potentialités métaboliques aussi bien des consortia, des levures que celles des lactobacilles. On assiste alors souvent au phénomène d'inhibition qui s'accroît avec l'accroissement de la concentration, 23-36-45 g_DCO/L. Ceci pourrait être aussi expliqué par une réduction de l'activité des microorganismes par un excès de substrat.

Diluées ou enrichies, les margines ont permis la croissance des consortia et leur adaptation, la survie et / ou la prolifération de levures oléagineuses et de bactéries probiotiques. Ainsi, on tenterait de dire qu'elles pourraient être proposées comme matière première pour la croissance de levures oléagineuses et de lactobacilles ou bien encore, comme matrice alimentaire d'enrichissement pour les produits alimentaires à base de probiotiques en plus de leurs polyphénols bénéfiques pour la santé (NADOÛR *et al.*, 2015 ; BEDOUHENE *et al.*, 2014 ; SENANI-OULARBI *et al.*, 2016 ; BEDOUHENE, 2018).

La technologie de bioconversion des margines diluées ou enrichies par des substrats à faible coût, glucose ou glycérol, pourrait conduire à la production de biomasse microbienne ou de biomolécules présentant un intérêt biotechnologique. Lorsque les margines brutes sont diluées ou enrichies, une croissance significative est observée conduisant à l'élimination des CP.

2.6.2. Potentiel de production en biohydrogène

La production de bioénergies par voie biologique, et notamment de biohydrogène, à partir de biomasse constitue une voie alternative d'énergies renouvelables et durables, à faible émission de gaz à effet de serre.

2.6.2.1. Obstacles et avantages des cultures mixtes

En premier lieu, les consortia révèlent de meilleures productions comparées aux souches pures, ils sont de moindre sensibilité aux concentrations élevées et présentent la faculté d'adaptation. Ce qui confirme le choix et la raison pour laquelle la plupart des travaux de biodégradation anaérobies ont été menés exclusivement avec des consortia. De surcroît, bien que la plupart des consortia soit capable de fermenter les margines diluées (23-38g_DCO/L), leur efficacité était différente. Ce qui implique que le degré de tolérance de chaque communauté vis à vis de la toxicité des margines est différente.

D'un point de vue globale, du fait que les phénols soient toxiques pour beaucoup de microorganismes, on assiste souvent à des inhibitions de la croissance cellulaire qui peuvent systématiquement survenir notamment, au premier contact avec des margines brutes concentrées. En l'occurrence, les cultures exposées auparavant à ces dernières (23 g_DCO/L et

1,1g_{PPT}/L) améliorent nettement les bioconversions sur des margines plus concentrées (34 et 38 g_{DCO}/L et 2,2g_{PPT}/L) en flacon ou en bioréacteur (45g_{DCO}/L dans le cas du consortium PBR) conduit avec une mixture de margines et de grignons. Des observations similaires ont été déjà signalées par certains auteurs ayant travaillé avec des eaux usées à des concentrations différentes, lesquels aussi ont déclaré cette approche d'adaptation comme étant utile. Il a été démontré que les cultures successives sur les eaux usées (phase d'adaptation aux substances toxiques) permettent la sélection de micro-organismes spécialisés parmi la communauté microbienne (MADIGOU et *al.*, 2016). L'adaptation peut induire une conversion de la population de souches sensibles au substrat vers des souches tolérantes. En effet, la vie communautaire des microorganismes caractéristique des consortia, est gouvernée par des systèmes de régulation via l'implication de molécules signales, les homosérines lactones. Cette signalisation, appelée aussi quorum sensing, est assurée sous la condition du seuil critique de la concentration cellulaire. Ce mécanisme assure plusieurs fonctions comme la formation des biofilms, la réponse au stress et l'adaptation. Ainsi face aux margines, la phase d'adaptation pourrait s'expliquer par la variation des pourcentages au niveau des populations microbiennes des consortia, celles-ci subissent certainement un rééquilibrage en faveur des microorganismes ayant des aptitudes de dégradations performantes.

La stratégie d'adaptation utilisée dans la présente étude concorde avec celle récemment rapportée par CALABRO et *al.* (2018), où la digestion anaérobie a été effectuée sur trois lots de margines contenant 0,5 ; 1 et 2 g/L en CP. L'inoculum non acclimaté a été complètement inhibé à une concentration de 2 g/L, tandis qu'un effet positif de l'adaptation aux margines a été observé avec un inoculum adapté à 1,0 et 2,0 g/L, entraînant une augmentation des rendements en méthane comparativement aux inocula non adaptés (CALABRO et *al.*, 2018).

Il a été démontré que divers espèces microbiennes, issues d'écosystèmes variés, peuvent produire du Bio-H₂ par voie fermentaire. Les cultures microbiennes mixtes présentent un potentiel particulièrement intéressant au regard de leur large flexibilité métabolique, permettant d'envisager l'utilisation de ressources organiques complexes, comme celles issues du traitement de la biomasse tels que les olives.

En revanche, la diversité microbienne des cultures mixtes peut constituer également une source d'instabilité et variabilité pour les bioprocédés via l'expression de multiples métabolismes bactériens, ce qui peut mener notamment à une reconsommation du Bio-H₂ produit (TRABLY et *al.*, 2013). Les recherches menées dans ce contexte, ont permis d'identifier puis d'utiliser des espèces-clés situées au cœur des réseaux trophiques en tant que

contrôleurs biologiques des écosystèmes microbiens, et ceci en améliorant la stabilité et les rendements de conversion en Bio-H₂.

Ces associations microbiennes ou consortia producteurs de Bio-H₂ sont généralement préférables par rapport aux cultures pures et ce pour leur pratique application, faible couts d'opération (économie d'énergie de stérilisation) et facilité de contrôle. Basées sur des cinétiques différentielles de divers groupes microbiens, les mixtures microbiennes permettent un large choix de substrats complexes (VALDEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2005 ; LI et FANG, 2007 ; WANG et WAN, 2009b ; JOBAR *et al.*, 2014). Cependant, l'enrichissement des cultures mixtes s'avère nécessaire, d'une part en vue d'améliorer la production du Bio-H₂, et d'autre part afin d'inhiber ses consommateurs tels que les méthanogènes et les homoacétogènes, souvent présents dans les consortia (WANG et WAN 2008 ; GONCALVES *et al.*, 2014 ; GHIMIRE et 2015 a, b).

À travers cette étude, des consortia producteurs de Bio-H₂ ont été sélectionnés. Il est important de souligner que toutes les variations au niveau des productions sont étroitement liées d'une part, aux potentialités métaboliques de chaque inoculum et d'autre part, aux conditions opératoires et le type de culture utilisé. Ce qui n'exclut pas que les autres consortia peuvent avoir de meilleures activités dans d'autres conditions. Cependant, il convient de cibler l'une des voies de bioconversion (figure 55) dont le procédé serait le moins couteux et le plus avantageux.

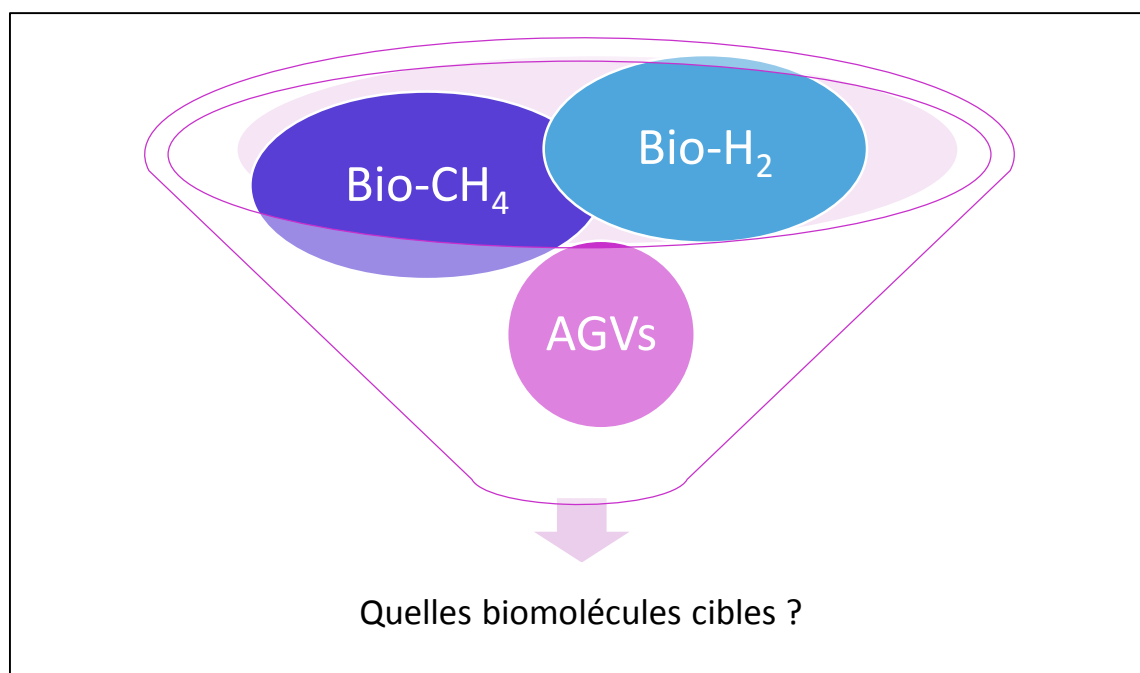


Figure 55. Molécules cibles de bioconversion anaérobie des margines.

2.6.2.2. Inhibition de la méthanogenèse et avantages du procédé

En second lieu, soulignons que l'absence de la méthanogenèse offre l'avantage d'une accumulation importante en AGVs. Ce qui met en valeur les biodigesteurs traités au BES ou menés à des charges organiques inhibitrices de méthanogènes. De plus, le résultat le plus marquant observé lors des cultures sur des marges concentrées, ou sur une forte dilution, est l'absence de production significative d'hydrogène. Ce résultat est conforme à d'autres observations rapportées dans la littérature avec d'autres microorganismes. Toutefois, une concentration modérée redonne une activité hydrogénogène au consortium. Les résultats d'analyses de biogaz montrent sans ambiguïté que les microorganismes et consortia microbiens utilisés dans ce travail ne produisent pas de méthane qui est un gaz avec un effet de serre environ 25 fois plus élevé que le CO₂. Le but principal qui était de simplifier les chaînes trophiques naturelles en éliminant les Archaea est donc atteint.

Il faudrait également souligner que comparé aux procédés thermophiles, il est bien notable que le procédé microbiologique entrepris s'effectue avec des microorganismes mésophiles, autrement dit il permet des gains en énergie conséquents. Les essais menés en bioréacteurs permettent d'apprécier l'effet « scal up », ceci permet de mieux appréhender le passage à l'échelle industrielle. Bien qu'étant seulement un pas préliminaire loin de la production industrielle, il serait nécessaire d'établir des essais en mode continu. Dans des environnements anaérobies, la dégradation de la biomasse qui conduit à la production de biogaz fait intervenir différentes espèces et nécessite un couplage et une synchronisation métabolique forte afin d'optimiser cette dégradation en évitant tout effet d'inhibition.

2.6.2.3. Les acides gras volatils

La phase liquide des fermentations étant le siège d'une accumulation importante d'acides organiques, la mise en place d'une technique d'extraction en continu des AGVs permettra d'envisager un couplage à un deuxième bioréacteur, aérobie, dans lequel des levures oléagineuses telles que *Cryptococcus curvatus* ou *Yarrowia lipolytica*, seront cultivées. Ces microorganismes sont capables de consommer les AGVs (acétate, propionate, butyrate) pour les transformer en lipides utilisables comme biodiesel.

2.6.3. Culture de levures et de lactobacilles

Sur les marges diluées et enrichies, on tenterait de dire que les levures utilisées consomment les CP exclusivement pour soutirer de l'énergie et pour contrecarrer leur effet toxique. Ceci est reflété par la réduction des CP parallèlement à la croissance. Par contre, il

semble que dans les autres cultures à forte concentration, les microorganismes étant toujours viables mais sans prolifération, ils ne consomment pas exclusivement les CP pour leur croissance, plutôt, ils l'utiliseraient seulement pour faire face à leur forte toxicité. Selon la culture, on assiste alors soit à une croissance ou une viabilité (figure 56)

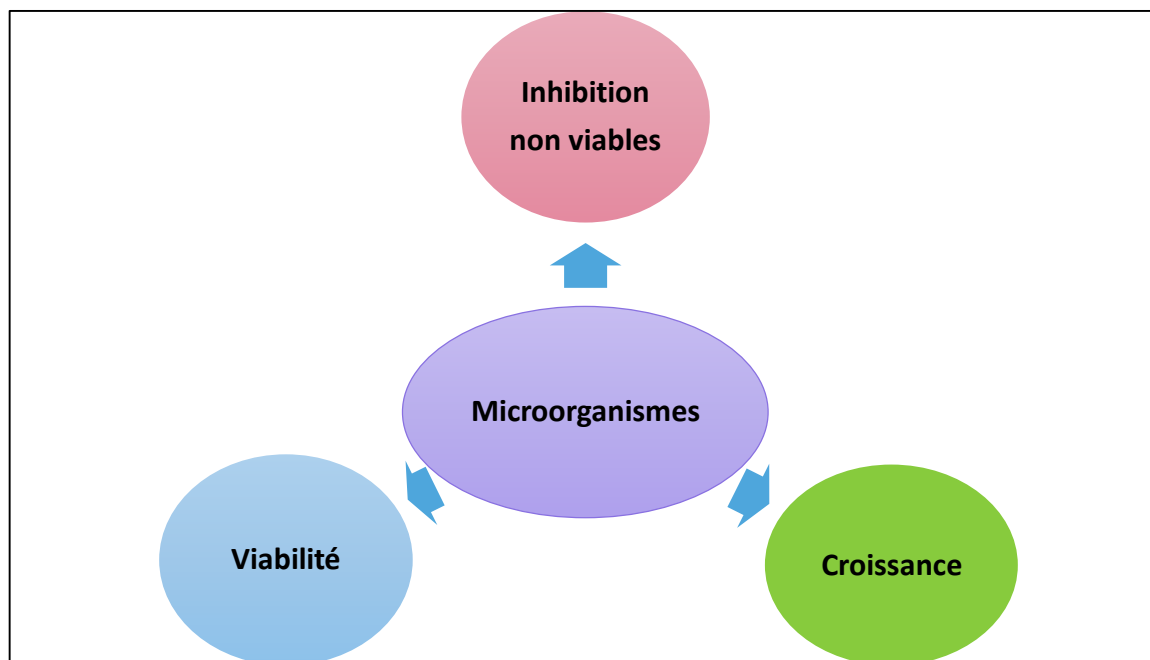


Figure 56. Réponse des levures aux substrats de fermentation.

Il convient de noter que la biodégradation est un phénomène très complexe, lequel est gouverné par des enzymes responsables de la fermentation. En fait, ces enzymes exigent certaines conditions optimales de culture pour mener une biodégradation efficace. De plus, sur de fortes concentrations, la majorité des CP peuvent se fixer sur les enzymes. Ce qui a pour effet d'altérer l'activité enzymatique privant ainsi les cellules de métabolites intermédiaires et d'énergie et aboutissant à la mort cellulaire. En plus de ces conditions de culture, la quantité d'enzymes requise pour une biodégradation complète doit être présente dans le milieu réactionnel.

Dans un contexte d'une valorisation par production de biomasse lipidique, il est maintenant intéressant de poursuivre l'étude pour optimiser le procédé et réaliser des extractions subséquentes de lipides. Le principe consiste à réaliser des expérimentations sous des conditions optimisées aussi bien pour les cultures de levures oléagineuses que les procédés d'extraction des lipides. De plus, en combinant les résultats issus de l'élucidation apporté à

propos des voies de valorisation agronomiques possibles, on tenterait de proposer les margines résiduelles comme amendement au sol dans une étude ultérieure.

2.6.4. Valorisations énergétiques combinées et/ou dépollution

Dans un contexte de valorisation énergétique (Bio-H₂) des margines par FS, plusieurs points doivent être pris en compte (figure 57). L'adaptation des consortia demeure essentielle pour aboutir à une stabilité dans la production. De plus, afin de surmonter la limite de biodégradation relative à leurs toxicités, il convient aussi d'extraire la fraction phénolique plutôt que de faire une dilution ou encore une biodégradation plus ou moins complète du substrat et sa conversion en biomasse fongique. Par contre, l'exploitation des AGVs issus de la production du Bio-H₂ pour la croissance des levures oléagineuses est plus attractive. Du point de vue économique et écologique, il est plus approprié de trouver une méthode d'extraction non toxique pour l'Homme et l'environnement, comme c'est le cas de l'usage des solvants organiques.

Par ailleurs, la croissance des levures dépend étroitement des conditions de culture et bien qu'elles nécessitent des dilutions, elles demeurent intéressantes dans un contexte de biodépollution et dans la mesure où elles arrivent déjà à dégrader les phénols. En revanche, la dilution et la réduction de la charge organique par pré-fermentation, notamment la source de carbone, peut entraver un procédé à deux étapes, dans le sens où une seconde fermentation serait envisagée.

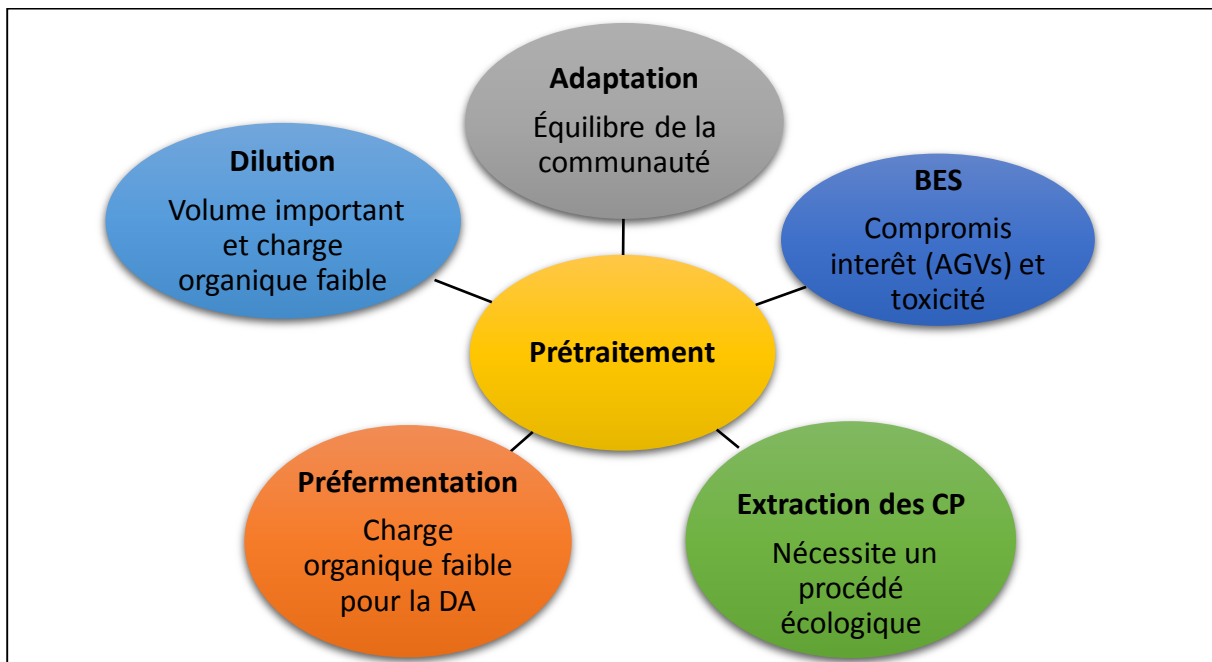


Figure 57. Diagramme récapitulatif des paramètres étudiés, leur importance, obstacle et solution à présager pour un procédé en scal-up.

L'étude en cours est une preuve de concept qui nécessite une étude plus approfondie pour assurer une croissance efficiente et rapide. De plus, les résultats obtenus révèlent que les margines peuvent être considérées comme une source appréciable et bénéfique de composés bioactifs et plus particulièrement de polyphénols.

2.6.5. Rôle antimicrobien

La présente étude s'est focalisé sur la biovalorisation des margines algériennes via l'évaluation de leurs effets antimicrobiens contre des bactéries pathogènes et microbiote ruminal, via trois essais visés sur l'extraction des polyphénols, étude de leurs bioactivités suivie de la biodigestion anaérobie de margines diluées et les margines résiduelles après extraction des polyphénols. Plusieurs données démontrant le potentiel antimicrobien et antioxydant des polyphénols extraits de margines ont été rapportés dans la littérature scientifique (tableau XXXIV). Toutefois, très peu de données sont disponibles sur l'exploitation biotechnologique des margines en Algérie, plus particulièrement leurs activités contre des pathogènes d'altération alimentaire et consortia microbiens

Cette partie expérimentale a démontré le potentiel de valorisation bioénergétique, antimicrobienne des margines et leurs extraits vis-à-vis des bactéries pathogènes, d'altération des aliments (*Brochotrix thermosphacta*), phytopathogènes (*Pseudomonas marginalis*) et du microbiote ruminal des margines et sur l'éventuelle possibilité de couplage de ces deux voies.

Cette étude fournit également des informations intéressantes sur l'action antimicrobienne des polyphénols des margines avec des CMI comprises entre 103 et 414,2 μ g/L. Compte tenu des propriétés antibiofilm des extraits (44-93%) et du fait que la formation de biofilms est un problème sérieux pour l'industrie alimentaire et la santé humaine, les margines se révèlent comme un produit naturel de grande valeur. L'utilisation de CP naturels, plutôt que des agents antimicrobiens toxiques ou bien d'antioxydants pour la bio-préservation des aliments et pour les dispositifs médicaux, occupe un grand intérêt. D'autres mesures plus pertinentes doivent être prises en compte lors de l'utilisation de ces produits dans l'aliment, telles que les caractéristiques organoleptiques et la méthode d'incorporation. L'extraction de composés précieux à partir de levures cultivées sur les margines, tels que les lipides, en plus de l'extraction des CP, pourrait représenter une voie de biovalorisation intéressante pour ces sous-produits agro-industriels, conduisant à des produits à haute valeur ajoutée. De plus, il serait avantageux de caractériser qualitativement les CP résiduels présents dans ces sous-produits par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.

Tableau XXXIII. Les margines comme source d'additifs alimentaires antimicrobiens et de fongicides attractifs.

Test	Additif	Concentration	Produit testé	Résultat	Qualité sensorielle	Références
Activité antifongique : Protection des végétaux						
Croissance des moisissures en surface de légumes et fruits	Margines sur la tomate dans le sol	Filtrat de margines	Tomates	Inhibition de la croissance de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. et lycopersici et de la sporulation <i>Botrytis</i> et <i>Penicillium</i> spp	–	VAGELAS et al. (2009a, b)
Croissance <i>Verticillium dahliae</i> Kleb	Margines dans le sol	Margines	Culture de tomates	Inhibition de la croissance	–	YANGUI et al. (2011)
Germination de spores d' <i>Aspergillus flavus</i>	Margines	Concentrât de margines par séchage	Grains de maïs broyés	Inhibition de la germination	–	SENNANI-OULARBI et al. (2018)
Croissance de champignons phytopathogènes	Margines	400 mL/kg MS	Sol	Inhibition de la croissance de <i>Rhizoctonia solani</i>	–	KOTSOU et al. (2004)
Activité antimicrobienne, dans les produits carnés, viandes, fromage et pain						
Croissance de moisissures en surface	Extrait phénolique brut de margines	1,25% d'extrait purifié	Saussices fermentées	Inhibition de la croissance et de la germination des spores	–	CHAVES-LÓPEZ et al. (2015)
Croissance de moisissures en surface et évaluation sensorielle	Extrait phénolique brut de margines	2,5% d'extrait purifié	Saussices fermentées	Inhibition de la croissance et de la germination des spores	Impact modéré sans effet indésirables	CHAVES-LÓPEZ et al. (2015)
Oxydation des lipides et croissance en surface d'Enterobacteriaceae et <i>Pseudomonas</i> spp. et évaluation sensorielle	Concentrât de polyphénols de margines	38,6 g/L	Poitrine de poulet fraîche	Retard de croissance de 48h	Couleur jaunâtre et bonne odeur	FASOLATO et al. (2015)

Suite Tableau XXXIII. Les margines comme source d'additifs alimentaires antimicrobiens et de fongicides attractifs.

Test	Additif	Concentration	Produit testé	Résultat	Qualité sensorielle	Références
Activité antimicrobienne, dans les produits carnés, viandes, fromage et pain						
Croissance de <i>Campylobacter</i> spp	Extrait de margines	Traitement par membrane et traitement enzymatique	Poulet de chair	Réduction de la prévalence de <i>Campylobacter</i> spp.	–	BRANCIARI et al. (2016)
Croissance de <i>L. monocytogenes</i>	Extrait purifié margines	0,15%	Viande fermentée	Croissance inhibée durant 45 jours fermentation	–	VENEZIANI et al. (2017)
Caractéristiques sensorielles et statut hygiénique	Extrait purifié de margines	750 et 1500 mg/kg	Hamburger viande blanche	Prolongation de la durée de conservation de 24h	Couleur plus sombre et goût d'olive doux non désagréable	VENEZIANI et al. (2017)
Coliformes totaux, Levures - moisissures et <i>Bacillus</i> spp.	Extrait de margines	200 mg /Kg de farine	Pain et biscottes	Prolongation de la durée de conservation	–	GALANAKIS et al. (2018)
Croissance de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et d'enterobacteriaceae	Extrait de margines	250 µg/mL et 500 µg/mL	Fromage	Retard la croissance de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et d'enterobacteriaceae	Amélioration de la conservation du fromage Fior di latte »	ROILA et al. (2019b)

Conclusion générale et perspectives

Volonté de réduire la pollution et souhait de promouvoir la valorisation biotechnologique à visé énergétique, industriel ou thérapeutique de biomolécules actives naturelles étaient les principaux moteurs du présent travail.

Aujourd'hui, le concept du bioraffinage, qui se réfère à la conversion de matières premières renouvelables issues de la biomasse en énergie, matériaux et produits chimiques à plus haute valeur ajoutée tout en générant un minimum de déchets et d'émissions, est une option biotechnologique attractive. Un des facteurs clés pour le développement et la mise en œuvre de bioraffineries à l'avenir est la demande croissante en énergie et en produits biosourcés bénéfiques pour la santé.

Le verger mondial destiné à la production d'huile d'olive est en pleine expansion et se concentre à plus de 97% dans le bassin méditerranéen où siègent les conditions climatiques idéales pour l'oléiculture. Par conséquent, les pays producteurs, comme l'Algérie, sont confrontés à une augmentation significative des sous-produits issus du procédé d'extraction, à savoir les margines et les grignons, ayant des répercussions négatives sur l'environnement sans aucun traitement préalable avant de les rejeter dans l'environnement. La biotechnologie nous vient en aide avec des procédés de valorisation et de bioconversion en vue de surmonter les problèmes de pollutions causés par les déchets comme ceux des industries oléicoles. Dans ce contexte, le travail réalisé s'inscrit dans un projet de valorisation des SPO.

L'objectif principal assigné à la présente étude était de trouver une voie de valorisation par bioconversion intéressante pour les SPO et les résultats ont permis de mettre en évidence un large éventail de voies d'exploitation biotechnologiques possibles. En revanche, l'une des contraintes liées à l'utilisation de ces substrats complexes, riches en matières organiques et plus particulièrement les polyphénols, est qu'ils présentent une toxicité élevée vis-à-vis des microorganismes utilisés, entravant ainsi les bioprocédés. Cette contrainte entraîne alors la nécessité de développer une stratégie qui pourrait palier ces obstacles avec les moyens les plus simples et plus convenables du point de vue écologique et économiques.

Ce travail a permis de mettre en évidence la faisabilité de la production du Bio-H₂ et d'AGVs à partir des SPO par fermentation anaérobie sombre. En premier lieu, des consortia digesteurs ont été sélectionnés sur des margines diluées et aucune production de méthane au faibles charges organiques n'est enregistrée, ainsi le but qui était de simplifier les chaînes trophiques naturelles en éliminant les Archaea avec le BES est donc atteint. En effet, les cultures conduites avec le consortium PBR traité au BES, étant le plus stable et performant en terme de production d'hydrogène et d'AGVs, ont enregistré des BHP de l'ordre de 28,01 (bioréacteur) à 42,52 mL/gMSV (en flacon). Quant aux AGVs, des concentrations appréciables sont produites

pour l'acétate et le butyrate et sont de l'ordre de 2,7 et 2,09 g/L, respectivement. Une forte inhibition est bien observée en utilisant les margines brutes et est attribuée à la charge organique élevée parallèlement aux CP inhibiteurs pour plusieurs types de micro-organismes. Cependant, la dilution lève cet effet inhibiteur menant ainsi à une bonne croissance et acclimatation des consortia et par conséquent, une nette amélioration de la production de biogaz et d'AGVs.

Le premier pas de l'expérience conduite en bioréacteur, avec 5 L de volume utile (mixture de margines et des grignons), a donné des résultats se situant dans la gamme de ceux obtenus en tubes et en flacons et ce malgré le contrôle des conditions opératoires. Le biosystème, qui fait intervenir différentes espèces, nécessite un couplage et une synchronisation métabolique forte afin d'optimiser cette dégradation en évitant tout effet d'inhibition.

À partir des résultats auxquels est parvenue cette partie d'étude, il peut être également conclu que l'avantage principal d'exploiter des digesteurs traités au BES réside dans la production intéressante et directe de Bio-H₂ et d'AGVs et plus particulièrement à de faibles charges en matières organiques qui seraient mieux convenables pour la méthanogenèse. Il faudrait également souligner que comparé aux procédés thermophiles, il est bien notable que le procédé microbiologique entrepris s'effectue avec des microorganismes mésophiles, autrement dit, il permet des gains en énergie conséquents.

L'investigation de la biométhanisation par co-digestion avec du fumier d'animaux d'élevage, a montré que la production de Bio-CH₄ est réalisable à de faibles concentrations en SPO. Cependant, le principal verrou identifié pour la conduite de ce bioprocédé fermentaire de biométhanisation réside dans le temps important des fermentations et dans l'incapacité des consortia à se développer sur des margines brutes ou concentrées. Les BMP obtenus varient de 2,9 à 202,04 NmLCH₄/gMSV.

En fin, la fermentation anaérobie sombre des SPO est un biosystème complexe et sensible à un certain nombre de paramètres tels que la concentration en substrat, le type d'inoculum, le prétraitement du substrat, la méthode d'enrichissement en inoculum et le système de bioconversion mis en œuvre.

Dans un second volet expérimental, la présente étude a montré que la croissance de levures et de lactobacilles sur les margines dépend étroitement de la concentration et de l'enrichissement de ces dernières. Bien que les levures nécessitent des dilutions ou des enrichissements non coûteux, elles demeurent intéressantes dans un contexte de biodépollution, dans la mesure où elles arrivent déjà à dégrader les phénols. Concernant les cultures sur margines diluées sans enrichissement, le nombre de cellules pour *Yarrowia lipolytica* et *Cryptococcus curvatus* augmente pour atteindre des valeurs de l'ordre de $5,6 \times 10^4$ UFC/mL et

$5,3 \times 10^5$ UFC/mL, respectivement. Ce résultat présente un intérêt, ainsi cette étude mérite d'être optimisée et approfondie pour cibler d'autres métabolites présentant un intérêt biotechnologique, tels que les lipides que peuvent accumuler ces levures oléagineuses. *L. paracasei*, *L. ramosus* et *L. casei* ont montré une bonne croissance sur milieu MRS en présence de margines. L'enrichissement des margines est indispensable pour leur croissance.

Le troisième volet expérimental s'est intéressé à l'évaluation du potentiel antimicrobien des margines et de leurs extraits en polyphénols vis à vis de microorganismes pathogènes humains et d'altération alimentaire. Dans cette optique, les margines peuvent être considérées comme une source appréciable et bénéfique de composés bioactifs et plus particulièrement de polyphénols. Les zones d'inhibitions, concernant les tests antimicrobiens, varient entre 7 et 26,5mm. Quant aux CMI enregistrées elles sont comprises entre 103,5 et 414,2 $\mu\text{g/mL}$. Les activités antibiofilm se situent dans les gammes de 44,44 à 93,81%. Ce travail a permis également de conclure que la récupération des polyphénols des margines peut fournir non seulement des biomolécules actives, mais pourrait contribuer également à l'amélioration de la biodigestion et la bioconversion anaérobie des margines brutes.

Enfin, l'étude en cours est une preuve de concept qui nécessite une étude plus approfondie en vue d'assurer de meilleurs rendements en terme de Bio- H_2 , d'AGVs, de Bio- CH_4 ou de biomasse oléagineuse, avant d'entamer un procédé à grande échelle.

Les résultats obtenus sont prometteurs et laissent présager plusieurs perspectives à ces bioprocédés :

- Les bioprocédés de production de Bio- H_2 , d'AGVs et Bio- CH_4 peuvent être soumis à de futures optimisations en vue de déterminer si les rendements en biogaz et en AGVs peuvent être améliorés pour l'ensembles des biodigesteurs testés ;
- Les AGVs pourraient être récupérés et convertis en composés intéressants comme les alcanes et les lipides microbiens ;
- La biomasse oléagineuse conséquente des cultures peut être exploitée pour l'extraction de lipides sous l'optimisation des conditions de culture et d'extraction ;
- Les activités biologiques des polyphénols doivent être approfondies en vue de présager de futures applications. En effet, des tests de toxicité et des méthodes d'encapsulation s'imposent ;
- Dans l'optique de lutte contre les biofilms, les résultats obtenus sont prometteurs et méritent d'être approfondies avec des méthodes moléculaires plus appropriées.
- La combinaison d'un procédé plus écologique pour l'extraction des polyphénols, au lieu des solvants organiques toxiques, avec un procédé de digestion subséquente des substrats exemptes de polyphénols pourrait être considérée comme une option de bioremédiation attractive.

*Références
Bibliographiques*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **ABDEL-SHAFY H., SCHORIES G. MOHAMED-MANSOUR M.S. and BORDEI V. (2015).** Integrated membranes for the recovery and concentration of antioxidant from olive mill wastewater, *Desalin. Water. Treat.*, **56**, 2, 305-314.
- **ABU-LAFI S., AL-NATSHEH S.M., YAGHMOOR R. and AL-RIMAWI F. (2017).** Enrichment of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater and *In Vitro* Evaluation of Their Antimicrobial Activities. *Evid-Based Complementary Altern. Med.*, 2017, 3706915.
- **AGUILERA M., QUESADA M.T., GUERRA D.A.V., MORILLO J.A., RIVADENEYRA M.A., RAMOS-CORMENZANA A. and MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008).** Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresour. Technol.*, **99**, 5640-5644.
- **AHMED P.M., FERNANDEZ P.M., FIGUEROA L.I.C. and PAJOT H.F. (2019).** Exploitation alternatives of olive mill wastewater: production of value- added compounds useful for industry and agriculture. *Biofuel. Res. J.*, **22**, 980-994.
- **AISSA I., KHARRA T.N., ALOUI F., SELLAMI M., BOUAZIZ M. and GARGOURI Y. (2017),** Valorization of antioxidants extracted from olive mill wastewater. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **64**, 4, 579-589.
- **AISSAM H., ERRACHIDI F., MERZOUKI M. and BENLEMLIH M. (2002).** Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé, **7**, 23-30.
- **AISSAM H. (2003).** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed ben abdellah (Maroc). Faculté des sciences Faculté des sciences Dhar El Mehraz Fès. 94.
- **AISSAM H., PENNINCKX M.J. and BENLEMLIH M. (2007).** Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1203-1208.
- **AKAR T., TOSUN I., KAYNAK Z., OZKARA E., YENI O., SAHIN E.N. and AKAR S.T. (2009).** An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. *J. Hazard Mater.*, **166**, 1217-1225.
- **AKRATOS C.S., TEKERLEKOPOULOU A.G., VASILIADOU I.A., and VAYENAS D.V. (2017).** Co-composting of olive mill waste for the production of soil amendments. In book: **GALANAKIS C.M.** Ed (2017). Olive Mill Waste. Academic Press, Cambridge, MA, USA, 161-182.
- **AKRETCHÉ H., PIERRE G., MOUSSAOUI R., MICHAUD P. and DELATTRE C. (2019).** Valorization of Olive mill wastewater for the development of biobased polymer films with antioxidant properties using eco-friendly processes. *Green Chem.*, **21**, 3065-3073.
- **AL AFIF R. and AMON T. (2019a).** Mesophilic anaerobic co-digestion of cow manure with three-phase olive mill solid waste. Recovery, Utilization, and Environmental Effects. *Energ. Source Part A*, **41**, 15, 1800-1808.
- **AL AFIF R. and LINKE B. (2019b).** "Biogas production from three-phase olive mill solid waste in lab-scale continuously stirred tank reactor," *Energy*, **171**, 1046-1052.
- **ALAGÖZ B.A. YENIGÜN O. and ERDİNÇLER A. (2015).** Enhancement of anaerobic digestion efficiency of wastewater sludge and olive waste: Synergistic effect of co-digestion and ultrasonic/microwave sludge pre-treatment. *Waste Manag.*, **46**, 182-188.
- **ALBA-MENDOZA J., RUIZ-GOMEZ A. and HIDALGO-CASADO F. (1990).** Technological evolution of the different processes for olive oil extraction. In: Erickson DR, editor. Edible fats and oils processing: basic principles and modern practices. *Am. Oil Chem. Soc.*, 341-7.

- **ALBURQUERQUE J.A., GONZALVEZ J., GARCÍA D. and CEGARRA J. (2004).** Agrochemical characterization of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour. Technol.*, **91**, 195-200.
- **ALBURQUERQUE J.A., GONZALVEZ J., GARCIA, D. and CEGARRA J. (2006).** Measuring detoxification and maturity in compost made from “alperujo”, the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere*, **64**, 470-477.
- **ALBURQUERQUE J.A., GONZALVEZ J., GARCIA D. and CEGARRA J. (2007).** Effects of a compost made from the solid by-product (“alperujo”) of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne L.*). *Bioresour. Technol.*, **98**,940-5.
- **ALIAKBARIAN B., DE FAVERI D., CONVERTI A. and PEREGO P. (2008).** Optimisation of olive oil extraction by means of enzyme processing aids using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.*, **42**, 34-40.
- **ALIGIANNIS N., KALPOTZAKIS E., MITAKU S. and CHINOU I. B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 4168-4170.
- **ALLOUCHE N., FKI I. and SAYADI S. (2004).** Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2, 267-73.
- **AL-MALLAHI J., FURUICHI T. and ISHII K. (2016).** Appropriate conditions for applying NaOH pretreated two-phase olive milling waste for codigestion with food waste to enhance biogas production. *Waste Manage.*, **48**, 430-439.
- **ALONSO S., RENDUELES, M. and DIAZ M. (2014).** Microbial production of specialty organic acids from renewable and waste materials. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **35**, 497-513
- **ALTIERI R., ESPOSITO A., PARATI F., LOBIANCO A. and PEPI M. (2009).** Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **63**, 8, 993-997.
- **AMADOU S., BOURENNANE N., HADDADI F., HAMIDOUCHE S. and SADOUD S. (2005).** Quel rôle pour les fermes pilées dans la préservation des ressources génétiques en Algérie. Série de document de travail, 126, Algérie, 119.
- **AMADOU, D. (2014).** Extraction, dépolymérisation et valorisation de la lignine kraft de la liqueur noire. Thèse de doctorat en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques. Université du Québec à trois-rivières. 12-219
- **AMARAL C., LUCAS M.S., SAMPAIO A., PERES J.A., DIAS A.A., PEIXOTO F., ANJOS M.D.R. and PAIS C. (2012).** Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Int. Biodeterior. Biodegra.*, **68**,45-50.
- **AMIOT M.J., FLEURIET A. and MACHEIX J.J. (1989).** Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochem*, **28**, 67-69.
- **AMIRANTE P., CATALANO P., AMIRANTE R., CLODOVEO M.L., MONTEL G.L., LEONE A. and TAMBORRINO A. (2002).** Experimental tests of olive oil extraction from depitted olives. *Olive Olio*, **6**, 16-22.
- **ANDREADOU I., BENAKI D., EFENTAKIS P., BIBLI S.I., MILIONI A.I., PAPACHRISTODOULOU A., ZOGA A., SKALTSOUNIS A.L., MIKROS E. and ILIODROMITIS E.K. (2015).** The natural olive constituent oleuropein induces nutritional cardio-protection in normal and cholesterolfed rabbits: comparison with preconditioning. *Planta Med.*, **81**, 655-663.
- **AOUIDI F., GANNOUN H., BEN OTHMAN N., AYED L. and HAMDY M. (2009).** Improvement of fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus paracasei* by cheese whey’s addition. *Process Biochem.*, **44**, 597-601.
- **APARICIO R and HARWOOD J. (2013).** Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. 2nd ed. Springer.

- **ARAB K., BOUCHENAK O. and YAHIAOUI K. (2013).** Evaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. Université M'Hamed Bougara, Boumerdes, Algérie. ISSN 1813-548X.
- **ARANDA E., SANPEDRO I., OCAMPO J.A. and GARCIA-ROMERA I. (2006).** Phenolic removal of olive mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **58**,176-9.
- **ASLI A.E. and QATIBI A.I. (2009).** Ethanol production from olive cake biomass substrate. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **14**,118-122.
- **ASSAS N., AYED L., BOUALLAGUI H., SAYADI S. and HAMDI M. (2009).** Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **63**, 407-413.
- **ASSAS N., AYED L., MAROUANI L. and HAMDI M. (2002).** Decolorization of fresh and stored and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.*, **38**, 361-365.
- **AURA A.M. (2008).** Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem. Rev.*, **7**, 407-429.
- **AVIANI I., LAOR Y., MEDINA S.H., KRASSNOVSKY A. and RAVIV M. (2010).** Co-composting of solid and liquid olive mill wastes: Management aspects and the horticultural value of the resulting composts. *Bioresour. Technol.*, **101**, 17, 6699-6706..
- **AVILA M., HIDALGO M., SÁNCHEZ-MORENO, C., PELAEZ C., REQUENA T. and PASCUAL-TERESA S.D. (2009).** Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and *Lactobacillus*. *Food Res. Inter.*, **42**,1453-1461
- **AYED L. and HAMDI M. (2003).** Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus Plantarum*. *Process Biochem.*, **39**,59-65
- **AYOUB, S., AL-ABSI, K., AL-SHDIEFAT, S., AL-MAJALI, D., HIJAZEAN, D. (2014).** Effect of olive mill wastewater land spreading on soil properties, olive tree performance and oil quality. *Sci. Hort.*, **175**, 160-166.
- **AZBAR N., BAYRAM A., FILIBELI A., MUEZZINOGLU A., SENGUL F. and OZER A. (2004).** A review of waste management options in olive oil production. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **34**, 3, 209-247.
- **AZBAR N., TUTUK F. and KESKIN T. (2009).** Biodegradation performance of an anaerobic hybrid reactor treating olive mill effluent under various organic loading rates. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **63**, 690-698.
- **AZIZ N.H., FARAG S.E., MOUSA L. and ABO M.A. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios.*, **93**, 374, 43-54.
- **AZIZ A., ELANDALOUSSI E.H. and BELHALFAOUI B. (2009).** Efficiency of succinylated-olive stone biosorbent on the removal of cadmium ions from aqueous solutions. *Colloids Surf. B*,**73**, 192-8.

B

- **BACCAR R., BOUZID J., FEKI M. and MONTIEL A. (2009).** Preparation of activated carbon from Tunisian olive-waste cakes and its application for adsorption of heavy metal ions. *J. Hazard Mater.*, **162**, 1522-9.
- **BAKKALI F., AVERBEK K. and IDAOMA M. (2008).** Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 446-475.
- **BALCH W.E., FOX G.E., MAGRUM L.J., WOESE C.R. and WOLFE R.S. (1979).** Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev*, **43**, 2, 260-296.
- **BARBARO B., TOIETTA G., MAGGIO R., ARCIELLO M., TAROCCHI M., GALLI A. and BALSANO C. (2014).** Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int. J. Mol.Sci.*, **15**, 18508-18524.
- **BASTIDAS-OYANEDEL J.R., MOHD-ZAKI Z., ZENG R.J., BERNET N., PRATT S. and**

- STEYER J.P. (2012). Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.*, **110**, 503-9.
- **BATUECAS E., TOMMASI T., BATTISTA F., NEGRO V., SONETTI G., VIOTTI P., FINO D. and MANCINI G. (2019).** Life Cycle Assessment of waste disposal from olive oil production: Anaerobic digestion and conventional disposal on soil. *J. Environ. Manage.*, **237**, 94-102.
 - **BAUMANN I. and WESTERMANN P. (2016).** Microbial Production of Short Chain Fatty Acids from Lignocellulosic Biomass: Current Processes and Market. *Biomed. Res. Int.*, 2016, 8469357.
 - **BECCARI M., BERTIN L., DIONISI D., FAVA F., LAMPIS S., MAJONE M., VALENTINO F., VALLINI G. and VILLANO M. (2009).** Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **84**, 901-908.
 - **BEDOUHENE S., HURTADO-NEDELEC M., SENNANI N., MARIE JC., EL-BENNA J. and al. (2014)** Polyphenols Extracted from Olive Mill Wastewater Exert a Strong Antioxidant Effect in Human Neutrophils. *Int. J Waste Resour.*, **4**,161, 1-6.
 - **BEDOUHENE S., MOULTI-MATI F., DANG P.M. and EL-BENNA J. (2017).** Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced neutrophil degranulation and chemotaxis via AKT, p38, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition. *Inflammopharmacology*, **25**, 6, 673-680.
 - **BEDOUHENE S. (2018).** Capacité anti-oxydante des polyphénols issus de l'olive et des margines sur les fonctions du neutrophile humain dans les conditions de stress oxydatif: Identification des cibles moléculaires de l'oleuropeine et de l'hydroxytyrosol. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi- Ouzou, Algérie. 1-150.
 - **BELAQZIZ M., EL-ABBASSI A., LAKHAL E.K., AGRAFIOTI E. and GALANAKIS C.M. (2016).** Agronomic application of olive mill wastewater: Effects on maize production and soil properties. *J. Environ. Manag.*, **171**, 158-165.
 - **BELIGON V., POUGHON L., CHRISTOPHE G., LEBERT A., LARROCHE C. and FONTANILLE P. (2015).** Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. *Bioresour. Technol.*, **192**, 582-591.
 - **BELIGON V. (2016).** Valorisation d'acides gras volatils issus de fermentation anaerobie par la production de lipides microbiens, precurseurs de biodiesel. Alimentation et Nutrition. Universite Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. Francais. <NNT : CLF22687>. <tel-01342501>.
 - **BELLIFA S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.56.
 - **BELLOU S., MAKRI A., SARRIS D., MICHOS K., RENTOUMI P., CELIK A., PAPANIKOLAOU S. and AGGELIS G. (2014).** The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes. *J. Biotechnol.*, **170**, 50- 59.
 - **BEN SASSI A., OUAZZANI N., WALKER G.M., IBNSOUDA S., EL MZIBRI M. and BOUSSAID A. (2008).** Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast Isolates. *Biodegradation*, **19**, 337-46.
 - **BENITEZ F.J., BELTRAN-HEREDIA J., TORREGROSA J. and ACERO J.L. (1997).** Improvement of the anaerobic biodegradation of olive mill wastewaters by prior ozonation pretreatment. *Bioprocess Eng.*, **17**, 169.
 - **BEOPOULOS A., CHARDOT T. and NICAUD J.M. (2009a).** *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, **91**, 692-696.
 - **BEOPOULOS A., CESCUT J., HADDOUCHE R., URIBELARREA J.L MOLINA-JOUVE C. and NICAUD J.M. (2009b).** *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog.*

Lipid Res., **48**, 375-387.

- **BIANCO A., BUIARELLI F., CARTONI G., COCCIOLI F., JASIONOWSKA R. and MARGHERITA P. (2003).** Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters. *Part I J. Separation Sci.*, **26**, 409-416.
- **BISIGNANO, G., TOMAINO, A., LO CASCIO, R., CRISAFI, G., UCCELLA, N. and SAIJA, A. (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 8, 971-974.
- **BLIKA P.S., STAMATELATOU K., KORNAROS M. and LYBERATOS G. (2009).** Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global NEST J.*, **11.**, 364-72.
- **BORJA R., BANKS A.M.C.J., ALONSOB V. and CHICAB A. (1995).** A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environ. Pollut.*, **88**, 13-18.
- **BOSKOU D. (2006a).** Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.*, **17**, 505-512
- **BOSKOU G., SALTA F.N., CHRYSOSTOMOU S., MYLONA A., CHIOU A. and ANDRIKOPOULOS N.K. (2006b).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem.*, **94**, 558-564.
- **BRANCIARI R., RANUCCI D., MIRAGLIA D., URBANI S., ESPOSTO S., SERVILI M., (2015).** Effect of dietary treatment with olive oil by - product (olive cake) on physico-chemical, sensory and microbial characteristics of beef during storage. *Int. J. Food Saf.*, **4**, 4, 225-229.
- **BRANCIARI F., RANUCCI D., ORTENZI R., ROILA R., TRABALZA-MARINUCCI M., SERVILI M., PAPA P., GALARINI R and VALIANI A. (2016).** Dietary Administration of Olive Mill Wastewater. Extract Reduces *Campylobacter spp.* Prevalence in Broiler Chicken. *Sustainability*, **8**, 9, 837.
- **BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. and BERSET C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*, **28**, 25-30.
- **BRENES, M., GARCIA, A., DE LOS SANTOS, B., MEDINA, E., ROMERO, C., DE CASTRO, A., and ROMERO, F. (2011).** Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. *Food Chem.*, **125**, 4, 1262-1266.
- **BROZZOLI V., BARTOCCIB S., TERRAMOCCIA S., CONTO G., FEDERICI F., D'ANNIBALE A. and PETRUCCIOLI M. (2010).** Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed. *Enz. Microb. Technol.*, **46**, 3-4, 223-228.
- **BROZZOLI V., CROGNALE S., SAMPEDRO I., FEDERICI F., D'ANNIBALE A. and PETRUCCIOLI M. (2009).** Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresour. Technol.*, **100**, 3395-402.
- **BUDINOVA T., PETROV N., RAZVIGOROVA M., PARRA J. and GALIATSATOU P. (2006).** Removal of arsenic (III) from aqueous solution by activated carbons prepared from solvent extracted olive pulp and olive stones. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **45**, 1896-901.
- **BURT S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 3, 223-253.

C

- **CABRERA F., SERRANO A., TORRES Á., RODRIGUEZ-GUTIERREZ G., JEISON D. and FERMOSE FG. (2019).** The accumulation of volatile fatty acids and phenols through a pH-controlled fermentation of olive mill solid waste. *Sci. Total Environ.*, **20**, 657, 1501-1507.
- **CALABRO P.S., FOLINO A.F., TAMBURINO V., ZAPPIA G., DEMETRIO A. and ZEMA D. A. (2018).** Increasing the tolerance to polyphenols of the anaerobic digestion of olive wastewater through microbial adaptation. *Biosyst. Eng.*, **172**, 19-28.
- **CAMARILLO R. and RINCÓN J. (2012).** Effect of inhibitory compounds on the two-phase anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. *Chem.*

Eng. J., 193-194.

- **CANNELLA D., PERONI C.V. and BRAVI M. (2010).** Yeast viability for second generation ethanol production from olive oil wastes. *J Biotechnol*, 150, 1-576.
- **CAPASSO R., EVIDENTE A., SCHIVO L., ORRU G., MARCIALIS M.A. and CRISTINZIO G. (1995).** Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 4, 393-398.
- **CARLOZZI P., SEGGIANI M., CAPPERUCCI A., TANINI D., CINELLI P. and LAZZERI A. (2019).** Hydroxytyrosol rich-mixture from olive mill wastewater and production of green products by feeding *Rhodopseudomonas sp.* S16-FVPT5 with the residual effluent. *J. Biotechnol.*, 10, 295, 28-36.
- **CARRARO L., FASOLATO L., MONTEMURRO F., MARTINO M.E., BALZA S., SERVILI M., NOVELLI E. and CARDAZZO B. (2014).** Polyphenols from olive mill waste affect biofilm formation and motility in *Escherichia coli* K-12. *Microb. Biotechnol.*, 7, 3, 265-275.
- **CASTELLO E., GARCIA Y., SANTOS C., IGLESIAS T., PAOLINO G., WENZEL J., BORZACCONI L., and al. (2009).** Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrog. Energy*, 34, 5674-5682.
- **CATANIA, P., VALLONE, M., FARID, A. and DE PASQUALE, C. (2016).** Effect of O2 control and monitoring on the nutraceutical properties of extra virgin olive oils. *J. Food Eng.*, 169, 179-188.
- **CAYUELA M.L., SÁNCHEZ-MONEDERO M.A. and ROIG A. (2006).** Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochem.*, 41, 616-623.
- **CERCA N. and JEFFERSON K.K. (2008).** Effect of growth condition on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 283, 36-41.
- **CERDA A., ARTOLA A., FONT X., BARRENA R., GEA T., SANCHEZ A. (2018).** Composting of food wastes: status and challenges. *Bioresour. Technol.*, 248, 57-67.
- **CHANDRASEKHAR K. LEE Y.J. and LEE D.W. (2015).** Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 8266-8293.
- **CHAVES-LOPEZ C., SERIO A., MAZZARRINO G., MARTUSCELLI M., SCARPONE E. and PAPARELLA A. (2015).** Control of household mycoflora in fermented sausages using phenolic fractions from olive mill wastewaters. *Int. J. Food Microbiol.*, 207, 49-56.
- **CHEN C.C. LIN C.Y. and LIN M.C. (2002).** Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 2, 224-228.
- **CHEN C.C., CHUANG Y.S., LIN C.Y., LAY C.H. and SEN B. (2012).** Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy*, 37, 15540-15546.
- **CHONG M., SABARATNAM V., SHIRAI Y., ALI M. and HASSAN M. A. (2009).** Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy*, 34, 8, 3277-3287.
- **CHOUAKI S., BESSEDIK F., CHEBOUTI A., MAAMRI F., OUMATA S., KHELDOUN S., HAMANA M.F., DOUZENE M., BELLAH F. et KHELDOUN A. (2006).** Deuxième rapport national sur l'état des ressources Phytogénétiques. Institut national de la recherche agronomique d'Algérie.
- **CLAASSEN P.A.M., VAN LIER J.B., LOPEZ CONTRERAS A.M., VAN NIEL E.W.J., SIJTSMA L., STAMS A.J.M DE VRIES S.S. and WESTHUIS R.A. (1999).** Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 741-55.
- **CLODOVEO M. L., HBAIEB R. H., KOTTI F., MUGNOZZA G. S. and GARGOURI M.**

- (2014). Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **13**, 135-154.
- **COI, (2018)**. Conseil Oléicole Internationale. Newsletter – marché oléicole, N° 126.
 - **COI, (2018)**. Conseil Oléicole Internationale. Newsletter – marché oléicole N° 130.
 - **CORDOVA J., NEMMAOUI M., ISMAILI-ALAOUI M., MORIN A., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. and BENJILALI B. (1999)**. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **5**, 75-8.
 - **CORNELI E., DRAGONI F., ADESSI A., DE PHILIPPIS R., BONARI E. and RAGAGLINI G. (2016)**. Energy conversion of biomass crops and agroindustrial residues by combined biohydrogen/biomethane system and anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.*, **211**, 509-518.
 - **CROGNALE S., D’ANNIBALE A., FEDERICI F., FENICE M., QUARATINO D. and PETRUCCIOLI M. (2006)**. Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 1547-55.
 - **CUEVA C., MORENO-ARRIBAS M.V., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J., BILLS G., VICENTE M.F., BASILIO A., LÓPEZ C.R., REQUENA T. RODRÍGUEZ and J.M. BARTOLOM B. (2010)**. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.*, **161**, 372-382.

D

- **D’ANNIBALE A., CRESTINI C., VINCIGUERRA V. and GIOVANNONZI S.G. (1998)**. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J. Biotechnol.*, **61**, 209-218.
- **D’ANNIBALE A., CASA R., PIERUCCHETTI F., RICCI M. and MARABOTTINI R. (2004)**. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum desf.*) germinability. *Chemosphere*, **54**, 887-94.
- **D’ANNIBALE A., SERMANI G.G.F. and PETRUCCIOLI M. (2006)**. Olive mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresour. Technol.*, **97**, 1828-1833.
- **DABROCK B., BAHL H. and GOTTSCHALK G. (1992)**. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1233-9.
- **DACRORY S., ABOU-YOUSEF H., ABOUZEID R.E, KAMEL S, ABDEL-AZIZ M.S. and EL-BADRY M. (2019)**. Antimicrobial cellulosic hydrogel from olive oil industrial residue. *Int. J. Biol. Macromol.* **1**, 117, 179-188.
- **DANELLAKIS D., NTAIKOU I., KORNAROS M. and DAILIANIS S. (2011)**. Olive oil millwastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, **101**, 358-66.
- **DAREIOTI M.A., DOKIANAKIS S.N., STAMATELATOU K., ZAFIRI C. and KORNAROS M. (2010)**. Exploitation of olive mill wastewater and liquid cow manure for biogas production. *Waste Manage.*, **30**, 1841-1848.
- **DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A. and SACCHI R. (2007)**. Characterisation and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chem.*, **104**, 858-867.
- **DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. and MICHAUD P. (2013)**. Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.*, **48**, 1532-1552.
- **DI BENE C., PELLEGRINO E., DEBOLINI M., SILVESTRI N. and BONARI E. (2013)**. Short- and long-term effects of olive mill wastewater land spreading on soil chemical and biological properties. *Soil. Biol. Biochem.*, **56**, 21-30.
- **DI GIOVACCHINO, L., SESTILI, S. and DI VINCENZO, D. (2002)**. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104**, 587-601.

- **DI MAURO M.D., TOMASELLO B., GIARDINA R.C., DATTILO S., MAZZEI V., SINATRA F., CARUSO M., D'ANTONA N. and RENIS M. (2017).** Sugar and mineral enriched fraction from olive mill wastewater for promising cosmeceutical application: characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. *Food Funct.*, **8**, 4713-4722.
- **DI MAURO M.D., FAVA G., SPAMPINATO M., ALEO D. MELILLI B., SAITA M.G., CENTONZE G., MAGGIORE R. and D'ANTONA N. (2019).** Polyphenolic Fraction from Olive Mill Wastewater: Scale- Up and *in Vitro* Studies for Ophthalmic Nutraceutical Applications. *Antioxidants*, 2019, **8**, 462.
- **DOMINECO T., FRANCESCO C., MARIA G.S., VINCEZA V., MARIATERESA C.D., ANTONELLA S., GABRIELA M. and GIUSEPE B. (2005).** Mecanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 2474-2478.
- **DONKOR O. N. and SHAH N. P. (2008).** Production of b-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soy milk. *J. Food Sci.*, **73**, 1, M15-20.
- **DOUROU M, KANCELISTA A, JUSZCZYK P. SARRIS D, BELLOU S, TRIANTAPHYLLOIDOU I., RYWINSKA A., PAPANIKOLAOU S. and AGGLIS G. (2016).** Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *J. clean. Pro.*, **139**, 957-969.
- **DRAKE H.L., HORN M.A. and WUST P.K. (2009).** Intermediary ecosystem metabolism as a main driver of methanogenesis in acidic wetland soil. *Environ. Microbiol. Rep.*, **1**, 307-318.

E

- **EL HAJJOUJI H., PINELLI E., GUIRESSE M., MERLINA M., REVEL J.C. and HAFIDI M. (2007).** Assessment of the genotoxicity of olive mill wastewater (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.*, **634**, 25-31.
- **EL YAMANI M., GHABBOUR N., SAKAR E.H., Y. and RHARRABTI Y. (2017).** Olive Oil Wastewaters from Northern Morocco: Physicochemical Characterization and Antibacterial activity of Polyphenols. *JMES*, **8**, 8, 2667-2378
- **ELAYADI F., EL ADLOUNI C., ACHAK M., EL HERRADI E., EL KRATI M., TAHIRI S., NAMAN M. and NAMAN F. (2019).** Effects of raw and treated olive mill wastewater (OMW) by coagulation-flocculation, on the germination and the growth of three plant species (wheat, white beans, lettuce). *Mor. J. Chem.*, **7**, 1, 111-122.
- **ELKACMI R., KAMIL N., BENNAJAH M. and KITANE S. (2016).** Extraction of Oleic Acid from Moroccan Olive Mill Wastewater. *Biomed. Res. Int.*, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1397852>.
- **ELSHARNOUBY O., HAFEZ H., NAKHLA G. and EL NAGGAR MH. (2013).** A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *Int. J. Hydrogen Energy.*, **38**, 4945-4966.
- **ENA A., PINTUCCI C. and CARLOZZI P. (2010).** Production of bioH₂ by *Rhodospseudomonas palustris* (strain 6A) grown in pre-treated olive mill waste, under batch or semi-continuous regime. *J. Biotech.*, **180**, 116-117.
- **ERGUL F.E., SARGIN S., ONGEN G. and SUKA F.V. (2009).** Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *Int. Biodeterior. Bioderad.*, **63**, 1-6.
- **EROGLU E., GUNDUZ U., YUCEL M., TURKER L. and EROGLU I. (2004).** Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 2, 163-71.
- **EROGLU E., GUNDUZ U., YUCEL M., TURKER L. and EROGLU I. (2006).** Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two stage processes. *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 11, 1527-1535.
- **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U. and YUCEL M. (2008).** Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.*, **99**,

6799-6808.

- **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U. and YUCEL M. (2009a).** Comparison of the physicochemical characteristics and photo-fermentative hydrogen production potential of wastewaters produced from different olive-oil mills in Western-Anatolia, Turkey. *Biomass. Bioenerg.*, **33**, 4, 706-711.
- **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U., YUCEL M. (2009b).** Treatment of olive mill wastewater by different physicochemical methods and the utilization of their liquid effluents for biological hydrogen production. *Biomass. Bioenerg.*, **33**, 701-705.
- **EROGLU E., GUNDUZ U., YUCEL M. and EROGLU I. (2010).** Photosynthetic bacterial growth and productivity under continuous illumination or diurnal cycles with olive mill wastewater as feedstock. *Int. J. Hydrogen Energy*, **35**, 5293-300.
- **ESMAIL A., CHAHBOUN N., MENNANE Z.L., AMIYARE R., ABED H., BARRAHI M., QEBIBO A., M. OUHSSINE M. and BERNY E. H. (2015).** Study of antimicrobial activity of olive mill wastewater (OMWW) from Fez Boulman against some pathogenic strains. *J. Mater. Environ. Sci.*, **6**, 3, 869-876.
- **ESPINOLA, F., MOYA, M., DE TORRES, A., CASTRO, E. (2015).** Comparative study of adjuvants for extraction of olive oil. *Eur. Food Res. Technol.*, **241**, 6, 759-768.
- **ESRA, S., AKTAS., SEDAT IMRE LALE ERSOY (2001).** Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. Technical Note, *Water Research*, Vol. 35, No. 9, 2336-2340

F

- **FABRI R.L., NOGUEIRA M.S., BRAGA F.G. and COIMBRA E.S. (2009).** *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial anti leishmanial, and antioxidant effects. *Bioresour. Technol.*, **100**, 428-433.
- **FADIL K., CHAHLAOUI A., OUAHBI A., ZAID A. and BORJA R. (2003).** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **51**, 37-41.
- **FALOYE F.D., KANA E.B.G, and SCHMIDT S. (2013).** Optimization of hybrid inoculum development techniques for biohydrogen production and preliminary scale up. *Int. J. Hydrogen Energy*, **38**, 11765-11773.
- **FANG H.H.P., ZHANG T. and LIU H. (2002).** Microbial diversity of a mesophilic hydrogen producing sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 112-118.
- **FARALONI C., ENA A., PINTUCCI C. and TORZILLO G. (2011).** *Chlamydomonas reinhardtii* cultures grown in pretreated olive mill wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy*, **36**, 5920-5931.
- **FASOLATO L., CARDAZZO B., BALZAN S., CARRARO L., TATICCHI A., MONTEMURRO F. and NOVELLI E. (2015).** Minimum bactericidal concentration of phenols extracted from oil vegetation water on spoilers, starters and food-borne bacteria. *Ital. J. Food Saf.*, **4**, 4519.
- **FASOLATO L., CARDAZZO B., BALZAN S., LISA CARRARO L., ANDREANI N.A., TATICCHI A. and NOVELLI E. (2016).** Using a concentrate of phenols obtained from olive vegetation water to preserve chilled food: two case studies. *Ital. J. Food Saf.*, **5**, 5651.
- **FAVARO L., ALIBARDI L., CRISTINA M., CASELLA S. and BASAGLIA M. (2013).** Effects of inoculum and indigenous microflora on hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. *Int. J. Hydrogen Energy*, **38**, 11774-11779.
- **FEDORAK P.M and HRUDEY S.E. (1984).** The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water Res.*, **18**, 361-7.
- **FERNANDES L.R., GOMES A.C., LOPES A., ALBUQUERQUE A. R. M. and SIMÕES R.M. (2015).** Sugar and volatile fatty acids dynamic during anaerobic treatment of olive mill wastewater. *Environ. Technol.*, 2015, 1096310.

- **FERNANDEZ-BOLAÑOS J., FELIZON B., BRENES M., GUILLEN R. and HEREDIA A. (1998).** Hydroxytyrosol and Tyrosol as the Main Compounds Found in the Phenolic Fraction of Steam Exploded Olive Stones. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1-7.
- **FERNANDEZ-BOLAÑOS J., RODRIGUEZ G., RODRIGUEZ R., HEREDIA A., GUILLEN R. and JIMENEZ A. (2002).** Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of the two-phase olive oil processing or “alperujo”. *J. Agri. Food Chem.*, **50**, 6804-6811.
- **FILIPPI C., BEDINI S., LEVI-MINZI R., CARDELLI R. and SAVIOZZI A. (2002).** Cocomposting of olive oil mill by-products: chemical and microbiological evaluations. *Compost. Sci. Util.*, **10**, 63-71.
- **FIorentino A., GENTILI A., ISIDORI M., LAVORGNA M., PARRELLA A. and TEMUSSI F. (2004).** Olive oil mill wastewater treatment using a chemical and biological approach. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5151-5154.
- **FIRAS A. and HASSAN F. (2008).** Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris L.* growing in Iraq. *Zhejiang Univ. Sci.*, **9**, 2,154.
- **FONTANILLE P., KUMAR V., CHRISTOPHE G., NOUAILLE R. and LARROCHE C. (2012).** Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.*, **114**, 443-449.
- **FOUNTOULAKIS M.S., DRAKOPOULOU S., TERZAKIS S., GEORGAKI E. and MANIOS T. (2008).** Potential for methane production from typical Mediterranean agro-industrial byproducts. *Biomass. Bioenerg.*, **32**, 155-161.
- **FOURNIER A. (2016).** Modifications chimiques de la lignine en vue de l'intégrer comme polyol à des mousses de polyuréthane. Mémoire de maîtrise en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques. Université du québec à trois-rivières, 10-133.

G

- **GALANAKIS C. M., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010a).** A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT- Food Sci. Technol.*, **43**,1009-1017.
- **GALANAKIS C. M. TORNBERG E. and GEKAS V. (2010b).** Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **85**, 1148-1155.
- **GALANAKIS C.M. TORNBERG E. and GEKAS V. (2010c).** Clarification of high-added value products from olive mill wastewater. *J. Food Eng.*, **99**, 190-197.
- **GALANAKIS C.M. (2011).** Olive fruit and dietary fibers: components, recovery and applications. *Trends Food Sci. Technol.*, **22**, 175-184.
- **GALANAKIS C.M., (2012).** Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends. Food Sci. Technol.*, **26**, 2, 68-87.
- **GALANAKIS C.M., GOULAS V., TSAKONA S., MANGANARIS G.A., GEKAS V., (2013).** A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int. J. Food Prop.*, **16**, 382-396.
- **GALANAKIS C.M. and KOTSIUOU K. (2017).** Recovery of Bioactive Compounds from Olive Mill Waste. In book: **GALANAKIS C.M. Ed (2017).** Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management. 205-229.
- **GALANAKIS C.M. (2017).** Olive Mill Waste : Recent Advances for Sustainable Management (book). Academic Press, Cambridge, MA, USA, 161-182.
- **GALANAKIS CM., TSATALAS P., IOANNIS Z.C. and GALANAKIS M. (2018).** Control of microbial growth in bakery products fortified with polyphenols recovered from olive mill wastewater. *Environ. Technol. Innov.*, **10**, 1–15.
- **GAMEIRO T., SOUSA F. SILVA F.C., COURAS C., LOPES M., LOURO V., NADAI H. I. and CAPELA I. (2015).** Olive Oil Mill Wastewater to Volatile Fatty Acids: Statistical Study of

- the Acidogenic Process. *Water Air Soil Pollut.*, 226, 4, 115.
- **GARCIA GARCIA I., JIMENEZ PEÑA PR., BONILLA VENCESLADA JL., MARTIN MARTIN A., MARTIN SANTOS MA. and RAMOS GOMEZ E. (2000).** Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.*, **35**,751-758.
 - **GARCIA-GOMEZ A., ROIG, A. and BERNAL M.P. (2003).** Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with OL: organic matter degradation and biological activity. *Bioresour. Technol.*, **86**, 59-64.
 - **GELEGENIS J., GEORGAKAKIS D., ANGELIDAKI I., CHRISTOPOULOU N. and GOUMENAKI M. (2007).** Optimization of biogas production from olive oil mill wastewater, by codigesting with diluted poultry manure. *App. Energy*, **84**, 6,646-663.
 - **GERASOPOULOS K., STAGOS D., KOKKAS S., PETROTOS K., KANTAS D. GOULAS P. and KOURETAS D. (2015a).** Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food Chem. Toxicol.*, **82**, 42-49.
 - **GERASOPOULOS K., STAGOS D., PETROTOS K., KOKKAS S., KANTAS D., GOULAS P. and KOURETAS D. (2015b).** Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food Chem. Toxicol.*, **86**, 319-327.
 - **GHARSALLAH N. (1993).** Production of single cell protein from olive mill wastewater by yeasts. *Environ. Technol.*, **14**, 391-395.
 - **GHARSALLAH N., LABAT M., ALOUI F. and SAYADI S. (1999).** The effect of *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of olive mill waste waters on anaerobic digestion. *Resour. Conserv. Recycl.*, **27**, 187-192.
 - **GHAZY S.E., SAMRA S.E., MAY A.E.M. and EL-MORSY S.M. (2006).** Removal of aluminium from some water samples by sorptive-flotation using powdered modified activated carbon as a sorbent and oleic acid as a surfactant. *Anal. Sci.*, **22**, 377-382.
 - **GHIMIRE A., FRUNZO L., PIROZZI F., TRABLY E., ESCUDIE R., LENS P. N., ESPOSITO G., (2015a).** A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energ.*, **144**, 73-95.
 - **GHIMIRE A., FRUNZO L., PONTONI L., D'ANTONIO G., LENS P. N., ESPOSITO G., and PIROZZI F. (2015b).** Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. *J. environ Manage.*, **152**, 43-48.
 - **GHIMIRE A., FRUNZO L., SALZANO E., PANICO A., LENS P. N. L. and PIROZZI F. (2015c).** Biomass enrichment and Scale-up implications for dark fermentation hydrogen production with mixed cultures. *Chem. Eng. Trans.*, **43**, 391-396.
 - **GHIMIRE A., VALENTINO S., FRUNZO L., TRABLY E., ESCUDIE R., PIROZZI F., LENS P. N. L. et al. (2015d).** Biohydrogen production from food waste by coupling semi-continuous dark-photofermentation and residue post-treatment to anaerobic digestion: A synergy for energy recovery. *Int. J. Hydrog. Energy*, **40**, 46, 16045-16055.
 - **GHIMIRE A., ESPOSITO F., FRUNZO L., TRABLY E., ESCUDIÉ R., PIROZZI F., LENS P.N.L. and ESPOSITO G. (2016).** Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. *Waste Manag.*, **50**, 55-64.
 - **GHOMAR O. (2015).** Traitement des margines de la région du Fès. Université sidi Mohamed ben Abdellah. Mémoire de fin d'étude.
 - **GIANLUCA, V., ENRICO, N., SONIA, E., AGNESE, T. and MAURIZIO, S. (2017).** Applications of recovered bioactive compounds in food products. In Book: **GALANAKIS C.M. Ed (2017).** Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management. 231-247.
 - **GIANNOUTSOU E.P., MEINTANIS C. and KARAGOUNI A.D. (2004).** Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their

- ability for its fermentation. *Bioresour. Technol.*, **93**, 301-6.
- **GIAVASIS I., TSANTE E., GOUTSIDIS P., PAPTAEODOROU K. and PETROTOS K.(2012)**. Stimulatory effect of novel polyphenol-based supplements from olive mill waste on the growth and acid production of lactic acid bacteria. In book *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*. World Scientific Publishing Group. 308–312.
 - **GIAVASIS I. and PETROTOS. (2016)**. Biovalorization of Olive Mill Waste Water for the Production of Single Cell Protein from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*. *BBJ.*, **11**, 2, 1-16.
 - **GILA A., BELTRAN G., BEJAOU M.A., SANCHEZ S., NOPENS I. and JIMENEZ A. (2016)**. Modeling the settling behavior in virgin olive oil from a horizontal screw solid bowl. *J. Food Eng.*, **168**, 148-153.
 - **GILA A., JIMENEZ A., BELTRAN G. and ROMERO A. (2015)**. Correlation of fatty acid composition of virgin olive oil with thermal and physical properties. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **117**, 3, 366-376.
 - **GINER E., RECIO M.C., RIOS J.L., CERDA´NICOLA´S J.M., GINER R.M. (2016)**. Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, **60**, 242-255.
 - **GODON J.J. (2008)**. Aspects biochimiques et microbiologiques de la méthanisation. In *La méthanisation*, Editions Tec et Doc, 61-86.
 - **GONCALVES C., PEREIRA C. and BELO I. (2010)**. Comparison of batch and fed-batch lipase production from olive mill wastewater by *Yarrowia lipolytica* and *Candida cylindracea*. In Special Abstracts, *J. Biotechnol.*, 150S,S1-576
 - **GONÇALVES F.A.G., COLEN G. and TAKAHASHI J.A. (2014a)**. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. Review Article, *Sci. World J.* [http://dx.doi.org/10.1155/\(2014\)/476207](http://dx.doi.org/10.1155/(2014)/476207).
 - **GONÇALVES M.R., COSTA J.C., PEREIRA M.A., ABREU A.A., ALVES M.M., (2014b)**. On the independence of hydrogen production from methanogenic suppressor in olive mill wastewater. *Int. J. Hydrogen Energ.*, **39**, 6402-6406. **GONÇALVES M.R., COSTA J.C., PEREIRA M.A., ABREU A.A., ALVES M.M., (2014b)**. On the independence of hydrogen production from methanogenic suppressor in olive mill wastewater. *Int. J. Hydrogen Energ.*, **39**, 6402-6406. **GONÇALVES M.R., COSTA J.C., PEREIRA M.A., ABREU A.A., ALVES M.M., (2014b)**. On the independence of hydrogen production from methanogenic suppressor in olive mill wastewater. *Int. J. Hydrogen Energ.*, **39**, 6402-6406.
 - **GONZALEZ-GONZALEZ A. and CUADROS F. (2015)**. Effect of aerobic pretreatment on anaerobic digestion of olive mill wastewater (OMWW): an ecoefficient treatment. *Food Bioprod. Process.*, **95**, 339-345.
 - **GÖRISH U. and HELM M. (2008)**. La production de Biogaz. *Les Editions Eugen Ulmer ed*, Paris.
 - **GUERMAZI Z., GHARSALLAOUI M., PERRI E., GABSI S. and BENINCASA C. (2015)**. Characterization of extra virgin olive oil obtained from whole and destoned fruits and optimization of oil extraction with a physical coadjuvant (Talc) using surface methodology. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, **6**, 160-165.
 - **GUNAY A. and KARADAG D. (2015)**. Recent developments in the anaerobic digestion of olive mill effluents. *Process Biochem.*, **50**, 11, 1893-1903.
 - **GUO X.M., TRABLY E., LATRILLE E., CARRÈRE H. and STEYER J.P. (2010)**. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**,19, 10660-10673.
 - **GUYADER J. (2015)**. Manipulation of the hydrogen pool available in the rumen to reduce methane emissions from ruminants. Agricultural sciences. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. English. < NNT: (2015)CLF22543 >.

H

- **HAAGENSEN F., SKIADAS I.V., GAVALA HN. and AHRING B.K. (2009).** Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass Bioenerg.*, **33**, 11, 1643-1651
- **HADDADIN M.S.Y., HADDADIN J., ARABIYAT O.I. and HATTAR B. (2009a).** Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour. Technol.*, **100**, 4773-4782.
- **HADJOU L., LAMANI W. and CHERIET F. (2013).** « Labellisation des huiles d'olive algériennes : contraintes et opportunités du Processus », N. 2/2013, Classification : L66, O25, Q13, 35-46.
- **HALLENBECK P. C. and GHOSH D. (2009).** Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends biotechnol.*, **27**, 5, 287-297.
- **HALLENBECK P.C, and BENEMANN J.R. (2002).** Biological hydrogen production fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrog. Energy*, **27**, 11, 85-93.
- **HAMDEN K., ALLOUCHE N., DAMAK M. and ELFEKI A. (2009).** Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem. Biol. Interact.*, **180**, 421-432.
- **HAMDI M. (1991a).** Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.*, **36**, 173-8.
- **HAMDI M., BOUHAMED H. and ELLOUZ R. (1991b).** Optimisation of *Aspergillus niger* growth on olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 285-288.
- **HAMDI M., GARCIA JL. and ELLOUZ R. (1992).** Integrated biological process for olive mill wastewater treatment. *Bioprocess Eng.*, **8**, 79-84.
- **HAMDI M. and ELLOUZ R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environ. Technol.*, **14**, 183-8.
- **HAMER H. M., JONKERS D., VENEMA K., VANHOUTVIN S., TROOST F. J. and BRUMMER R. J. (2008).** The role of butyrate on colonic function. Review article. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **27**, 2, 104-119.
- **HAMZA K. M. (2013).** Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive : une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel. Thèse. Doc. Université de Sfax, école nationale d'ingénieurs de Sfax. 150.
- **HAMZA M. and SAYADI S. (2015).** Valorisation of olive mill wastewater by enhancement of natural hydroxytyrosol recovery. *Int. J. Food Sci., Technol.*, **50**, 826-833.
- **HANCOCK V., WITSO L.L. and KLEMM P. (2011).** Biofilm formation as a function of adhesion, growth medium, substratum and strain type. *Int. J. Med. Microbiol.*, **301**, 570-576.
- **HARMSSEN, P. F. H., HACKMAN, M. M. and BOS, H. L. (2014).** Green building blocks for biobased plastics. *Biofuels Biopro. Bioref.*, **8**, 306-324.
- **HAWKES F., HUSSY I., KYAZZE G., DINSDALE R. and HAWKES D. (2007).** Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**, 172-84
- **HORI T., HARUTA S., UENO Y., ISHII M. and IGARASHI Y. (2006).** Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2, 1623-1630.

I

- **IBOUKHOULEF H. (2014).** Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancée basés sur le système Fenton-like (H₂O₂/Cu). Thèse. Doc. UMMTO, Tizi ouzou. 129.
- **INAREJOS-GARCIA A. M., GOMEZ-RICO A., SALVADOR M. D. and FREGAPANE G.**

(2009). Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition. *Eur. Food Res. Technol.*, **228**, 671-677.

- **INFANTES D., GONZALEZ DEL CAMPO A., VILLASEÑOR J. and FERNANDEZ F.J. (2011).** Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 15595-15601.

J

- **JAKSON D.W., SIMECKA J.W. and ROMEO T. (2002).** Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J. Bacteriol.*, **184**, 3406-3410.
- **JANAKAT S., AL-NABULSI A.A.R., ALLEHDAN S., OLAIMAT A.N. and ALAN HOLLEY R. (2015).** Antimicrobial activity of amurca (olive oil lees) extract against selected foodborne pathogens. *Food Sci. Technol., Campinas*, **35**, 2, 259-265.
- **JIMENEZ A.N.A., GUILLEN R., FERNANDEZ-BOLANOS J. and HEREDIA A. (1994).** Cell wall composition of olives. *J. Food Sci.*, **59**, 1192-1196.
- **JOBARD M., PESSIOT J., NOUAILLE R., and SIME-NGANDO T. (2014).** Microbial diversity supporting dark fermentation of waste. *Trends Biotechnol.*, **32**, 11, 549-550.
- **JOBARD M., PESSIOT J., NOUAILLE R., FONTY G. and SIME-NGANDO T. (2015).** Microbial diversity in support of anaerobic biomass valorization. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **37**, 1, 1-10.
- **JUSTINO C.I.L., PEREIRA R., FREITAS A., ROCHA-SANTOS T.A.P., PANTELEITCHOUK T.S.L. and DUARTE A.C. (2012).** Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology*, **21**, 615-629.

K

- **KACHOURIF., KSONTINI H., KRAIEM M., SETTI K., MECHMECHE M. and HAMDI M. (2016).** Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds. *J. Food Sci. Technol.*, **52**, 12, 7924-7933.
- **KALLEL M., BELAID C., MECHICHI T., KSIBI M. and ELLEUCH B. (2009).** Removal of organic load and phenolic compounds from olive mill wastewater by Fenton oxidation with zero-valent iron. *Chem. Eng. J.*, **150**, 391-395.
- **KALMIS E., AZBAR N., YILDIZ H. and KALYONCU F. (2008).** Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Bioresour. Technol.*, **99**, 1, 164-169.
- **KAPDAN I.K. and KARGI F. (2006).** Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme. Microb. Technol.*, **38**, 569-582.
- **KAPELLAKIS IE., TSAGARAKIS KP., AVRAMAKI CH. and ANGELAKIS AN. (2006).** Olive mill wastewater management in river basins: A case study in Greece. *Agri. Water Manag.*, **82**, 354-70.
- **KAPELLAKIS I.E., TSAGARAKIS K.P. and CROWTHER J.C. (2008).** Olive oil history, production and by-product management. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **7**, 1-26.
- **KATAOKA N., MIYA A. and KIRIYAMA K. (1997).** Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen producing anaerobic bacteria. *Water Sci. Technol.*, **36**, 41-7.
- **KESSLER B., WEUSTHUIS R., WITHOLT B. and EGGINK G. (2001).** Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **71**, 159-182.
- **KHANAL S., CHEN W.H., LI, L. and SUNG S. (2003).** Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrog. Energy.*, **29**, 1123-1131.
- **KHOUFI S., ALOUI F. and SAVADI S. (2006).** Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Res.*, **40**, 2007-2016.
- **KHOUFI S., HAMZA M. and SAYADI S. (2011).** Enzymatic hydrolysis of olive wastewater

for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresour. Technol.*, **102**, 9050-9058.

- **KHOUI S., LOUHICHI, A. and SAYADI S., (2015).** Optimization of anaerobic co-digestion of olive mill wastewater and liquid poultry manure in batch condition and semi-continuous jet loop reactor. *Bioresour. Technol.*, **182**, 67-74.
- **KIM S.H., HAN S.K. and SHIN H.S. (2006).** Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem.*, **41**,199-207.
- **KIM J.K., NHAT L., CHUN Y.N. and KIM S.W (2008).** Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **13**, 499-504.
- **KIM D.H., KIM S.H. and SHIN H.S. (2009).** Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme Microb. Technol.*, **45**, 181-187.
- **KOMNITSAS K., MODIS K., DOULA M., KAVVADIAS V., SIDERI D., ZAHARAKI D. (2016).** Geostatistical estimation of risk for soil and water in the vicinity of olive mill wastewater disposal sites. *Desalin. Water Treat.*, **57**,7, 2982-2995.
- **KOTAY S.M. and DAS D. (2008).** Biohydrogen as a renewable energy resource: prospects and potentials. *Int. J. Hydrog. Energy*, **33**, 1, 258-263.
- **KOTSOU M., MARI I., LASARIDI K., CHATZIPAVLIDIS I., BALIS C. and KYRIACOU A. (2004).**The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *App Soil Ecol*, **26**, 113-121.
- **KOTSYURBENKO O. R. (2005).** Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **53**, 1, 3-13.
- **KOTSYURBENKO O. R., FRIEDRICH M. W., SIMANKOVA M. V., NOZHEVNIKOVA A. N., GOLYSHIN P. N., TIMMI, K. N. and CONRAD R. (2007).** Shift from acetoclastic to H₂-dependent methanogenesis in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic *Methanobactetium* strain. *Appl Environ Microbiol*, **73**, **7**, 2344-2348.
- **KOUGIAS P. G., KOTSOPOULOS T. A. and MARTZOPOULOS G. G. (2010).** Anaerobic co-digestion of pig waste with olive mill wastewater under various mixing conditions. *Fres. Environ. Bull.*, **19**, 1682-1686.
- **KOUGIAS P.G., KOTSOPOULOS T.A. and MARTZOPOULOS G.G. (2014).** "Effect of feedstock composition and organic loading rate during the mesophilic co-digestion of olive mill wastewater and swine manure," *Renew Energ.*, **69**, 202-207.
- **KOUTROTSIOS G., LAROU E., MOUNTZOURIS K.C. and ZERVAKIS G.I. (2016).** Detoxification of olive mill wastewater and bioconversion of olive crop residues into high-value-added biomass by the choice edible mushroom *Hericium erinaceus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **180**, 2, 195-209.
- **KOUTROULI E.C., GAVALA H.N., SKIADAS I.V. and LYBERATOS G. (2006).** Mesophilic biohydrogen production from olive pulp. *Proc. Saf. Environ. Prot.*, **84**,285-289.
- **KOUTROULI E.C., KALFAS H., GAVALA H.N., SKIADAS I.V., STAMATELATOU K. and LYBERATOS G. (2009).** Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresour. Technol.*, **100**, 3718-3723.

L

- **LAGROUH F., DAKKA N. and BAKRI Y. (2017).** The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J. Mycol. Med.*, **27**,3, 303-311.
- **LAKHTAR H., ISMAILI-ALAOUI MA., PERRAUD-GAIME I., PHILIPPOUSSIS A. and ROUSSOS S. (2010).** Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **64**, 167-172.
- **LAMAN I. O. and ILBERT H. (2016).** Spécificités de l'oléiculture en montagne (région kabyle

- en Algérie) : pratiques culturelles et en eux de la politique oléicole publique. In : ATER M., ESSALOU H L., ILBERT H., MO KH LI A., KH ADARI B. L'oléiculture au Maroc de la préhistoire à nos jours : pratiques, diversité, adaptation, usages, commerce et politiques. Montpellier : CIHEAM, Options Méditerranéennes : Série A. *Séminaires Méditerranéens*, 118, 149 -159.
- **LAMBERT R. J. W., SKANDAMIS P. N. and COOTE P. J. (2001).** A study of the Minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 453- 462.
 - **LANCIOTTI R., GIANOTTI A., BALDI D., ANGRISANI R., SUZZI G., MASTROCOLA D. and GUERZONI ME. (2005).** Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.*, **96**, 317-22.
 - **LARA-VILLOSLADA F., OLIVARES M., SIERRA S., RODRIGUEZ J.M., BOZA J. and XAUS J. (2007).** Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br. J. Nutr.*, **1**, 96-100.
 - **LARIF M., OUHSSINE M., SOULAYMANI A. E. and ELMIDAOUI A. (2013).** Potential effluent oil mills and antibacterial activity polyphenols against some pathogenic strains. *Res. Chem. Intermed.*, **41**, 2, 1213-1225.
 - **LATRILLE E., TRABLY E. and LARROCHE C. (2011).** Production de biohydrogène : voie fermentaire somber. *Techniques De L'ingenieur*, BIO3351.
 - **LE VERGE S. (2004).** La fertilization à partir des residues de la trituration des olives. *Le Nouvel Olivier (OCL)* **42**, 5-21.
 - **LEDESMA-AMARO R. and NICAUD J.M. (2016).** Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol.* **34**,10, 798-809.
 - **LEE Z.K., LI S.L., LIN J.S., WANG Y.H., KUO P.C. and CHENG S.S. (2008).** Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. *Int. J. Hydrog. Energy*, **33**.5234-41.
 - **LEE D.J., SHOW and SU A. (2011).** Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. *Bioresour. Technol.*, **102**, 8393-402.
 - **LEE C.M., HUNG G.J. and YANG C.F. (2013).** Hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* WP 3-5 in a serial photobioreactor fed with hydrogen fermentation effluent. *Bioresour. Technol.*, **102**, 8350-8356.
 - **LEITE P., SALGADO J.M., VENÂNCIO A., DOMÍNGUEZ J.M. and BELO I. (2016).** Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.*, **214**, 737-746.
 - **LEOUIFOUDI I., ZYAD A., AMECHROUQ A., OUKERROU M. A., MOUSE H. A., MBARKI M. (2014).** "Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater," *Food Sci. Technol.*, **34**, 2, 249- 257.
 - **LESAGE-MEESSEN L., NAVARRO D., MAUNIER S., SIGOILLOT J.C., LORQUIN J., DELATTRE M., SIMON J.L., ASTHER M. and LABAT M. (2001).** Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.*, **75**, 501-507.
 - **LEULMI N. (2010).** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Mémoire de magister, UMC, Constantine. 75.
 - **LI C., and FANG H. H. P. (2007).** Fermentative hydrogen production from wastewater and wastes by mixed cultures. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1-39.
 - **LIN P.Y., WHANG LM., WU Y.R., REN W.J., HSIAO C.J. and LI S.L. (2007).** Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model. *Int. J. Hydrog. Energy*, **32**, 12, 1728-1735.
 - **LINARES A., CABA J.M., LIGERO F., DE LA RUBIA T. and MARTINEZ J. (2003).**

Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavidobrunnea*. *Chemosphere*, **51**, 887-891.

- **LOPEZ M.J.** and **RAMOS-CORMENZANA A.** (1996). Xanthan production from olive-mill wastewaters. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **38**, 263-270.
- **LOPEZ M.J.** **MORENO J.** and **RAMOS-CORMENZANA A.** (2001). *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. *Water Res.*, **35**, 828-1830.
- **LOPEZ DE LACEY A.M.**, **PEREZ-SANTIN E.**, **LOPEZ-CABALLERO M.E.** and **MONTERO P.** (2013). Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. *Food Sci. Technol.*, **30**, 1-9.
- **LUO G.**, **KARAKASHEV D.**, **XIE, L.**, **ZHOU Q.** and **ANGELIDAKI I.** (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**,8, 1816-27.

M

- **MACHEIX J.J.**, **FLEURIET A.** and **JAY-ALLEMAND C.H.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPTUR, Lausanne.
- **MADIGOU C.**, **POIRIER S.**, **BUREAU C.** and **CHAPLEUR O.** (2016). Acclimation strategy to increase phenol tolerance of an anaerobic microbiota. *Bioresour. Technol.*, **216**, 77-86.
- **MAHYUDIN A.R.**, **FURUTANI Y.**, **NAKASHIMADA Y.**, **KAKIZONO T.** and **NISHIO N.** (1997). Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 4,358-363.
- **MANDAL B.** **NATH K.** and **DAS D.**, (2006). Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 831-5.
- **MANNELLI F.**, **CAPPUCCI A.**, **PINI F.**, **PASTORELLI R.**, **DECOROSI F.**, **GIOVANNETTI L.**, **MELE M.**, **MINIERI S.**, **CONTE G.**, **PAUSELLI M.**, **RAPACCINI S.**, **VITI C.** and **BUCCIONI A.** (2018). Effect of different types of olive oil pomace dietary supplementation on the rumen microbial community profile in Comisana ewes. *Scientific Reports*, **8**, 8455, 1-11.
- **MARI I.**, **EHALOTIS C.**, **KOTSOU M.**, **BALIS C.** and **GEORGAKAKIS D.** (2003). Respiration profiles in monitoring the composting of by-products from the olive oil agro-industry. *Bioresour. Technol.*, **87**, 331-336.
- **MARTINEZ-GARCIA G.**, **JOHNSON A.C.**, **BACHMANN R.T.**, **WILLIAMS C.J.**, **BURGOYNE A.** and **EDYVEAN R.G.J.** (2009). Anaerobic treatment of olive mill wastewater and piggery effluents fermente with *Candida tropicalis*. *J. Hazar. Mater.*, **164**, 1398-13405.
- **MARTINEZ G.A.**, **BERTIN L.**, **SCOMA A.**, **REBECCHI S.**, **BRAUNEGG G.** and **FAVA F.** (2015). Production of polyhydroxyalkanoates from dephenolised and fermented olive mill wastewaters by employing a pure culture of *Cupriavidus necator*. *Biochem. Eng. J.*, **97**, 92-100.
- **MARTIN-LARA MA.**, **BLANZQUEZ G.**, **RONDA A.**, **RODRIGUEZ IL.** and **CALERO M.** (2012). Multiple biosorption-desorption cycles in a fixed-bed column for Pb(II) removal by acid-treated olive stone. *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**, 1006-1012.
- **MASSADEH MI** and **MODALLAL N.** (2008). Ethanol production from olive mill wastewater (OMW) pretreated with *Pleurotus sajor-caju*. *Ener. Fuels*, **150**, 22,150-154.
- **MATOS M.**, **BARREIRO M.F.** and **GANDINI A.** (2010). Olive stone as a renewable source of biopolyols. *Ind. Crop. Prod.*, **32**, 7-12.
- **MCDONALD S.**, **PRENZLER P.D.**, **ANTOLOVICH M.**, **ROBARDS K.** (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.*, **73**, 73-84.
- **MCNAMARA C. J.**, **ANASTASIOU C.C.**, **O'FLAHERTY V.** and **MITCHELL R.** (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **61**,127-134.

- **MEDINA E., DE CASTRO A., ROMERO C. and BRENES M. (2006).** Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agr. Food Chem.*, **54**, 14, 4954-4961.
- **MEDINA E., ROMERO C., BRENES M. and DE CASTRO A. (2007).** Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *J. Food Prot.*, **70**, 5, 1194-1199.
- **MEDINA E., ROMERO C., DE LOS SANTOS B., DE CASTRO A., GARCIA A., ROMERO F. and BRENES M. (2011).** Antimicrobial activity of olive solutions from stored Alpeorujo against plant pathogenic microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 13, 6927-6932.
- **MEGONIGAL J.P., HINE M.E. and VISSCHER P.T. (2004).** Anaerobic metabolism: linkages to trace gases and aerobic processes. In: Schlesinger, W.H. (Ed.), *Biogeochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, 317-424.
- **MERCADE M.E., MANRESA M.A., ROBERT M., ESPUNY M.J., ANDRES C. and GUINEA J. (1993).** Olive oil mill effluent. New substrate for biosurfactant production. *Bioresour. Technol.*, **43**, 1-6.
- **MILANESE M., DE RISI A., DE RICCARDIS A. and LAFORGIA D. (2014).** Numerical study of anaerobic digestion system for olive pomace and mill wastewater. *Energy, Procedia*, **45**, 141-149.
- **MONLAU F., BARAKAT A., TRABLY E., DUMAS C., STEYER J.P. and CARRÈRE H. (2013).** Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **43**, 260-322.
- **MONTEDORO G.F., BEGLIOMINI A.L., SERVILI M., PETRUCCIOLI M. and FEDERICIF. (1993).** Pectinase production from olive vegetation waters and its use in the mechanical olive oil extraction process to increase oil yield and improve quality. *Ital. J. Food Sci.*, **5**, 355-362.
- **MONTI M., BERTIN L., SCOMA A. and FAVA F. (2013).** Production of biohydrogen and volatile fatty acids from dephenolized olive mill wastewaters in a sequential two-step anaerobic process. *Environ. Eng. Manage. J.*, **12**, 11, 85-88.
- **MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E. and ROURA S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT, Food Sci. Technol.*, **38**, 565-570.
- **MORILLO J.A., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A., and MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2006).** Production of a metal-binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. *Curr. Microbiol.* **53**,189-193.
- **MORILLO JA., GUERRA DEL AGUILA V., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A. and MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2007).** Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1705-1710.
- **MORILLO J.A., AGUILERA M., ANTIZAR-LADISLAO B., FUENTES S., RAMOS-CORMENZANA A., RUSSELL NJ. and MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008a).** Molecular microbial and chemical investigation of the bioremediation of two-phase olive mill waste using laboratory-scale bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 309-317.
- **MORILLO JA., GARCIA-RIBERA R., QUESADA T., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A. and MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008b).** Biosorption of heavy metals by the EPS produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 2699-26704.
- **MOSTAFA S. S., EL-HASSANIN A. S., SOLIMAN A. SH. RASHAD S. and EL-CHAGHABY G. A. (2019).** Microalgae growth in effluents from olive oil industry for biomass production and decreasing phenolics content of wastewater. *EJAB*, **23**, 1, 359 -365
- **MOYA RAMÍREZ I., TSAOUSI K., RUDDEN M., MARCHANT R., JURADO**

- ALAMEDA E., GARCÍA ROMÁN M. and BANAT IM. (2015).** Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour. Technol.*, **198**, 231-236.
- **MUSSOLINE W., GIOVANNI E., GIORDANO A. and LENS P. (2012).** The anaerobic digestion of rice straw - a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **43**, 895-915.
 - **MUYZER G. and SMALLA K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in *Microb. Ecol., Antonie Leeuwenhoek*, **73**,127-141.
 - **MWAKALUKWA R., ASHOUR A., AMEN Y., NIWAA Y., TAMRAKARA S., MIYAMOTOD T. and SHIMIZU K. (2019).** Anti-allergic activity of polyphenolic compounds isolated from olive mill wastes. *J. Funct. Foods.*, **58**, 207-217.

N

- **NADOUR M., MOULTI-MATI F., MICHAUD P. and LAROCHE C. (2012).** Composition, structure, and valorisation of fibres from olive fruit and by products. *Agro Food Ind. Hi-Tec.*, **23**, 6, 18-22.
- **NADOUR M., LAROCHE C., PIERRE G., DELATTRE C., MOULTI-MATI F. and MICHAUD P., (2015).** Structural characterization and biological activities of polysaccharides from olive mill wastewater. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **177**, 2, 431-45.
- **NAJAR-SOUISSI S., OUEDERNI A. and RATEL A. (2005).** Adsorption of dyes onto activated carbon prepared from olive stones. *J. Environ. Sci.*, **17**, 998-1003.
- **NATH, K. and DAS, D. (2004).** Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**, 520-529.
- **NAVES P., DEL PRADO G., HUELVES L., GRACIA., RUIZ V., BLANCO J., RODRIGUEZ-CERRATO V., PONTE M.C. and SORIANO F. (2008).** Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* is method-dependent. *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 585- 590.
- **NIAOUNAKIS M. and HALVADAKIS C.P. (2004).** Olive mill waste management, literature review and patent survey. Athens, Greece: Typothito-George Dardanos, Athens.
- **NIAOUNAKIS M. and HALVADAKIS C.P. (2006).** Olive processing waste management literature review and patent survey. Waste management series, 5, 2nd ed. Elsevier.
- **NIJVELDT R. J., NOOD E., HOORN D. E., BOELEN S P.G., NORREN K. and LEEUWEN P. (2001).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**, 418-425.
- **NTAIKOU I., KOURMENTZA C., KOUTROULI E., STAMATELATOU K., ZAMPRAKA A., KORNAROS M. and LYBERATOS G. (2009).** Exploitation of olive oil mill wastewater for combined bio-hydrogen and biopolymers production. *Bioresour. Technol.*, **100**, 3724-3730.

O

- **OBIED H., ALLEN M., BEDGOOD D., PRENZLER P., ROBARDS K. and STOCKMANN R. (2005).** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. agricul. Food Chem.*, **53**, 823-837.
- **OBIED H.K., BEDGOOD J. D. R., PRENZLER D. and ROBARDS K. (2007).** Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food. Chem. Toxicol.*, **45**, 1238-1248.
- **OKAMOTO M., MIYAHARA T., MIZUNO O. and NOIKE T. (2000).** Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Sci. Technol.*, **41**(3), 25-32.
- **O-THONG S., PRASERTSAN P. and BIRKELAND N.K. (2009).** Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. *Bioresour. Technol.*, **100**, 909-18.

- **ÖZDEMİR Z. (2009)**. Growth inhibition of *Clavibacter Michiganensis subsp. Michiganensis* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato by olive mill wastewaters and citric acid . *J. Plant. Pathol.*, **91**, 1, 221-224.

P

- **PAGLIACCIA P., GALLIPOLI A., GIANICO A., MONTECCHIO D. and BRAGUGLIA C.M. (2015)**. Single stage anaerobic bioconversion of food waste in mono and co-digestion with olive husks: Impact of thermal pretreatment on hydrogen and methane production. *Int. J. Hydrog. Energy*, **41**, 2, 905-915.
- **PAIXAO N., PERESTRELO R., MARQUES J.C. and CAMARA J.S. (2007)**. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.*, **105**, 204-214.
- **PAPADAKI E. and MANTZOURIDOU F.T. (2019)**. Citric acid production from the integration of Spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.*, **280**, 59-69.
- **PAPANIKOLAOU S. and AGGELIS G. (2002)**. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.*, **82**, 43-49.
- **PAPANIKOLAOU S., GALIOTOU-PANAYOTOU M., FAKAS S., KOMAITIS M. and AGGELIS G. (2008)**. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresour. Technol.*, **99**, 7 , 2419-2428.
- **PAREDES M.J., MORENO E., RAMOS-CORMENZANA A. and MARTINEZ J. (1987)**. Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, **16**, 7, 1557-1564.
- **PAREDES C., CEGARRA J., ROIG A., SANCHEZ-MONEDERO M. A. and BERNAL M. P. (1999)**. Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresour. Technol.*, **67**, 111-115
- **PAREDES C., BERNAL M.P., CEGARRA J. and ROIG A. (2002)**. Biodégradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresour. Technol.*, **85**, 1-8.
- **PASTER, N., JUVEN, B. J. and HARSHEMESH H. (1988)**. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *J. Appl. Microbiol.*, **64**, 293-297.
- **PATRA A.K. (2011)**. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, **6**, 416-428.
- **PAUDEL S., MAGRATI T., LAMICHHANE J.R. (2011)**. Antimicrobial activity of wild olive crude extracts *in vitro*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2**, 3, 110-113.
- **PEREIRA A.P., FERREIRA I., MARCELINO F., VALENTÃO P., ANDRADE R. SEABRA R., ESTEVINHO L., BENTO A. and PEREIRA J.A. (2007)**. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) Leaves. *Molecules*, **12**, 5, 1153-1162.
- **PELLERA F.M. and GIDARAKOS E. (2016)**. Effect of substrate to inoculum ratio and inoculum type on the biochemical methane potential of solid agroindustrial waste. *J. Environ. Chem. Eng.*, **4**, 3, 3217-3229.
- **PERES F., MARTINS L. L. and FERREIRA-DIAS S. (2014)**. Laboratory-scale optimization of olive oil extraction: Simultaneous addition of enzymes and microtalc improves the yield. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **116**, 1054-1062.
- **PERES F., MARTINS L. L. and FERREIRA-DIAS S. (2017)**. Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **57**, 14, 3104-3126.
- **PESSIOT J., NOUAILLE R., JOBARD M., SINGHANIA R.R., BOURNILHAS A., CHRISTOPHE G., FONTANILLE P., PEYRET P., FONTY G. and LARROCHE C.**

- (2012). Fed-batch anaerobic valorization of slaughterhouse by-products with mesophilic microbial consortia without methane production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **167**, 1728-1743.
- **PINTO G., POLLIO A., PREVITERA L., STANZIONE M. and TEMUSSI F. (2003).** Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1657-9.
 - **PINTO-IBIETA F., SERRANO A., JEISON D., BORJA R. and FERMOSE F.G. (2016).** Effect of cobalt supplementation and fractionation on the biological response in the biomethanization of Olive Mill Solid Waste. *Bioresour. Technol.*, **211**, 58-64.
 - **PLASTINA P., BENINCASA C., PERRI E., FAZIO A., AUGIMERI G., POLAND M., WITKAMP R., MEIJERINK J. (2019).** Identification of hydroxytyrosyl oleate, a derivative of hydroxytyrosol with anti-inflammatory properties, in olive oil by-products. *Food Chem.*, **279**, 105-113.
 - **PULIDO R., BRAVO L. and SAURA-CALIXTO F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 8, 3396-3402.

R

- **RAFEHI H., VERVERIS K., KARAGIANNIS TC. (2012).** Mechanisms of action of phenolic compounds in olive. *Diet. Suppl.*, **9**, 2, 96-109.
- **RAFRAFI Y., TRABLY E., HAMELIN J., LATRILLE E., MEYNIAL-SALLES I., BENOMAR S., et al. (2013).** Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *Int. J. Hydrog. Energy*, **33**, 1-11.
- **RAHMANIAN N., JAFARI S.M. and GALANAKIS C.M. (2014).** Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **91**, 1, 1-18.
- **RAJHI H., MNIF I., ABICHOU M. and RHOUMA A. (2018).** Assessment and valorization of treated and non- treated olive mill wastewater (OMW) in the dry region. *Int. j. recycle. org. waste agric.*, **7**,3, 199-110.
- **RAMOS P., SANTOSC S. A. O., GUERRA Â.R., GUERREIRO O., FELÍCIO L., JERÓNIMO E., SILVESTRE A.J.D., NETOC C. P. and DUARTE M. (2013).** Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Ind. Crops. Prod.*, **46**, 359-368.
- **RAMOS-CORMENZANA A. (1986).** Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: Inter. Symp: On olive by-products valorization. Sevilla-Spain. 41-60.
- **RAMOS-CORMENZANA A., MONTEOLIVA-SANCHEZ M. and LOPEZ M.J. (1995).** Bioremediation of alpechin. *Int. Biodeterior. Biodegra.* **35**, 249-68.
- **RANALLI A. (1991).** The effluent from olive mills: Proposals for reuse and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, **38**, 19-34.
- **RANALLI A. and DE MATTIA G. (1997).** Characterization of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **74**, 1105-1113.
- **RANALLI A., CONTENTO S., SCHIAVONE C. and SIMONE N. (2001).** Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **103**, 228-238.
- **RASHAD S., EL-HASSANIN A.S., MOSTAFA S.S.M., EL-CHAGHABY G.A. (2019).** Cyanobacteria cultivation using olive milling wastewater for bio-fertilization of celery plant. *Global J Environ, Sci. Manage.* **5**, 2, 167-174.
- **RATLEDGE C., (2002).** Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 1047-1050.
- **REBOREDO-RODR_IGUEZ, P., GONZ-ALEZ-BARREIRO, C., CANCHO-GRANDE, B. and SIMAL-G_and ARA, J. (2014).** Improvements in the malaxation process to enhance the aroma quality of extra virgin olive oils. *Food Chem.*, **158**, 534-545.

- **REINER A., KROGFELT K., KLEIN A., ZECHNER B.M. and MOLIN E. (2006).** *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strain: impact of environmental and genetic factors. *J. Bacteriol.*, **188**, 3572-3581.
- **RIBEREAU-GAYON P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, 254.
- **RINCÓN B., BORJA R., MARTÍN M. and MARTÍN A. (2009).** Evaluation of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process of acidified olive mill solid residue from a previous hydrolytic-acidogenic step. *Waste Manag.*, **29**, 2566-2573.
- **RINCÓN B., BORJA R., MARTIN M.A. and MARTIN A. (2010).** Kinetic study of the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion process treating olive mill solid residue. *Chem. Eng. J.*, **160**, 215-9.
- **RINCÓN B., BUJALANCE L., FERMOSE F.G., MARTÍN A. and BORJA R. (2013).** Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: influence of thermal pretreatment on the process kinetics. *Bioresour. Technol.*, **140**, 249-255.
- **RINCON B., BUJALANCE L., FERMOSE F.G., MARTIN A. and BORJA R. (2014).** Effect of ultrasonic pretreatment on biomethane potential of two-phase olive mill solid waste: kinetic approach and process performance. *Sci. World J.*, 648-624.
- **RÍOS J. L. and RECIO M. C. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, **100**, 80-84.
- **RODIS P.S., KARATHANOS V.T. and MANTZAVINO A. (2002).** Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agr. Food. Chem.*, **50**, 596-601.
- **RODRIGUEZ M.M., PIREZ J., RAMOS-CORMENZANA A. and MARTINEZ J. (1988).** Effect of extracts obtained from olive oil mill waste on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *J. Appl. Bacteriol.*, **64**, 219-222.
- **RODRÍGUEZ J., KLEEREBEZEM R., LEMA J.M., and VAN LOOSDRECHT M.C.M. (2006).** Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 592-606.
- **RODRIGUEZ G., LAMA A., RODRIGUEZ R., JIMENEZ A., GUILLEN R. and FERNANDEZ-BOLANOS J. (2008).** Olive stones an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresour. Technol.*, **99**, 5261-5269.
- **RODRIGUES F., ANTÓNIA D.A., NUNES M.A.M. and PRIOR PINTO OLIVEIRA M. B. (2017).** Applications of Recovered Bioactive Compounds in Cosmetics and Health Care Products. In Book: **GALANAKIS C.M. Ed (2017).** Olive Mill Waste : Recent Advances for Sustainable Management. 255-268.
- **ROIG A., CAYUELA M.L. and SANCHEZ-MONEDERO M.A. (2006).** An overview on olive mill wastes and their valorization methods. *Waste Manage.*, **26**, 960-969.
- **ROILA R., BRANCIARI R., RANUCCI D., ORTENZI R., URBANI S., SERVILI M., VALIANI A., (2016).** Antimicrobial activity of olive mill wastewater extract against *Pseudomonas fluorescens* isolated from mozzarella cheese. *Ital. J. Food. Saf.*, **5**, 2, 5760.
- **ROILA R., RANUCCI D., VALIANI A., GALARINI R., SERVILI M., BRANCIARI R. (2019a).** Antimicrobial and anti-biofilm activity of olive oil by-products against *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat. *Acta. Sci. Pol. Technol. Aliment.*, **18**, 1, 43-52.
- **ROILA R., VALIANI A., RANUCCI D., ORTENZI R., SERVILI M., VENEZIANI G. and BRANCIARI R. (2019b).** Antimicrobial efficacy of a polyphenolic extract from olive oil by-product against “Fior di latte” cheese spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**, 295, 49-53.
- **ROMERO-GARCIA J.M., NIÑO L., MARTINEZ-PATIÑO C., ÁLVAREZ C., CASTRO E., NEGRO M.J. (2014).** Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends, *Bioresour. Technol.* **159**, 421–432.
- **RUBIO J.A., ROMERO L.I., WILKIE A.C., GARCÍA-MORALES J.L. (2019).** Mesophilic Anaerobic Co-digestion of Olive-Mill Waste With Cattle Manure: Effects of Mixture Ratio.

Front. Sustain. Food Syst., **3**, 9.

- **RUBIO-SENENT F., RODRÍGUEZ-GUTIERREZ G., LAMA-MUÑOZ A., GARCÍA A.** and **FERNANDEZ-BOLAÑOS J. (2015)**. Novel pectin present in new olive mill wastewater with similar emulsifying and better biological properties than citrus pectin. *Food Hydrocoll.*, **50**, 237-246.
- **RUGGERI B., BATTISTA F., BERNARDI M., FINO D.** and **MANCINI G. (2015)**. The selection of pretreatment options for anaerobic digestion (AD): A case study in olive oil waste production. *Chem. Eng. J.*, **259**, 630-639.
- **RUIZ-MENDEZ M.V., ROMERO C., MEDINA E., GARCIA A., DE CASTRO A.** and **BRENES M. (2013)**. Acidification of alperujo paste prevents off-odors during their storage in open air. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **90**, 3, 401-406.

S

- **SAAVEDRA M., BENITEZ E., CIFUENTES C.** and **NOGALES R. (2006)**. Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation*, **17**, 93-102.
- **SABBAH I., MARSOOK T.,** and **BASHEER S. (2004)**. The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process Biochem.*, **39**, 1947-1951.
- **SADKAOUI A., JIMENEZ A., PACHECO R.** and **BELTRAN G. (2015)**. Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil in water emulsion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **118**, 4, 545-552.
- **SAKAKI S. (2014)**. Etude de la production des acides gras volatils à partir de la fermentation acidogène des boues d'épuration des effluents issus d'une usine de pâtes et papiers Mémoire de Maîtrise en Sciences de l'eau à l'INRS et Master en Sciences de l'eau et de l'environnement. Université du Québec.8.
- **SAMPEDRO I., MARINARI S., D'ANNIBALE A., GREGO S., OCAMPO J.A.** and **GARCIA-ROMERA I. (2007)**. Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **60**, 116-25.
- **SANCHEZ V. S., MARTINEZ S.M.E., ESPEJO C.M.T.** and **DELGADO P.A. (1996)**. Production of microalgae from Olive Mill Wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **38**, 3-4, 245-247.
- **SARATALE G.D., CHEN S., LO Y., SARATALE R.G.** and **CHANG J. (2008)**. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation - a review. *J. Sci. Ind. Res.*, **67**, 962-79.
- **SARRIS D., MATSAKAS L., AGGELIS G., KOUTINAS A. A.** and **PAPANIKOLAOU S. (2014)**. Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Ind. Crops. Prod.*, **56**, 83-93.
- **SARRIS D., STOFOROS N.G., MALLOUCHOS A., KOOKOS I.K., KOUTINAS A.A., AGGELIS G.** and **PAPANIKOLAOU S. (2017)**. Production of added-value metabolites by *Yarrowia lipolytica* growing in olive mill wastewater-based media under aseptic and non-aseptic conditions. *Eng. Life Sci.*, **17**, 6, 695-709.
- **SAYADI S., ALLOUCHE N., JAOUA M.** and **ALOUI F. (2000)**. Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochem.*, **35**, 725-735.
- **SCHIEVANO A., TENCA A., LONATI S., MANZINI E.** and **ADANI F. (2014)**. Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass?. *Appl. Energ.*, **124**, 335-342.
- **SCHNEIDER H., SCHWIERTZ A., COLLINS M. D.** and **BLAUT M. (1999)**. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch.*

Microbiol., **171**, 81-90.

- **SCOMA A., BERTIN L., ZANAROLI G., FRARACCIO S., FAVA F. (2011).** A physicochemical-biotechnological approach for an integrated valorization of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.*, **102**, 10273-10279.
- **SCOMA A., CORREDOR F.V., BERTIN L., GOSTOLI C. and BANDINI S. (2016).** Recovery of VFAs from anaerobic digestion of dephenolized olive mill wastewaters by electrodialysis. *Sep. Purif. Technol.*, **159**, 8, 81-91.
- **SENANI-OULARBI N., MOULTI-MATI F., LETTERON P., DUCROC R., EL BENNA J. and MARIE J.C. (2016).** Hypoglycemic effect of olive mill wastewater in mice involves the sglt-1 transporter. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **9**, 1, 73.
- **SENANI-OULARBI N., RIBA A. and MOULTI-MATI F. (2018).** Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production by olive mill wastewater. *Bioscience Research*, **15**, 1, 369-380.
- **SHOW K. Y., LEE D.J. and CHANG J.S. (2011).** Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresour. Technol.*, **102**, 8524-8533
- **SICILIANO A., STILLITANO M.A., and DE ROSA S. (2016).** Biogas production from wet olive mill wastes pretreated with hydrogen peroxide in alkaline conditions. *Energy*, **85**, 903-916.
- **SILVA F. C., SERAFIM L. S., NADAIS H., ARROJA L. and CAPELA I. (2013).** Acidogenic fermentation towards valorisation of organic waste streams into volatile fatty acids. *Chem. Biochem. Eng.*, **27**, 4, 467-476.
- **SILVAN J.M., PINTO-BUSTILLOS M.A., VÁSQUEZ-PONCE P., PRODANOV M., MARTINEZ-RODRIGUEZ and A.J. (2019).** Olive mill wastewater as a potential source of antibacterial and anti-inflammatory compounds against the foodborne pathogen *Campylobacter*. *Innov. Food Sci. Emer. Technol.*, **51**, 177-185.
- **SINGLETON V.L. and ROSI J.A. (1965).** Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158
- **SISTI, L., TOTARO, G., BOZZI CIONCI, N., DI GIOIA, D., CELLI, A., VERNEY, V. and LEROUX, F. (2019).** Olive Mill Wastewater Valorization in Multifunctional Biopolymer Composites for Antibacterial Packaging Application. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 10, 2376.
- **SKALTSOUNIS L.A. (2015).** Chemical and biological investigation of olive mill wastewater OMWW secoiridoid lactones. *Planta Med.*, **81**, 12-13, 1205-1212.
- **SOUILEM S., EL-ABBASSI A., KIAI H., HAFIDI A., SAYADI S. and GALANAKIS C.M. Ed (2017).** Olive Oil Production Sector: Environmental Effects and Sustainability Challenges. In Book: **GALANAKIS C.M. Ed (2017).** Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management. 1-20.
- **STAMS A.J.M. and PLUGGE C.M. (2009).** Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 8, 568-577.
- **STASINAKIS A.S., ELIA I., PETALAS A.V. and HALVADAKIS C.P. (2008).** Removal of total phenols from olive- mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *J. Hazard. Mater.*, **160**, 408-13.
- **SYDNEY B.E., LARROCHE C., NOVAK A.C., NOUAILLE R., SARMA S.J., BRAR S. K., LETTI L.A.J., SOCCO V.T.L., SOCCOL C.R. (2014).** Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresour. Technol.*, **159**, 380-386.

T

- **TAFESH A., NAJAMI N., JADOUN J., HALAHLIH F., RIEPL H. and AZAIZEH H. (2011).** Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2011, **9**, 431021.
- **TAHERZADEH M.J. and KARIMI K. (2008).** Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review ethanol and biogas production. *Int. J. Mol. Sci.*,

9, 9, 1621–1651.

- **TAMBORRINO A., ROMANIELLO R., ZAGARIA R. and LEONE A. (2014).** Microwave-assisted treatment for continuous olive paste conditioning: Impact on olive oil quality and yield. *Biosyst. Eng.*, **127**, 92-102.
- **TANISHO S., KUROMOTO M. and KADOKURA N. (1998).** Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy*, **23**, 559-563.
- **TASSOU C. C., NYCHAS, G. J. and BOARD R. G. (1991).** Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**, 2, 231-237.
- **TASSOU C. C. and NYCHAS G. J. (1995).** Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 2, 120-124.
- **TEICHMANN K., KULIBERDA M., SCHATZMAYR G., PACHER T., ZITTERLEGLSEER K., JOACHIM A. and FRANZ H. (2016).** *In vitro* inhibitory effects of plant-derived by-products against *Cryptosporidium parvum*. *Parasite*, **23**, 41.
- **THAKKER C., MARTINEZ I., SAN, K. Y. and BENNETT G. N. (2012).** Succinate production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.*, **7**, 213-224.
- **TRABLY E., GIUDICI-ORTICONI M.T., BENOMAR S., LATRILLE E., MEYNIAL-SALLES I., RAFRAFI Y., HAMELIN J. and STEYER J.P. (2013).** Ingénierie écologique microbienne pour la production de biohydrogène. *Innovations Agronomiques*, **26**, 67-82.
- **TRANter H. S., TASSOU S. C. and NYCHAS G. J. (1993).** The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 3, 253-259.
- **TSANGALIS D., ASHTON J.F., MCGILL A.E.J. and SHAH N. P. (2002).** Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by b-glucosidase-producing Bifidobacteria. *J. Food. Sci.*, **67**, 3104-3113.
- **TSIMIDOU M., PAPADOPOULOS G. and BOSKOU D. (1992).** Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reverse-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.*, **44**, 53-60.

V

- **VAGELAS I., KALORIZOU H., PAPACHATZIS A. and BOTU M. (2009).** Bioactivity of Olive Oil Mill Wastewater Against Plant Pathogens and Post-Harvest Diseases. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **23**, 2, 1217-1219.
- **VAGELAS I., PAPACHATZIS A., KALORIZOU H. and WOGIATZI E. (2009).** Biological Control of *Botrytis* Fruit Rot (Gray Mold) on Strawberry and Red Pepper Fruits by Olive Oil Mill Wastewater. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **23**, 4, 1489-149.
- **VAIDYA V., CAROTA E., CALONZI D., PETRUCCIOLI M., D'ANNIBALE A. (2019).** Production of lignin-modifying enzymes by *Trametes ochracea* on high-molecular weight fraction of olive mill wastewater, a byproduct of olive oil biorefinery. *N. Biotechnol.*, **50**, 44-51.
- **VALDEZ-VAZQUEZ I., RIOSLEAL E., ESPARZA GARCIA F., CECCHI F. and POGGI VARALDO H. (2005).** Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrog. Energy*, **30**, 13-14, 1383-1391.
- **VENEZIANI G., NOVELLI E., ESPOSTO S., TATICCHI A. and SERVILL, M. (2017).** Applications of recovered bioactive compounds in food products. In book : **GALANAKIS C.M.** (Ed.). Olive mill Waste: Recent advances for the sustainable management. 231–253.
- **VENKATA MOHAN S., LALIT BABU V. and SARMA P.N. (2008).** Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour. Technol.*, **99**, 59-67.
- **VICHI S., BOYNUEGRI P., CAIXACH J., ROMERO A. (2015).** Quality losses in virgin olive oil due to washing and short term storage before olive milling. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*,

117, 12, 2015-2022.

- **VIERHUIS E., SERVILI M., BALDIOLI M., SCHOLS H.A., VORAGEN A.G.J. and MONTEDORO G. (2001).** Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1218-1223.
- **VIERHUIS E., KORVER M., SCHOLS H.A. and VORAGEN, A.G.J. (2003).** Structural characteristics of pectic polysaccharides from olive fruit (*Olea europaea cv moraiolo*) in relation to processing for oil extraction. *Carbohydr. Polym.*, **51**, 135-148.
- **VISIOLI F., POLI A. and GALLI C. (2002).** Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.*, **22**, 1, 65-75.
- **VLYSSIDES A.G., LOIZIDES M. and KARLIS P.K. (2004).** Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J. Clean. Prod.*, **12**, 603-611.

W

- **WANG J. and WAN W. (2008).** Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *Int. J. Hydrog. Energy*, **33**, 2934-2941.
- **WANG J. and WAN W. (2009a).** Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *Int. J. Hydrog. Energy*, **34**, 799-811.
- **WANG J. and WAN W. (2009b).** Kinetic models for fermentative hydrogen production: a review. *Int. J. Hydrog. Energy*, **34**, 3313-3323.
- **WANG J. and WAN W. (2011a).** Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge. *Biomass Bioenerg.*, **35**, 3896-38901.
- **WANG Y.Y., AI P., HU C.X. and ZHANG Y.L. (2011b).** Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. *Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 390-396.
- **WILLIAM S R. (1994).** Bergey's manual of Detemination Bacteriology, 3^{ème} édition. Hensyl, États-unis.
- **WONG Y.M., WU T.Y. and JUAN J.C. (2014).** A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renew Sust. Ener. Rev.*, **34**, 471-82.

X

- **XU K., LIU H. and CHEN J. (2010).** Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archeal community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion. *Bioresour. Technol.*, **101**, 2600-2607.

Y

- **YAHIAOUI N. (2012).** Etudes de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxyapatite et charbon actif. Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. Thèse de magistère, Faculté des sciences. Spécialité chimie, 106.
- **YANGUI T., SAYADI S., GARGOUBI A. and DHOUB A. (2010).** Fungicidal effect of hydroxytyrosol rich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*. *Crop. Prot.*, **29**, 1208-1213.
- **YANGUI T., SAYADI S., CHAKROUN H. and DHOUB A. (2011).** Effect of hydroxytyrosol-rich preparations on phenolic-linked antioxidant activity of seeds. *Engin Life Sci*, **11**, 511-516.
- **YARIMTEPE C.C., NILGÜN A., OZ N.A. and INCE O. (2017).** Volatile fatty acid production dynamics during the acidification of pretreated olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.*, **241**, 936-944
- **YE R., JIN Q., BOHANNAN B.J.M., KELLER J.K. and BRIDGHAM S.D. (2014).** Homoacetogenesis : A potentially underappreciated carbon pathway in peatlands. *Soil. Biol. Biochem.*, **68**, 385-391.
- **YESILADA O. SIK S. and SAM M. (1997).** Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 37-42.
- **YIN H.C., DONG X., LV L., WANG Z.G., XU Q.Q., LIU X-L. and YAN H. (2013).**

Economic production of probiotics from kitchen waste. *Sci. Biotechnol.*, **22**, 1, 59-63.

- **YORULMAZ A., TEKIN A. and TURAN S. (2011).** Improving olive oil quality with double protection: Destoning and malaxation in nitrogen atmosphere. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 637-643.
- **YOUSUF A., SANNINO F., ADDORISIO V. and PIROZZI D.J. (2010).** Microbial conversion of olive oil mill wastewaters into lipids suitable for Biodiesel Production. *Agric. Food Chem.*, **58**, 8630-8635.

Z

- **ZAHEDI S., SALES D., ROMERO LI. and SOLERA R. (2014).** Dark fermentation from real solid waste. Evolution of microbial community. *Bioresour. Technol.*, **151**, 221-226.
- **ZAIER H., CHMINGUI W., RAJHI H., BOUZIDI D., ROUSSOS S. and RHOUMA A. (2017).** Physico-chemical and microbiological characterization of olive mill wastewater (OMW) of different regions of Tunisia (North, Sahel, South). Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines de différentes régions de la Tunisie (Nord, Sahel, Sud). *Agri. BioTech.*, **48**, 2, 2897-2906.
- **ZEMA D.A., ZAPPIA G., BENALIA S., G. ZIMBALATTI PERRI E., URSO E., TAMBURINO V. and BERNARDI B. (2018).** Limiting factors for anaerobic digestion of olive mill wastewater blends under mesophilic and thermophilic conditions. *J. Agric. Res.*, **49**, 2, 130-137.
- **ZENJARI B., EL HAJJOUJI H., AIT BADDI G., BAILLY J-R., REVEL J-C., NEJMEDDINE A. and HAFIDI M. (2006).** Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater-straw mixtures. *J. Hazard. Mater.*, **138**, 433-437.
- **ZERVA A., ZERVAKIS G.I., CHRISTAKOPOULOS P. and TOPAKAS E. (2017).** Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *J. Environ. Manage.*, **203**, 791-798.
- **ZHANG Z.P., SHOW K.Y., TAY J.H., LIANG D.T., LEE D.J. and JIANG W.J. (2006).** Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem.*, **41**, 10, 2118- 2123.
- **ZHANG J. and HUANG P.L. (2007).** Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 879-884.
- **ZHU H. and BELAND M. (2006).** Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int. J. Hydrog. Energy*, **31**, 1980-1988.
- **ZIREHPOUR A., RAHIMPOUR A., JAHANSHAHI M. and PEYRAVI M. (2014).** Mixed matrix membrane application for olive oil wastewater treatment: process optimization based on Taguchi design method. *J. Environ. Manag.*, **132**, 113-120.

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

1/ Publications internationales

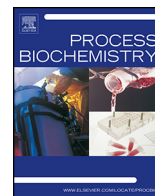
- **Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F. and Michaud P. (2013).** Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48: 1532-1552 .www.journals.elsevier.com.
- **Dermeche S. and Moulti-Mati F. (2019).** Assessment of olive mill wastewaters bioconversion potential into biotechnological and health interest microbial biomass, *Algerian J. Env. Sc. Technology*, 5: 1, 898-908.

2/ Communications internationales

- **Dermeche S., Moulti-Mati F., Nouaille R., Christophe G., Pessiot J., Fontanille P., Larroche C. (2011).** Valorization of olive mill by-products through biological hydrogen and volatile fatty acids production. International Congress of New Horizons in Biotechnology, à Trivandrum, Inde.
- **Dermeche S., Michaud P. et Moulti-Mati F. (2014).** Evaluation de l'activité antibactérienne des composés phénoliques extraits de margines. Premier colloque international de Biotechnologie végétale et Microbienne, 2-3 décembre, Oran, Algérie.
- **Dermeche S. et Moulti-Mati F. (2015).** Sensibilité de souches uro-pathogènes vis-à-vis de biomolécules extraites de margines. Communication affichée au Premier Colloque international de biologie Appliquée. 29 Novembre au 01 Décembre, Oran, Algérie.
- **Dermeche S. and Moulti-Mati F. (2019).** Toward biotechnological conversion of olive oil mill by-products into valuable biomolecules and microbial biomass. International Conference on Food, Nutrition, and Agriculture (ICFNA-19) on Sep 27-28, Istanbul (Turkey).

3/ Communications nationales

- **Dermeche S. and Moulti-Mati F. (2018).** Bioconversion des sous-produits oléicoles en biogaz et acides gras volatils, 2^{ème} Salon National des Produits de la Recherche Palais des Expositions, Pins Maritimes - SAFEX- Alger.
- **Dermeche S., Moulti-Mati F et Michaud P. (2014).** Bioconversion des margines par fermentation anaérobie. Effet de la dilution et de l'extraction des polyphénols, 20^{ème} Journées Nationales de Microbiologie, 12-13 novembre 2014, Jijel, Algérie.



Review

Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies

S. Dermeche^{a,1}, M. Nadour^{a,1}, C. Larroche^b, F. Moulti-Mati^a, P. Michaud^{b,*}^a Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Université M. Mammeri, BP N° 17 RP, 15000 Tizi Ouzou, Algeria^b Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal UMR CNRS 6602, Polytech' Clermont-Ferrand, 24 avenue des Landais, BP-20206, 63174 Aubière, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2012

Received in revised form 15 July 2013

Accepted 16 July 2013

Available online 24 July 2013

Keywords:

Olive

Phenolic compounds

Polysaccharide

Olive mill wastewater

Olive pomace

Bioconversion

ABSTRACT

The olive mill waste generated from olive oil extraction is a major environmental issue, particularly in Mediterranean areas. The extraction of olive oil is achieved through discontinuous or continuous processes. The two processes yield three fractions: a solid residue and two liquid phases (oil and olive mill wastewater). The characterization of these two by-products showed that they are mainly composed of phenolic compounds, carbohydrates, organic acids and mineral nutrients variably distributed depending on the process employed and the agronomic practices. Untreated olive by-products discharged between November and March into the environment are a major ecological issue for olive oil-producing countries due to their high toxic organic loads, low pH, and high chemical and biological demands. In this context, recent research studies highlight on the treatment approaches and valorization options for dealing with olive mill waste residues, predominantly those allowing for the recovery of valuable natural components such as phenolic compounds, dietary fibers, animal feed, biofuel, biogaz, enzymes, polymers and other. The impact of the chemical heterogeneity and water content of olive mill by-products about these processes of valorization and bioconversion is discussed.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	1533
2. Processes for the extraction of olive oil and its associated by-products.....	1533
3. Chemical compositions of olive by-products.....	1535
3.1. General composition.....	1535
3.2. Phenolic compounds.....	1535
3.2.1. Recovery of phenolic compounds.....	1535
3.2.2. Phenolic compounds from liquid residue: OMWW.....	1537
3.2.3. Phenolic compounds in solid residues: olive pomace.....	1537
3.3. Carbohydrates: purification and structure.....	1538
4. Environmental impacts of OMWW.....	1540
4.1. Soil pollution and phytotoxicity.....	1540
4.2. Water pollution.....	1541
4.3. Air pollution.....	1541
5. Applications and bioconversion of olive oil by-products.....	1541
5.1. Agricultural uses.....	1541
5.2. Production of bioactive phenolic compounds.....	1543

Abbreviations: AIR, alcohol-insoluble residue; Ara, arabinose; BOD, biological oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; CPBR, Cylindrical PhotoBioReactor; CSTR, Continuous Stirred Tank Reactor; 3,4-DHPEA-EDA, Decarboxymethyl Oleuropein-Aglycone; DF, dietary fiber; FPBR, flat photobioreactor; Gal, galactose; GalA, galacturonic acid; Glc, glucose; HPLC, High-Performance Liquid Chromatography; HPP, hydrogen production potential; HRT, hydraulic retention time; Man, mannose; NDF, neutral detergent fiber; OMWW, olive mill wastewater; PHAs, polyhydroxyalkanoates; Rha, rhamnose; TPOMW, two-phase olive mill waste; SFE, supercritical fluid extraction; VFA, volatile fatty acids; Xyl, xylose.

* Corresponding author.

E-mail address: philippe.michaud@univ-bpclermont.fr (P. Michaud).¹ Both contributed equally to this work.

Assessment of olive mill wastewaters bioconversion potential into biotechnological and health interest microbial biomass

S. Dermeche, F. Moulti-Mati

Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University, Tizi-Ouzou, Algeria.

*Corresponding author: dermeche.s@yahoo.fr

ARTICLE INFO

Article History:

Received : 20/11/2018

Accepted : 30/01/2019

Key Words:

Olive mill wastewaters;
Polyphenol;
Antibacterial;
Probiotic;
Oleaginous yeasts.

ABSTRACT/RESUME

Abstract: Olive mill by-products which are characterized by powerful antioxidant and recalcitrant compounds to biodegradation represent an important environmental problem. They are produced in huge quantities in short periods of time. Therefore, finding a suitable biovalorization strategy to exploit these by-products is a great interest. In this context, the current study aimed to olive mill wastewaters (OMWW) bioconversion into valuable microbial biomass, oleaginous yeasts, as well as healthy probiotic bacteria as enrichment substrat. This study also describes and discusses the antimicrobial potential of OMWW. Yeasts and bacterial growth was monitored by plating on malt extract agar (MEA) and Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSa) agar respectively. The antimicrobial properties of ethyl acetate polyphenolic extracts from fermented and unfermented OMWW were assessed using the disc diffusion method. The experiments trials reveals that the raw OMWW exert a strong inhibition against oleaginous yeasts and probiotic bacteria while substrate dilution or enrichment led to cell growth promoting and polyphenol removal. Moreover, polyphenolic extracts provide a wide antimicrobial spectrum potential against pathogenic and food spoiling bacteria. Thus, OMWW could be considered as a beneficial and valuable nutritional source for microbial biomass production and mainly those are of biotechnological and health interest.

I. Introduction

Because of the growing interest and demand in high dietetic and healthy nutritional value compounds, olive oil production is an expanding industrial sector worldwide which yields reached a value close to 2.89 million tons in 2017 [1]. Olive oil extraction process leads to two residues: a solid fraction, olive mill solid residu (OMSR), resulting from the pressed olive oil vegetation (olive cake or Amegruche in Kabylia region, Algeria) and a liquid fraction, commonly known as OMWW as well as Alpechin, Amurca [2] and Amuredj in Kabylia region. In pressure (traditional method) or three-phase centrifugation process effluents are olive pomace and OMWW, whereas in a two-phase centrifugation oil extraction system, the effluent is

composed of wet olive pomace. The structural characterization of these two natural by-products showed that they are mainly composed of simple and complexes polyphenolic compounds, pectines and prebiotic polysaccharides, organic acids and mineral nutrients variably distributed depending on the employed olive oil extraction process and the agronomic practices [3, 4, 5]. Beside, OMWW are associated to a huge pollution issues due to their color darkness and high content of phenolic compounds. Unfortunately, OMWW are often disposed in evaporation ponds or various environmental receptors leading to strong odor nuisance, soil contamination, plants growth or germination inhibition [3, 5].

OMWW can be considered as serious threat to the aquatic flora and fauna, thus severe effects on

Annexes

ANNEXE 1 : Milieux de culture, solution et réactifs.

• Composition des milieux de culture

➤ **Gélose Müller Hinton (g/L)**

- Extraits de viande.....	3
- Amidon.....	1,5
- Hydrolysate acide de caséine	17,5
- Agar.....	18
- pH.....	7,4

➤ **Gélose Nutritive (g/L)**

- Peptone.....	10
- Extrait de viande	3
- Extrait de levure.....	3
- NaCl	5
- Agar.....	18
- pH.....	7,3
- Stérilisation à 120°C/15 min.	

➤ **Bouillon cœur cervelle (BHIB) (g/L)**

- Protéose-peptone	10
- Infusion de cervelle de veau	12,5
- Infusion de cœur de bœuf	5
- Glucose	2
- NaCl	5
- Na ₂ HPO ₄	2,5
- Eau distillée	1L
- pH.....	7,4
- Stérilisation à 120°C/15 min.	

➤ **Potato Dextrose Agar (PDA) (g/L) :**

- Pomme de terre.....	200
- Glucose.....	20
- Eau distillée	1L

Préparation :

- Laver la pomme de terre et couper en cubes dans 300 mL d'eau distillée ;
- Porter à ébullition puis écraser la pomme de terre ;
- Filtrer puis ajouter le glucose ;
- Compléter le volume à 1 litre.

➤ **Milieu MM (g/L) ou mL/L**

Solution minérale I.....	85mL
- K ₂ HPO ₄	6

Solution minérale II	85mL
- KH ₂ PO ₄	6
- NH ₄ Cl.....	12
- NaCl	1,2
- MgSO ₄	1,2
- CaCl ₂	1,2
- Solution de vitamines.....	10mL
- Extrait de levure.....	0,5
- Tryptone	1
- Eau distillée	1L
- pH	7

• **Solutions, colorants et réactifs**

➤ **Eau physiologique stérile (g/L)**

- NaCl	9
- Eau distillée	1L
- pH.....	7
- Stérilisation à 120°C/15 min.	

➤ **Tampon phosphate salin (PBS) (g/L)**

- NaCl	8
- KCl.....	0,2
- Na ₂ HPO ₄	1,44
- KH ₂ PO ₄	0,24
- Eau distillée.....	1L
- pH.....	7,5

➤ **Cristal Violet (g/L)**

- Poudre de cristal violet.....	10
- Eau distillée.....	1L

➤ **Résazurine (g/L)**

- Résazurine	10
- Eau distillée.....	1L

➤ **Solution de carbonate de sodium (7%)**

- Na ₂ CO ₃	7g
- Eau distillée.....	100mL

➤ **Solution de DPPH (0,1mM)**

- DPPH	3,9mg
- Étanol	100mL

ANNEXE 2 : Exemples de spectres d'analyse

- Analyse des produits issus des bioconversions

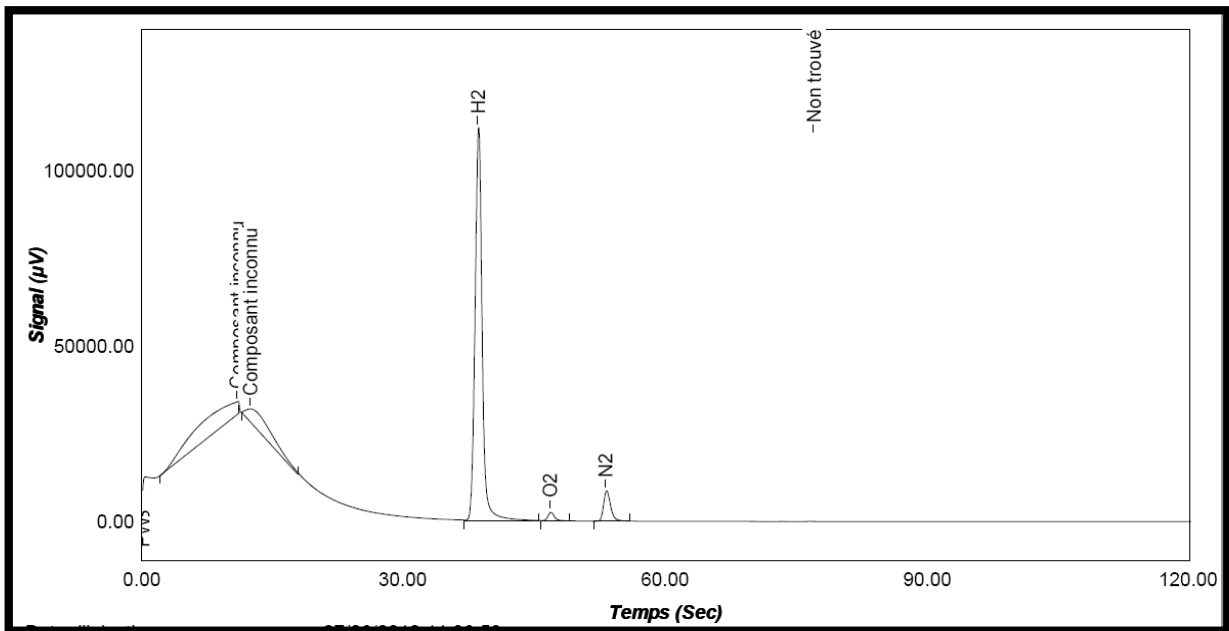


Figure 1. Exemple d'un spectre d'analyse de biogaz par micro-GC.

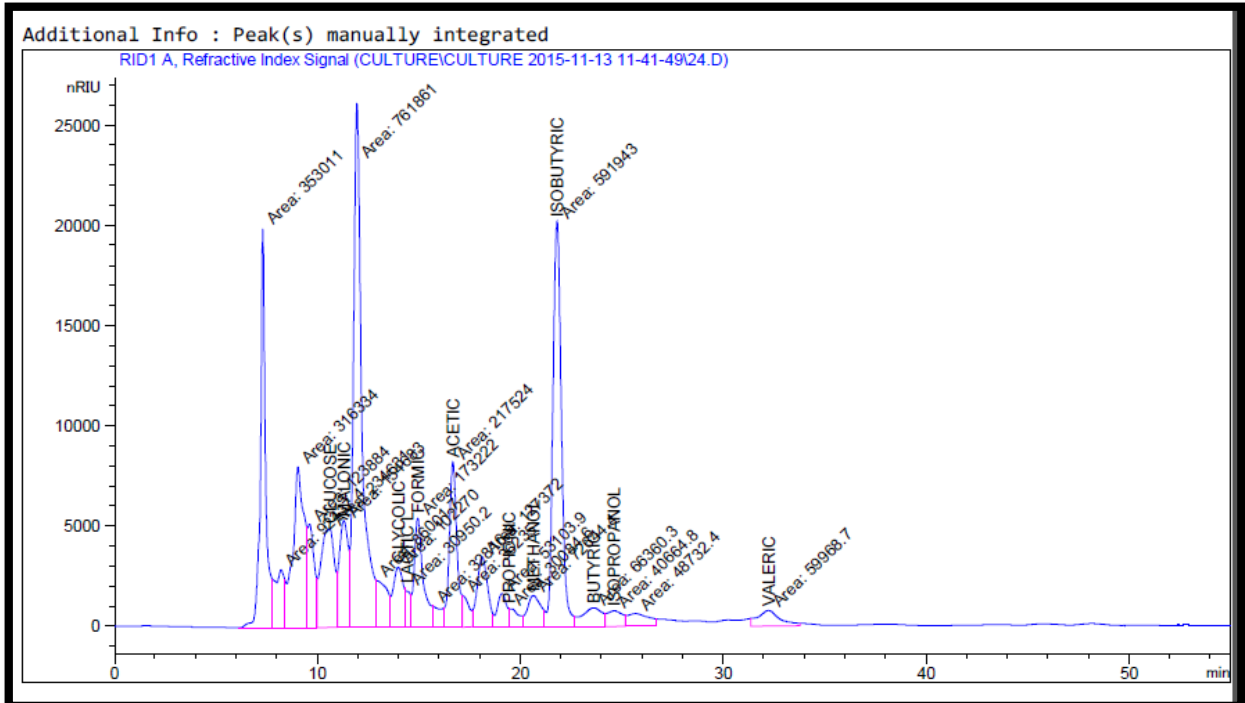


Figure 2. Exemple d'un spectre d'analyse des AGVs par HPLC.

ANNEXE 3 : Analyse du grignon

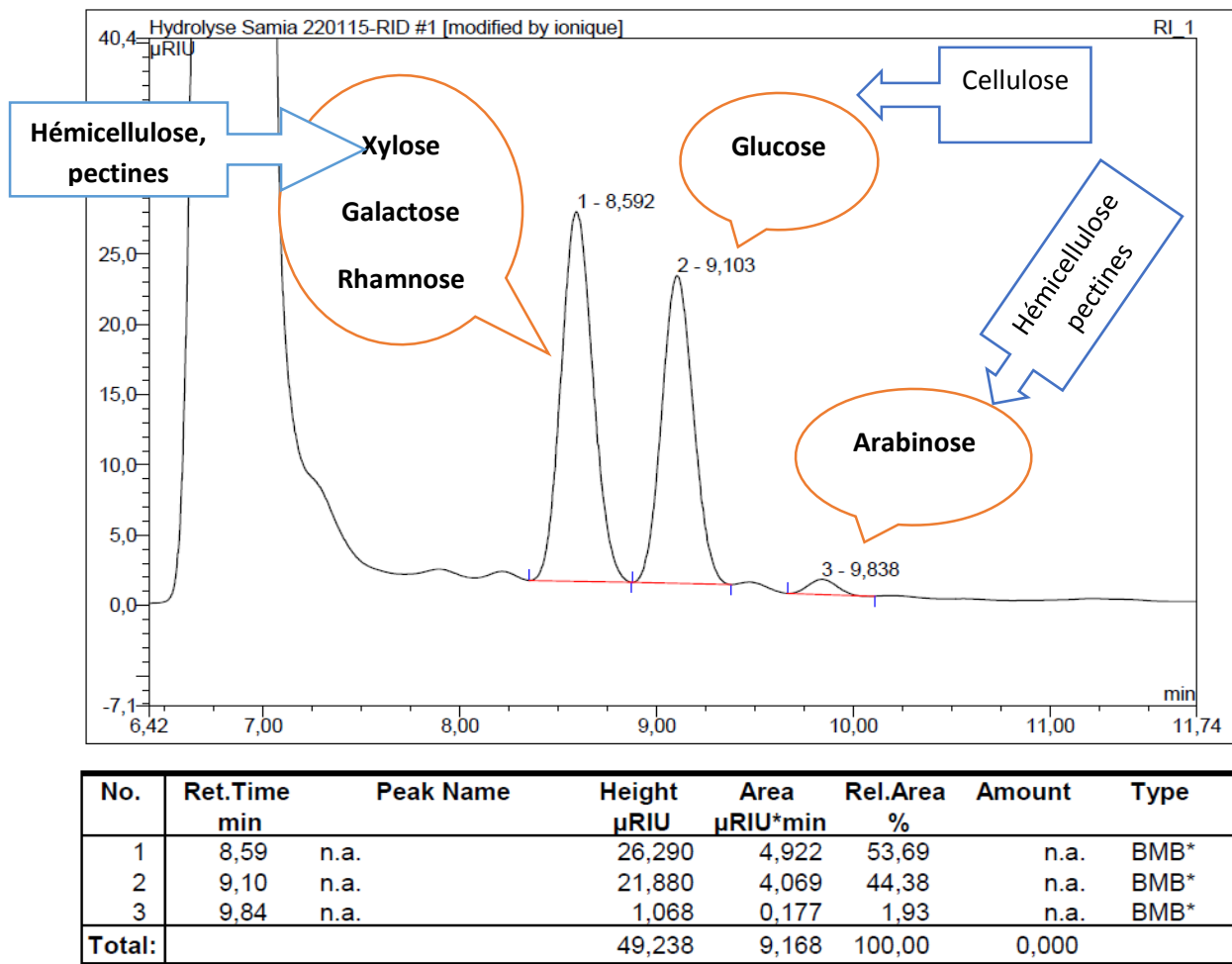


Figure 1. Résultats de l'analyse HPLC de l'hydrolysate de grignons

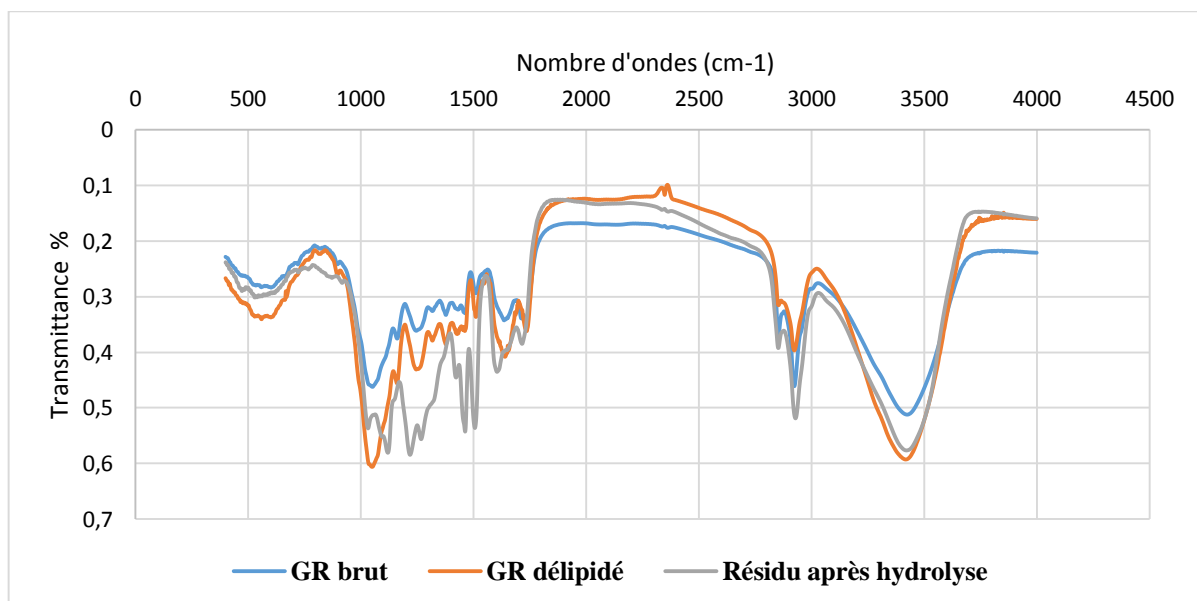


Figure 2. Spectre infrarouge des grignons avant et après traitement de délipidation et d'hydrolyse acide à L'H₂SO₄. Par analogie à la littérature, la figure montre un spectre caractéristique des lignines.

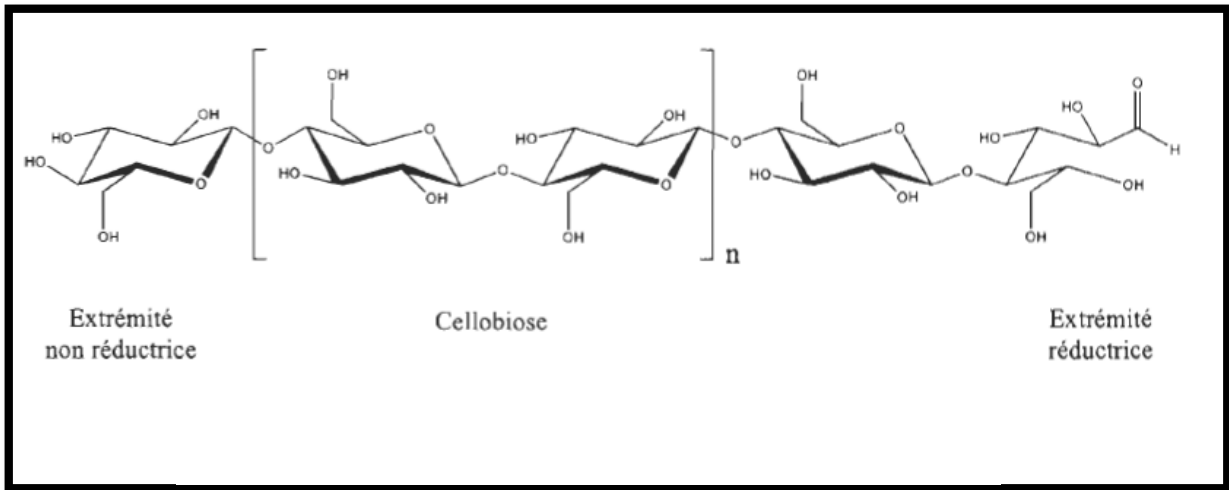


Figure 3. Représentation de la cellulose

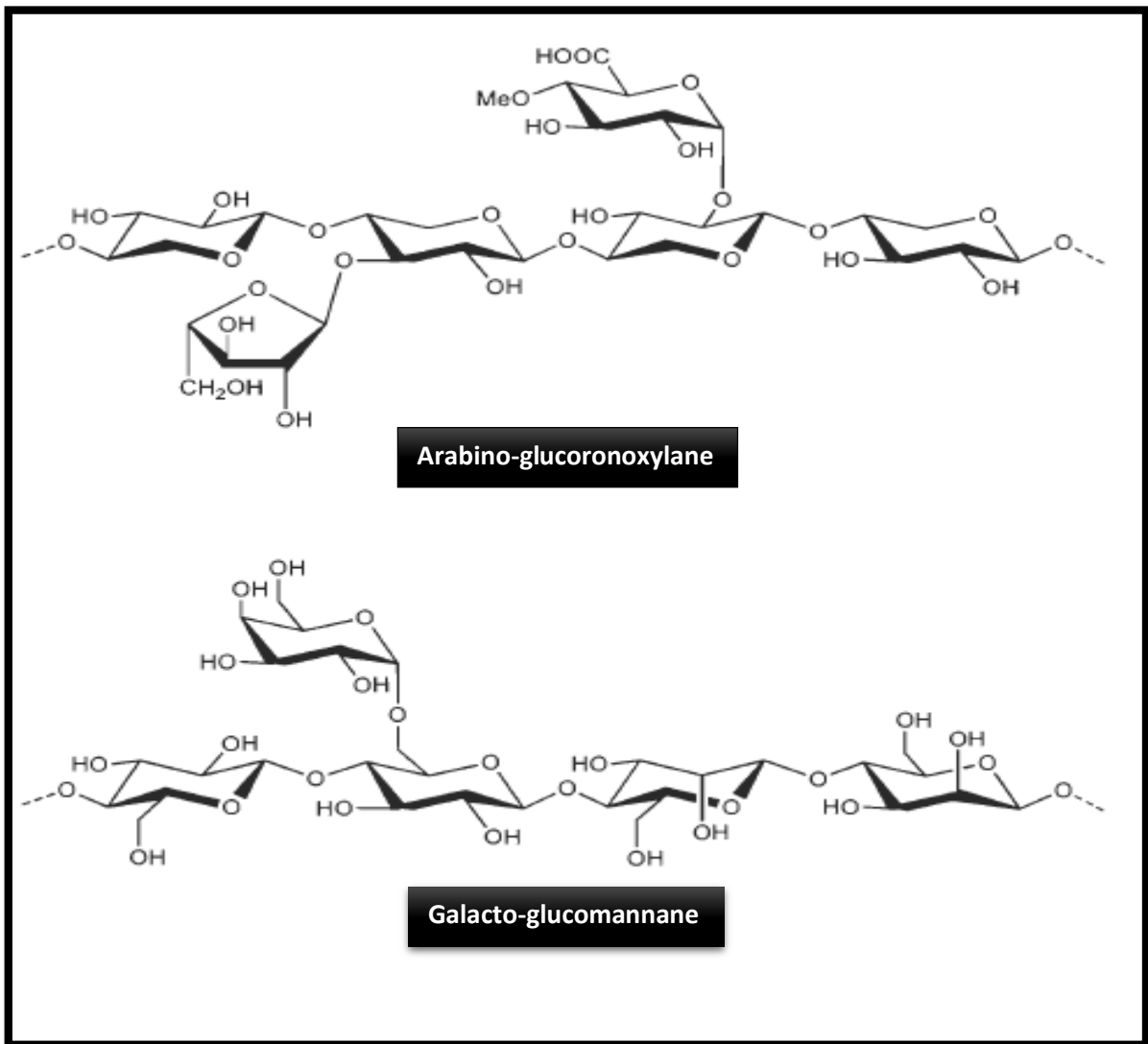


figure 4. Exemples d'arabino- gluconoxylane et de galacto-glucomannanes.

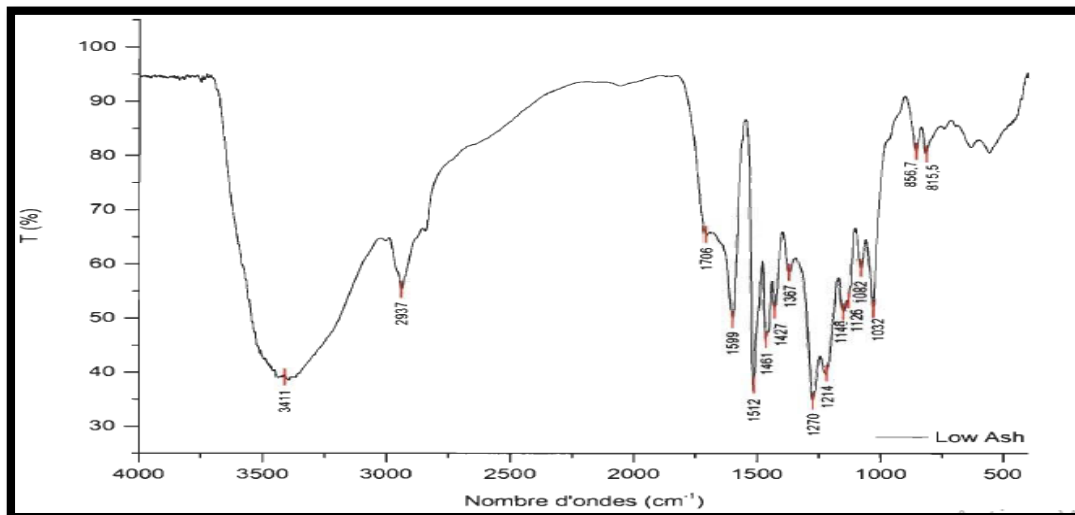


Figure 5. Exemple de spectre infrarouge de lignines (FOURNIER, 2016)

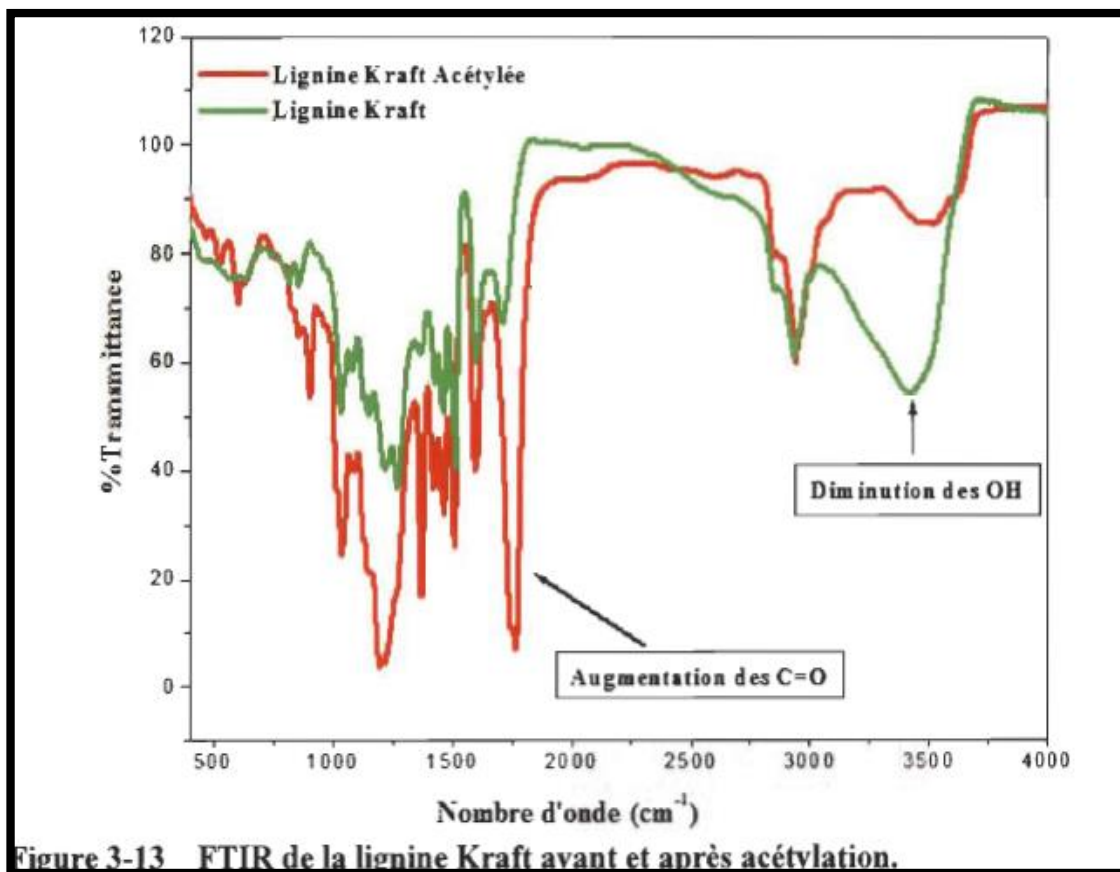


Figure 3-13 FTIR de la lignine Kraft avant et après acétylation.

Figure 6. Exemples de 'un spectre infrarouge de lignines (AMADOU, 2014).

Tableau 1. Principales valeurs de bandes d'analyse IR des lignines

Nombre d'onde (cm⁻¹)	Identification
3460-3412	Étirement des OH
2935-2848	Étirement de C-H dans les groupes CH ₃ et CH ₂
2880-2689	Vibration de C-H dans les groupes méthoxyles
1738-1709	Étirement des C=O non conjugués des cétones et esters
1675-1645	Étirement des C=O conjugués
1605-1593	Vibration des noyaux aromatiques et étirement des C=O
1515-1505	Vibration des noyaux aromatiques
1470-1460	Déformation asymétrique des C-H dans CH ₃ and CH ₂
1430-1422	Vibration des C-H aromatique sur le plan
1370-1365	Étirement des C-H aliphatique dans CH ₃
1330-1325	Vibration de l'anneau syringyle avec l'étirement de C=O
1270-1266	Vibration de l'anneau guaiacyle avec l'étirement de C=O
1230-1221	Étirement de C-C, C-O et C=O, Anneau guaiacyle et C=O
1140	Déformation plane des C-H aromatiques des guaiacyles
1128-1125	Déformation plane des C-H aromatiques des guaiacyles, étirement des alcools secondaires et C=O
1086	Déformation des C-H des alcools secondaires et des éthers aliphatiques ou aromatiques
1035-1030	Déformation plane des C-H aromatiques, Déformation des C-O des alcools primaires, étirement des C=O
925-915	Déformation or du plan des C-H aromatique
858-853	Déformation or du plan des C-H en position 2,5 et 6 du guaiacyle
815	Déformation or du plan des C-H en position 2,5 et 6 du guaiacyle

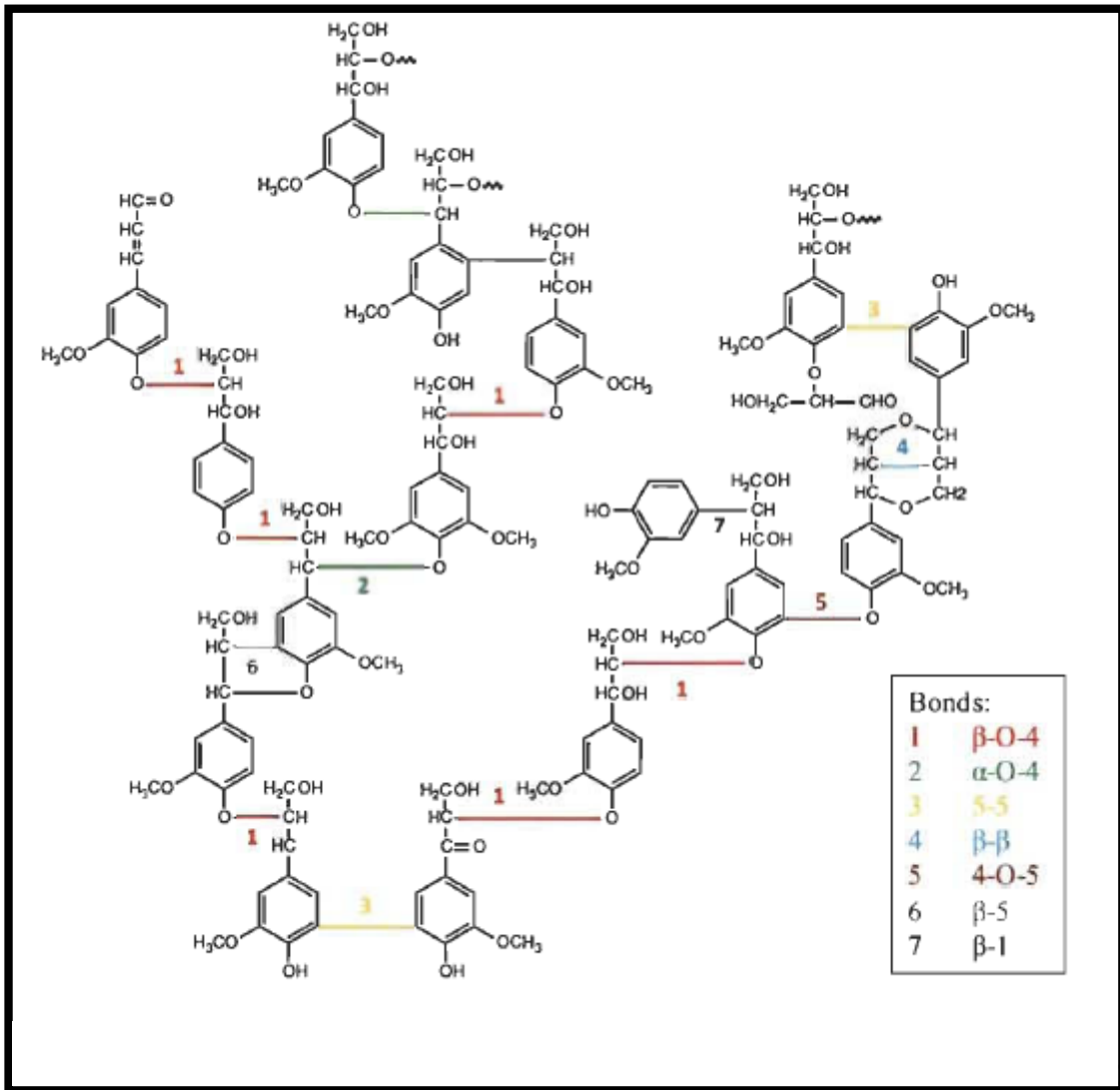


Figure 7. Schéma d'un fragment de lignine.

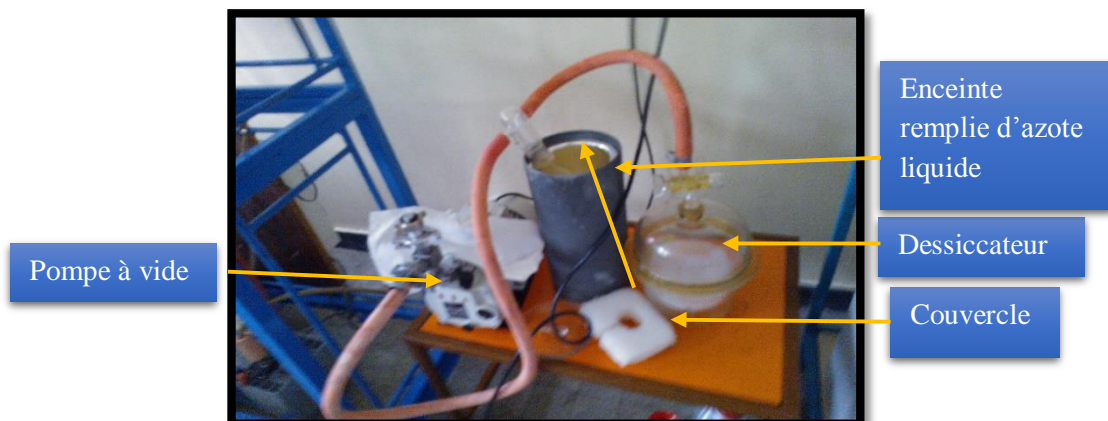


Figure 8. Montage de lyophilisation.

ANNEXE 4 : Courbes étalon

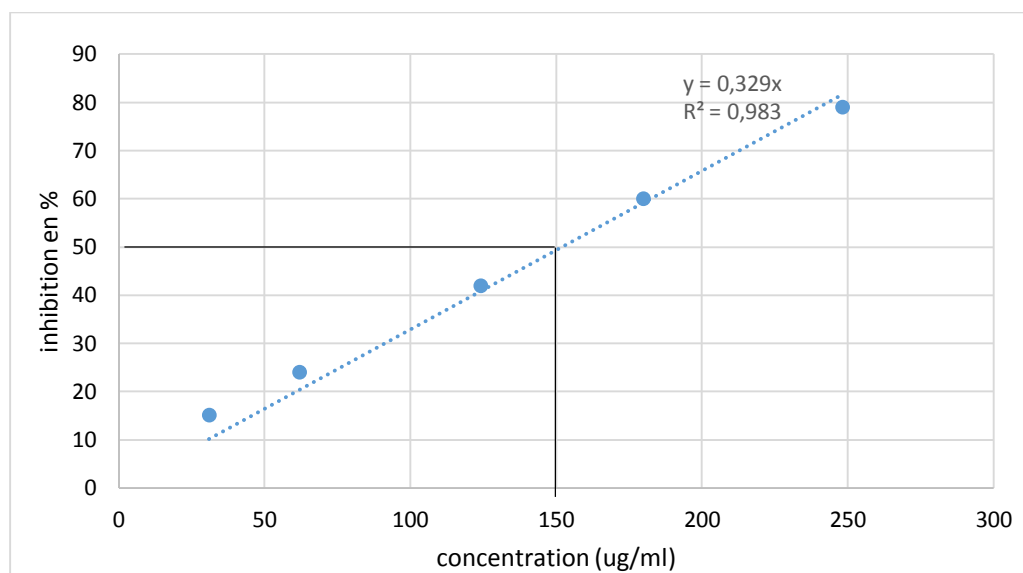


Figure 1. Exemple de courbes de tendance pour la détermination des valeurs IC50. La courbe montre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (y) en fonction de concentrations différentes de l'extrait PREE.


ANNEXE 5 : Appareil et étapes de l'analyse de la DCO


Méthode 5000

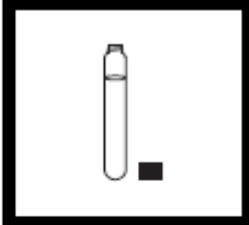
DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE Pour eau, eau résiduaire et eau de mer

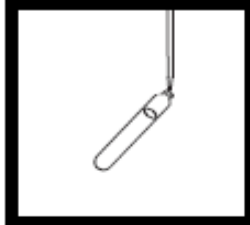
Méthode Digestion par réacteur* Approuvée par l'USEPA** pour l'analyse des eaux résiduaires

Digestion







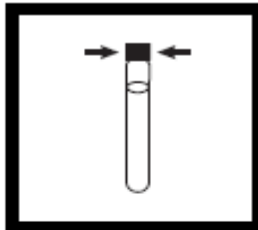


- Homogénéiser 500 ml d'échantillon pendant 2 minutes dans un homogénéiseur.
Note : Pour la gamme 0 à 15.000 mg/l, homogénéiser 100 ml d'échantillon. Pour améliorer l'exactitude et la reproductibilité, verser l'échantillon homogénéisé dans un bêcher de 250 ml. Agiter doucement sur agitateur magnétique pendant le prélèvement de l'aliquote.
- Allumer le réacteur DCO. Préchauffer à 150 °C. Placer l'écran de sécurité devant le réacteur.
Attention : S'assurer que les équipements de sécurité sont en place pour protéger l'opérateur des projections en cas de fuite de réactif.
- Prendre un tube de réactif DCO de la gamme appropriée.

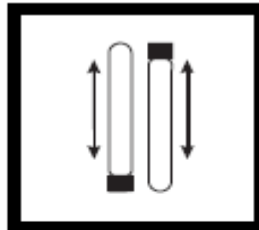
Gamme de concentration d'échantillon (mg/l)	Type de tubes DCO
0 à 150	Gamme basse
0 à 1.500	Gamme haute
0 à 15.000	Gamme haute plus

Note : Le réactif est sensible à la lumière. Conserver les tubes non utilisés dans la boîte opaque, dans un réfrigérateur si possible. L'exposition des tubes à la lumière pendant l'essai est sans influence sur le résultat.
- Retirer le bouchon d'un tube. Tenir le tube incliné à 45 degrés. Pipetter 2,00 ml (0,20 ml pour la gamme 0 à 15.000 mg/l) d'échantillon dans le tube.
Note pour 0 à 15.000 mg/l : Pipetter seulement 0,20 ml d'échantillon et non 2,00 ml en utilisant une pipette TenSette. Pour une plus grande exactitude, effectuer un minimum de 3 essais et faire la moyenne des résultats.
Note : Toute trace de réactif répandu affecte l'exactitude de l'analyse. Le réactif est dangereux pour la peau et les autres matières. Ne pas effectuer d'analyse avec des tubes dont une partie du réactif a été répandue. Laver le réactif répandu à grande eau.

Attention : Certains des réactifs utilisés dans cette technique peuvent être dangereux pour la santé et la sécurité de l'utilisateur s'ils sont manipulés de façon inappropriée et accidentellement mal employés. Lire les consignes au chapitre Sécurité de ce manuel. Des vêtements et lunettes de protection doivent être utilisés pour la sécurité de l'opérateur. En cas de contact, laver la partie atteinte à l'eau courante. Suivre attentivement les instructions.

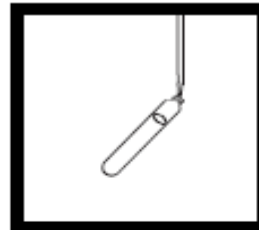


5. Fermer hermétiquement le bouchon du tube. Rincer le tube DCO à l'eau désionisée et l'essuyer soigneusement avec un papier absorbant.



6. En tenant le tube par le bouchon au-dessus d'un évier, le retourner plusieurs fois pour mélanger le contenu. Placer le tube dans le réacteur DCO préchauffé.

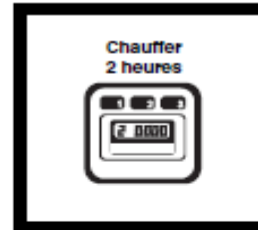
Note : Le tube devient très chaud lors du mélange.



7. Préparer un blanc en répétant les étapes 3 à 6, en remplaçant l'échantillon par 2,00 ml (0,20 ml pour la gamme 0-15.000 mg/l) d'eau désionisée.

Note : S'assurer que la pipette est propre.

Note : Un blanc doit être analysé avec chaque série d'échantillons. Tous les essais (échantillons et blanc) doivent être faits avec le même lot de tubes. Le numéro de lot est indiqué sur l'étiquette de la boîte.

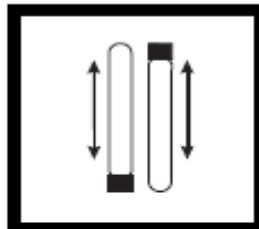


8. Chauffer les tubes pendant 2 heures.

Note : Beaucoup d'échantillons d'eau résiduaire contenant des substances facilement oxydées sont digérées complètement en moins de deux heures. Si nécessaire, mesurer la concentration (sur les tubes chauds) à intervalles de 15 minutes jusqu'à ce que la lecture demeure inchangée. Refroidir les tubes à la température ambiante pour la mesure finale.

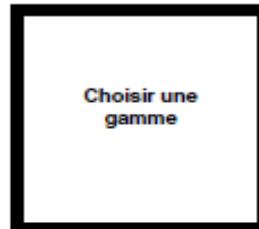


9. Eteindre le réacteur. Attendre environ 20 minutes le refroidissement des tubes à 120°C ou au-dessous.



10. Retourner chaque tube plusieurs fois pendant qu'il est encore chaud. Placer les tubes sur un portoir. Attendre que les tubes soient refroidis.

Note : Si le tube présente une couleur verte pure, mesurer la DCO et si nécessaire, répéter l'essai sur un échantillon dilué ou utiliser un tube d'une autre gamme.



11. Utiliser l'une des méthodes suivantes pour mesurer la DCO :

- Mesure colorimétrique 0 à 150 mg/l DCO
- Mesure colorimétrique 0 à 1.500 mg/l DCO
- Mesure colorimétrique 0 à 15.000 mg/l DCO

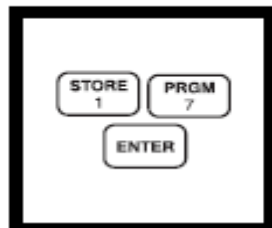
Mesure colorimétrique, 0-1500 et 0-15.000 mg/l DCO



1. Entrer le numéro de programme mémorisé pour la DCO, gamme haute et haute plus.

Presser : **PRGM**

L'affichage indique :
PRGM?



2. Presser : **17 ENTER**

L'affichage indique
mg/l, COD et le symbole
ZERO.

Note : Pour d'autres formes (O₂), presser la touche CONC.



3. Placer l'adaptateur de tube DCO/TNT dans le puits de mesure en le tournant pour qu'il tombe en place. L'enfoncer pour qu'il soit correctement installé.



4. Essuyer l'extérieur du tube d'essai à blanc avec un tissu propre.

Note : Essuyer avec un tissu mouillé puis avec un tissu sec pour éliminer les traces de doigts et autres marques.



5. Placer le blanc dans l'adaptateur avec le logo Hach dirigé vers l'opérateur.

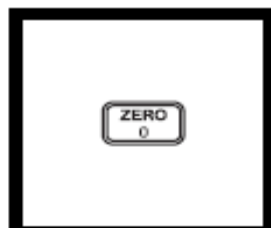
Presser verticalement sur le haut du tube jusqu'à ce qu'il soit solidement en place dans l'adaptateur.

Note : Ne pas déplacer le tube latéralement, ceci cause des erreurs.



6. Ajuster le capot de l'appareil pour couvrir le tube.

Note : Le blanc est stable lorsqu'il est stocké à l'obscurité ; voir Blancs pour mesure colorimétrique à la suite de cette technique.



7. Presser : **ZERO**

Le curseur se déplace vers la droite puis l'affichage indique :

0 mg/l COD



8. Essuyer l'extérieur d'un tube d'échantillon avec un tissu propre.



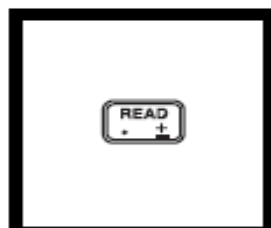
9. Placer le tube dans l'adaptateur avec le logo Hach dirigé vers l'opérateur.

Presser verticalement sur le haut du tube jusqu'à ce qu'il soit solidement en place dans l'adaptateur.

Note : Ne pas déplacer le tube latéralement, ceci cause des erreurs.



10. Ajuster le capot de l'appareil pour couvrir le tube.



11. Presser : **READ**

Le curseur se déplace vers la droite puis le résultat en mg/l de DCO s'affiche.

Note : Avec les tubes pour la gamme 0 à 15.000 mg/l, multiplier la valeur affichée par 10.

Note : Pour une meilleure exactitude avec les échantillons proches de 1500 ou 15.000 mg/l DCO, répéter l'analyse avec un échantillon dilué.

ANNEXE 6 : Méthode PCR-TGGE (protocole du LMGE)

• **Extraction d'ADN génomique bactérien ou fongique à partir d'échantillons hétérogènes**

C'est une méthode qui consiste à lyser des cellules par reprise du culot avec une solution d'extraction contenant des détergents (CTAB). Ces derniers, servent à disperser les bicouches lipidiques des membranes et à dénaturer les protéines. La procédure suivante est la déprotéinisation de la solution, réalisée par ajout de protéinase K et de SDS. Les protéines résiduelles seront éliminées avec les lipides via une extraction par solvants organiques, phénol additionné de chloroforme. Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau. L'ADN reste en solution dans la phase aqueuse et est récupérée par centrifugation. L'ADN est ensuite récupéré par précipitation à l'isopropanol et centrifugation à grande vitesse, un culot d'ADN est obtenu à cet effet. Ce dernier est ensuite soumis à des lavages, avec de l'éthanol à 70%, afin d'éliminer les sels. Après séchage le précipité est repris avec de l'eau nucléase free.

• **Séparation des fragments d'ADNr 16S par électrophorèse à gradient temporel de température (TTGE)**

C'est une technique de biologie moléculaire, qui permet de séparer des fragments d'ADN de même taille selon leur contenu en bases guanines-cytosines (GC). La séparation est réalisée par électrophorèse de produits PCR sur gel polyacrylamide en présence d'agent dénaturant (urée), et d'un gradient de température. En effet, plus une séquence contient de bases GC, plus la température de dénaturation est élevée et donc plus la distance de migration est grande.

1) **Préparation du gel :**

	1 gel	2gels
Bis acrylamide 40%	12,50 mL	25 mL
TAE 50X	1,30ml	2,6ml
Urée	21g	42g
H₂O	19ml	38mL

- Le mélange est réalisé dans un erlenmeyer, la dissolution s'effectue sous agitation magnétique.
- Coulage du gel :

Ajouter :

TEMED	31µL	62µL
(Persulfate d'ammonium) APS 10 %	310µL	620µL

- Couler très rapidement le gel jusqu'en haut des deux plaques avec une pipette de 25mL ;
- Positionner le peigne ;
- Laisser prendre le gel en masse pendant 1 heure minimum ;
- Faire chauffer le bac électrophorétique à 66°C (1heure de mise en température) ;
- Rincer les puits avec de l'eau distillée ;
- Placer un spacer sur le fond du support de migration, enlever les petites pinces, placer l'ensemble (plaque+gel) dans le support de migration de tel façon que les puits soient à l'intérieure du montage maintenir le tout avec 4 grandes pinces ;
- Retirer le spacer puis enlever le joint rouge uniquement sur la partie basse du gel ;
- Placer le montage dans la cuve ;

2) **Préparation du tampon TAE 1X :**

- Dans la cuve mettre 500mL de TAE 50X et compléter avec l'eau stérile QSP 25 Litres. (utilisable 4 fois)

4) **Préparation et dépôt des échantillons :**

- Ajouter de loading buffer à 1X final aux produits PCR ;
- Déposer 300ng d'ADN / puits pour les échantillons pour les consortia, ou 150ng pour les souches pures ;

- Laver les puits par aspiration refoulement avec le tampon de la cuve ;
- Déposer les échantillons fermer la porte du dessus ;
- Allumer le générateur.

6) Démoulage du gel

- Eteindre le générateur ;
- Eteindre le moteur de la cuve électrophorétique ;
- Garder le TAE pour une prochaine utilisation ;
- Sortir le gel de son support ;
- Faire lever avec une spatule pour récupérer le gel entre les deux plaques ;
- Repérer le sens du gel ;
- Arroser le gel d'eau distillée, mouiller les gants ;
- Mettre le gel dans le plat contenant du TAE1X, maintenir l'agitation douce pendant 5 minutes. (lavage du gel).

7) Coloration du gel

- Ajouter 15µL de GelStar (Nucleic Acid Gel Stain) et 300mL de tampon TAE 1X dans le plat (utilisable 4 fois) ;
- Couvrir avec un papier d'aluminium (GelStar photosensible) ;
- Laisser colorer au minimum 20 minutes sous agitation.

8) Révélation

- Mettre de l'eau distillée sur la plaque vitrée ;
- Déposer le gel (sans le déchirer) sur cette plaque avec des gants mouiller de TAE et prendre la photo du gel entier à l'aide du logiciel UVP.

• Préparation du Mix

	Pour 1 échantillon	Pour 30 échantillons
Tampon (10x) sans MgCl ₂	5 µl	150 µl
MgCl ₂	2 µl	60 µl
DNTP [10µM]	1 µl	30 µl
Amorce 968FGC	1 µl	30 µl
Amorce 1401R	1 µl	30 µl
BSA [50mg/mL]	0,25 µl	7,5 µl
Taq polymérase	0,30 µl	9 µl

• Préparation des échantillons à amplifier

- Les extraits d'ADN sont dosés avant amplification au nano Drop.
- Une quantité de 100ng doit être présente dans chaque puit.
- Faire le calcul d'après les concentrations obtenues sachant que 10,5 µl de Mix sont ajoutés dans chaque puits et que tous ces puits sont remplis QSP 50µl.
- Un témoin négatif est réalisé avec 10,5 µl de Mix et 38,50µl d'eau PCR.
- Mettre une paire de gants sous la hôte PCR, allumer les UV et les laisser agir 20 minutes.
- Conserver les réactifs et les ADN à l'extérieure de la hôte PCR dans de la glace.
- Dans les puits ajouter dans l'ordre le Mix, l'eau et pour finir l'ADN.
- Allumer le thermocycleur 5 minutes avant de terminer la préparation des échantillons
- Passer les tubes PCR dans la centrifugeuse quelques secondes pour faire tomber les gouttes dans les puits.
- Placer les tubes dans le thermocycleur.

- **Réglage du thermocycleur :**

Le cycle d'amplification est le suivant :16S

95°C pdt 5 minutes

95°C pdt 1 minute

58°C pdt 1 minute

72°C pdt 1minute 30

72°C pendant 10 minutes puis 4°C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur.

30 cycles

Une fois l'amplification terminée arrêter le thermocycleur, faire sortir les tubes PCR du thermocycleur et les mettre dans de la glace avant de les déposer sur gel d'agarose 1%.

- **Gel d'agarose 1%**

Pour éviter tout risque de contamination toxique éventuel mettre des gants pour toutes les manipulations effectuées dans la salle d'électrophorèse.

- **Préparation du tampon TAE 0,5X**

A partir du tampon TAE 10X faire une dilution au 20^{ème} :

Mesurer 50 mL de TAE 10X avec une éprouvette, les introduire dans un flacon de 1L puis remplir QSP 1L d'eau distillée.

- **Préparation du gel d'agarose 1%**

- Dans un erlenmeyer, peser 1g d'agarose puis y ajouter 100mL de tampon TAE 0.5X ;
- Dissoudre le mélange au micro-onde 2 fois 30 secondes ;
- Ajouter 3µL de SYBER SAFE (agent intercalant et révélateur pour l'ADN).

- **Mise en place du gel :**

- Couler le gel d'agarose ;
- Laisser prendre en masse environ 30 minutes ;
- Immerger le gel avec son support transparent dans la cuve électrophorétique contenant du tampon 0,5X.

- **Préparation des échantillons à déposer :**

- Pour des concentrations en ADN <ou = 20 : Déposer 7µl d'ADN et 3µl de tampon de charge.
- Pour des concentrations en ADN <ou = 55 : Déposer 5µl d'ADN et 3µl de tampon de charge.
- Pour des concentrations en ADN <ou = 80 : Déposer 4µl d'ADN et 2µl de tampon de charge.
- Déposer 1µl d'échelle
- Faire migrer 30 minutes à 100V

Lecture des Résultats

- Ouvrir le logiciel Vision Word ;
- Allumer les UV (UV on) 5 minutes avant la lecture du gel ;
- Placer le gel sans son support transparent sur la plaque vitrée de la chambre à UV ;
- Régler le temps d'exposition, l'aperture, le zoom de façon à obtenir l'image le plus nette possible.

ANNEXE 7. Profil de l'antibiogramme des souches uro-pathogènes.

Tableau XXXI. Résistance et sensibilité des entérobactéries sélectionnées des ECBU vis-à-vis des antibiotiques.

ATB Souches	N°	β-lactamine						Aminoside			Quinolone		Sulfamide		Autre		
		AM	AM	KZ	CR	I	Tic	CN	AK	Cip	NA	SXT	C	F	FOS	CT	
<i>E. coli</i>	1	R	R	S	S	S	R	R	-	-	S	R	-	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	2	R	R	I	S	-	-	S	-	S	S	S	-	S	S	S	-
<i>E. coli</i>	3	R	R	I	S	-	-	S	-	S	R	R	-	S	S	S	-
<i>E. coli</i>	4	R	R	R	R	S	R	S	-	-	R	R	S	R	R	S	-
<i>E. coli</i>	5	R	R	I	S	-	R	S	-	R	R	R	S	S	S	S	R
<i>P. mirabilis</i>	6	R	R	S	S	S	R	-	S	-	R	S	S	R	R	S	R
<i>P. mirabilis</i>	7	R	R	I	S	S	R	-	-	-	R	R	R	R	R	S	R
<i>P. vulgaris</i>	8	R	R	S	S	S	-	S	S	-	S	S	S	R	R	S	R
<i>K. pneumoniae.</i>	9	R	R	I	S	-	-	S	-	S	S	R	R	R	R	S	R
<i>K. pneumoniae</i>	10	R	R	S	S	S	R	S	-	-	S	S	S	R	R	S	-
<i>E. cloacae</i>	11	R	R	S	S	S	S	-	S	I	S	S	S	S	S	S	-

(-) : non testé ; R : résistant ; S : sensible ; I : intermédiaire.

AM : Ampicilline / AMC : Amoxicilline + acide clavulanique / KZ: Céfazoline / CRO: Céftriaxone / IP: Imipenème / TIC: Ticarcilline / CN: Gentamicine / AK: Amikacine / CIP: Ciprofloxacine / NA: Acide-Nalidixique /

LVX: Levofloxacine / SXT: Bactrime / C: Chloramphénicol / FOS: Fosfomycine / F: Nitrofurantoinne /