

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

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Filière : Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

THEME:

Valorisation des margines par fermentation

Présenté par :

OUADJIR Siham et YAHIAOUI Rezkia

Devant le jury composés de :

Promotrice : Melle DERMECHE S. Maitre assistante Classe A UMMTO

Présidente : Mme OUALI-ABDOUNE S. Maitre assistante Classe A UMMTO

Examineur 1 : Mr TITOUCHE Y. Maitre assistant Classe A UMMTO

Examineur 2 : Mme BENAZZOUZ K. Maitre assistante Classe A UMMTO

Promotion 2015/2016

Remerciements

En premier lieu, nous remercions LE BON DIEU le Tout Puissant de nous avoir accordé la volonté, la santé et le courage durant ces années d'études.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à notre promotrice M^{lle} DERMECHE S., enseignante chercheur au laboratoire de biochimie analytique et biotechnologies à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, qui nous a encadrés pendant la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à adresser nos plus sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer notre travail.

Merci à Mme OUALI-ABDOUN S. maitre assistante classe A à l'UMMTO pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir accepté de présider notre jury.

Mr TITOUCHE Y. maitre assistant classe A à l'UMMTO, et Mme BENAZZOUC K, maitre assistante classe A à l'UMMTO, qu'ils nous ont fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à : M^{lle} GHAZI A., M^{lle} AILI D., Mr TITOUCHE Y., Mr SEBBANE H., Mr BARIZ K., M^{lle} ADDAR L. et M^{lle} ZOBIRI A. pour toutes leurs aides et précieux conseils.

Nous remercions ainsi tous les techniciens et techniciennes du département Biochimie – Microbiologie.

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

*Je dédie ce mémoire,
à tous ceux et toutes celles
qui m'ont accompagné et soutenu
durant cette année de formation*

Rezkia

Je dédie ce travail

À mes très chers parents, à qui j'adresse mes sincères gratitude et reconnaissances, dont la présence et le soutien permanents ont fait de mon parcours ce qu'il est aujourd'hui.

À mon cher frère Rafik et sa femme Fatiha

À mon admirable soeur Lynda et son mari Djamel

À mon adorable sœur Tounsia

À mes chères neveux Elina et Ilyane.

À mes grands parents maternels et à la mémoire de mes grands parents paternels.

À mon binôme Rezkia.

À toutes les personnes qui me sont proches du cœur ou du sang dont les noms ne pourraient se contenir dans cet espace.

Siham

Table des matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Introduction	1
1^{ère} Partie : Synthèse bibliographique	
I. Production oléicole.....	3
1.1. Production et consommation mondiale	3
1.2. Production dans le bassin méditerranéen	3
1.3. Production et consommation en Algérie	4
II. Procédés d'extraction de l'huile d'olive	4
2.1. Système discontinu d'extraction par presse.....	4
2.2. Système continu d'extraction par centrifugation	6
2.2.1. Système d'extraction à 3 phases.....	6
2.2.2. Système d'extraction à 2 phases.....	6
2.3. Méthode Sinolea	8
III. Caractérisation des margines et des grignons.....	8
3.1. Composition générale.....	8
3.2. Composés phénoliques	10
3.2.1. Récupération et analyse des composés phénoliques.....	10
3.2.1.1. Récupération des composés phénoliques.....	10
3.2.1.2. Analyse des composés phénoliques	12
3.2.1.3. Rôle et fonctions biologiques des composés phénoliques	12
3.2.2. Composés phénoliques des margines.....	13
3.2.3. Composés phénoliques des grignons.....	13
IV. Impacts des margines et des grignons sur l'environnement	14
4.1. Pollution de l'air	14
4.2. Pollution des eaux.....	14
4.3. Pollution du sol	14
V. Dépollution et bioconversion margines et des grignons.....	16
5.1. Prétraitement des margines et des grignons	16
5.1.1. Prétraitement physique.....	16
5.1.2. Prétraitement chimique	17
5.1.3. Prétraitement biologique	18
5.2. Biotransformation des margines et des grignons en molécules d'intérêts	18
5.2.1. Production de l'hydrogène	20
5.2.2. Production de méthane	22
5.2.3. Production de l'éthanol.....	23
5.3. Application et utilisation margines et des grignons	24
5.3.1. Usage agricole	24
5.3.2. Usage industriel	24
5.3.2.1. Produits de valeur issus de l'hydrogène.....	24

5.3.2.2. Autres biopolymères	24
5.3.2.3. Production d'enzymes.....	25
5.3.3. Autres usages	25

2^{ème} Partie: Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes	27
I.1. Matériels	27
I.2. Méthodes.....	28
1.2.1. Caractérisation des margines	28
• Teneur en matière sèche totale.....	28
• Teneur en cendre (matière minérale)	29
• Teneur en matière volatile (Matière organique)	29
• pH	29
I.2.2. Extraction des polyphénols des margines.....	29
I.2.3. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie	31
I.2.4. Activité anti-oxydante des extraits de margines avant et après fermentation	33
I.2.5. Fermentation aérobies des margines	34
I.2.5.1. Conditions de culture des souches.....	34
I.2.5.2. Culture des souches de lactobacilles	34
I.2.5.3. Dénombrement de colonies sur boîtes.....	35
I.2.6. Fermentation anaérobie (margines ; margine MRS)	35
II. Résultats et discussion	37
2.1. Caractérisation des margine	37
2.2. Rendement d'extraction	38
2.3. Etude de la fermentation aérobie des margines brutes par les souches <i>Lactobacillus</i>	39
2.3.1. Test de confirmation de la pureté des souches bactériennes utilisées	39
2.3.2. Cinétiques de croissance des souches <i>Lactobacillus</i> en culture sur les milieux MRS et MRS-margines	42
2.4. Fermentation anaérobie des margines et des grignons.....	48
2.4.1. Production du méthane.....	48
2.4.2. Production de l'hydrogène	49
2. 5. Mise en évidence de l'activité anti-oxydante.....	50

Conclusion générale et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

L'industrie de production oléicole génère de grandes quantités de sous produits de près de 30 millions de m³ de margines et 20 millions de tonnes de grignons à l'échelle mondiale.

Les margines par leur richesse en composés phénoliques peu biodégradable ou récalcitrant causent un réel problème environnementale. Un traitement par fermentation sévère nécessaire pour leur valorisation et dépollution.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de réaliser une fermentation aérobie des margines par des souches de *Lactobacillus* et l'étude de l'activité antioxydante des extraits avant et après fermentation. Des fermentations anaérobies des margines et des grignons ont été conduites, les phases gazeuses et liquides sont analysées par chromatographie liquide à haute performance et chromatographie phase gazeuse.

Le dénombrement des souches de la fermentation aérobie a permis d'avoir une cinétique de croissance importante qui montre un même comportement vis-à-vis de ce substrat tout en réduisant le taux des composés phénoliques et donc la diminution de la charge organique polluante.

L'évaluation des activités biologiques a permis de conclure que l'activité antioxydante est liée à la nature et la concentration polyphénols dans les margines. Les extraits bruts pourraient être qualifiés d'excellents piègeurs de radicaux libres par rapport aux extraits fermentés.

En fin, les résultats de l'analyse par chromatographie liquide à haute performance et chromatographie phase gazeuse ont indiqué une bonne production de biogaz (méthane et hydrogen) dans des conditions de co-digestion.

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant à la valorisation des margines et des grignons par voie microbienne

Mots clefs : margines, grignons, fermentation, co-digestion, polyphénols, *Lactobacillus*.

Abstract

Olive oil production process generates large amounts of by-products of nearly 30 million m³ of olive mill waste water (OMWW) and 20 million tones of olive pomace at global scale. OMWW, are rich in hardly and recalcitrant biodegradable phenolic compounds which cause a serious environmental problem. In fact, fermentation is necessary and important for their treatment and valorisation.

In this context, this work focused to investigate OMWW aerobic fermentation by *Lactobacillus* strains and to study the antioxidant activity of the extracts before and after fermentation. Anaerobic fermentations were also performed on OMWW and olive pomace and the produced biomolecules were analyzed by high performance liquid chromatography and gas chromatography.

Significant growth kinetics were observed in *Lactobacillus* fermentations, which shows a similar behavior for all strains and led to phenolic compound reduction and therefore the decrease in organic pollutant load. Moreover, the evaluation of biological activities revealed a good antioxidant activity in crude extracts as well as those are recovered after fermentations. The results of high performance liquid chromatography and gas chromatography analysis indicated a good performance in biogas production (methane and hydrogen) under co-digestion conditions. The fermentation performed in the current study, might be subjected to further optimizations.

This work opens up new prospects for the recovery of olive-products by microbial pathways.

Key words: OMWW, olive pomace, fermentation, co-digestion, polyphenols, *Lactobacillus*.

Liste des figures

Figure 1: Système discontinu d'extraction de l'huile d'olive par presse.	05
Figure 2 : Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu.	07
Figure 3: Structure des principaux composés phénoliques des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive. Me : groupement CH ₃	11
Figure 4 : Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel	15
Figure 5: Protocole d'extraction des polyphénols à partir des margines	30
Figure 6 : Etapes de dosage des polyphénols	32
Figure 7: Structure du DPPH● et sa réduction par l'antioxydant RH	33
Figure 8: Etapes du dénombrement des souches de <i>Lactobacillus</i>	36
Figure 9 : Rendement des extraits de polyphénols totaux de margines brutes et fermentés	38
Figure 10 : Culture de <i>lactobacillus</i> sp âgée de 24h	39
Figure 11 : Résultats de la coloration de Gram de LB (G× 100).....	40
Figure 12: Image d'une culture des <i>Lactobacillus</i> sur milieu MRS-margines	41
Figure 13 : Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus gasseri</i> dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines	42
Figure 14 : Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus paracasei</i> dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines.....	43
Figure 15 : Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines.....	44
Figure 16 : Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus casei</i> dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines	45
Figure 17 : Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus brevis</i> dans le milieu MRS ainsi que MRS-margine	46
Figure 18: Cinétiques de croissance de <i>Lactobacillus acidophilus</i> dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines.....	47
Figure 19 : Activités anti-oxydantes des extraits testés d'un échantillon extrait au rotavapor.....	50
Figure 20 : Activités anti-oxydantes des extraits testés d'un échantillon extrait est évaporé sous flux d'azote.....	51

Liste des tableaux

Tableau I : production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive au sein des pays du bassin méditerranéen en 1000 t	03
Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques des margines et des grignons d'olives	09
Tableau III : Comparaison des méthodes de prétraitement appliquées sur les effluents d'extraction de l'huile d'olives	17
Tableau IV: Déphénolisation des sous produits par des traitements microbiens.....	19
Tableau V: Diversité physiologique et voies de production de l'hydrogène.....	21
Tableau VI: Les souches bactériennes utilisées.....	27
Tableau VII : Tableau regroupant l'appareillage utilisé lors de l'expérimentation.....	28
Tableau VIII : Valeurs du pH obtenues après fermentation des margines.....	37
Tableau IX : Résultats de production du méthane au cours des fermentations anaérobies obtenus par CPG.....	48
Tableau X: Résultats de production de l'hydrogène obtenus par HPLC et CPG	50

Liste des abréviations

AG : Acide gallique
AGLC : Acide gras à longue chaîne
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AGV : Acides gras volatils
BHIB : BrainHeart Infusion Broth (Bouillon Infusion cœur-cerveau)
CA : Charbon actif
CP : Composés phénoliques
CPG : Chromatographie gazeuse
CSTR : Completely stirred tank reactor
DBO : Demande biologique en oxygène
DBO₅ : Demande biologique en oxygène pendant cinq jours
DCO : Demande chimique en oxygène
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique
DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle
EAG : Equivalent d'acide gallique
EtOH : Ethanol
FES : Procédé de fermentation à l'état solide
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HFS : Processus d'hydrolyse et de fermentation séparés
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
H₂S : Sulfure d'hydrogène
IC₅₀ : Concentration en extrait qui inhibe 50% du DPPH·
LB : *Lactobacillus*
MH : Gélose Mueller Hinton
MOC : Matière organique chargée
MRS : Milieu de Man-Rogosa- Sharpe
MS : Matière sèche
MST : Matière sèche totale
NaCl : Chlorure de Sodium
Na₂CO₃ : Carbonate de sodium
OH : Groupement hydroxyle
PHA : Polyhydroxyalcanoate
POU : Protéines d'organismes unicellulaires
PPH : Potentiel de production d'hydrogène
PPT : Polyphénols totaux
TRH : Temps de rétention hydraulique

Introduction

L'industrie oléicole est une activité économique importante, concentrée principalement dans les pays méditerranéens qui tiennent environ 95% de la production mondiale. L'Algérie constitue le 7^{ème} producteur à l'échelle mondiale avec une production d'environ 2, 22% de la production méditerranéenne.

L'accroissement de la production oléicole et l'introduction des techniques modernes pour l'extraction de l'huile ont placé l'olivier dans une position délicate de pollueur potentiel, phénomène qui a pris de l'ampleur avec l'avènement des systèmes continus de trituration à trois phases utilisant beaucoup d'eau. C'est pour cela que l'olive et l'huile qui en dérivent, ne constituent qu'une part infime de la biomasse produite tout au long du processus oléicole. Les margines et les grignons d'olives représentent la masse restante considérée comme résidu de la trituration des olives qui engendre des problèmes environnementaux inquiétants.

En Algérie, les margines ne subissent en général aucun traitement et sont souvent déversés dans la nature. Il en résulte un impact négatif sur l'environnement qui se traduit par le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement de mauvaises odeurs. Ces problèmes environnementaux sont attribués à la richesse de ces effluents en matière organique et en particulier en polyphénols. Néanmoins, les polyphénols ont montré des propriétés antimicrobiennes, hypolipidémiques, hypocholestérolémiantes et anticancérigènes (GHARBY et *al.*, 2014).

Jusqu'à nos jours, le traitement des margines constitue un problème complexe vue la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. En effet, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisante et incomplète (OUABOU et *al.*, 2014). Bien qu'il n'existe pas encore de solution parfaite permettant le traitement des margines, certains procédés semblent être plus efficaces que d'autres. Les choix opérés par les chercheurs dépendront ainsi des contraintes, du moment et des facteurs multiples et complexes d'ordres socio-économique et technique. Toutefois, les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés physiques, chimiques et/ou biologiques. Cependant, chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients. La recherche de méthodes alternatives ou complémentaires de traitement a conduit à l'émergence vers de nouvelles technologies (IBOUKHOULEF., 2014).

La bio-transformation naturelle des margines peut produire des molécules à haute valeur ajoutées; l'identification de ces métabolites est essentielle dans la stratégie du choix de molécules biologiquement actives. En appliquant les technologies de bioconversion des margines en bioréacteur, la bioconversion du substrat (oleuropéine, hydroxytyrosol glucosides, ...) en ces métabolites de dégradation, a été réalisée à grande échelle (HAMZA KARRAY., 2013).

De plus, des recherches sont orientées sur la valorisation de ces effluents dans divers domaines : compostage, agriculture et même dans l'industrie pharmaceutique.

C'est dans ce cadre que ce travail met l'accent sur la valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole, en particulier les margines et grignons.

L'objectif de ce travail est d'exploiter les margines et grignons par fermentation anaérobies et aérobies afin de pouvoir produire des substances d'intérêts. Les fermentations sont réalisées non seulement comme outils de conversion mais aussi pour l'évaluation de la sensibilité de quelques souches probiotiques vis-à-vis des margines via leur fermentation ainsi que évaluation des activités antioxydantes des extraits phénoliques qui en découlent.

Cette étude est constituée de deux parties:

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui rassemble des données essentielles sur:

- ☐ La production oléicole et les procédés d'extraction de l'huile d'olive ;
- ☐ Les procédés de traitement des margines et grignons ;
- ☐ La dépollution et la conversion de ces sous produits.

La deuxième partie est portée sur l'étude expérimentale en regroupant la description du matériel et des protocoles mis en application dans ce travail et la discussion des résultats obtenus.

I. Production oléicole

1.1. Production et consommation mondiale

La surface agricole mondiale occupée par les oliviers a atteint 11193000 hectares principalement en Espagne, Italie, Turquie et Tunisie (AFIDOL, 2012). D'autres pays commencent à augmenter leur production, c'est le cas notamment de l'Australie qui a vu sa capacité augmenter de 1000 tonnes en 2000/2001 à 12000 tonnes en 2013/2014. Egalement pour l'Iran (9000 tonnes) et l'Argentine (6000 tonnes) (COI, 2014a). La production mondiale d'huile d'olive est estimée à 2,89 millions de tonnes soit 2,3% de la production mondiale des huiles végétales (AFIDOL, 2012).

La consommation mondiale d'huile d'olive se situe entre 2,8 et 3,05 millions de tonnes avec une croissance moyenne annuelle d'environ 3,29% depuis 10 ans. Elle a grimpé de 1,85 millions de tonnes en 1991/1992 à 3,08 millions de tonnes en 2011/2012 notamment dans des pays occidentaux comme les États-Unis. L'Union Européenne consomme 56,37% de la production mondiale. La majorité des flux d'importation sont intra-européens, ce qui explique la concentration de la consommation au sein de ces pays. Cependant, on assiste ces dernières années à une ouverture de nouveaux marchés vers les États-Unis, le Brésil, le Canada, l'Australie, le Japon et la Chine (COI, 2014b).

1.2. Production dans le bassin méditerranéen

D'après le prévisionnel du COI 2014/2015, la production la plus importante sera celle de l'Espagne avec 825700 tonnes (41,58%), suivie des productions de l'Italie avec 302500 tonnes (15,23%), de la Grèce avec 300000 tonnes (15,11%), de la Turquie (9,57%), du Maroc (5,54%), de la Syrie (2,52%), de l'Algérie (2,22%) et de la Jordanie (1,76%) (COI, 2014a). Le tableau I regroupe les données méditerranéennes de production, de consommation, d'exportation et d'importation de l'huile d'olive au cours des campagnes 2005/2006 à 2014/2015.

Tableau I : Production, consommation, exportation et importation de l'huile d'olive au sein des pays du bassin méditerranéen en 1000 t (COI, 2014a).

Campagne	Production	Consommation	Exportation	Importation
2005/06	2 496	2 023	436	200
2006/07	2 646	2 053	609	237
2007/08	2 606	2 020	499	141
2008/09	2 548	2 065	545	133
2009/10	2 812	2 038	576	103
2010/11	2 932	2 123	616	110
2011/12	3 146	2 092	696	105
2012/13	2 275	1 997	751	169
2013/14	3 077	2 006	711	100
2014/15	2 220	1 832	743	113

Au cours de la dernière décennie, la production de l'huile d'olive a été relativement stable. Durant certaines campagnes oléicoles, de légères diminutions de production sont enregistrées et pourrait être expliquée notamment par l'alternance biologique. En effet, l'alternance est une particularité de l'olivier qui peut engendrer une très forte chute de la

production une année sur deux. Afin de maintenir une bonne régularité de production, des soins attentifs tel que la taille, la fertilisation et l'irrigation sont recommandés notamment pour les variétés présentant une forte tendance à l'alternance biologique (AFIDOL, 2004).

1.3. Production et consommation en Algérie

La production oléicole algérienne au cours de la dernière décennie se situait en moyenne de 44650 tonnes par an. La production nationale montre cependant une variation inter-annuelle assez importante, fortement liée aux conditions climatiques et à l'effet de l'alternance biologique de l'olivier.

Les produits et sous-produits de l'olivier sont :

- L'huile d'olive : elle reste le produit essentiel de l'olivier dans la région de Kabylie, par contre dans la région Ouest elle vient en deuxième position après l'olive de table ;
- Les grignons d'olives : ces sous-produits du processus d'extraction de l'huile d'olive sont composés de résidus de pulpe et de fragments de noyaux ;
- Les margines : c'est un sous-produit liquide très toxique pour l'environnement et généralement déversé dans les oueds.

Le rejet des effluents des industries productrices d'huile d'olive est un problème majeur. Ces eaux fortement polluées causent de sérieux problèmes environnementaux. Des détails sur ce point seront abordés dans les titres suivants.

À la fin des années 2000, selon ILBERT (2005), l'industrie oléicole algérienne était composée majoritairement d'huileries traditionnelles (85%) et ne comptait que 10% d'huileries modernes ce qui représentait 1705 établissements.

Entre 1990 et 2000, la production moyenne annuelle d'huile d'olive a atteint 31250 tonnes, avec un minimum de 6000 tonnes en 1991 et un maximum de 54500 tonnes en 1999. En 2003/04, cette production a atteint un nouveau maximum avec 69500 tonnes. Entre les campagnes 2004/05 et 2007/08, la production se situait entre 21500 et 33500 tonnes pour atteindre en 2010/11 67000 tonnes. Cette production est redescendue à 44000 tonnes en 2013/2014.

La couverture des besoins de consommation en huile d'olive est assurée à 100% par la production nationale. Actuellement, l'huile d'olive est consommée pratiquement dans sa totalité dans les zones de production. La consommation par habitant est passée d'une moyenne de 0,85 kg/an au cours des années 80 et 90 à 1,43 kg en 2000 et 1,53 kg en 2004, soit une augmentation de 80%. L'autoconsommation dans les zones traditionnelles est très forte (COI, 2006).

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

L'huile d'olive est définie comme l'huile obtenue à partir du fruit d'olivier et des procédés de production qu'incluent plusieurs étapes. L'extraction peut être réalisée par des procédés qualifiés de discontinus (pressage) ou continus (centrifugation) dans des huileries traditionnelles ou modernes.

2.1. Système discontinu d'extraction par presse

Le procédé discontinu par presse est le plus ancien et la méthode la plus répandue pour l'obtention de l'huile d'olive. L'invention des presses hydrauliques était une révolution pour les anciennes huileries. Après le broyage des olives, la pâte est étendue sur des disques

fibres entassés les uns sur les autres puis placés dans le pressoir. Ces disques sont traditionnellement faits en fibre du chanvre ou de noix de coco et plus récemment en fibres synthétiques pour un nettoyage et une maintenance plus faciles (figure 1).

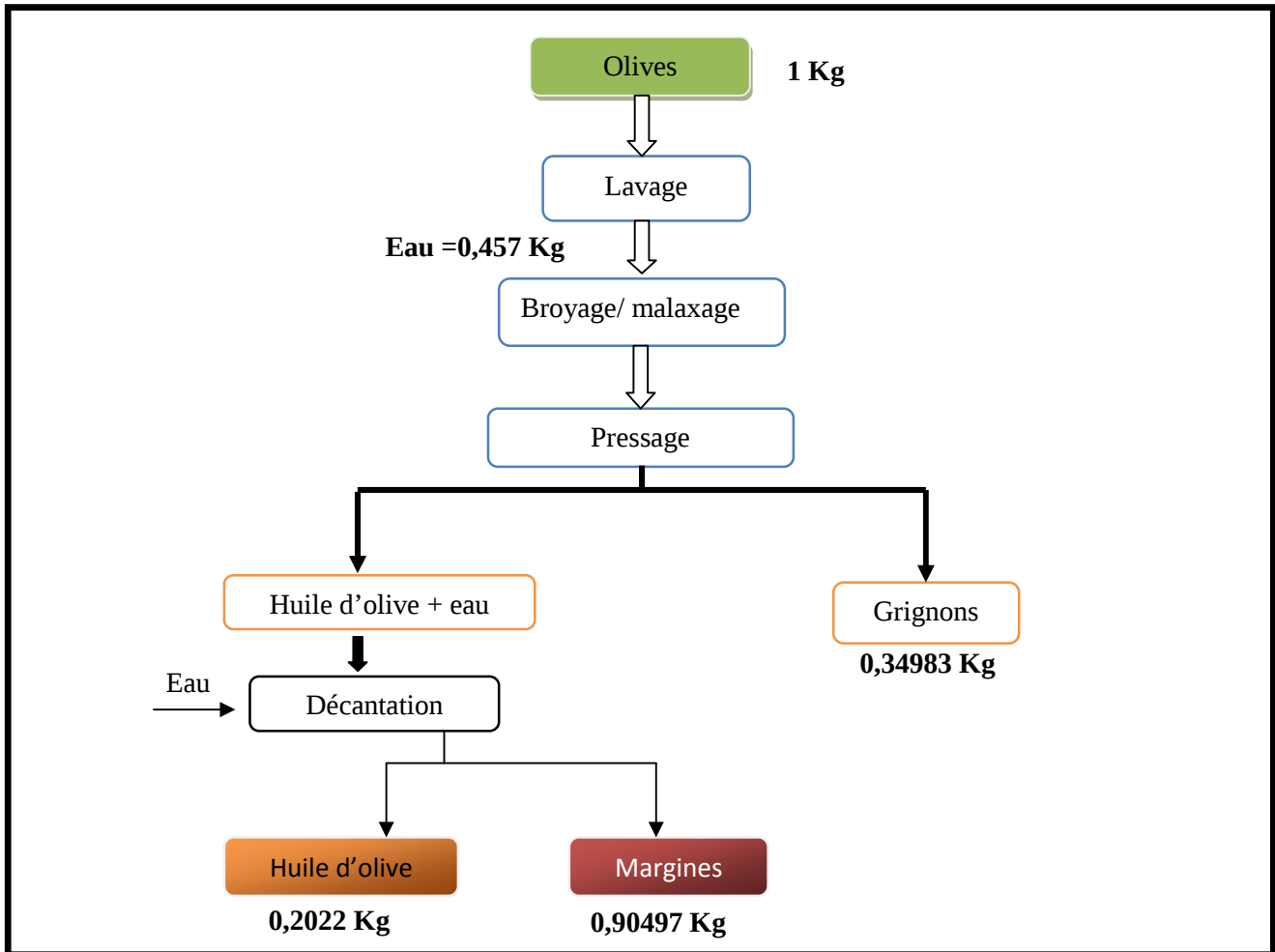


Figure 1: Système discontinu d'extraction de l'huile d'olive par presse (VLYSSIDES et *al.*, 2004 ; DERMECHE et *al.*, 2013).

La pression est appliquée sur les disques pour compacter la phase solide de la pâte d'olives et récupérer les phases liquides (huile et eaux de végétation). Une faible quantité d'eau est ajoutée pour faciliter la séparation de l'huile des autres phases. La sous-étape d'extraction par presse produit une fraction solide appelée grignon d'olive contenant la pulpe d'olive, peau, noyau et eau. Ce sous produit, mélangé avec une émulsion qui contient l'huile d'olive, est séparé par décantation du reste de la margine.

Cette méthode offre des avantages tels que le faible coût de l'équipement et la simplicité de la technique. En outre, la quantité d'eau utilisée est relativement faible ce qui génère de faibles volume de margines qui sont de l'ordre de 40 à 60 L/100 kg d'olives (KAPELLAKIS et *al.*, 2008). Cependant, ces margines posent un sérieux problème de pollution de l'environnement du fait de leur demande chimique en oxygène (DCO) plus élevée que celle des margines plus diluée générées par les autres procédés d'extraction (DI GIOVACCHINO et *al.*, 2002). Le système discontinu d'extraction par presse présente

également des inconvénients, tels que les coûts élevés de la main d'œuvre et la discontinuité du processus.

2.2. Système continu d'extraction par centrifugation

Le procédé continu d'extraction d'huile d'olive utilise un décanteur industriel pour séparer toutes les phases par centrifugation. Il est basé sur les différences de densité des composants de la pâte d'olives (huile, eau et résidus insolubles). Les décanteurs, avec des modifications mineurs, peuvent fonctionner soit en système tri-phasique ou bi-phasique.

2.2.1. Système d'extraction à 3 phases

Comme le montre la figure 2, le décanteur du procédé continu tri-phasique nécessite l'addition de l'eau chaude à l'étape de centrifugation, 1,25 à 1,75 fois supérieure à une extraction traditionnelle et donc génère une quantité importante de margines qui représente 80 à 120 L/100 Kg d'olive (ALBURQUERQUE *et al.*, 2004).

Le système tri-phasique génère 3 fractions : résidu solide (grignon) et deux phases liquides (huile et margine). Ce système a marqué des avantages comme l'automatisation totale et une huile de meilleure qualité, mais il présente certains inconvénients comme une consommation élevée d'eau et d'énergie ainsi que des coûts élevés d'équipements (ROIG *et al.*, 2006). Ce système, en dépit de sa grande consommation d'eau, est toujours employé pour la production d'huile d'olive, particulièrement dans les pays producteurs de grandes quantités d'huile sur des périodes courtes (BENITEZ *et al.*, 1997).

2.2.2. Système d'extraction à 2 phases

Afin de réduire le volume des margines, le procédé d'extraction bi-phasique a été développé durant les années 1990, comme le résume la figure 2.

En utilisant cette technologie la pâte d'olives est séparée en deux phases : huile d'olive et grignon humide. Ce dernier est un sous produit semi solide qui peut être retraité pour extraire d'avantage d'huile et augmenter ainsi les rendements. En effet, il y'a deux types d'huile de grignons : une huile extraite en utilisant des solvants (traditionnel), et une huile obtenue à travers une extraction physique ou par centrifugation (deuxième centrifugation). Ce système a été surnommé de décanteur économique en raison de la réduction de la consommation d'eau (ROIG *et al.*, 2006., KAPELLAKIS *et al.*, 2008).

Cependant, le grignon humide résultant (10L/100Kg d'olives) est difficile à gérer car sa charge polluante est plus concentrée. Pendant la dernière décennie, le système bi-phasique est devenu dominant en Espagne, où environ 90% de huilerie utilisent cette technologie. Il est aussi largement utilisé en Croatie, mais son utilisation n'est pas étendue aux autres pays producteurs du fait des problèmes de gestion des grignons humides qui sont très polluants (MCNAMARA *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de certaines préparations enzymatiques durant le processus d'extraction améliore la qualité d'huile ainsi que le rendement d'extraction (MONTEDORO *et al.*, 1993; RANALLI *et al.*, 1997).

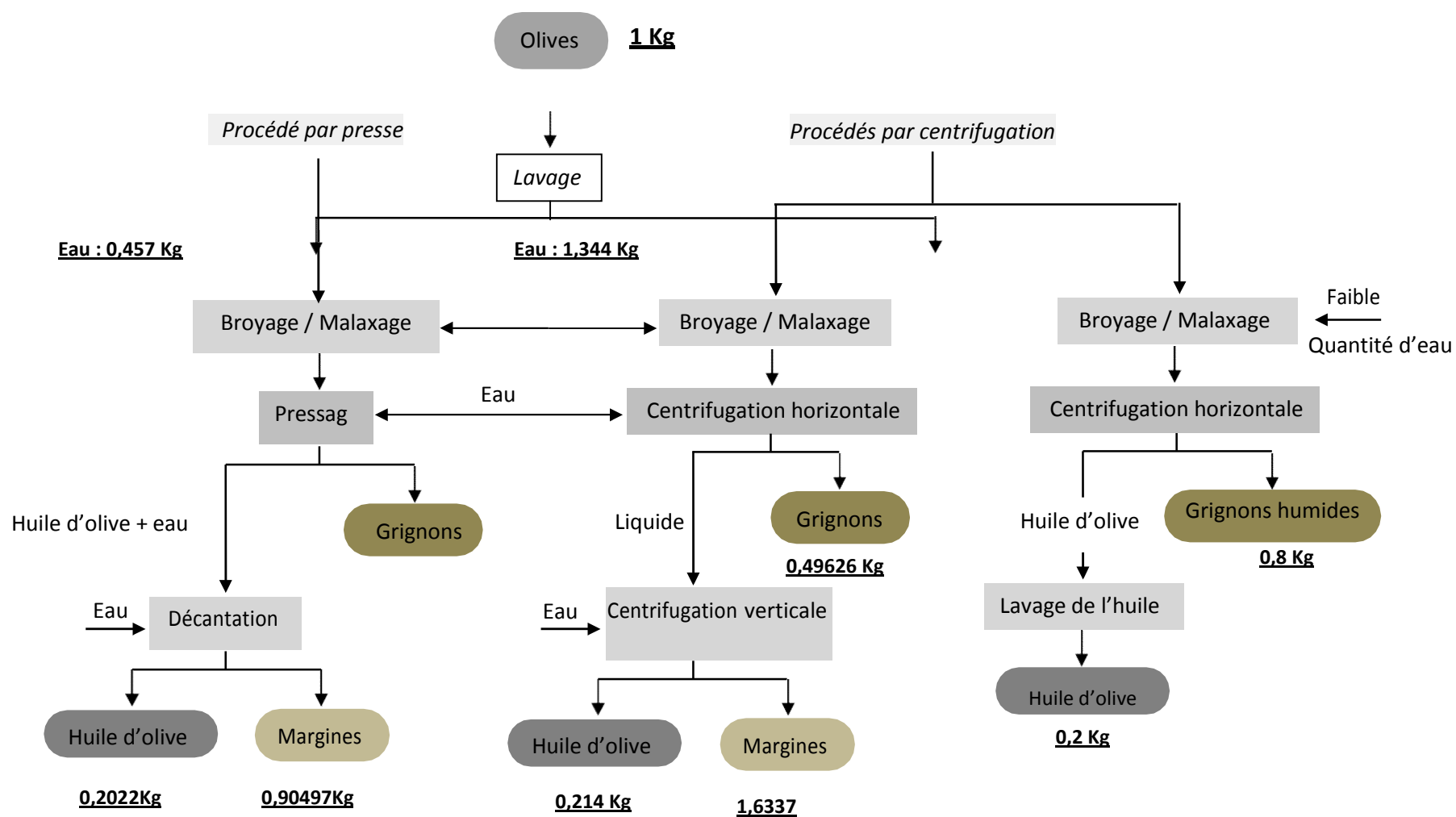


Figure 2 : Méthodes d'extraction de l'huile d'olive par les systèmes discontinu et continu
(VLYSSIDES et *al.*, 2004 ; DERMECHE et *al.*, 2013).

2.3. Méthode Sinolea

Une autre méthode d'extraction d'huile moins couramment utilisée que les précédentes qui est le procédé continu combinant la percolation et la centrifugation, connu sous le nom de Sinolea (VEKIARI et *al.*, 2002). Au lieu du pressage ou de centrifugation, cette méthode utilise la filtration sélective combinée avec la centrifugation pour séparer l'huile de la pâte d'olive. Cependant, ce procédé est peu appliqué du fait de ses coûts opérationnels élevés, de son entretien coûteux, de sa demande élevée en énergie et de son faible rendement. Par conséquent, la pâte d'olive obtenue après extraction doit être traitée en utilisant une méthode standard pour augmenter les rendements en huile.

III. Caractérisation des sous-produits oléicoles

3.1. Composition générale

Les margines sont des effluents liquides de couleurs rouge-à-noire légèrement acides avec des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 5,9 (EROGLU et *al.*, 2008) et entre 2,24 et 5,9 selon AKAR et *al.* (2009) cité par DERMECHE et *al.* (2013), et ont une conductivité électrique très élevée.

La composition des margines et des grignons varie qualitativement et quantitativement selon la variété d'olive, les conditions climatiques, les pratiques culturelles, le temps de stockage (entreposage) des olives ainsi que le procédé d'extraction. Les principales caractéristiques physico-chimiques des margines et des grignons d'olives sont récapitulées dans le tableau II. En plus de l'eau (83 – 92%), les composants principaux des margines sont les composés phénoliques CP, les sucres, et les acides organiques (Tableau II). Elles contiennent également des éléments minéraux, tels que le potassium.

La cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont les composants principaux des grignons. Cependant, des lipides résiduels et des protéines y sont également présents (RODRIGUEZ et *al.*, 2008).

Les grignons humides sont formés d'eau de végétation, de morceaux de noyaux et de pulpe. Leur taux d'humidité est élevé (65-75%), comparé à celui des grignons issus des systèmes d'extraction traditionnels (22-25%) et à trois phases (40-45%) (ALBA-MENDOZA et *al.*, 1990 ; ALBURQUERQUE et *al.*, 2004). Les contenus en matière sèche et en cendres des grignons des systèmes à deux et trois phases sont respectivement de 87,1-94,4% et 1,4-4%. L'analyse de la composition minérale montre que tout comme les margines, les principaux éléments minéraux des grignons sont le potassium, suivi du calcium et du sodium. Les concentrations de ces sels hydrosolubles sont plus élevées dans les margines. En outre, la quantité en eau des margines et des grignons humides détermine leur richesse en CP totaux et en sucres hydrosolubles.

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

Sous-produits oléicoles			
Paramètres	Margines	Résidus solides	
		Grignons	Grignons humides
Pulpe (%)		12–35	10–15
Matière sèche (%)	6,33-7,19	87,1-94,4	
Taux de cendre (%)	1	1,7–4	1,42-4
pH	2,24-5,9		4,9-6,8
Conductivité électrique (dS/m)	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 en suspension totaux	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
Elements 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 études microbiologiques effectuées sur plusieurs échantillons de margines ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes. Donc, ces effluents ne posent aucun problème hygiénico-sanitaire (RANALLI, 1991a). Des analyses microbiologiques ont montré que les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries (AISSAM et *al.*, 2002).

Ces micro-organismes supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristiques de ces effluents, et résistent plus que les bactéries aux substances phénoliques. Parmi les levures, on trouve *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 fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria sp.* La flore bactérienne regroupe les bactéries qui résistent aux polyphénols particulièrement les bactéries à Gram-négatif. Le genre *Pseudomonas sp.* ainsi que *Bacillus megaterium* ont été décrits (AISSAM, 2003).

3.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des métabolites secondaires, produits à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important, et le plus spécifique dans le règne végétale avec plus de 10 000 molécules caractérisées jusqu'aujourd'hui et qui ne cessent d'augmenter (BETA et al., 2005).

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. (BRUNETON, 1993 ; BALASUNDRAM et al., 2006). Les principales classes de CP correspondent aux acides phénoliques, aux flavonoïdes, aux lignanes, aux stilbènes, aux tannins et aux lignines (SHAHIDI et NACZK, 2004). Ils sont responsables des couleurs des fruits et légumes qu'ils protègent contre les pathologies et la lumière UV.

Les polyphénols présentent une structure très variée. Il existe des molécules de structure simple, de forme phénolique avec un cycle benzénique sur lequel sont fixés des groupements hydroxyles: les acides coumarique, OH-coumarique, caféique, ferrulique, cinnapique. Il existe également des composés plus complexes qui sont les flavonoïdes et les anthocyanes. Leur structure est toujours constituée de cycles benzéniques plus ou moins substitués par des groupements OH (YAHIAOUI, 2012).

Les sous-produits oléicoles sont riches en CP (Figure 3) répartis en fonction de leur polarité. Les principales familles de CP identifiées sont les acides phénoliques, les secoiridoïdes et les flavonoïdes (ALLOUCHE et al, 2004 ; OBIED et al, 2005). La teneur en polyphénols des margines et des grignons dépend essentiellement de la variété 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) (KHOUFI et al., 2006).

3.2.1. Récupération et analyse des composés phénoliques

3.2.1.1. Récupération des composés phénoliques

Plusieurs techniques ont été utilisées pour récupérer des composés phénoliques des sous-produits oléicoles, y compris l'hydrolyse enzymatique, l'extraction par solvant, la séparation membranaire, la centrifugation et des méthodes de chromatographie.

KHOUFI et al. (2011) ont démontré que l'hydrolyse des margines par une préparation enzymatique d'*Aspergillus niger* cultivé sur la paille de blé est une source potentielle des composés phénoliques bioactifs (en particulier hydroxytyrosol) avec des applications prometteuses.

L'extraction par solvant est la technique la plus couramment utilisée pour extraire des composés phénoliques et l'acétate d'éthyle étant le solvant le plus efficace pour le traitement des margines dans des conditions acides (ALLOUCHE et al., 2004).

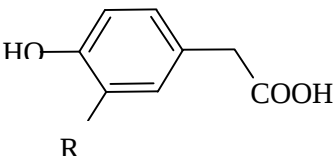
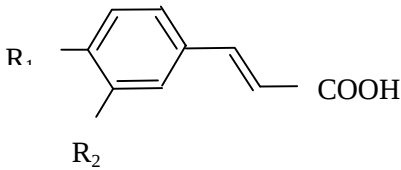
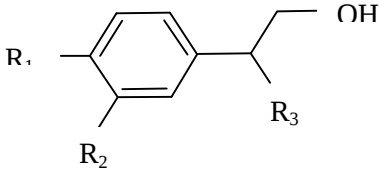
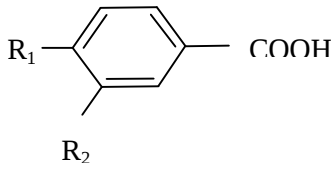
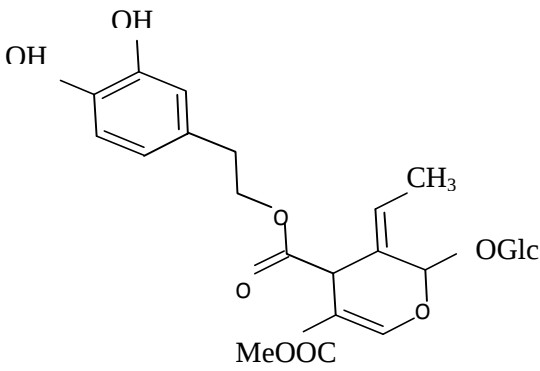
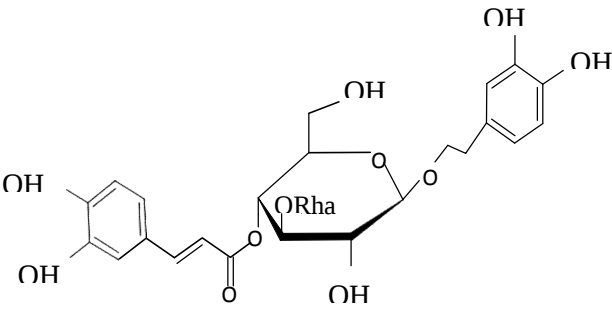
 R = H : Acide 4-hydroxyphenyl acétique R = OH : Acide 3,4-dihydroxyphenyl	 R1 = H, -R2 = H : Acide cinnamique R1 = OH, -R2 = H : Acide <i>p</i>-coumarique R1 = OH, -R2 = OH : Acide caféique R1 = OH, -R2 = OCH3 : Acide férulique
 R1 = OH, -R2 = H, -R3 = H : tyrosol R1 = OH, -R2 = OH, -R3 = H : hydroxytyrosol R1 = OH, -R2 = OH, -R3 = OH : 3,4-dihydroxyphenylglycol	 R1 = OH, -R2 = H : 4-acide hydroxybenzoïque R1 = OH, -R2 = OH : acide protocatechique R1 = OH, -R2 = OCH3 : acide vanillique
 Oleuropéine	 Verbascoside

Figure 3: Structure des principaux composés phénoliques des sous-produits issus de l'extraction de l'huile d'olive. Me : groupement CH₃ (DERMECHE et al., 2013).

ZAFRA et al. (2006) ont conçu une méthode simple et sensible pour la détermination des 21 composés phénoliques à l'aide d'une micro-extraction liquide-liquide des margines avec de l'acétate d'éthyle suivie d'une étape de silylation. Les analyses d'identification et de quantification ont ensuite été effectuées en utilisant la GC-MS. Les inconvénients de solvants organiques, comme l'inflammabilité et la toxicité, ont récemment été surmontés en utilisant des fluides supercritiques, notamment, du CO₂ supercritique. Ainsi, à la suite de la méthode décrite par LAFKA et al. (2011), des composés phénoliques ont été extraits à partir du grignon humide à l'aide d'un solvant liquide classique et le CO₂ supercritique. Une analyse par HPLC de l'extrait à l'éthanol a montré que le composé phénolique prédominant est

l'hydroxytyrosol; de plus, divers acides phénoliques et flavonoïdes ont été également identifiés.

Une approche dynamique a été proposée pour l'extraction sous ultrasons des 20 composés phénoliques du grignon humide (PRIEGO-CAPOTE et *al.*, 2004). Cette méthode, a démontré que le grignon humide constitue une source intéressante de composés phénoliques par rapport à l'huile d'olive (8680µg/g par rapport à 50-1200µg / g). En effet, une haute intensité d'ondes ultrasons produit des gradients intenses de pression et de température au sein du matériau et le découpe, entraînant une rupture structurelle due à la cavitation (implosion des bulles de gaz dans le matériau). Ce phénomène provoque une réduction de la taille des particules, par conséquent, l'ultrason induit une meilleure pénétration du solvant dans les tissus cellulaires, ainsi, l'amélioration des taux du transport en masse dans les tissus et la facilité du transfert des composants de la cellule dans le solvant, en définitive, l'amélioration de l'efficacité d'extraction (USAQUEN-CASTRO et *al.*, 2006).

GORTZI et *al.* (2008) a étudié le point d'extraction en utilisant Genapol X-080 en tant que tensioactif pour la séparation des composés phénoliques à partir des margines. Ils ont constaté que la plupart des composés phénoliques individuels étudiés ont été récupéré à un rendement élevé (89,5%). Cette procédure offre une alternative intéressante à l'extraction liquide-liquide ou liquide-solide par solvant en raison de sa simplicité, du temps court d'extraction, de l'exigence de laboratoire et d'équipements limités et l'utilisation de solvants d'extraction non toxiques.

3.2.1.2. Analyse des composés phénoliques

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours des trente dernières années (MANCHEIX et *al.*, 2005 ; FERNANDEZ DE CORDOVA et MEDINA, 2014), grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des détecteurs à barrettes d'iodes permettent l'analyse des spectres d'absorption en ultraviolet et le couplage de la HPLC avec les techniques physico-chimiques modernes (spectrométrie de masse, résonnance magnétique nucléaire...) (BENDINI et *al.*, 2007 ; QU et *al.*, 2012).

3.2.1.3. Rôle et fonctions biologiques des composés phénoliques

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (LEONG et SHUI, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique.

Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes sur la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (HENNEBELLE et *al.*, 2004).

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les

activités antiallergiques, anti-athérogéniques, anti-inflammatoires, hépatoprotectives, antimicrobiennes, antivirales, anti-thrombotiques, cardioprotectives et vasodilatoires (MIDDLETON *et al.*, 2000 ; KSOURI *et al.*, 2007).

L'action antimicrobienne des phénols est liée à leur capacité à dénaturer les protéines et sont généralement classés comme agents agissant en surface (CATURLA *et al.*, 2005 ; CASAS-SANCHEZ *et al.*, 2007). Leur action conduirait à la fuite des constituants cellulaires tels que les protéines, potassium et le phosphate des bactéries. Ces effets pourraient être dus à la destruction du peptidoglycane ou aux dommages de la membrane cellulaire, ainsi qu'une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physico-chimiques des composés polyphénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien (DOMINECO *et al.*, 2005).

Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en 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).

3.2.2. Composés phénoliques des margines

Après extraction de l'huile par les systèmes presse ou à trois phases, une grande partie des 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). 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 classes hydrophiles y sont logiquement les plus représentées et incluent les alcools phénoliques, les acides phénoliques, les dérivés de secoiridoïdes, les flavonoïdes (lutéoline, luteolin-7-glucoside) et les lignanes. VISIOLI *et al.* (2002) ont rapporté que l'oleuropéine, un ester d'acide élénolique et d'hydroxytyrosol, est un composé majeur des margines, tandis que ALLOUCHE *et al.* (2004) n'ont pas identifié ce composé dans ces mêmes sous-produits. Cette différence est expliquée par le stade de maturation des olives ainsi que par la dégradation de l'oleuropéine en acide élénolique et en hydroxytyrosol par une estérase pendant l'extraction de l'huile d'olive (AMIOT *et al.*, 1989 ; VISIOLI *et al.*, 2002).

3.2.3. Composés phénoliques des grignons

Selon MAESTRO-DURAN *et al.* (1994), les noyaux et les graines d'olives contiennent une quantité significative de CP. Trois glucosides, incluant le salidroside, le nuzhénide et le nuzhénide-oleoside, y ont ainsi été identifiés. Le nuzhénide est le CP majeur des graines d'olives suivi du verbascoside également détecté dans la pulpe (RYAN *et al.*, 2003).

Le tyrosol et l'hydroxytyrosol ont été détectés dans les noyaux d'olives alors que la décarboxyméthyleuropéine a été isolée dans la pulpe, les graines et les noyaux d'olives (FERNANDEZ-BOLÑOS *et al.*, 1998).

Les CP les plus abondants dans les grignons humides sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol (FERNANDEZ- BOLÁNOS *et al.*, 2002) ainsi que l'acide p-coumarique. A un degré moindre, l'acide vanillique est également présent dans ce sous-produit (LESAGE-MEESSEN *et al.*, 2001). 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.

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

Les margines, principaux sous-produits de l'industrie oléicole posent un problème écologique important pour les pays producteurs (pays du bassin méditerranéen). (EL-CHOKRAFI, 2015)

Cet impact négatif sur l'environnement s'explique par leur charge élevée en matières organiques toxiques (particulièrement les CP peu biodégradables), leur DCO (jusqu'à 320 g/L) et DBO (plus de 132 g/L) élevées, leur forte charge saline, et leur pH acide (Figure 4) (STASINAKIS *et al.*, 2008 ; DERMECHE *et al.*, 2013).

4.1. Pollution de l'air

Cette pollution est causée généralement par la décomposition de ces effluents. Les fortes teneurs en sels des margines, leur forte charge et 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 H_2S lors du processus de fermentation (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2004). Les mauvaises odeurs posent des problèmes de pollution de l'air par le taux élevé d'ammoniacque et d'autres gaz produits lors du traitement de ces effluents.

4.2. Pollution des eaux

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 (GHATTAS, 2004). 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). COSSU *et al.* (1993) ont montré également que la DCO des margines est 200 à 400 fois supérieure à celle d'une eau usée typiquement municipale.

Fiorentino *et al.* (2004) ont conclu que les composés phénoliques ont un fort potentiel toxique sur les systèmes aquatiques, tandis que JUSTINO *et al.* (2012) ont indiqué que les margines à contenu phénolique 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.

En outre, 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, en inhibant ainsi la croissance des plantes (KAPELLAKIS *et al.*, 2006).

4.3. Pollution du sol

La pollution due aux margines touchent le sol en induisant des effets négatifs sur la croissance des plantes et leur germination, sur l'activité microbienne et sur les propriétés physico-chimiques des sols (PAREDES *et al.*, 1987).

La fertilité du sol se réduit suite à l'action altérante des acides, des minéraux et des composés organiques. Cette action se traduit par une destruction de la capacité d'échange cationique du sol (CEC) (NASSIF, 2004).

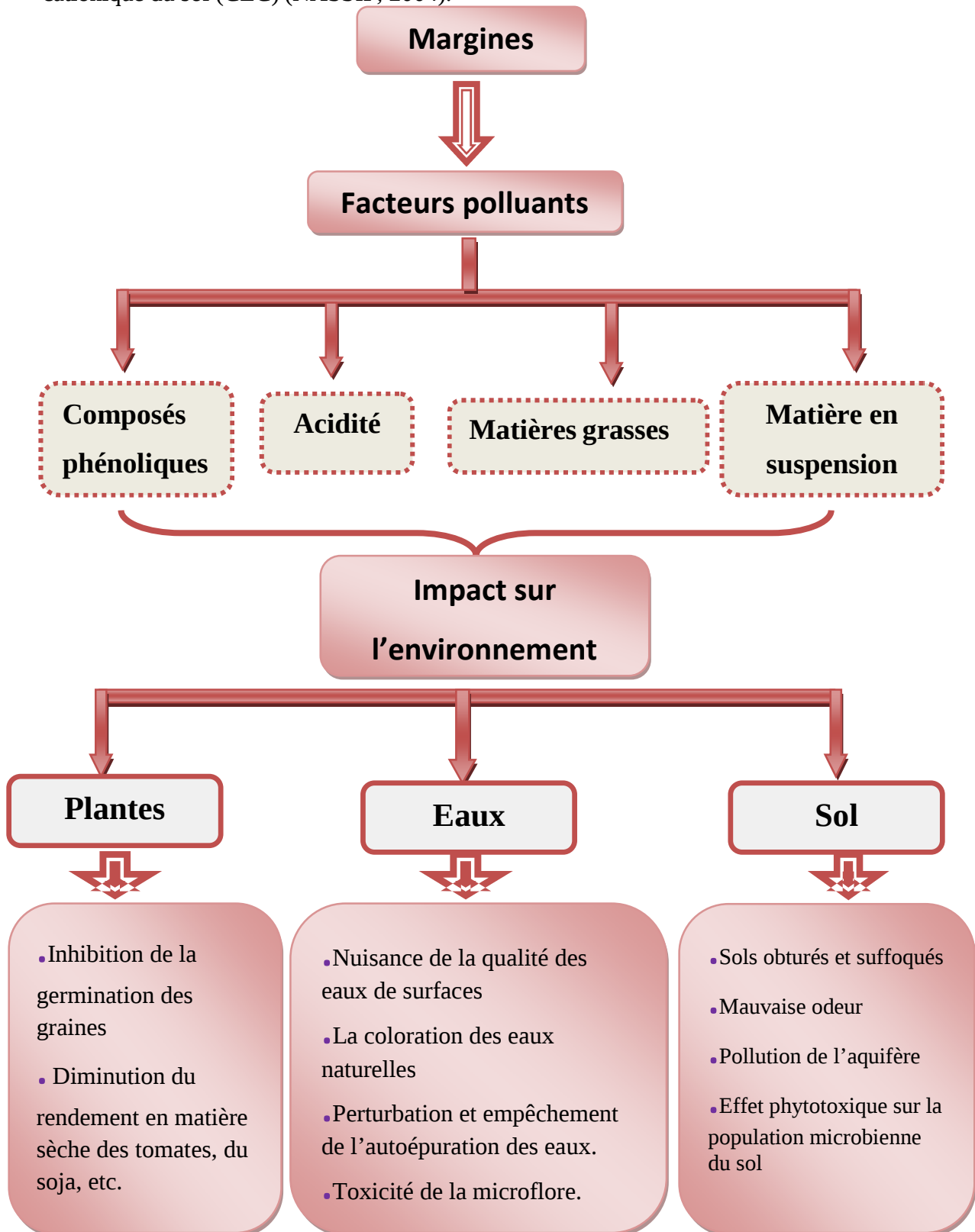


Figure 4: Conséquences environnementales des rejets de margines dans le milieu naturel. (LEULMI, 2010).

V. Dépollution et bioconversion des margines et des grignons

5.1. Prétraitement des margines et grignons

La dégradation anaérobie des sous-produits oléicoles présente des difficultés due à la teneur élevée en matière cellulosique peu dégradables et en substances toxiques qui les composent, comme les phénols, les acides gras à chaîne longue, les tanins, etc (AZBAR et *al*, 2009 ; BENITEZ et *al*, 1997 ; CAMARILLO et RINCON, 2012). La croissance lente de la communauté microbienne anaérobie est très sensible aux conditions inhibitrices, avec l'éthanol étant plus toxique que le phénol (MCNAMARA et *al.*, 2008).

Les polyphénols sont phytotoxiques et résistants à la dégradation biologique, en effet, une réduction de 65,8% de composés phénoliques peut diminuer la toxicité des margines à environ 33% (KALLEL et *al*, 2009 ; KHOULFI et *al*, 2006). Un prétraitement améliore la productivité du méthane en éliminant les substances toxiques, ce qui augmente la biodégradation et réduit les composés cellulosiques.

Divers méthodes physiques, chimiques et biologiques ont été appliquées seules ou combinées avant la digestion anaérobie. La Dilution, le chauffage, les ultrasons; le traitement chimique avec de l'acide, base et de sel, l'oxydation chimique avancée et les traitements biologiques sont toutes des méthodes de prétraitement appliquées aux sous produits d'extraction d'huile d'olive.

5.1.1. Prétraitement physique

Une comparaison des méthodes de prétraitement appliquées sur les sous-produits oléicoles sont fournies dans le tableau III. SABBAAH et *al.* (2004) ont comparé l'impact du prétraitement de filtration par du sable et adsorption sur charbon actif et filtration à travers un papier filtre avec une porosité de 1,6µm. En comparaison avec d'autres matériaux, le charbon actif était plus supérieur en ce qui concerne l'élimination des substances toxiques et l'amélioration du rapport DBO₅ / DCO de 0,60 à 0,88.

Le traitement thermique est principalement mené afin de dégrader les composés cellulosiques des grignons et l'efficacité du processus dépend de la température et du temps.

Dans leur étude, RINCÓN et *al.* (2013) ont trouvé que 31-42% de DCO dans la phase liquide et que la productivité du méthane avait augmenté à 5% à 120°C avec un faible contenu en lignine. D'une part, le traitement thermique a réduit de 14% la production de CH₄ en raison de la libération des substances inhibitrices dans les margines, bien que la solubilisation de la matière organique était améliorée de 72% (GIANICO et *al.*, 2013).

Des applications extensives d'ultrason ont été menées comme prétraitements de divers effluents oléicoles. L'efficacité de ces traitements dépend principalement de la fréquence et du temps d'exposition aux ultrasons. En comparaison avec une haute fréquence, la faible fréquence augmente significativement la solubilisation et élimine les substances les plus toxiques. OZ et UZUN (2015) ont trouvé que la DCO soluble avait augmenté de 59% à 79%, ce qui avait comme effet une amélioration la productivité du méthane dans des traitements anaérobies ultérieurs. En effet, Un temps de 90 minutes d'exposition a montré une solubilisation de 57% de la DCO dans la phase liquide faisant ainsi augmenter le rendement du méthane de 5,6% (RINCON et *al.*, 2014).

Tableau III : Comparaison des méthodes de prétraitement appliquées sur les effluents issus du procédé d'extraction de l'huile d'olives.

Les effluents	Conditions du prétraitements	Effets de prétraitement	Référence
Margines	Ozonation à 20°C, pH de 4,85 et 40 l/h pour 8 h	La réduction de DCO à 6,2%, 94,3% de phénol éliminé, l'amélioration de la productivité de CH ₄	BENITEZ et al. (1997)
Margines	Aération avec le champignon <i>P. chrysosporium</i>	La réduction de DCO de 19%	GHARSALLAH et al. 1999
Margines	traitement électrochimique à pH 6,2, 12V et 20 mA cm ⁻² pour 30 min.	52% et 42% de DCO éliminé par les anodes d'AL et Fe, élimination des couleurs jusqu'à 97%, élimination du solide en suspension a augmenté de 48% à 68%.	INAN et al. (2004)
Margines	Filtration par sable + Charbon actif Adsorption	DBO ₅ /DCO augmente de 0,6 à 0,88 DCO éliminé dans UASB augmente de 40% à 68%.	SABBAH et al. (2004)
Margines	Electrocoagulation et électrode en fer + sédimentation	Plus de 70% de phénols sont éliminés, le rapport DBO ₅ /DCO a augmenté de 0,33 à 0,58, la réduction de la couleur à 90%, inhibition a diminuée à 66,4%, le rendement de CH ₄ a augmenté à 90%.	KHOUI et al. (2007)
Margines	Fenton à pH 2-4 pour 24 h	Le rapport DBO ₅ /DCO a augmenté de 0,14 à 0,53.	KALLEL et al. (2009)
Les enveloppes d'olive + margines	Traitement par la chaleur à 134°C et 3,12 bar pendant 20 min	72% d'augmentation de matière organique soluble, la productivité de CH ₄ a diminué de 14 % due à la libération des substances inhibitrices	GIANICO et al. (2013)
Grignons	Traitement par la chaleur à 120,180°C pendant 180 min	DCO soluble augmente à 42%, les composés hemicellulosiques, la cellulose et la lignine ont diminués. La productivité de méthane a augmenté 1,9% à 5%	RINCON et al. (2013)
Margines	Aération avec des bactéries indigènes pour 5 j	Polyphénol éliminé jusqu'à 90%, la dégradation organique a augmenté à 31,65%, le rendement de CH ₄ a augmenté 2,4 fois	GONZALEZ-GONZALEZ et GUADROS. (2014)
Grignon	Ultrason à 24kHz et 200W pour 90 min	La constante cinétique augmente à 48%, le taux de production du CH ₄ a augmenté de 12%, le rendement de CH ₄ a augmenté à 5,6%.	RINCON et al. (2014)
Margines	Ultrason à 20 kHz et 0,4 w/ml pour 10 min	DCO soluble augmente de 59% à 79%, la productivité de CH ₄ est améliorée à 20%, la turbidité a augmenté de 1200 à 1800 UTN	OZ et UZUN. (2015)

5.1.2. Prétraitement chimique

Les chercheurs ont rapporté que l'acidification peut réduire la teneur en composés phénoliques des grignons à environ 40,7%, tandis que le traitement avec des bases chimiques peut dégrader la lignine et les matières cellulosiques en améliorant ainsi la production du CH₄ (RINCÓN et al, 2009 ; BATTISTA et al, 2014). En effet, BATTISTA et al. (2014) ont déclaré une forte amélioration en ajoutant les sels FeCl₃ et CaCO₃.

Les processus d'oxydation avancée offrent une forte élimination de produits chimiques organiques et toxiques et améliorent la biodégradabilité anaérobie. L'efficacité du procédé électrochimique se base sur le type d'électrode et le pH. INAN et *al.* (2004) ont appliqué un prétraitement électrochimique à pH 6,0, une élimination de 52% et 42% de DCO était obtenue avec l'utilisation d'anodes en aluminium et en fer, respectivement. D'autre part, NEFFA et *al.* (2013) ont rapporté que 57% de composés phénoliques sont éliminés par des électrodes d'aluminium avec l'augmentation du rapport $\text{DBO}_5 / \text{DCO}$ de 0,33 à 0,58. KHOUI et *al.* (2007) ont abouti, par l'utilisation d'électrodes en fer, à une élimination de plus de 70 % de composés phénoliques ainsi qu'une amélioration du rendement en méthane (CH_4) à environ 90%.

Le processus Fenton a été évalué comme étant l'une des meilleures méthodes de prétraitement pour éliminer des polluants toxiques provenant des effluents oléicoles et améliorer leur biodégradabilité. Cette méthode peut également aboutir à une élimination complète de DCO avec des rendements rapportés variant de 80% à 95% (RIZZO et *al.*, 2008 ; ELGAHARY et *al.*, 2009).

5.1.3. Prétraitements biologiques

Des prétraitements aérobies ont été largement utilisés pour l'élimination sélective des composés phénoliques à partir des margines, cependant une diminution de la concentration en DCO réduit le potentiel de la production du méthane. 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. En conséquence, 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. L'aération a améliorée le rendement en méthane avec un facteur de 2,4 par l'élimination de DCO.

Les chercheurs ont pu éliminer des quantité considérable de DCO et de composés phénoliques quand les margines ont été traitées par des champignons tels que *Geotrichum candidum* et *Aspergillus terreus* (BORJA et *al.*, 1995). En effet, *G. candidum* avait éliminé 75% de la DCO des margines tandis que *P. chrysosporium* a été efficace sur la dégradation de polyphénols de faibles poids moléculaires et avait réduit la DCO de 20-50% et la toxicité de 5% (GHARSALLAH et *al.*, 1999 ; SAYADI et *al.*, 2000 ; GONZALEZ-GONZALEZ et CUADROS, 2014) (voir tableau IV).

5.2. Biotransformation des margines et grignons en molécules d'intérêts

En effet, plusieurs études se sont focalisées sur la production de méthane à travers la digestion anaérobie des margines (FEDORAK et HRUDEY, 1984 ; RINCÓN et *al.*, 2009). L'application du processus 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)

Tableau IV: Déphénolisation des sous-produits par des traitements microbiens (DERMECHE et al., 2013)

Sous produits	Souche	Réduction de la DCO (%)	Réduction de composés phénoliques (%)	Réduction de la toxicité et leurs effets	Références
les 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	-	GIANNOUTSOU 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 genotoxicité	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)
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>Coriolopsis rigida</i>	-	89	Elimination de l'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 de blé	D'ANNIBALE et al. (2004)
Margines	<i>Lentinula edodes</i>	-	75	-	LAKHTAR et al. (2010)
Grignon humide	<i>Coriolopsis rigida</i>	-	73	Diminution de la phototoxicité	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)
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</i> - <i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	50	-	PINTO et al. (2003)

5.2.1. Production de l'hydrogène

Un grand nombre d'espèces microbiennes avec des différences taxonomiques et physiologiques, peuvent produire de l'hydrogène (Tableau V) par des voies métaboliques simples ou combinées.

Les procédés à une ou deux étapes de fermentation ont été développés pour la production de l'hydrogène. La production fermentaire de l'hydrogène à travers une fermentation à l'obscurité d'eau diluée de grignon humide (1:4) a été démontré comme faisable, ce qui entraîne 2,8-4,5 mmol de de l'hydrogène par gramme de glucides consommée (KOUTROULI et al, 2006 ; KOUTROULI et al, 2009).

Avec un CSTR (completely stirred tank reactor) l'un des principaux facteurs dictant le rendement de l'hydrogène est le temps de rétention hydraulique (TRH) (KOUTROULI et al, 2006 ; NTAIKOU et al, 2009). Des TRH compris entre 27 et 33 h se sont avérés favorables en termes de l'acidification totale des eaux usées et la production du propionate, tandis qu'une HRT de 14,5 h favorisait à la fois la production du H₂ et du rapport butyrate /acétate (NTAIKOU et al., 2009).

Avec le véritable développement du domaine de la bioénergie, le coût de biomasses végétales et des matières organiques fermentescibles, va augmenter d'une manière significative dans un avenir proche et pourrait rivaliser avec d'autres domaines industriels

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1039-1043.

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

Il a été rapporté que l'efficacité dans la production de l'hydrogène par masse de glucides consommée, diminue avec TRH (KOUTROULI et al., 2006). La production de l'hydrogène des margines diluée (1% et 20%) a été menée à l'aide *Rhodobacter sphaeroides* en photobioréacteurs à colonne (EROGLU et al., 2004). Le potentiel de production de l'hydrogène (PPH) était d'environ 13,9 L/L de margines. Une étude comparative avec plusieurs échantillons de margines dilués (4%) a trouvé une relation linéaire entre les rapports molaires C / N et les capacités de production de l'hydrogène. En effet, le PPH le plus élevé (20 L/L de margines) a été obtenu avec une teneur en matière organique la plus élevée (principalement l'acide acétique, aspartique et glutamique) et un rapport molaire C/N le plus élevée (EROGLU et al., 2009).

EROGLU et al. (2006) ont aussi travaillé sur un procédé à deux étapes où une fermentation à l'obscurité par des cultures de boues activées a été combinée avec une photofermentation par *Rhodobacter sphaeroides* dans des réacteurs discontinus. Le PPH le plus élevé (29 L / L margines) de la post-photofermentation a été obtenu en utilisant les margines diluées (50%, v/v) issus de l'étape de fermentation à l'obscurité comme substrat.

L'hydrogène et le méthane ont été également produits dans un procédé à deux étapes où le a été de l'hydrogène produit dans la première étape et le méthane dans la seconde (KOUTROULI et al., 2009).

Le grignon humide a été rapporté d'idéal pour des productions mésophiles et thermophiles (55°C) du méthane (KOUTROULI et al., 2009). Il a été démontré que la production de l'hydrogène dans des conditions thermophiles était plus efficace que le processus 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 des microalgues et les margines comme substrat (SANCHEZ VILLASCLARAS, 1996 ; PINTO et al, 2003), en effet, FARALONI et al. (2011) ont aussi proposé la photoproduction de l'hydrogène par la souche de *Chlamydomonas reinhardtii*.

5.2.2. Production de méthane

Dans les procédés développés pour la production du méthane ont distingue ceux à deux étapes de traitement aérobie-anaérobie et ceux à deux phases de digestion anaérobie.

Les champignons ont été largement utilisés pour prétraiter les sous-produits oléicoles avant la digestion anaérobie (HAMDI et al, 1992 ; BLIKA et al, 2009). Le prétraitement des margines avec *Aspergillus niger* avait pour effet le dédoublement de la production du méthane dans la subséquente digestion anaérobie (HAMDI, 1991). 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 méthane (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 composés phénoliques et d'améliorer la production du méthane 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 composés phénoliques des margines, de plus, une bonne amélioration de la production du méthane est enregistrée.

Des études récentes 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 acides gras volatils (AGV) et les alcools. Dans la deuxième phase, ces métabolites seront métabolisés et bio-transformés en CH₄ et CO₂ par les méthanogènes ou les archées.

Une autre approche récemment étudiée est la co-digestion des margines avec d'autres substrats déchets comme le fumier de volaille, les eaux usées d'abattoirs, les résidus viticoles et le fumier de vache liquide, fournissant des rendements en méthane jusqu'à 250,9L/Kg de DCO (GELEGENIS et *al.*, 2007 ; DAREIOTI et *al.*, 2010).

Une mixture contenant 20% de margines et 80% du fumier de vache liquide a été dégradé en anaérobiose via la digestion anaérobie à deux étapes sous des conditions mésophiles avec un temps de rétention hydraulique (TRH) de 19 jours (DAREIOTI et *al.*, 2010). La production du méthane est enregistrée à un taux équilibré allant jusqu'à 0,91L/L/jour.

5.2.3. Production d'éthanol

En ce qui concerne la fermentation du grignon, peu d'études ont été rapportés sur sa bioconversion en bioéthanol. La teneur élevée en matière organique des sous-produits oléicoles, fait d'eux une ressource alternative prometteuse pour la production de bioéthanol soit par des bactéries ou des levures.

Dans une expérience rapportée par ASLI et QATIBI (2009), les composés lignocellulosiques des grignons d'olives ont été prétraités avec de l'acide sulfurique dilué (160 °C) suivie par précipitation et filtration pour éliminer les inhibiteurs de la fermentation. Les hydrolysats obtenus contenaient 18,1 g / l de sucres solubles, qui ont été fermenté par une souche recombinante d'*Escherichia coli* afin de produire de l'éthanol. Un rendement de 0,45 g / g de sucre a été enregistré.

Une étape de prétraitement enzymatique en utilisant un mélange de deux enzymes celluloses, Celluclast et Novozyme 188, combiné avec une oxydation par voie humide a été appliquée au grignon d'olive pour produire l'éthanol (HAAGENSEN et *al.*, 2009). L'éthanol a été produit après une étape ultérieure de fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* et *Thermoanaerobacter mathranii*. Le plus haut niveau de production d'éthanol a été obtenu par l'application d'une seule étape d'un prétraitement enzymatique.

Les margines bioconvertis par des champignons, tels que *Pleurotus sajor-caju* semblent également être un substrat prometteur pour la production de bioéthanol (MASSADEH et MODALLAH, 2008), et le prétraitement avec *Pleurotus sajor-caju* a été déjà démontré pour améliorer les rendements de la production l'éthanol. À l'aide des margines diluées traitées thermiquement et prétraitées avec *Pleurotus sajor-caju*, la production d'éthanol a été de 14,2 g /L après 48 h de la fermentation avec la levure. Cette souche était également capable d'éliminer les composés phénoliques.

5.3. Application et utilisation des sous-produits oléicoles

5.3.1. Usage agricole

Le contenu élevé en eau, matière organique et nutriments font des margines un bon candidat pour sa bioconversion en engrais après l'élimination des CP (MEKKI et *al*, 2009 ; PIOTROWSKA et *al*, 2011).

Le traitement biologique aérobie, principalement avec des levures et des champignons filamenteux, a émergé comme méthodes de biofertilisation appropriées car ils conduisent à des résidus de faible toxicité, DCO et teneur en composés phénoliques.

Le compostage est également l'une des technologies assurant la transformation des margines en fertilisant. Le compostage de déchets organiques est un processus bio-oxydant impliquant la minéralisation et l'humification partielle de la matière organique (HADDADIN et *al*, 2009). ZENJARI et *al*. (2006) ont trouvé que la dégradation des composés phénoliques a atteint 95% après la phase de maturation et que la toxicité a complètement disparu après deux mois de compostage.

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

5.3.2. Usage industriel

5.3.2.1. Produits de valeur issus de la production de l'hydrogène

La production photobiologique de l'hydrogène 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 des agents anticancéreux, des colorants alimentaires et des 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 plastique. Ces granules de polyester intracellulaires sont produits par certaines bactéries pour stocker le carbone et l'énergie grâce au métabolisme d'acide gras (KESSLER et *al*, 2001). En outre, NTAIKOU et *al*. (2009) ont montré la faisabilité de la production combinée de l'hydrogène et biopolymères à partir des margines en utilisant un procédé à deux étapes.

5.3.2.2. Autres biopolymères

De nombreuses équipes de recherches ont traité microbiologiquement les margines pour produire des polysaccharides microbiens (RAMOS-CORMENZA et *al*, 1995 ; LOPEZ et RAMNOS-CORMENZANA, 1996 ; MORILLO et *al*, 2007 ; AGUILERA et *al*, 2008 ; MORILLO et *al*, 2008). Les margines ont été proposés 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 augmenté considérablement les rendements de 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 nutriments et d'énergie, réduisant ainsi la toxicité des déchets. Le rendement le plus élevé de la production

d'exopolysaccharide était de l'ordre de 5,1 g / L avec 80% de margine (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 d'exopolysaccharides était de 2g /L (MORILLO et al., 2006). Ces exopolysaccharides peuvent être appliqués comme des biofiltres pour les métaux lourds qui contaminent les eaux (MORILLO et al., 2008).

Enfin, il a été démontré que les souches de *Pseudomonas sp.* peuvent pousser sur les margines en tant que seule source de carbone et peuvent accumuler des rhamnolipides (MERCADÉ et al., 1993).

5.3.2.3. Production d'enzymes

Les enzymes industrielles peuvent être produites par des levures et des champignons filamenteux en utilisant les sous produits d'extraction d'huile d'olive comme substrats (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 sont produites par *Panus tigrinus* et les pectinases par *Cryptococcus var albidus* (CROGNALE et al., 2006), alors que les lipases ont été obtenus par *Candida cylindracea* et les souches de *Yarrowia lipolytica* (LANCIOTTI et al, 2005 ., D'ANNIBALE et al, 2006 ., BROZZOLI et al, 2009 ., GONCALVES et al, 2010).

Les lipases microbiennes ont été appliquées dans la laiterie, produit pharmaceutique, détergent et autres industries (CORDOVA et al., 1999). Le grignon a également été utilisé avec succès pour la production de lipase à l'aide des cultures fongiques thermostables de *Rhizomucor pusillus* et *Rhizopus rhizopodiformis* (CORDOVA et al., 1998).

5.3.3. Autres usages

Les margines ont été traditionnellement utilisées pour fabriquer des savons tels que le savon Marseille. Cependant, d'autres auteurs ont étudié les applications non biologiques des sous-produits oléicoles, notamment pour valoriser leur grande capacité d'adsorption. MEKSI et al. (2012) ont rapporté une autre approche pour la valorisation des margines en tant que ressource possible pour la teinture de matières textiles telles que la laine. AKAR et al. (2009) décrit un rendement élevé de biosorption pour le grignon pour éliminer le colorant RR198 des eaux usées.

Le charbon actif obtenu du grignon constitue une autre application potentielle pour éliminer les colorants (NAJAR-SOUISSI et al., 2005), les odeurs, et même les contaminants de l'eau tels que l'arsenic (BUDINOVA et al., 2006) ou l'aluminium (GHAZY et al., 2006) et il est aussi utilisé en tant que biosorbant des ions de métaux lourds (AZIZ et al, 2009 ; BACCAR et al, 2009). Plus récemment, MARTIN-LARA et al. (2012) ont rapporté que le noyau d'olive traitée à l'acide était un bon biosorbant pour l'élimination du plomb dans les eaux usées.

La cosmétologie pourrait également être un domaine intéressant pour l'application des sous-produits oléicoles à l'avenir. Le noyau d'olive a récemment été effectivement incorporé dans des formulations cosmétiques en raison de ses propriétés exfoliantes (Anonyme1).

La dernière application non-biologique des sous-produits oléicoles décrite dans la littérature est en chimie comme polyols, une approche intéressante pour la production de polyuréthane. Une étude a récemment rapporté l'utilisation d'oxypropylation de noyaux

d'olive comme macromonomères dans la synthèse des polyuréthanes et des polyesters, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'exploitation de ce sous-produit (MATOS et *al.*, 2010). De même, TEJEDA-RICARDEZ et *al.* (2003) ont rapporté la liquéfaction par solvolysé des résidus de noyau d'olive pour obtenir des produits liquéfiés qui peuvent être utilisés comme matières premières des matériaux pour les résines à phénol-formaldéhyde.

Partie 2: partie expérimentale

I. Matériels et méthodes

Le travail expérimental de ce mémoire a été effectué au sein du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB, microbiologie appliquée) et le laboratoire commun de microbiologie à l'université de Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou (UMMTO), durant la période Mars – Juin de l'année 2016.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel biologique

➤ Les margines

Les margines utilisées proviennent d'une unité industrielle moderne de trituration d'olives par centrifugation à trois phases, située dans la région de Ouaguenoune (Tizi-Ouzou) pendant la campagne oléicole 2015/2016.

Au laboratoire, les échantillons ont été répartis dans des bouteilles en plastiques, puis conservés à -18°C jusqu'au moment de l'emploi.

Ces margines sont constituées de 10,68 % (95 g/l) de MS, et de 89,32 % d'eau. Ces teneurs ont été déterminées par étuvage à 105°C ; cette quantification sert à exprimer la quantité des composés phénoliques dosés par spectrophotométrie en mg contenus dans 1g de MS.

➤ Les souches bactériennes

Le Tableau VI montre les souches utilisées (ainsi que leurs codes respectifs) dans cette étude ainsi que leurs températures optimales de croissance.

Tableau VI: Les souches bactériennes utilisées

Souches	Température optimale
<i>Lactobacillus gasseri</i> (LB ₂)	37°C
<i>Lactobacillus paracasei</i> (LB ₃)	30°C
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LB ₄)	37°C
<i>Lactobacillus casei</i> (LB ₅)	30°C
<i>Lactobacillus brevis</i> (LB ₆)	30°C
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LB ₇)	37°C

I.1.2. Produits chimiques et appareillage

➤ Produits chimiques

Les produits chimiques et les réactifs utilisés sont :

- ❖ **Solvants organiques** : acétate d'éthyle, chloroforme, méthanol, diméthylsulfoxyde (DMSO) ;
- ❖ **Acides/Bases** : acide formique ;
- ❖ **Etalons (composés phénoliques)** : acide gallique ;
- ❖ **Réactifs** : 2,2- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), réactif de Folin-Ciocalteu ;
- ❖ **Sels** : carbonate de sodium (Na₂CO₃), Chlorure de Sodium (NaCl),
- ❖ **Autres produits** :

*Acide ascorbique ;

* papier WATTMAN N° 1.

➤ Milieux de cultures

Suivant les méthodes employées et selon les souches ; les milieux de culture utilisés sont :

- Bouillon MRS (CONDA) ;
- Gélose MRS (CONDA) ;
- Gélose Mueller Hinton (MH) ((CONDA) Biokar diagnostics);
- Bouillon nutritif (CONDA);
- Gélose nutritive (CONDA);
- Bouillon BHIB.

Les milieux MRS ont été additionnés de : L-cystéine (SIGMA).

➤ Appareillage

Les différents appareils utilisés sont donnés dans le tableau VII:

Tableau VII : Tableau regroupant l'appareillage utilisé lors de l'expérimentation.

Appareil	Firme
Balance de précision	KERN
Etuve 30°C, 37°C	BINDER, MEMMERT
Agitateur magnétique	VARIOMAG poly 15
Bain-marie thermostaté	MEMMERT
Spectrophotomètre UV-Visible	MEDLINE scientific limited
Microscope photonique	Hund WETZLAR
Centrifugeuses réfrigérée	SIGMA 4-16 K
Vortex	BIOBLOCK SCIENTIFIC
Four à moufle	NABERTHERM controller B 170
Autoclave de paillasse	PBINTERNATIONAL
pH mètre	HANNA instrument
Congélateur	ENNIEM
Réfrigérateur	MAXIPOWER

I.2. Méthodes

1.2.1. Caractérisation des margines

• Teneur en matière sèche totale

La matière sèche totale (MST) correspond au résidu sec appelé parfois extrait sec. Il s'agit des matières restantes après séchage de l'échantillon à 105°C jusqu'à obtention d'un résidu sec à poids constant. La matière sèche comprend à la fois les matières en suspension et les composés dissous.

Elle sert à exprimer la quantité des composés dosés par spectrophotométrie, en milligrammes contenus dans 1 gramme de MST.

Elle est déterminée par évaporation d'un échantillon de 20 ml dans un bécher, préalablement séché et taré, à 105°C jusqu'à poids constant. Après refroidissement dans un dessiccateur, la teneur en matière sèche, exprimée en g/l, est donnée par la formule suivante:

$$MS = \frac{(m - m_0)}{V} \times 1000 \text{ g/L}$$

MS : teneur en matière sèche

m_0 : masse du bécher vide

m : masse du bécher et des margines après séchage.

V : volume de la prise d'essai (20 ml).

La teneur en eau ou humidité est déterminée comme suit :

$$TE = \frac{(m_1 - m)}{(m_1 - m_0)} \times 100 (\%)$$

TE : teneur en eau

m_1 : masse du bécher contenant les 20ml de margines avant séchage

- **Teneur en cendre (matière minérale)**

La matière sèche obtenue est calcinée à 600°C dans un four à moufle pendant 24 heures.

La teneur en cendres exprimée en g/l est donnée par la formule suivante:

$$TC = \frac{m_c}{V} \times 1000 (g/l)$$

TC: teneur en cendres (g/l).

m_c : masse des cendres utilisées

V: volume de la prise d'essai (20ml).

- **Teneur en matière volatile (Matière organique)**

La matière volatile est déterminée en faisant la différence entre la matière sèche obtenue par évaporation à 105°C et les résidus de cendres issues de la calcination à 600°C pendant 2 heures. Elle est exprimée en g/l.

$$MV = MS - TC (g/l)$$

- **pH**

La mesure de l'acidité est faite pour des échantillons de margines non diluées. Après l'étalonnage du pH-mètre, l'électrode de mesure est plongée dans un bêcher contenant un volume de 20ml de margines et le pH est noté.

1.2.2. Extraction des polyphénols des margines

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tout le contenu total en phénols, et par conséquent affecte les activités biologiques méditées par ces métabolites (LEE et *al.*, 2003).

L'extraction des polyphénols totaux (PPT) à partir des margines brutes est une extraction de type liquide-liquide qui repose sur le principe de solubilité dans les solvants organiques. Le choix du solvant dépend de la nature des composés à extraire, de leur solubilité dans le solvant et surtout de la nature du matériel végétal.

➤ **Extraction des polyphénols totaux à l'acétate d'éthyle**

Un volume de margines de 100ml est additionné de 100ml de solvant " acétate d'éthyle" (v /v), l'ensemble est homogénéisé. Après une centrifugation à 4°C et à une vitesse de 4000 g pendant 5min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en polyphénols (surnageant) et les margines (culot).

La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C (ZAHARI *et al.*, 2014). L'extrait sec est récupéré dans un volume minimum du DMSO ou de méthanol. Le protocole est illustré par la figure 5. En effet, FKI *et al.* (2005) ont démontré que l'acétate d'éthyle est plus efficace que les autres solvants d'extraction avec un taux d'extraction élevé.

Si les extraits polyphénoliques doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant de récupération peut être critiquable car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique (YRJONEN, 2004); Pour cela, le diméthylesulfoxyde « DMSO » a été choisi en étant le solvant préférable par la majorité des auteurs, notamment, ALAVI *et al.* (2005), OWNAGH *et al.* (2010) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir puissant permettant l'évaluation direct de l'activité antimicrobienne.

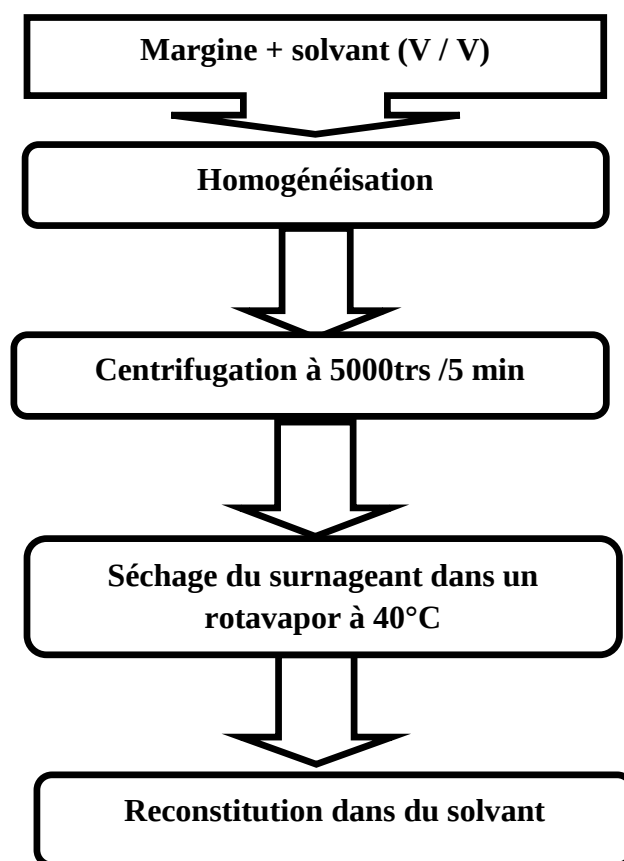


Figure 5: Protocole d'extraction des polyphénols à partir des margines.

Pour une pratique directe de quelques tests tel que le test de l'activité antioxydante, des extraits secs de polyphénols ont été reconstitués dans un volume du méthanol,

Plusieurs échantillons sont utilisés pour les différentes analyses, chaque échantillon représente une série d'extrait et le détail est cité ci-après :

Echantillon 1 : série 1 d'extrait brut (EB) et d'extraits fermentés (EF) ;

Echantillon 2 : série 2 d'extrait brut (EB') et d'extraits fermentés (EF') ;

Echantillon 3 : série 3 d'extrait brut (EB'') et d'extraits fermentés (EF'').

Les fermentations sont réalisées avec les souches de lactobacilles citées dans le tableau VI précédant.

➤ Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = M / M_0 \times 100$$

- **R (%)** : Rendement exprimé en % ;

- **M** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant ;

- **M₀** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

I.2.3. Dosage des composés phénoliques par colorimétrie

La teneur en composés phénoliques des différents extraits obtenus à partir des margines traitées et non traitées a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue.

Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Les solutions des différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions.

A 125 µl de chaque extrait ou dilution, sont ajoutés 500µl d'eau distillée puis 125 µl du réactif Folin-Ciocalteu, six minutes plus tard, 1,25 ml de la solution aqueuse de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7% (annexe1) sont additionnés au milieu réactionnel puis le mélange est ajusté à 3 ml avec de l'eau distillée.

Après 60 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm au spectrophotomètre contre un blanc sans extrait (figure 6). La quantité des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (AG) (0-200µg/ml) de la forme « y = ax » (annexe 1) et est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matières sèches totales des margines brutes.

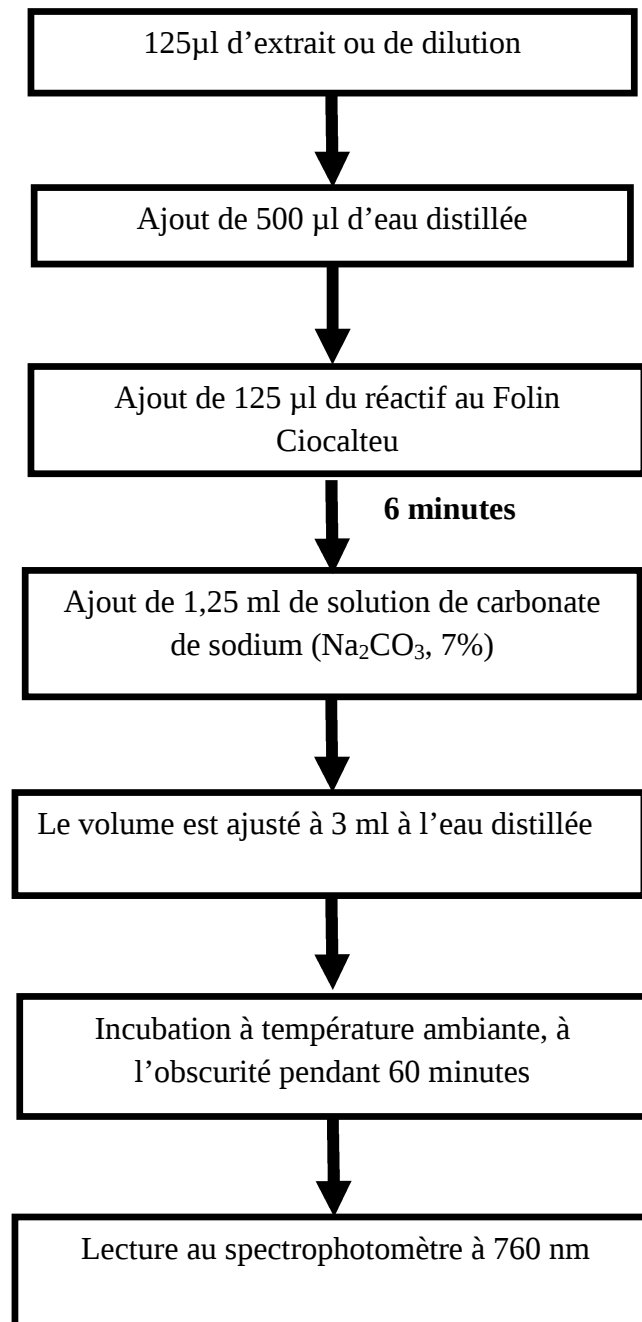


Figure 6: Etapes de dosage des polyphénols selon SINGLETON et ROSSI (1965).

1.2.4. Activité anti-oxydante des extraits de margines avant et après fermentation

Cette méthode utilise le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), un radical libre, coloré, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes d'hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs pour étudier la relation structure-activité anti-oxydante des composés phénoliques.

Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 7). En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (MOLYNEUX, 2004).

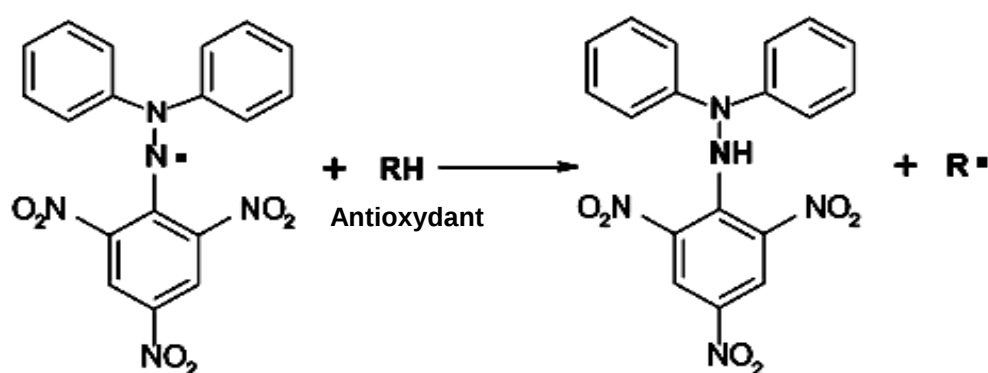


Figure 7: Structure du DPPH• et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO *et al.*, 2007).

Le protocole expérimental utilisé est celui de BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol. 20µl des solutions d'extraits phénoliques issus des margines brutes et des margines fermentées ou standards sont ajoutés à 1ml de DPPH. Le mélange est homogénéisé au vortex et laissé à l'obscurité pendant 30 minutes et la décoloration par rapport au contrôle négatif qui contient uniquement la solution de DPPH et méthanol qu'on mesure à 517nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique synthétique (vitamine C) comme un antioxydant standard. Les extraits phénoliques de margines utilisés dans le milieu réactionnel, ont été préparé à plusieurs concentration.

Le pourcentage d'activité anti-radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{DPPH (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Avec :

A₀ : Absorbance en absence de l'échantillon

A₁ : Absorbance du mélange en présence de l'échantillon

La diminution de l'absorbance est évaluée par le pourcentage d'inhibition (% I) et l'IC₅₀ (quantité équivalente en extrait qui neutralise 50% du DPPH). Une IC₅₀ faible correspond à une activité antioxydante ou anti-radicalaire élevée de l'extrait. Ce paramètre a été introduit par BRAND-WILLIAMS et ses collaborateurs (1995) et a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (BRAND-WILLIAMS *et*

al, 1995 ; BOSKOU *et al*, 2006 ; LOŽIENE *et al*, 2007; CHEW *et al*, 2009). Le pouvoir antiradicalaire APR est inversement proportionnel à l'IC50 (APR=1/IC50) (PRAKASH *et al*, 2007 ; CHEW *et al*, 2009).

1.2.5. Fermentation aérobies des margines

Dans cette partie expérimentale, la fermentation des margines est assurée par l'utilisation des souches appartenant au genre *Lactobacillus* citées dans le tableau VI. Avant l'utilisation de ces souches, un examen microscopique est réalisé à fin d'assurer la pureté des souches (voir annexe 2).

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les souches de Lactobacilles sont des bactéries Gram-positifs de forme bâtonnet, immobiles, non-sporulantes, anaérobies facultatives, homo-fermentaires et catalase négatives (WILLIAM, 1994).

Plusieurs espèces appartenant à ce genre sont utilisées dans diverses industries comme agents de fermentation lactiques ou sont rencontrées comme contaminants (KHALID et MARTH, 1990; LECLERC *et al.*, 1994).

1.2.5.1. Conditions de culture des souches

✓ Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Man-Rogosa- Sharpe (MRS). Le bouillon MRS est préparé en dissolvant 55,3g de poudre de MRS dans 1 L d'eau distillée. 0,5 g de cystéine est additionné à ce milieu.

La gélose MRS est préparée en ajoutant 15 g/L d'agar au bouillon MRS.

Après agitation, les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 15 min.

✓ Conservation

Les souches de lactobacilles sont conservées sur milieu MRS gélifié 4°C sur des périodes courtes.

✓ Mise en culture

Une opération de repiquage est nécessaire avant chaque test où les souches conservées à 4°C sont revivifiées dans 20ml du MRS bouillon incubées à température optimale pendant 18 heures.

1.2.5.2. Culture des souches de lactobacilles

Une préculture de 24 h est réalisée où les milieux MRS-cystéine sont ensemencés par une biomasse issue d'une culture de 18 h. Pour constituer l'inoculum, les précultures (20 ml) sont centrifugées stérilement à 4000tr pendant 5 min à 4 °C, suivie de plusieurs lavages à l'eau physiologique, le culot est ensuite récupéré, et remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

La suspension bactérienne obtenue est agitée au vortex pendant quelques secondes pour une bonne homogénéisation. La DO initiale prise à 600 nm doit être proche de 0,4. 1ml de cette suspension est ajouté à 20ml de milieu MRS-cystéine comme témoin positif afin de pouvoir comparer les biomasses obtenues pour chaque souche.

Les fermentations sont réalisées dans des tubes de 23 ml remplis à raison de 21ml (20 ml du milieu MRS-margines autoclavé et 1ml de l'inoculum bactérien) et hermétiquement fermés. Les tubes sont ensuite incubés aux températures de développement des souches (voir tableau VI) pendant 24, 48 et 72h heures.

1.2.5.3. Dénombrement de colonies sur boîtes

Le dénombrement bactérien est effectué à partir d'une série de dilution (10^{-1} à 10^{-10}) dans de l'eau physiologique stérile pour le témoin positif ainsi que pour le test (MRS-margine ensemencés), et ceci à t_0 , 24h et 48h d'incubation.

100 μ l sont ensuite prélevés de chaque dilution et étalés sur une gélose MRS, à l'aide d'un râteau stérile (voir figure 8).

Le comptage de colonies a été réalisé à t_0 , 24h et 48h d'incubation. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été prises en considération.

1.2.6. Fermentation anaérobie

Des fermentations anaérobies sont réalisées à l'aide de la microflore autochtone des margines et des grignons, d'autres avec les quatre souches de *Lactobacillus* (LB₂, LB₄, LB₅ et LB₇). Ces souches ont été repiquées dans 150 ml de MRS et incubées à température optimale pendant 24 h.

Après incubation, la culture bactérienne jeune de chaque souche est centrifugée à 4000 trs/5min à 4°C, suivie de plusieurs lavages à l'eau physiologique, le culot est ensuite récupéré. 40 ml de margines autoclavées ont été ensemencés par la biomasse récupérée accompagné d'un témoin négatif (margine non ensemencée). Après une bonne homogénéisation, 10 ml de chaque mélange ont été introduits dans un tube. Les quatre mélanges ainsi que les tubes ont été incubés à température optimale pendant 24 à 48h.

La vérification de la production de biogaz a été faite par l'introduction d'une seringue à travers le bouchon après 24h et 48h d'incubation. La phase liquide est analysée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) concernant les métabolites produits et le biogaz est analysé par chromatographie gazeuse (CPG)

Des extractions à l'acétate d'éthyle (v/v) ont été effectuées sur les cultures en fin de fermentation et les extraits obtenus (échantillon 3) ont été reconstitués dans le DMSO ou du méthanol pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

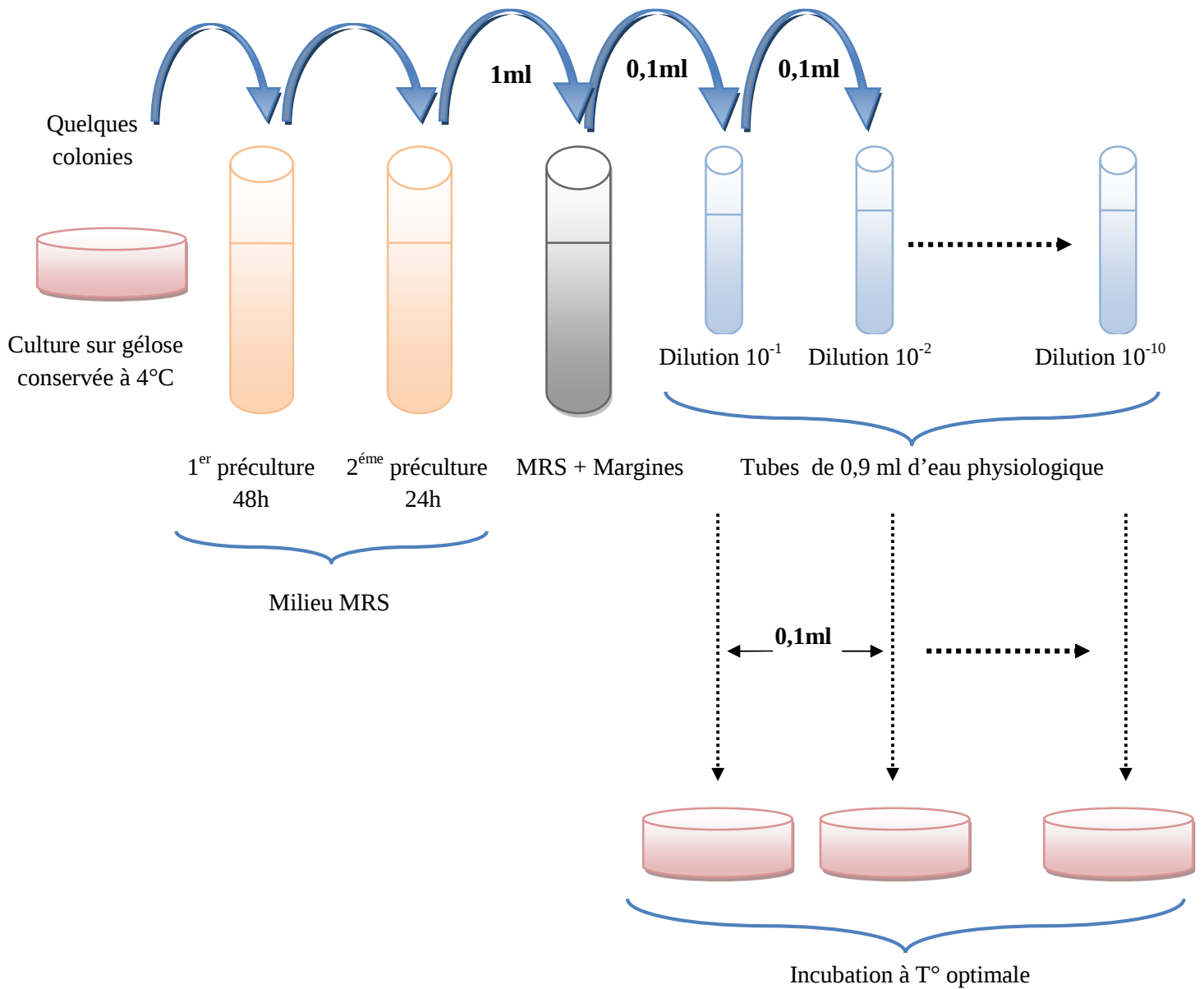


Figure 8: Etapes du dénombrement des souches de *Lactobacillus*

II. Résultats et discussion

2.1. Caractérisation des margines

- **Teneur en matière sèche et en eau**

La teneur des margines en matières sèches totales est de l'ordre de 95g/l. Elle est nettement plus élevée que celle des margines prises comme échantillon par STEEGMANS et FRAGEMAN. (1992) (19,2 g/l), et celle des margines étudiées par PAREDES *et al.* (1999), et par YAHIAOUI. (2012) (13g/l).

Cependant, cette valeur se rapproche de celle des margines étudiées par AISSAM. (2003) (98g/l). De même, EL ABBASSI *et al.* (2011) ont trouvé que leur échantillon de margines contenait 90 g/l de MST.

Ces variations peuvent être dues à des paramètres climatiques et géologiques, à des variations botaniques, au stade de maturation de l'olive et au procédé d'extraction d'huile. La teneur en eau est de 89,32% et ceci s'explique par l'ajout de grandes quantités d'eau lors du processus d'extraction de l'huile d'olive qui génère des margines diluées.

- **Teneur en matière volatile et en cendres**

Les teneurs moyennes des margines en matière volatile (MV) et en cendres sont de l'ordre de 84,9 g/l et 10,1 g/l respectivement. La MV représente 89,36% de la MS, ce qui montre la nature organique de ces effluents.

Ce pourcentage est proche de celui observé par plusieurs auteurs (ASSA *et al.*, 2002 ; FOUNTOULAKIS *et al.*, 2002 ; FADIL *et al.*, 2003 ; AISSAM 2003 ; IBOUKHOULEF, 2014). Cette valeur est supérieure à celles des margines étudiées par YAHIAOUI. (2012) (74%). Ces variations sont dues au fait que les margines n'ont pas subi de prétraitement préalable.

- **pH**

La mesure du pH a donné une valeur de 6.09. Les margines sont donc des effluents acides, en raison de la présence des acides organiques. La valeur enregistrée dans cette étude se rapproche de celle citée par EROGLU *et al.* (2008) (4.2 à 5.9). L'acidité des margines augmente avec la durée de leur stockage. Ce phénomène peut être expliqué par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques. Ces réactions se manifestent par un changement de la coloration initiale des margines du marron vers un noir très sombre (ASSAS, 2009).

- **Evolution du pH après fermentation**

Le tableau VIII présente les valeurs du pH obtenues après fermentation des margines par différentes souches de *Lactobacillus* en tenant compte du pH des margines brutes qui était de 6.09.

Tableau VIII: les valeurs du pH obtenues après fermentation des margines

Souches assurant la fermentation	pH à t =72h
LB ₂	5.60
LB ₃	5.57
LB ₄	5.63
LB ₅	5.67
LB ₆	5.63
LB ₇	5.59

Les valeurs du pH mesurées après 72 h d'incubation pour les margines brutes et celles fermentées par les souches LB₂, LB₃, LB₄, LB₅, LB₆ et LB₇ étaient de 6.09 ; 5.60 ; 5.57 ; 5.63 ; 5.67 ; 5.63 et 5.59 respectivement. Les valeurs du pH des margines diminuent au cours des croissances bactériennes. Ces diminutions confirment que les lactobacilles sont capables de fermenter les margines étant chargées en polyphénols.

Dans une étude menée par AYED et HAMDI. (2003), sur la décoloration par fermentation des margines par *Lactobacillus plantarum* où ils ont trouvé qu'une croissance de cette souche sur les margines pendant 6 jours a produit une augmentation du nombre de cellules viables et une diminution du pH en conduisant à une dépolymérisation des composés phénoliques de haut poids moléculaire, avec une décoloration résultante des margines frais. Environ 58% de la couleur, 55% de la demande chimique en oxygène (DCO) et 46% des composés phénoliques ont été éliminés d'une margine diluée dix fois. La diminution du pH après la co-fermentation de deux effluents margine/lactosérum de fromage à une proportion de 10/90, induit la précipitation des protéines du lactosérum avec des composés phénoliques et donc améliore la décoloration (AOUIDI et al., 2009).

De même, NADOUR. (2015) a noté une diminution remarquable du pH au cours du développement de *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei* dans les milieux supplémentés par de glucose, des résidus insolubles dans l'alcool et de fraction soluble extraite des margines.

2.2.Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction à l'acétate d'éthyle des polyphénols des margines brutes et fermentées sont présentés dans l'histogramme suivant (figure 9).

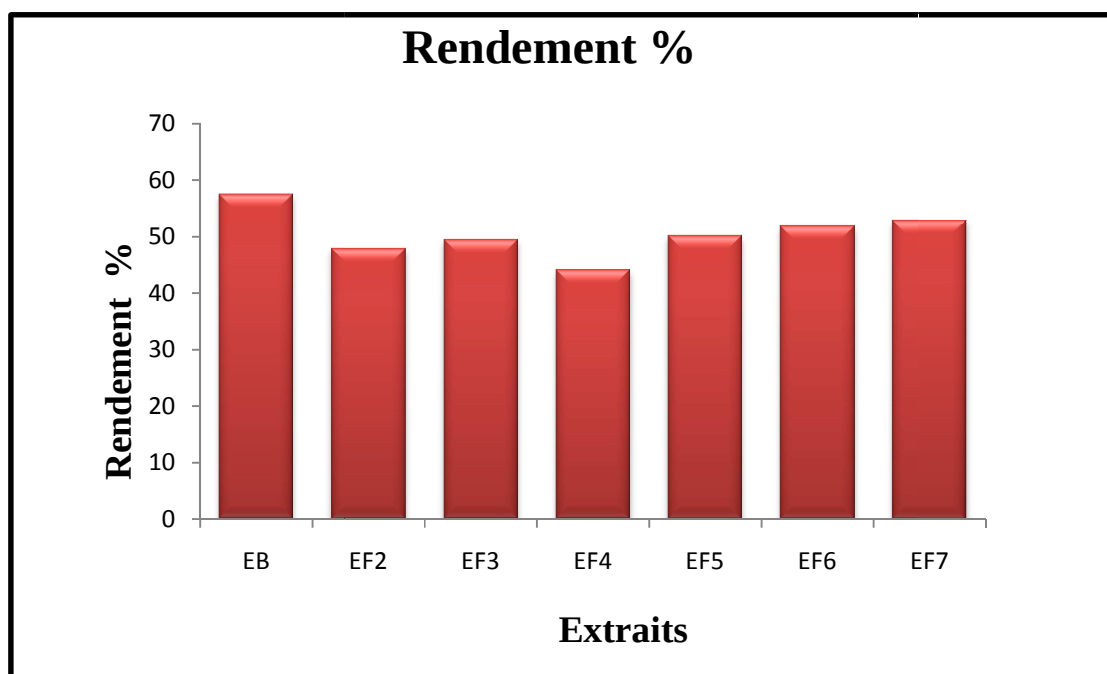


Figure 9 : Rendement des extraits de polyphénols totaux de margines brutes et fermentés.

EB : extrait de margine brute ; **EF :** extrait de margine fermentée par LB 2, LB3, LB 4, LB 5, LB 6 et LB 7

La figure 9 montre que les rendements varient en fonction des margines (brutes ou fermentées) ainsi que du métabolisme des souches utilisées pour la fermentation. On remarque que le rendement le plus élevé est obtenu à partir des margines brutes avec un pourcentage de 57,45%. Ce résultat confirme la charge élevée des margines en polyphénols ainsi l'efficacité du solvant utilisé.

Une légère différence a été remarquée entre les différents rendements des extraits fermentés, à l'exception de l'extrait obtenu par *Lactobacillus rhamnosus* (EB₄) où le rendement a diminué jusqu'à 44,15%. Ceci peut être expliqué par la consommation des polyphénols au cours du développement important de la souche.

RODI et al. (2002) ont rapportés qu'après extraction de l'huile d'olive, moins de 2% des composés phénoliques du fruit se retrouvent dans celle-ci et plus de 98% passent dans les margines appelées aussi eaux de végétation, par conséquent ce résidu est considéré comme une source importante de polyphénols. Cependant leur qualité et leur quantité dépendent de plusieurs facteurs qui sont en général géographiques, variétaux, saisonniers...etc.

AIT BADDI et al. (2008), ont démontré que l'acétate d'éthyle exerce un haut pouvoir d'extraction des polyphénols de margines. Il contribue également à l'élimination des fractions protéiques, glucidiques et acides organiques qui peuvent interférer avec l'extrait phénolique.

Plusieurs facteurs influencent l'extraction des CP à partir de la matière végétale tels que le type et le volume du solvant utilisé, le temps d'extraction et sa température en affectant tout le contenu total en phénols, flavonoïdes et l'activité antioxydante (NACZK et SHAHIDI, 2004 ; ALTIOK, 2010).

2.3. Etude de la fermentation aérobie des margines brutes par les souches *Lactobacillus*

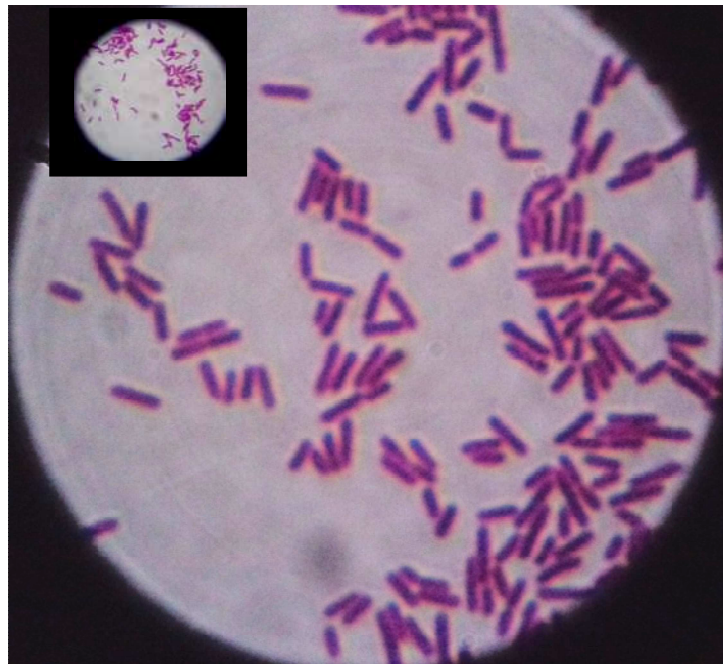
2.3.1. Test de confirmation de la pureté des souches bactériennes utilisées

Un ensemencement des souches sur gélose MRS, nous a permis d'obtenir des colonies bien isolées observées à l'œil nu et qui apparaissent de forme ovale à contour irrégulier, de diamètre compris entre 0,2 et 2mm et de couleur blanchâtre à consistance crémeuse (figure 10).



Figure 10 : Culture de *lactobacillus* sp âgée de 24h

- * l'observation des cellules bactériennes à l'état frais montre que les bactéries sont immobiles.
- * L'observation des cellules au microscope photonique après coloration simple au bleu de méthylène, nous a montré que les six espèces du genre *Lactobacillus* étudié ont la forme de bâtonnet à extrémité arrondi.
- * Après la coloration de Gram, les cellules bactériennes sont colorées en violet, donc ces espèces sont des bactéries à Gram positif (+) (figure 11).



**Figure 11 : Résultats de la coloration de Gram de *LB*
(G× 100)**

Un changement de couleur a été observé après 24 h d'incubation dans tous les milieux ensemencés par les différentes souches et ceci confirme leur développement en assurant la fermentation des margines comme substrat (voir figure 12).

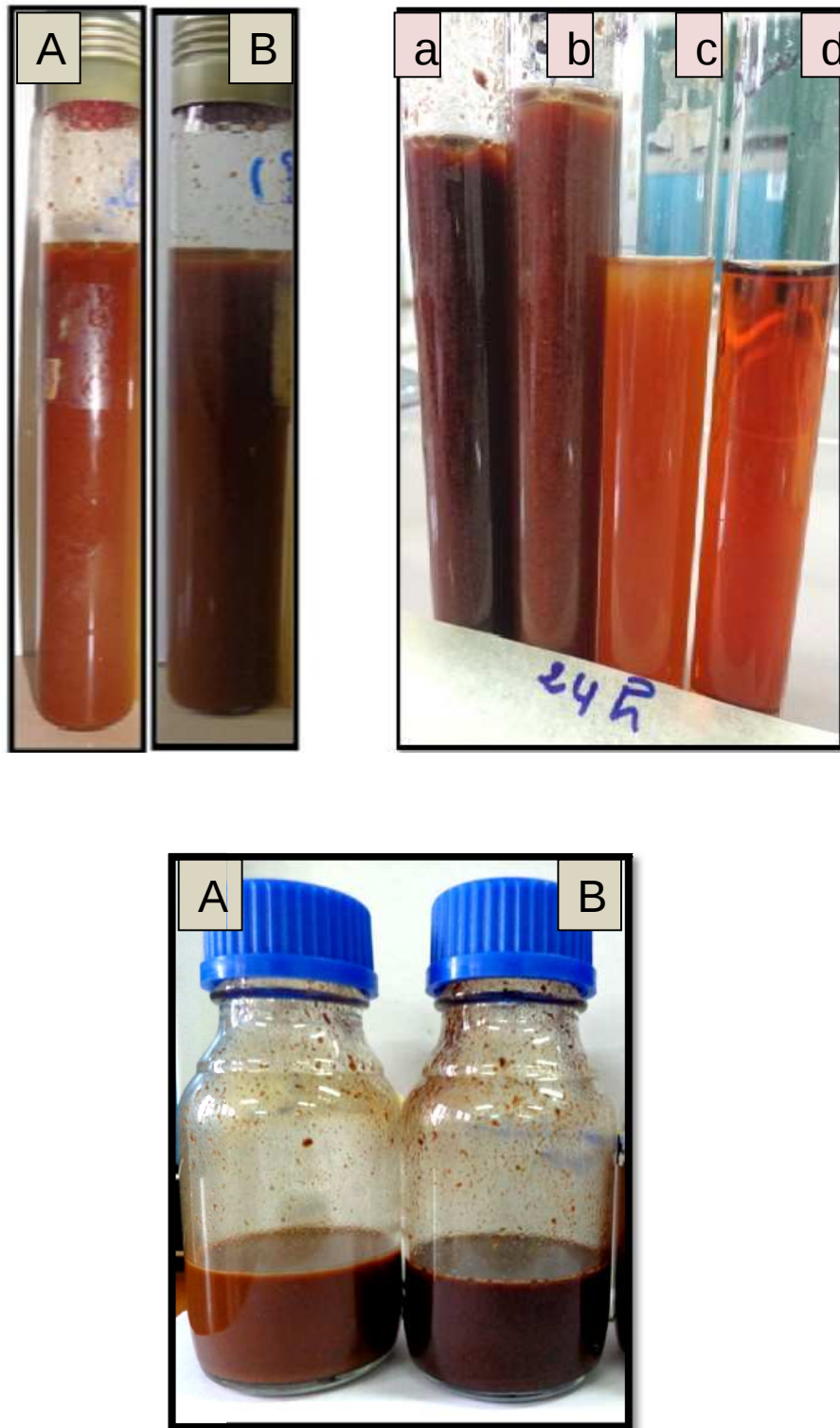


Figure 12: Image d'une culture des *Lactobacillus* sur milieu MRS-margines
(A : milieu MRS-margine fermenté, B : milieu MRS-margines)
(a : milieu MRS-margine fermenté, b : milieu MRS-margines c : milieu MRS fermenté
et d : milieu MRS)

2.3.2. Cinétiques de croissance des souches *Lactobacillus* en culture sur les milieux MRS et MRS-margines

Dans le but d'une valorisation des margines, six souches de *Lactobacillus* ont été étudiées pour une fermentation aérobie de cet échantillon. La culture de ces souches sur milieu MRS-margines a été comparée à une culture témoins (culture sur milieu MRS). Les résultats de ces cultures sont portés sur le tableau I (Annexe 3) et illustrés dans les figures ci-dessous.

➤ Fermentation des margines par *Lactobacillus gasseri*

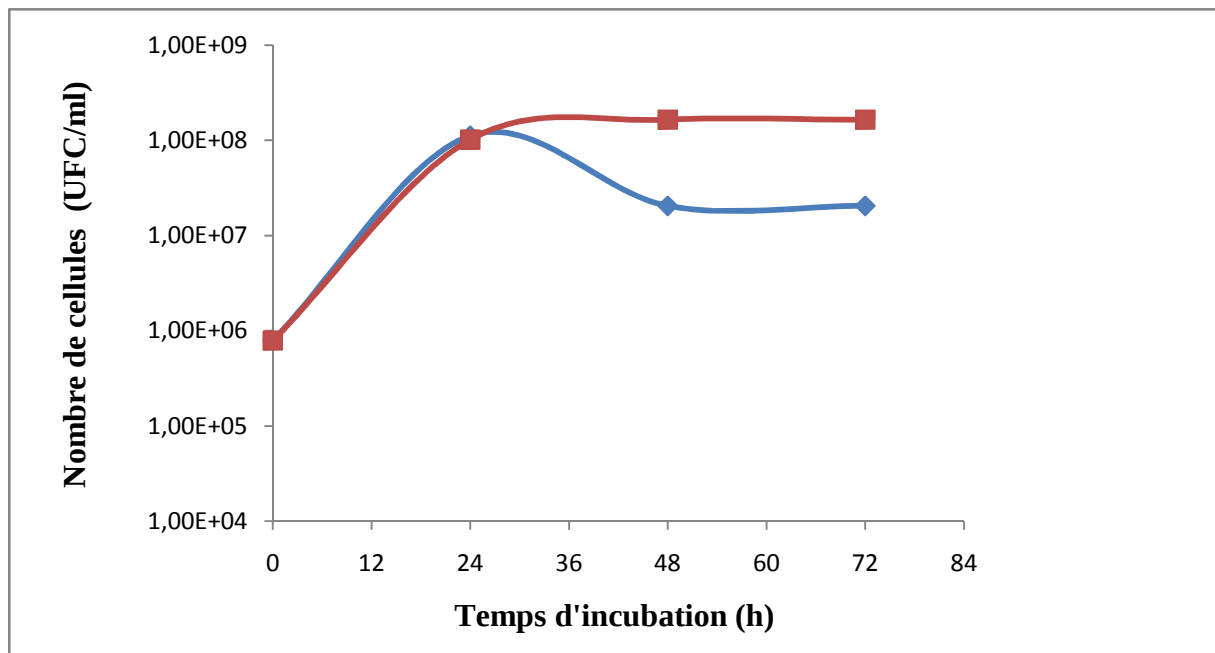


Figure 13 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus gasseri* dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines (MRS (-♦-), MRS-Margines (-■-)).

D'après ce graphique, on note une biomasse initiale de $7,9 \cdot 10^5$ UFC/ml pour une culture témoins ainsi que MRS-margines fermentés par *L. gasseri*. Cette croissance augmente au fil de temps pour atteindre une valeur maximale au bout des 24 h et 48 h pour la culture témoins et celle de la fermentation respectivement.

A signaler que le rythme de croissance est plus marqué dans la culture MRS-margine que dans la culture MRS donc la souche *L. gasseri* présente une croissance importante dans le milieu MRS-margine. Cependant, la diminution de la biomasse est constatée après 24 h pour la culture témoins pour retourner à la valeur initiale après 72 h d'incubation. Ceci se traduit par un épuisement du milieu MRS en éléments nutritifs pour la culture témoins et confirme la richesse des margines en substrats servant de source nutritives pour la souche dans le milieu MRS-margines.

On constate donc en plus du milieu sélectif (MRS) des *lactobacillus*, les margines sont considérées comme milieu favorable pour le développement de cette souche.

Les résultats obtenus sont en concordance avec ceux trouvés par HESSAS et LAKSI (2015) dans son étude sur six souches (*L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. brevis* et *L. acidophilus*), concernant leur viabilité en présence de trois extraits aqueux.

➤ Fermentation des margines par *Lactobacillus paracasei*

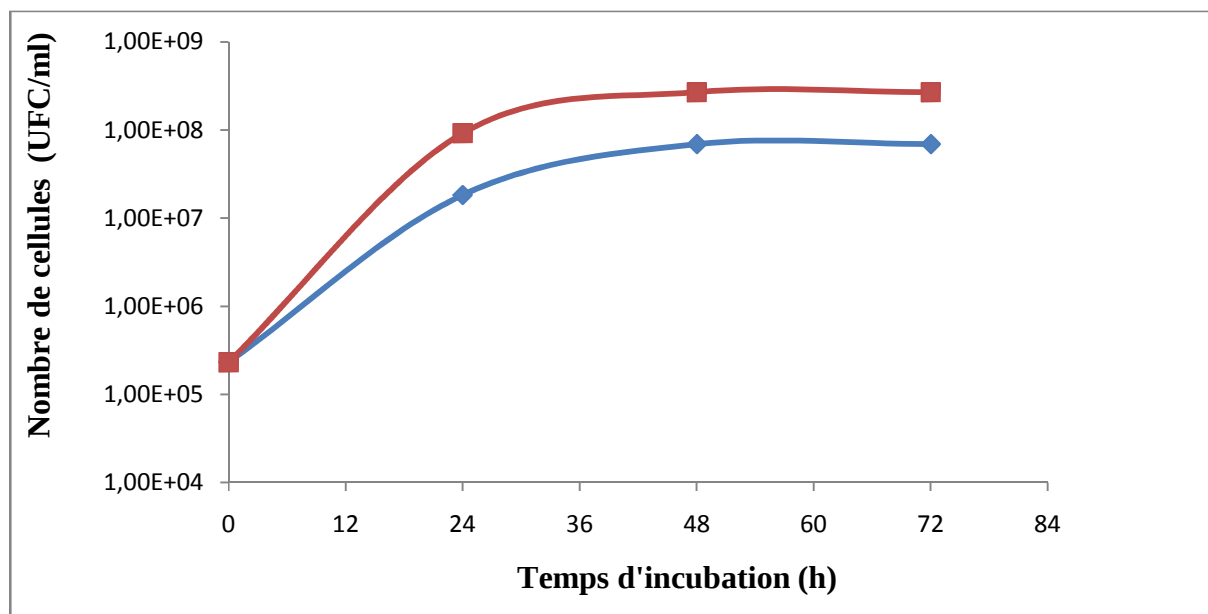


Figure 14 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus paracasei* dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines (MRS (-♦-), MRS-Margines (-■-)).

D'une manière générale, on remarque que le nombre de cellule augmente au fur et à mesure dans le temps montrant la viabilité de la souche en question.

Les résultats dans la figure 14 montrent que la croissance microbienne de la souche *Lactobacillus paracasei* testée est plus marquée en culture MRS-margines où la phase stationnaire est atteinte au bout des 48 h d'incubation par une valeur de $2,69.10^8$ UFC/ml contre une valeur de $6,9.10^7$ UFC/ml pour une culture témoins.

En plus de l'acidité présente dans les margines, les autres éléments sont favorable au développement de la souche donc le mélange MRS-margines a stimulé la croissance de cette dernière. De façon similaire, d'autres études ont rapporté l'action conjuguée des fibres diététiques et des CP dans la stimulation de la croissance de souches probiotiques et l'inhibition de souches pathogènes.

Cette viabilité similaire a été confirmé par CEYLAN et FUNG (2004), en étudiant l'effet des infusions du thé sur des bactéries probiotiques (*L. acidophilus* L10 et *L. paracasei* L26).

L'AURA (2008) ; BRAUNE et BLAUT (2011), ont quantifié l'activité de deux enzymes microbiennes β - glucosidase et β -glucosidase en considérant ces enzymes les premières intervenant dans le métabolisme des flavonols glycosylés. De plus SCHNEIDER, COLLINS ET BLAUT (1999) ont lié le phénomène de la croissance de quelques souches de probiotiques étudiées (*Lb. acidophilus* et *Lb. paracasei*) en présence des extraits bruts de thé dans leurs

milieux de culture à leur pouvoir de puiser leur énergie de la bioconversion des polyphénols pour survivre, à l'aide de deux enzymes, β -glucosidase et β -glucuronidase.

De même, dans une étude menée par LOPEZ DE LACEY *et al.* (2013), qui porte sur l'activité enzymatique et la survie des trois souches probiotiques (*Lactobacillus paracasei* LAFTI-L26, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI-L10 et *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* LAFTI-B94) pendant l'incubation dans six variétés différentes d'extraits de thé vert, montre que les extraits de thé vert ont permis la survie des souches probiotiques choisis mieux que la solution saline, avec *B. animalis* B94 maintenant les plus hauts niveaux de cellules viables. Ces bactéries probiotiques sélectionnées ont montré une activité β -glucosidase, β -galactosidase et une rhamnosidase.

Dans d'autres études les chercheurs ont rapporté l'utilisation de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus paracasei* dans le traitement des margines où ils ont enregistré une réduction de polyphénols d'une valeur de 46% et 50% respectivement (AYED *et al.*, 2003 ; AOUIDI *et al.*, 2009).

D'après ces résultats, on constate que la souche *L. paracasei* est une souche modèle pour une fermentation aérobie des margines.

➤ Fermentation des margines par *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei*

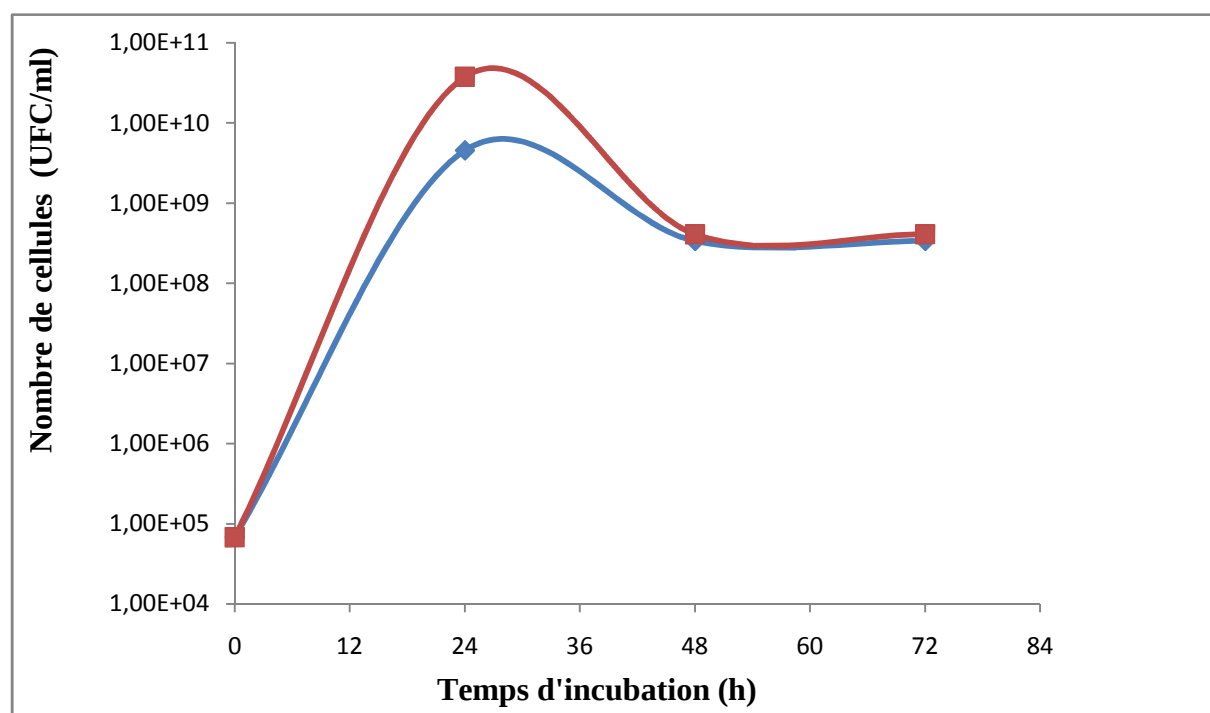


Figure 15 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines (MRS (-♦-), MRS-Margines (-■-)).

Dans la phase exponentielle, un développement rapide des cellules est enregistré avec une valeur maximale de $4,54.10^9$ UFC/ml et $3,77.10^{10}$ UFC/ml pour la culture en MRS et MRS-margines respectivement et qui montrent la viabilité des cellules en question.

Au bout des 48 h d'incubation, le nombre de cellules a diminué dans les deux milieux pour stabiliser à une valeur commune de $4,1.10^8$ UFC/ml. Ceci est expliqué par l'épuisement de milieux dus à une consommation excessive des éléments nutritifs.

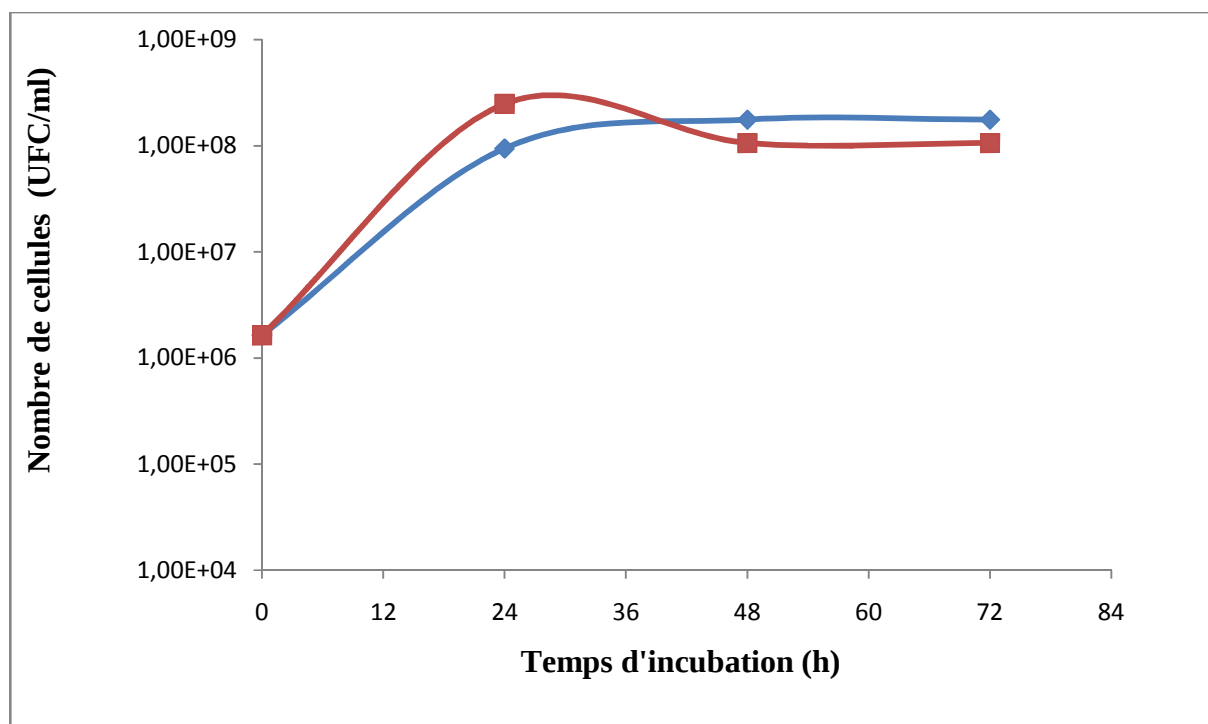


Figure 16 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus casei* dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines (MRS (-♦-), MRS-Margines (-■-)).

D'une manière générale, une croissance remarquable de *L. casei* dans les deux milieux et elle est plus marquée dans la culture MRS-margine qui est exprimée par une valeur maximale de $2,47.10^8$ UFC/ml. D'après ces résultats, on constate que les margines n'ont pas d'effet inhibiteur sur la souche étudiée.

Les deux souches de lactobacilles testées (*L. ramosus* et *L. casei*) montrent une croissance importante dans les milieux de culture MRS-margine par rapport aux croissances observées avec les milieux MRS indiquant de ce fait leur aptitude à fermenter les margines. Ces souches seront utilisées comme souches modèles pour une fermentation aérobie des margines.

De même AOUIDI (2012) dans son étude sur *Lb rhamnosus* et *Lb plantarum*, a noté l'indépendance de la souche testée et la dose d'extrait utilisée sur l'augmentation de l'UFC au cours du temps. AVILA et al. (2009) ont trouvé que les souches *L. plantarum* et *L. casei* ont montré une grande activité β -glucosidase.

➤ Fermentation des margines par *Lactobacillus brevis*

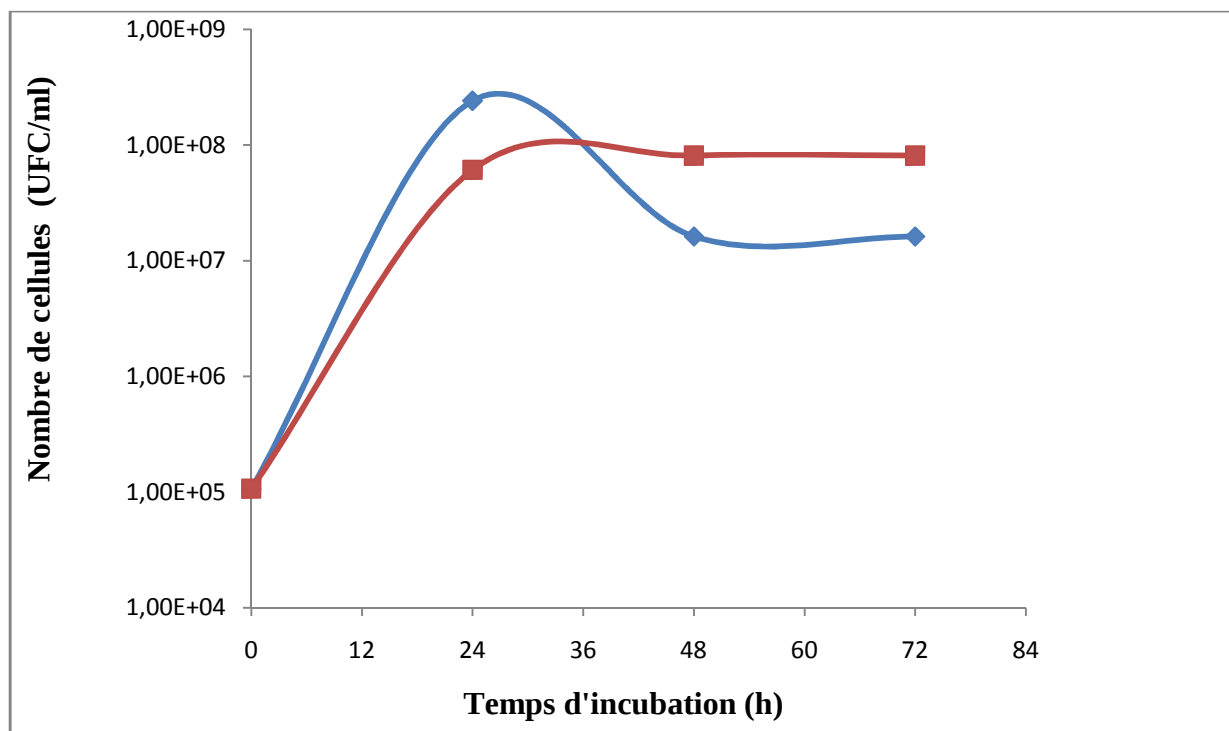


Figure 17 : Cinétiques de croissance de *Lactobacillus brevis* dans le milieu MRS ainsi que MRS-margine (MRS (-♦-), MRS-Margine (-■-)).

Comparant entre les courbes de croissance établies, on remarque une différence distincte entre la cinétique de croissance de cette souche dans la culture sur les deux milieux.

La biomasse initiale est de $1,07.10^5$ UFC/ml pour les deux cultures et ce nombre de cellules augmente pour atteindre la phase stationnaire après 48 h d'incubation avec une valeur de $8,1.10^7$ UFC/ml pour la culture testée contre une valeur maximale de $2,41.10^8$ UFC/ml enregistrée après 24 h d'incubation sur milieu MRS et qui va diminuer au fil du temps où une valeur finale de $1,62.10^7$ UFC/ml est enregistrée. D'après ces résultats, on constate que les margines ne présentent pas une inhibition sur la souche testée.

Dans une étude faite par CUEVA et *al.* (2010) qui porte sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des acides phénoliques sur des *Lactobacillus* (*Lactobacillus paraplantarum* LCH7, *Lactobacillus plantarum* LCH17, *Lactobacillus fermentum* LPH1, *L. fermentum* CECT 5716, *Lactobacillus brevis* LCH23, et *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711) et des agents pathogènes (*Staphylococcus aureus* EP167 et *Candida albicans* MY1055), ils ont noté que toutes les souches étudiées ont montré des sensibilités vis-à-vis des composés phénoliques avec de légères différences entre leurs courbes de croissances établies.

Selon LARA-VILLOSLADA et *al.*, (2007) les hautes concentrations d'acides phénoliques (1000 mg/ml) peuvent limiter la viabilité *in vivo* des Lactobacilles. Cependant, NADOUD. (2015) note que certaines souches montrent une difficulté à pousser en présence de résidu insoluble dans les alcools (RIA) et fraction soluble extraite des

margines (FSM) à une concentration de 10 g/L à l'exemple de *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. brevis* et *paracasei* par l'effet bactéricide des CP résiduels présents dans les extraits testés.

➤ Fermentation des margines par *Lactobacillus acidophilus*

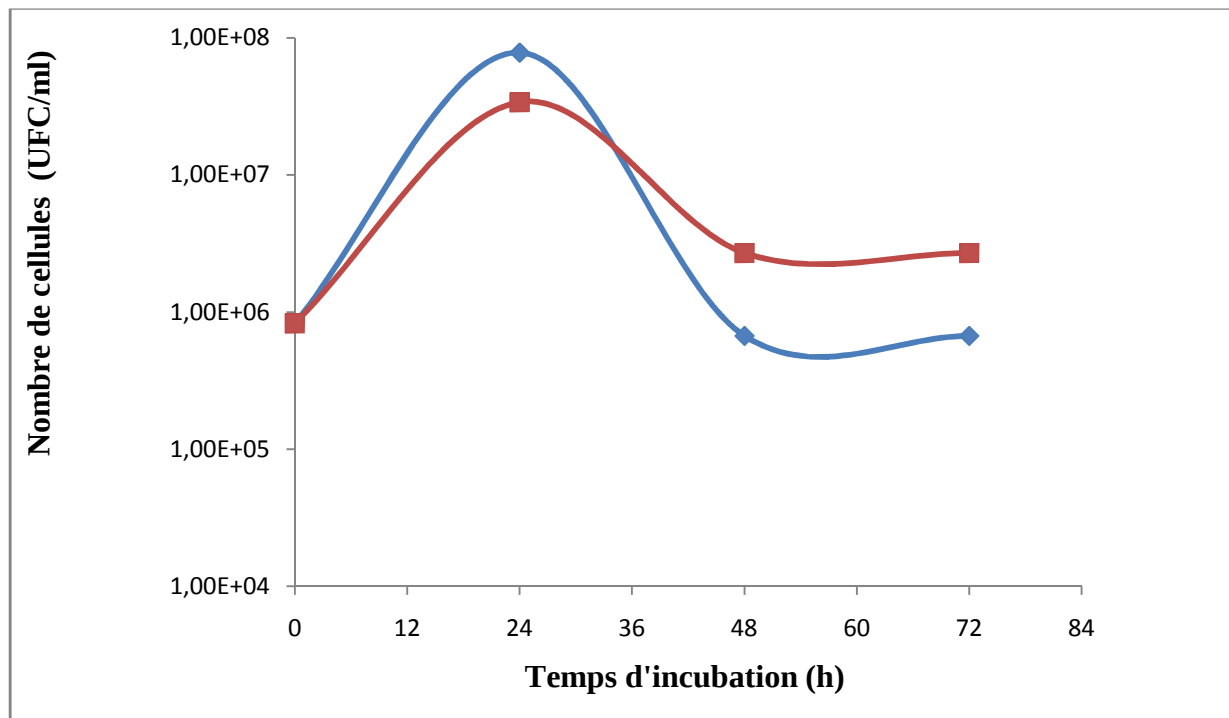


Figure 18: Cinétiques de croissance de *Lactobacillus acidophilus* dans le milieu MRS ainsi que MRS-margines (MRS (-♦-), MRS-Margines (-■-)).

Un rythme de croissance similaire et remarquable pour la souche testée dans les deux cultures. Au bout de 24 h d'incubation, les deux cultures présentent une valeur maximale de $3,4 \cdot 10^7$ UFC/ml contre $7,8 \cdot 10^7$ UFC/ml sur milieu MRS-margine et MRS respectivement. Pour les deux cultures, une phase de déclin est enregistrée après les 48 h. La diminution de la biomasse peut être attribuée également à la toxicité des CP lorsque le temps d'incubation est long.

JUAN M. RODRIGUEZ et al. (2010) ont rapporté que les acides 4-Hydroxybenzoïques et phénylpropioniques sont les composés les plus actifs contre toutes les souches Gram positif, aussi le nombre et la position des substitutions dans l'anneau de benzène des acides phénoliques influencent leur pouvoir antimicrobien contre *Lactobacillus*. CUEVA (2010) a expliqué la sensibilité de ces souches probiotiques vis-à-vis des extraits phénoliques par le fait que le Genre *Lactobacillus* est dépourvu d'une couche externe qui va lui procurer plus de résistance aux agressions extérieures, et qui faciliterait la diffusion des acides phénoliques par la paroi cellulaire, l'acidification intracellulaire, menant donc à la mort cellulaire (SHAN et al., 2007). D'autres interprètent cette sensibilité par la nature de leurs membranes bactérienne (perméable à la plupart des agents biocides) (FAUCHER et AVRIL, 2002).

Dans une étude faite par AVILA et al. (2009), sur le potentiel enzymatique de huit souches de *Lactobacillus plantarum*, 6 souches de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*

acidophilus LA-5, et *Bifidobacterium lactis* BB-12 pour la bioconversion des glycosides delphinidine et malvidol en leurs métabolites. Ils ont noté que la souche de *L. acidophilus* a montré une faible activité β -glucosidase, à la fois, intra et extracellulaire.

La relation entre la saturation des chaînes polyphénoliques et le potentiel antimicrobien exercé contre les bactéries lactiques était peu claire et pas trop abordé.

2.4. Fermentation anaérobie

2.4.1. Production de méthane

Comme le montre le tableau IX, à des concentrations de margines et des grignons de 6%, le potentiel de méthanisation est remarquablement faible avec un rendement maximal de CH₄ de 7,2 et 7,8 % pour les deux substrats respectivement. Les valeurs maximales de méthanisation ont été enregistrées à une concentration en substrat de 2 g pour les deux sous produit avec 360,78 ml/g pour les margines et 399,66 ml/g pour les grignons avec des volumes de production du méthane de 14,43 et 16,52 L/L respectivement.

Récemment, dans leurs expériences menées dans des flacons en bouteille, ANDRES DONOSO-BRAVO et *al.* (2016), ont trouvé qu'un rapport substrat / inoculum de 0.5 comme étant le meilleur pour être utilisé dans des digesteurs anaérobies en batch avec des grignons d'olive comme substrat. En accord avec les résultats du présent travail, les mêmes auteurs ont déclaré que le prétraitement par broyage des grignons améliore nettement le taux de production de méthane tout en maintenant le rendement maximal en méthane. En ce qui concerne l'effet de la macération enzymatique, avec des enzymes cellulolytiques, enzyme Hemicellulase, cellulase, Xylanase, Pectinase et autres, la production de méthane avait augmenté jusqu'à 274 ml CH₄ / g.

Concernant les margines concentrées (6% p/v), la méthanisation était faible, 1,29 ml /g, de biogaz contenant 2,1-7,2 % de CH₄ (tableau IX). Ces résultats vont dans le même sens avec ceux obtenus par BATISTA et *al.* (2014), lesquels ont rapporté une faible production de biogaz autour de 0,36 NL / L avec une teneur en méthane de 51,6% v/v avec les margines sans prétraitement.

Tableau IX : Résultats de production du méthane au cours des fermentations anaérobies obtenus par CPG.

Substrats	g initial (%)	potentiel biochimique en méthane	% CH ₄	
		ml/g ou m ³ /t	NL/L	Min-Max
Margines	1	252,69	5,054	38-70
	2	360,78	14,43	52.9-65.3
	3	118,33	7,1	11,3-16,5
	6	1,29	0,15	2,1-7,2
Grignons	1	289,22	5,78	44-60
	2	399,66	16,52	39-71
	3	141,31	8,46	9,12-17
	6	3,11	0,372	1,1-7,8

Comme observé pour les présents résultats (tableau IX), à des concentrations de 6% de margines et grignons ont conduit à une faible production en méthane de 0,15 et 0,372NL/L

respectivement. La croissance lente de la communauté microbienne anaérobie est très sensible aux conditions inhibitrices avec la teneur élevée des sous-produits oléicoles en substances toxiques telles les phénols, l'éthanol, etc (MCNAMARA *et al.*, 2008).

Par ailleurs, AL-MALLAHI *et al.* (2015) ont étudié les conditions appropriées pour la co-digestion des margines du système biphasique, prétraités au NaOH avec des déchets alimentaires. Les auteurs ont conclu que l'inhibition de la production de méthane était fortement liée à la forte concentration de l'acide oléique à l'intérieur du réacteur.

L'effet de la dilution des grignons et des margines de 6 à 2% (g/L) s'est avéré nécessaire et bénéfique pour une meilleure production de méthane, ainsi les volumes respectifs récupérer de méthane était dans la gamme de 16,52 NL/L pour le grignon et 14,43NL/L pour les margines, avec des teneurs de (pourcentage de méthane) 71 et 65,3 % respectivement pour les deux substrats. BATTISTA *et al.* (2014), ont aussi obtenu des résultats un peu plus élevés que ceux de la présente étude suite à l'ajout de FeCl₃ et de CaCO₃, la production de biogaz était de 19,89 NL/L et 21,57NL/L, respectivement, d'une teneur en méthane supérieure à 83% v/v. Tekin and Dalgic (2000) ont aussi rapporté une production en méthane d'environ 80 ml /g COD avec les margines.

Le rendement en méthane ne sont pas loin de à ceux obtenus par d'autres chercheurs tels que 150-260 ml CH₄/g DCO dégradée et 183 ml de CH₄/g DCO dégradé respectivement pour les margines et des eaux usées de manioc (MARTIN *et al.*, 1991; HAMED I *et al.*, 1992 ; INTANOO *et al.*, 2014).

L'étude menée par RIGGIO *et al.* (2015) était sur la co-digestion anaérobie de grignons d'olive mélangée avec les boues de vache et la pulpe de pomme. Les résultats obtenus ont montré que la production de méthane avec ces mixtures est non seulement réalisable, mais aussi intéressante sur le plan économique et énergétique. La production stable de biogaz a été obtenue d'environ 400 ml /g MSV à un temps de rétention hydraulique de 40 jours dans un mélange contenant 85% de boues de vache, 10% de grignons d'olive et 5% de la pulpe de pomme (% par volume). Le pourcentage de méthane dans le biogaz était d'environ 52% et l'élimination maximale de DCO était de 63%.

2.4.2. Production d'hydrogène

Les rendements faibles ou importants en hydrogène obtenus dans les tests peuvent trouver des explications suite à l'analyse des voies métaboliques qui peuvent donner certaines informations importantes sur les voies de fermentation et la performance dans la production de l'hydrogène.

Les faibles rendements obtenus sont probablement liées à la sensibilité des souches, seules ou en mixtures, à des inhibiteurs tels que les composés phénoliques, ce qui a conduit une décomposition de la biomasse restreinte.

En effet, l'apparition de l'acétate et du butyrate confirme la génération de l'hydrogène. Étant donné que les voies métaboliques conduisant à l'acide lactique ne sont pas favorables à la production de l'hydrogène, l'accumulation du lactate (E1) ($0,63 \pm 0,01$ g / L) peut expliquer les faibles rendements de l'hydrogène observés en comparaison aux autres cultures.

Tableau X: Résultats de production de l'hydrogene obtenus par HPLC et CPG.

Tests (Margines + grignons)	Biogaz (ml)	Bio-H ₂ (%)	mmole/L	acétate	butyrate	butyrate/ acétate	lactate	Propionate	éthanol
E1	50,0	45,6	152,9	1,3	1,0	0,76	0	0,11	0
E2	44,0	38,1	112,4	2,1	1,9	0,47	0,333	0,45	0
E3	60,0	38,9	156,8	1,9	1,6	0,82	0,011	0	0,13
E4	12,0	19,9	16,1	2,8	2,1	0,18	0,630	0	0,2

2. 5. Mise en évidence de l'activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante des différents extraits de margines est évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la coloration de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (EBRAHIMZADEH et *al.*, 2010).

Les valeurs des IC₅₀ des différents extraits ont été déterminées et illustrées par les figures suivantes :

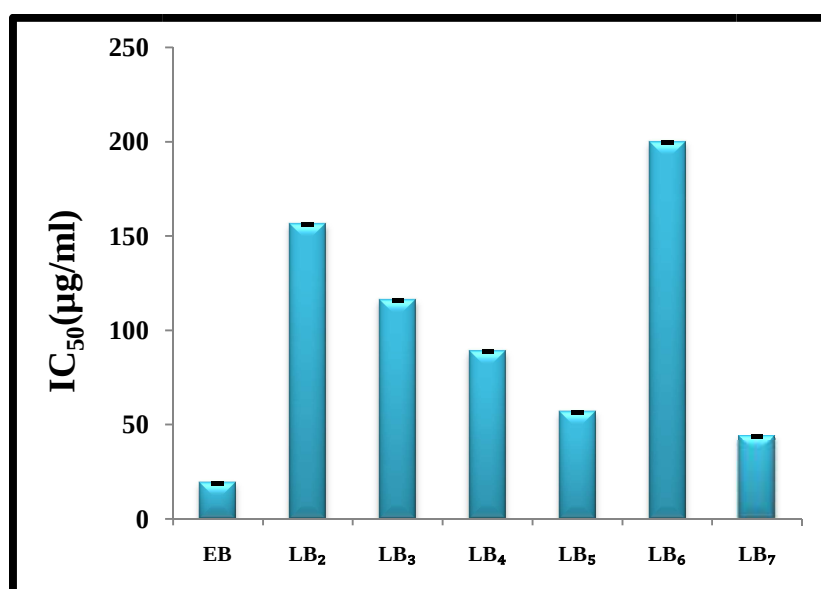


Figure 19 : Activités anti-oxydantes des extraits testés d'un échantillon extrait au rotavapor.

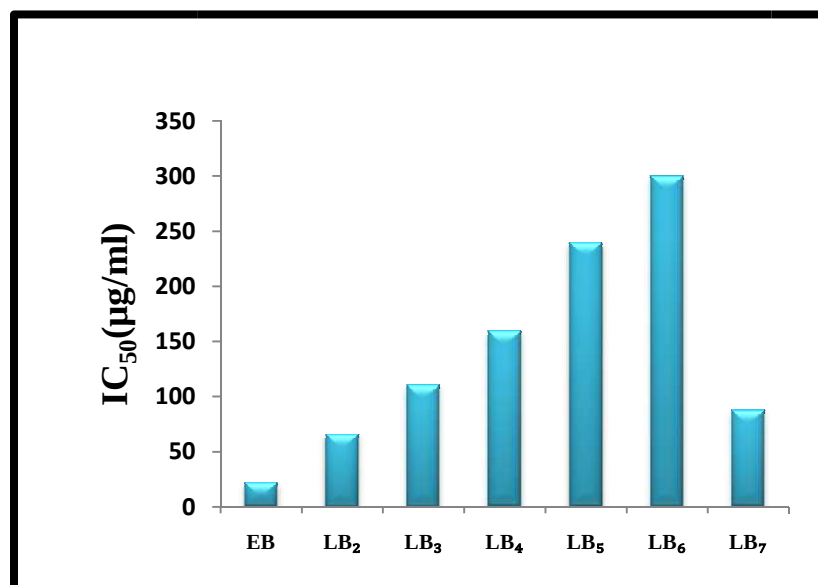


Figure 20 : Activités anti-oxydantes des extraits testés d'un échantillon extrait est évaporé sous flux d'azote.

La différence de l'activité est mise en évidence en utilisant ce paramètre (IC₅₀) qui est définie comme étant la concentration de l'échantillon qui donne un pourcentage d'inhibition de 50% du phénomène oxydatif.

D'après les figures 19 et 20, une faible concentration d'extrait de margine brute a réduit 50% de l'activité de DPPH ce qui explique que cet extrait a montré une meilleure activité.

Il est remarquable que l'activité antioxydante de l'extrait brute est quasiment la même avec l'utilisation des deux différentes méthodes d'évaporation du solvant d'extraction. En revanche, l'activité des extraits de margines fermentées varie en fonction de la souche utilisée ainsi que de la méthode d'évaporation appliquée. De ce fait, l'IC₅₀ des extraits fermentés par LB₂ et LB₃ sont meilleures en utilisant le flux d'azote pour l'évaporation.

Cependant, les valeurs de l'IC₅₀ des extraits fermentés par les souches LB₄, LB₅, LB₆ et LB₇ obtenues par l'évaporation au moyen du rotavapor sont nettement inférieures à celles obtenues en utilisant l'évaporation sous flux d'azote, indiquant que l'évaporation au moyen du rotavapor permet d'obtenir un meilleur rendement en polyphénols ainsi une meilleure activité antioxydante. Il est largement répandue dans la littérature que ce n'est pas nécessairement une forte teneur en polyphénols qui exhibe une activité anti-oxydante puissante (MOURE et *al.*, 2001).

Des résultats différents de l'activité anti-oxydante des extraits phénoliques après fermentation ont été obtenus et qui peuvent s'expliquer par la différence de la composition phénolique de ces extraits du au aux différents métabolismes de chaque souche. En effet la capacité de réduction des radicaux libres est largement influencée par la composition phénolique de l'échantillon (YOU-CHENG HSEU et *al.*, 2008).

Les interactions entre les espèces réactives et les antioxydants dépendent de plusieurs paramètres biologiques, physiques et chimiques tel que la structure, la taille, la solubilité et le potentiel oxydo-réducteur (pouvoir réducteur) (BRAND-WILLIAMS et *al.*, 1995).

LIU et *al.* (2014) ont rapporté que les biomolécules phénoliques extraites par l'acétate d'éthyle et par le *n*-butanol possédaient des groupements polaires (parties glycanes) qui leur permettent d'acquérir et de potentialiser certaines fonctions notamment (solubilité, activité anti-oxydante...).

De même, LAFKA et *al.* (2011) ; KANG et *al.* (2003) ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité antiradicalaire élevée. Il est bien établi que l'activité anti-oxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité anti-oxydante la plus élevée (HEIM et *al.*, 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (TORRES DE PINEDO et *al.*, 2007).

Les margines sont riches en hydroxytyrosol (HAMDEN et *al.*, 2009) qui possède une activité anti-oxydante très importante recherchée dans le domaine agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique (MANNA et *al.*, 1999 ; D'ANGELO et *al.*, 2005). En fin, la concentration en polyphénols totaux est corrélée significativement avec la capacité anti-oxydante évaluée généralement par le test de DPPH confirmant la diminution.

Conclusion générale et perspectives

Les margines et les grignons sont à la fois des substrats toxiques pour l'environnement et des sources d'énergies et de biomolécules actives non négligeables en vue de la nature des substances qui les composent. C'est pour cette raison qu'on s'intéresse plus à étudier la fermentation de ces substrats.

Dans un premier volet, une étude de la cinétique de croissance de six souches de *Lactobacillus* sur les margines a été réalisée afin d'explorer le comportement de ces souches probiotiques bénéfiques dans ce milieu en comparaison avec le milieu sélectif (MRS). Des tests d'évaluation des activités biologiques des composés phénoliques issus de ces margines ont été menés avant et après fermentation par ces souches.

Le suivi du traitement biologique des margines brutes par les six souches durant 72h d'incubation a permis d'avoir une cinétique de croissance importante dans le milieu. A noter que le rythme de croissance dans les margines était meilleur que dans le milieu MRS. Les courbes de croissance des souches étudiées démontrent leur adaptation aux margines et résistances aux polyphénols.

La cinétique de la croissance des souches *L. paracasei*, *L. ramnosus* et *L. casei* a révélé un développement très important indiquant de ce fait que celles-ci pourraient être utilisées comme souches modèles pour une fermentation aérobie des margines.

Les résultats de la fermentation anaérobie analysés par HPLC et CPG ont indiqué une meilleure production de biogaz (méthane et hydrogène) dans des conditions de co-digestion. Une dilution des grignons et des margines de 6 à 2% g/L s'est avérée nécessaire et bénéfique pour une meilleure production de méthane, ainsi les volumes respectifs récupérés de méthane étaient dans la gamme de 16,52-0,372 NL/L pour le grignon et 14,43-0,15NL/L pour les margines, avec des teneurs de 71-7,8 % et 65,3-7,2 % respectivement pour les deux substrats. Ces résultats obtenus démontrent que la production de méthane est associée à la concentration en composés phénoliques.

Les rendements faibles ou importants en biohydrogène obtenus dans les tests analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) peuvent trouver des explications suite à l'analyse des voies métaboliques qui peuvent donner certaines informations importantes sur les voies de fermentation et la performance dans la production de l'hydrogène. En effet, un rapport élevé de butyrate/acétate de 0,76, donne un rendement plus important de l'hydrogène de 45,6 %.

L'évaluation du potentiel anti-radicalaire par le test au DPPH a montré que les extraits issus des margines étaient doués d'une activité anti-oxydante. L'application de deux méthodes d'évaporation du solvant d'extraction des polyphénols l'une au rotavapor et l'autre sous flux d'azote a donné lieu à des extraits avec des activités anti-oxydantes non négligeables. L'extrait des margines brutes s'est montré le plus actif en comparaison avec ceux issus des fermentations, cependant les activités antioxydantes de ces derniers s'avèrent intéressantes. La diminution des activités antioxydantes pourrait s'expliquer par la consommation des composés phénoliques lors de fermentation et la variation de composition de ces derniers.

Cette étude révèle l'importance des fermentations aérobie (par les lactobacilles) et anaérobie par la microflore des margines et grignons puisqu'elles minimisent leur effet indésirable sur l'environnement; par leur capacité, sous l'action de l'activité de la biomasse cellulaire, d'une part à dégrader la matière organique néfaste et d'autre part à produire de l'énergie sous forme de biogaz (méthane et hydrogene). On peut conclure que ces effluents ne peuvent être considérés comme source de préjudice pour l'environnement mais des milieux de culture stables exploitables en biotechnologies.

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant à la valorisation des sous-produits oléicoles par voie microbienne.

- Il serait intéressant de poursuivre cette étude en appliquant des techniques d'analyse plus performante.
- Il serait envisageable aussi d'étudier la capacité de la co-culture des souches *Lactobacillus* à traiter les margines.
- En outre, il serait avantageux de caractériser qualitativement et quantitativement les composés phénoliques présents dans ces sous-produits par des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.
- Il est souhaitable également d'optimiser les conditions de culture et de projeter l'étude dans des fermenteurs à grande échelle.

Références bibliographiques

A

- ✓ **AFIDOL** (Association Française Interprofessionnelles De l'Olive). (2004). Guide du planteur d'oliviers.
- ✓ **AFIDOL** (Association Française Interprofessionnelles De l'Olive). (2012). Le marché de l'huile d'olive : situation et perspectives.
- ✓ **AGUILERA M., QUESADA MT., GUERRA DEL AGUILA V., MORILLO JA., RIVADENEYRA MA., RAMOS-CORMENZANA A. et MONTEOLIVA-SANCHEZ M.** (2008). Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresource Technol.* **99**:5640–4.
- ✓ **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. 94p.
- ✓ **AISSAM H., ERRACHIDI F., MERZOUKI M., 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., PENNINCKX MJ. et BENLEMLIH M.** (2007). Reduction of phenolics content and COD in olive oil millwastewaters by indigenous yeasts and fungi. *World J Microbiol Biotechnol.* **23**:1203–8.
- ✓ **AKAR T., TOSUN I., KAYNAK Z., OZKARA E., YENI O., SAHIN EN. et AKAR ST.** (2009). An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. *J Hazard Mater.* **166**:1217–25.
- ✓ **ALBA-MENDOZA J., RUIZ-GOMEZ A. et HIDALGO-CASADO F.** (1990). Technological evolution of the different processes for olive oil extraction. In: Erickson DR, editor. Ediblefats and oils processing: basic principles and modern practices. Champaign, Illinois, USA: 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. *Bioresource Technol.* **91**: 195–200
- ✓ **ALBURQUERQUE JA., GONZALVEZ J., GARCIA D. et 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.). *Bioresource Technol.* **98**:940–5.
- ✓ **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. et ISHII K.** (2015). Appropriate conditions for applying NaOH pretreated two-phase olive milling waste for codigestion with food waste to enhance biogas production. *Waste Manage.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.10.009>.
- ✓ **AMARAL C., LUCAS MS., SAMPAIO A., PERES JA., DIAS AA., PEIXOTO F.,**

- ANJOS MDR. et PAIS C. (2012).** Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Int Biodeterior Biodegrad.* **68**:45–50.
- ✓ **AMIOT M.J., FLEURIET A. and MACHEIX J.J. (1989).** Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry.* **28**, 67–9.
 - ✓ **ANDRES DONOSO-BRAVO., ORTEGA-MARTINEZ E. AND G. RUIZ-FILIPPI (2016).** Impact of milling, enzyme addition, and steam explosion on the solid waste biomethanation of an olive oil production plant. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* **2(39)**: 331-340.
 - ✓ **AOUIDI F., GANNOUN H., BEN OTHMAN N., AYED L. et HAMDİ M. (2009).** Improvement of fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus paracasei* by cheese whey's addition. *Process Biochem.* **44**:597–601.
 - ✓ **ARANDA E., SANPEDRO I., OCAMPO JA. et GARCIA-ROMERA I. (2006).** Phenolic removal of olivemill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *Int Biodeterior Biodegrad.* **58**:176–9.
 - ✓ **ASLI AE et QATIBI AI. (2009).** Ethanol production from olive cake biomass substrate. *Biotechnol Bioproc Eng.* **14**:118–22.
 - ✓ **ASSAS N., AYED L., MAROUANI L. et HAMDİ M. (2002)** Decolorization of fresh and stored and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Pro. Biochem.*, (sous press).
 - ✓ **ASSAS N., AYED L., BOUALLAGUI H., SAYADI S. et HAMDİ M. (2009).** Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Int Biodeterior Biodegrad.* **63**: 407–13.
 - ✓ **AVIANI I., LAOR Y., MEDINA SH., KRASSNOVSKY A. et RAVIV M. (2010).** Co-composting of solid and liquid olive mill wastes: Management aspects and the horticultural value of the resulting composts. *Bioresource Technol.* **101**:6699–706.
 - ✓ **ÁVILA M., HIDALGO M., SÁNCHEZ-MORENO C., PELAEZ C., REQUENA T. et PASCUAL-TERESA SD. (2009).** Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Research International.* **42**:1453–1461.
 - ✓ **AYED L et HAMDİ M. (2003).** Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus Plantarum*. *Process Biochem.* **39**:59–65.
 - ✓ **AZBAR N., TUTUK F. et 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 A., ELANDALOUSSI EH. et 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. et 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.
- ✓ **BALASUNDRAM N., SUNDRAM K., SAMMAN S. (2006).** Phenolic compounds in plants

and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191-203.

- ✓ **BATTISTA F., FINO D. et RUGGERI B. (2014).** Polyphenols concentration's effect on the biogas production by wastes derived from olive oil production *Chem. Eng. Trans.* **38**: 373–378.
- ✓ **BELLOU S., MAKRI A., SARRIS D., MICHOS K., RENTOUMI P., CELIK A., PAPANIKOLAOU S. et AGGELIS G. (2014).** The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes. *Journal of Biotechnology*. **170** 50– 59.
- ✓ **BENDINI A., CERRETANI L., CARRASCO-PANCORBO A., ANA MARIA GÓMEZ-CARAVACA A.M., SEGURA-CARRETERO A., FERNÁNDEZGUTIÉRREZ A. and LERCKER G. (2007).** Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Mol.*, **12** : 1679-1719.
- ✓ **BENITEZ F.J., BELTRAN-HEREDIA J., TORREGROSA J. et ACERO J.L. (1997).** Improvement of the anaerobic biodegradation of olive mill wastewaters by prior ozonation pretreatment. *Bioprocess. Eng.* **17**: 169.
- ✓ **BEN SASSI A., OUAZZANI N., WALKER GM., IBNSOUDA S., EL MZIBRI M. et BOUSSAID A. (2008).** Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast Isolates. *Biodegradation*. **19**:337–46.
- ✓ **BETA T., NAM S., DEXTER J.E. et SAPIRSTEIN H.D. (2005).** Phenolic content and antioxydants Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. *Cereal chem.* **82** (4): pp 390- 393.
- ✓ **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**: 409–16.
- ✓ **BLIKA PS., STAMATELATOU K., KORNAROS M. et LYBERATOS G. (2009).** Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global NEST J*: **11**(3):364–72.
- ✓ **BORJA R., BANKS A.M.C.J., ALONSOB V. et CHICAB A. (1995).** A kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environ. Pollut.* **88**: 13–18.
- ✓ **BOSKOU G., SALTA F.N., CHRYSOSTOMOU S., MYLONA A., CHIOU A. and ANDRIKOPOULOS N.K. (2006).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem.* **94**: 558–564.
- ✓ **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.
- ✓ **BRAUNE A and BLAUT M. (2011).** Intestinal Bacterium Eubacterium cellulosolvens Deglycosylates Flavonoid C- and O-Glucosides. *Appl. Environ. Microbiol.* **22** (78): 8151-8153.
- ✓ **BRAVO L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nut. Rev.* **56**: 317–33.
- ✓ **BROZZOLI V., CROGNALE S., SAMPEDRO I., FEDERICI F., D'ANNIBALE A. et PETRUCCIOLI M. (2009).** Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technol.*

100:3395–402.

- ✓ **BRUNETON J. (1993).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques et Documentaires, Paris.
- ✓ **BUDINOVA T., PETROV N., RAZVIGOROVA M., PARRA J. et 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.

C

- ✓ **CAMARILLO R et 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 68–76.
- ✓ **CANNELLA D., PERONI CV. et BRAVI M. (2010).** Yeast viability for second generation ethanol production from olive oil wastes. *J Biotechnol.* **150S**:S1–576.
- ✓ **CAPASSO R. (1997).** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, **1**, 145-156.
- ✓ **CAPASSO R., EVIDENTE A., SCHIVO L., ORRU G., MARCIALIS M.A. et CRISTINZIO G. (1995).** Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 393–8.
- ✓ **CASAS-SANCHEZ J., ALSINA M.A., HERRLEIN M.K. and MESTRES C. (2007).** Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *ColloidPolym Sci.* **285**: 1351-1360.
- ✓ **CATURLA N., PEREZ-FONS L., ESTEPA A. & MICOL V. (2005).** Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **137**, 2-17.
- ✓ **CEYLAN E. et FUNG D.Y.C. (2004).** Antimicrobial activity of spices. *Journal of rapid methods and automation in microbiology.* **(12)**: 1-55.
- ✓ **CHEW Y-L., GOH J-K. and LIM Y-Y. (2009).** Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.* **116**: 13–18.
- ✓ **CHOI S.H. et GU M.B. (2001).** Phenolic toxicity detection and classification through the use of a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 248-255.
- ✓ **CLAASSEN PAM, VAN LIER JB, LOPEZ CONTRERAS AM, VAN NIEL EWJ, SIJTSMA L, STAMS AJM, DE VRIES SS, WESTHUIS RA. (1999).** Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol.* **52**:741–55.
- ✓ **COI (Conseil oléicole international). (2006).** Indicateurs macroéconomiques et agricoles.
- ✓ **COI (Conseil oléicole international). Novembre 2014a.** Huiles d'olive, Production.
- ✓ **COI (Conseil oléicole international). Novembre 2014b.** Huiles d'olive, Consommation
- ✓ **CORDOVA M., NEMMAOUI M., ISMAILI-ALAOUI A., MORIN S., ROUSSOS M., RAIMBAULT B. et BENJILALI B. (1998).** Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J Mol Catal B: Enzym.* **5**:75–8.

- ✓ **CORDOVA J., NEMMAOUI M., ISMAILI-ALAOUI M., MORIN A., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. et BENJILALI B. (1999).** Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J Mol Catal B: Enzym.* 5:75–8.
- ✓ **COSSU R., BLAKEY N. et CANNAS P. (1993).** Influence of Codisposal of Municipal Solid Waste and Olive Vegetation Water on the Anaerobic Digestion of a Sanitary Landfill. *Wat Sci Tech.* 27 (2): 261-271.
- ✓ **CROGNALE S., D'ANNIBALE A., FEDERICI F., FENICE M., QUARATINO D. et 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 J.M. et BARTOLOM B. (2010).** Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology.* 161: 372-382.

D

- ✓ **D'ANNIBALE A., CRESTINI C., VINCIGUERRA V. et GIOVANNOZZI SG. (1998).** The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J Biotechnol.* 61:209–18.
- ✓ **D'ANNIBALE A., CASA R., PIERUCCETTI F., RICCI M. et 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 GG., FEDERICI F. et PETRUCCIOLI M. (2006).** Olive mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technol.* 97:1828–33.
- ✓ **DANELLAKIS D., NTAIKOU I., KORNAROS M. and DAILIANIS S. (2011).** Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 101: 358–66.
- ✓ **D'ANGELO S., INGROSSO D., MIGLIARDI V., SORRENTINO A., DONNARUMMA G., BARONI A., MASELLA L., ANTONIETTA TUFANO M., ZAPPIA M. et GALLETTI P. (2005).** Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 38: 908-919.
- ✓ **DAREIOTI MA., DOKIANAKIS SN., STAMATELATOU K., ZAFIRI C., KORNAROS M. (2010).** Exploitation of olive mill wastewater and liquid cow manure for biogas production. *Waste Manage.* 30:1841–8.
- ✓ **DERMECHE S., NADOOR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. and MICHAUD P. (2013).** Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.* 48: 1532–1552.
- ✓ **DI GIOVACCHINO L., SESTILI S. AND DI VINCENZO D. (2002).** Influence of olive processing on virgin olive quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 587–60.
- ✓ **DOMINECO T., FRANCESCO C., MARIA G.S., VINCEZA V., MARIATERESA C.D., ANTONELLA S., GABRIELA M., GIUSEPE B. (2005).** Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 49: 2474-2478.

E

- ✓ **EBRAHIMZADEH M. A., NABAVI S. F., NABAVI S. M., MAHMOUDI M., ESLAMI B. and DEHPOUR A. A. (2010).** Biological and pharmacological effects of *Delphinium elbursense*. *Afr. J. of Biotechnol.* **9 (34)**: 5542-5549.
- ✓ **EL-ABBASSI A., KHAYET M. and HAFIDI A. (2011).** Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. *Watr. Res.* **45**: 4522–4530.
- ✓ **EL-CHOKRAFI F Z. (2015).** Traitement des margines de la ville de Fès. Mem. Master, USMBA, Fès. 45p.
- ✓ **EL HAJJOUJI H., PINELLI E., GUIRESSE M., MERLINA M., REVEL JC. et HAFIDI M. (2007).** Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the Vicia faba micronucleus test. *Mutat Res.* **634**:25–31.
- ✓ **EL-GOHARY F.A., BADAWY M.I., EL-KHATEEB M., EL-KALLINY S. (2009).** Integrated treatment of olive mill wastewater (OMW) by the combination of Fenton's reaction and anaerobic treatment. *J. Hazard. Mater.* **162**: 1536–1541.
- ✓ **ENA A., PINTUCCI C. and CARLOZZI P. (2010).** Production of bioH₂ by *Rhodopseudomonas palustris* (strain 6A) grown in pre-treated olive mill waste, under batch or semi-continuous regime. *J Biotech*: S180.
- ✓ **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U. and YUCEL M. (2009).** Comparison of the physicochemical characteristics and photofermentative hydrogen production potential of wastewaters produced from different olive-oil mills in Western-Anatolia, Turkey. *Biomass. Bioenerg.* **33(4)**: 706–11.
- ✓ **EROGLU E., GUNDUZ U., YUCEL M., TURKER L. et 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. et EROGLU I. (2006).** Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two stage processes. *Int J Hydrogen Energy.* **31(11)**:1527–35.
- ✓ **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U. et YUCEL M. (2008).** Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Bioresource Technol.* **99**:6799–808.
- ✓ **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U., YUCEL M. (2009).** Treatment of olive mill wastewater by different physicochemical methods and the utilization of their liquid effluents for biological hydrogen production. *Biomass Bioenerg.* **334**: 701–5.
- ✓ **EROGLU E., GUNDUZ U., YUCEL M. et 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.

F

- ✓ **FADIL K., CHAHLAOUI A., OUAHBI A., ZAID A. et BORJA R. (2003).** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *Int Biodeterior Biodegrad.* **51**:37–41.
- ✓ **FARALONI C., ENA A., PINTUCCI C. et TORZILLO G. (2011).** Chlamydomonas reinhardtii cultures grown in pretreated olive mill wastewater. *Int J Hydrogen Energy.*

36:5920–31.

- ✓ **FEDORAK PM and HRUDEY SE. (1984).**The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water Res.* **18**:361–7.
- ✓ **FERNANDEZ-BOLAÑOS J., FELIZON B., BRENES M., GUILLEN R., 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., 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**:6804–11.
- ✓ **FERNANDEZ DE CORDOVA et MEDINA. (2014).** Analytical methods for determination of polyphenols in Beer.pp **289–299**
- ✓ **FEZZANI B et BEN CHEIKH R. (2010).** Two-phase anaerobic co-digestion of olive millwastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature. *Bioresour.Technol.* **101**: 1628–1634.
- ✓ **FILIPPI C., BEDINI S., LEVI-MINZI R., CARDELLI R. et 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. et TEMUSSI F. (2004).** Olive oil mill wastewater treatment using a chemical and biological approach. *J.Agric. Food Chem.* **52**: 5151–5154.
- ✓ **FKI I., ALLOUCHE N. et SAYADI S. (2003).** The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chem.* **93**: 197-204.
- ✓ **Faucher J.L., Avril J.L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Tome 1, Ellipses (Ed.), Paris. 214p.
- ✓ **FOUNTOULAKIS M.S., DOKIANAKIS S.N., KORNAROS M.E., AGGELIS G.G. et LYBERATOS G. (2002).** Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* **19 (36)**: 4735-44.
- ✓ **FOUNTOULAKIS MS., DRAKOPOULOU S., TERZAKIS S., GEORGAKI E. et MANIOS T. (2008).**Potential for methane production from typical Mediterranean agro-industrial byproducts. *Biomass Bioenerg.* **32**:155–61.

G

- ✓ **GARCIA GARCIA I., JIMENEZ PEÑA PR., BONILLA VENCESLADA JL., MARTIN MARTIN A., MARTIN SANTOS MA. et 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**:751–8.
- ✓ **GELEGENIS J, GEORGAKAKIS D, ANGELIDAKI I, CHRISTOPOULOU N, GOUMENAKI M. (2007).** Optimization of biogas production from olive oil mill wastewater, by codigesting with diluted poultry manure. *App Energy.* **84(6)**:646–63.
- ✓ **GEORGIEVA TI et AHRING BK. (2007).** Potential of agroindustrial waste from olive oil

industry for fuel ethanol production. *Biotechnol J.* 2:1547–55.

- ✓ **GHARBY S., HARHAR H., BOUZOUBAA Z., ROUDANI A., CHAFCHAOUNI I., KARTAH B. et CHARROUF Z. (2014).** Effet des Polyphénols extraits des margines sur la stabilité de l'huile de tournesol (Effect of Polyphenols extracts from margins on the stability of sunflower oil). *J. Mater. Environ. Sci.* 5(2): 464-469.
- ✓ **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. et SAYADI S. (1999).** The effect of Phanerochaete chrysosporium pretreatment of olive mill waste waters on anaerobic digestion. *Resour. Conserv. Recycl.* 27: 187–192.
- ✓ **GHATTAS D. (2004).** Valorisation des margines par digestion anaérobie. Mem. DES. INRA, France.39p
- ✓ **GHAZY SE., SAMRA SE., MAY AEM. et EL-MORSY SM. (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.* 22:377–82.
- ✓ **GIANICO A., BRAGUGLIA C.M., MESCIA D. et MININNI G. (2013).** Ultrasonic and thermal pretreatments to enhance the anaerobic bioconversion of olive husks. *Bioresour. Technol.* 147: 623–626.
- ✓ **GIANNOUTSOU EP., MEINTANIS C. et KARAGOUNI AD. (2004).** Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. *Bioresource Technol.* 93: 301–6.
- ✓ **GORTZI O., LALAS S., CHATZILAZAROU A., KATSOYANNOS E., PAPACONSTANDINO S. et DOURTOGLOU E. (2008).** Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080. *J Am Oil Chem Soc.* 85:133–40.
- ✓ **GONCALVES C., PEREIRA C., BELO I. (2010).** Comparison of batch and fed-batch lipase production from olivemill wastewater by *Yarrowia lipolytica* and *Candida cylindracea*. *J Biotechnol.* 150S:S1–576. In Special Abstracts.
- ✓ **GONZÁLEZ-GONZÁLEZ A. et CUADROS F. (2014).** Effect of aerobic pretreatment on anaerobic digestion of olive mill wastewater (OMWW): an ecoefficient treatment. *Food Bioprod. Process.* 1–7.
- ✓ **GULLUCE M., SOKMEN M., DAFERERA D., AGAR G., OZKAN H., KARTAL N., POLISSIOU M., SOKMEN A. ET SAHIN F. (2003).** In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 51: 3958–3965.

H

- ✓ **HAAGENSEN F., SKIADAS IV., GAVALA HN. et AHRING BK. (2009).** Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass Bioenerg.* 33:1643–51.
- ✓ **HADDADIN MSY., HADDADIN J., ARABIYAT OI. et HATTAR B. (2009).** Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technol.* 100:4773–82.

- ✓ **HAFIDI M., AMIR S. et REVEL J.C. (2005).** Structural characterization of olive millwaster-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³ CNMR. *Process Biochem.* **40**: 2615–2622.
- ✓ **HAMDEN K., ALLOUCHE N., DAMAK M. et ELFEKI A. (2009).** Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions.* **180**: 421-432.
- ✓ **HAMDI M. (1991).** Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Bioresource Technol.* **36**:173–8.
- ✓ **HAMDI M., BOUHAMED H. et ELLOUZ R. (1991).** Optimisation of *Aspergillus niger* growth on olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. Biothechnol.* **36**: 285-288.
- ✓ **HAMDI M. et ELLOUZ R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environ Technol.* **14**: 183–8.
- ✓ **HAMDI M., GARCIA JL. et ELLOUZ R. (1992).** Integrated biological process for olive mill wastewater treatment. *Bioprocess Eng.* **8**:79–84.
- ✓ **HAMZA KARRAY 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. 150p.
- ✓ **HEIM K.E., TAGLIAFERO A.R., BOBILYA, D.J. (2002).** Flavonoids antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *J. of Nutrition and Biochemistry,* **13**: 572- 584.
- ✓ **HENNEBELLE T., SAHPAZ S., BAILLEUL F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, Phytothérapie. **1**: 3-6.
- ✓ **HESSAS N. et LAKSI K. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits polyphénoliques issus de sous- produits oléicoles et la sensibilité des souches probiotiques vis-à-vis de ces extraits. Mem, master, ummto, Tizi Ouzou.81p.

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 ousou. 129p.
- ✓ **ILBERT H. (2005).** Produits du terroir méditerranéen : conditions d'émergence, d'efficacité et modes de gouvernance (PTM : CEE et MG). Centre international de hautes etudes agronomiques. Montpellier.
- ✓ **INAN H., DIMOGLO A., SIMSEK H. et KARPUZCU M. (2004).** Olive oil mill wastewater treatment by means of electro-coagulation. *Sep. Purif. Technol.* **36**: 23–31.
- ✓ **Intanoo P., Rangsanvigit P., Malakul P. et S. Chavadej. (2014).** Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stageupflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilicoperation. *Bioresour. Technol.* **173**: 256–265.

J

- ✓ **JUSTINO C.I.L., PEREIRA R., FREITAS A., ROCHA-SANTOS T.A.P., PANTELEITCHOUK T.S.L. et 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

- ✓ **KALLEL M., BELAID C., MECHICHI T., KSIBI M. ET 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.
- ✓ **KANG D.G., YUN C.K. & LEE H.S. (2003).** Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol.* **87**: 231–236.
- ✓ **KAPELLAKIS IE., TSAGARAKIS KP., AVRAMAKI CH. et ANGELAKIS AN. (2006).** Olive mill wastewater management in river basins: A case study in Greece. *Agricultural Water Management.* **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., 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. et EGGINK G. (2001).** Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **71**:159–82.
- ✓ **KHALID N.M et MARTH E.H. (1990).** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* **73**: 158-167.
- ✓ **KHOUI S., ALOUI F. et SAVADI S. (2006).** Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Res.* **40**: 2007–2016.
- ✓ **KHOUI S., FEKI F. et SAYADI S. (2007).** Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *J. Hazard. Mater.* **142**: 58–67.
- ✓ **KHOUI S., HAMZA M., SAYADI S. (2011).** Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresource Technol.* **102**:9050–8.
- ✓ **KOTAY SM, DAS D. (2008).** Biohydrogen as a renewable energy resource: prospects and potentials. *Int J Hydrogen Energy.* **33**(1):258–63.
- ✓ **KOUTROULI EC, GAVALA HN, SKIADAS IV, LYBERATOS G. (2006).** Mesophilic biohydrogen production from olive pulp. *Proc Saf Environ Prot.* **84**:285–9.
- ✓ **KOUTROULI EC., KALFAS H., GAVALA HN., SKIADAS IV., STAMATELATOU K., LYBERATOS G. (2009).** Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresource Technol.* **100**:3718–23.
- ✓ **KSOURI, R., MEGDICHE, W., DEBEZ, A., FALLEH, H., GRIGNON, C., ABDELLY. C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch.* **45**: 244-249.

L

- ✓ **LAFKA T-A., LAZOU AE., SINANOGLU VJ., LAZOS ES. (2011).** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem.* **125**:92–8.
- ✓ **LAKHTAR H., ISMAILI-ALAOUI MA., PERRAUD-GAIME I., PHILIPPOUSSIS A et 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**:167–72.
- ✓ **LANCIOTTI R., GIANOTTI A., BALDI D., ANGRISANI R., SUZZI G., MASTROCOLA D. et GUERZONI ME. (2005).** Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technol.* **96**:317–22.
- ✓ **LARA-VILLOSLADA F., OLIVARES M., SIERRA S., RODRIGUEZ JM., BOZA J. et XAUS J. (2007).** Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr.* **1**:S96-100.
- ✓ **LECLEC H., GAILLARD F.L. et SIMONET M. (1994).** Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN, Paris. 445p.
- ✓ **LEONG LP. and SHUI G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* **76**: 69-75.
- ✓ **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**: 501–7.
- ✓ **LEULMI N. (2010).** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l’ovin. Mem. magister, UMC, Constantine. 75p.
- ✓ **LEVIS-MENZI R., GAVIOZZI A., RIFFALDI R. et FALZI L. (1992).** L’épandage au champ des margines : effet sur les propriétés du sol. *Olivae.* **40**: 20-25.
- ✓ **LIN PY., WHANG LM., WU YR., REN WJ., HSIAO CJ., LI SL. (2007).** Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation. *Int J Hydrogen Energy.* **32**:1728–35.
- ✓ **LINARES A., CABA JM., LIGERO F., DE LA RUBIA T. et MARTINEZ J. (2003).** Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavidio-alba*. *Chemosphere.* **51**:887–91.
- ✓ **LIU F., LIAOS., ZOU Y. and XIAO G. (2014).** Antioxidant activity of *Phellinus igniarius* extracts. *The FASEB Journal.* **28**(1): 830-32.
- ✓ **LOPEZ DE LACEY A.M., PEREZ-SANTIN E., LOPEZ-CABALLERO M.E. et MONTERO P. (2013).** Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. *Food Science and Technology.* **30**: 1-9.
- ✓ **LOPEZ MJ., MORENO J. ET RAMOS-CORMENZANA A. (2001).** *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. *Water Res.* **35**:828–1830.
- ✓ **LOPEZ MJ et RAMOS-CORMENZANA A. (1996).** Xanthan production from olive-mill wastewaters. *Int Biodeterior Biodegrad.* **38**:263–70.
- ✓ **LOPEZ MJ et RAMOS-CORMENZANA A. (1996).** Xanthan production from olive-mill wastewaters. *Int Biodeterior Biodegrad.* **38**:263–70.

- ✓ **LOŽIENE K., VENSKUTONIS P., AUSRA S., and JUOZAS L A.R. (2007).** Scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem.* **103**: 546–559.

M

- ✓ **MACHEIX J.J., FLEURIET A. & JAY-ALLEMAND C.H. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPTUR Lausanne.
- ✓ **MAESTRO-DURÁN R., LEON-CABELLO R., RUIZ-GUTIERREZ V., FIESTAS P. and VAZQUEZ-RONCERO A. (1994).** Glucosidos fenólicos amargos de las semillas del olivo. *GrasasAceites.* **45**: 332–5.
- ✓ **MAHYUDIN AR, FURUTANI Y, NAKASHIMADA Y, KAKIZONO T, NISHIO N. (1997).** Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J Ferment Bioeng.* **83(4)**:358–63.
- ✓ **MANNA C., GALLETTI P., CUCCIOLLA V., MONTEDERO G. & ZAPPIA V. (1999).** Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. of Nutritional Biochemistry.* **10**: 159-165.
- ✓ **MARI I., EHALIOTIS C., KOTSOU M., BALIS C. et GEORGAKAKIS D. (2003).** Respiration profiles in monitoring the composting of by-products from the olive oil agro-industry. *Bioresource Technol.* **87**:331–6.
- ✓ **MARTÍN A., BORJA R., GARCÍA I. et FIESTAS J.A. (1991).** Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process Biochem.* **26** :101–107.
- ✓ **MARTIN-LARA MA., BLANZQUEZ G., RONDA A., RODRIGUEZ IL. et 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**:1006–12.
- ✓ **MARTINEZ-GARCIA G., JOHNSON AC., BACHMANN RT., WILLIAMS CJ., BURGOYNE A. et EDYVEAN RGJ. (2009).** Anaerobic treatment of olive mill wastewater and piggery effluents ferment with *Candida tropicalis*. *J Hazard Mater.* **164**: 1398–405.
- ✓ **MASSADEH MI et MODALLAL N. (2008).** Ethanol production from olive mill wastewater (OMW) pretreated with *Pleurotus sajor-caju*. *Energy Fuels.* **150 (22)**:150–4.
- ✓ **MATOS M., BARREIRO MF. et GANDINI A. (2010).** Olive stone as a renewable source of biopolyols. *Ind Crop Prod.* **32**:7–12.
- ✓ **MCNAMARA C.J., ANASTASIOU C.C., O'FLAHERTY V. et MITCHELL R. (2008).** Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **61**: 127–134.
- ✓ **MEGONIGAL J.P., HINE M.E. et VISSCHER P.T., 2004.** Anaerobic metabolism: linkages to trace gases and aerobic processes. In: Schlesinger, W.H. (Ed.), *Biogeochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, UK. pp. 317-424.
- ✓ **MEKKI A., DHOUIB A. et SAYADI S. (2009).** Evolution of several soil properties following amendment with olive mill wastewater. *Prog Nat Sci.* **19**:1515–21.
- ✓ **MEKSI N., HADDARA., HAMMAMIA S. et MHENNI MF. (2012).** Olive mill wastewater: a potential source of natural dyes for textile dyeing. *Ind Crop Prod.* **40**:103–9.
- ✓ **MIDDLETON E., KANDASWAMI C. and THEOHARIDES T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer.

Pharmacol Rev. 52: 673-839.

- ✓ **MOLYNEUX P. (2004).** The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26 (2)**: 211-219.
- ✓ **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.
- ✓ **MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E. et ROURA S.I. (2005).**Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, 38p, 565-570.
- ✓ **MORILLO JA., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A., et 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**:189–93.
- ✓ **MORILLO JA., GUERRA DEL AGUILA V., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A. et 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**:1705–10.
- ✓ **MORILLO JA., AGUILERA M., ANTIZAR-LADISLAO B., FUENTES S., RAMOS-CORMENZANA A., RUSSELL NJ. et MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008).** Molecular microbial and chemical investigation of the bioremediation of two-phase olive mill waste using laboratory-scale bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* **79**:309–17.
- ✓ **MORILLO JA., GARCIA-RIBERA R., QUESADA T., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A. et MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008).** Biosorption of heavy metals by the EPS produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J Microbiol Biotechnol.* **24**:2699–704.
- ✓ **MOURE A., CRUZ J. M., FRANCO D., DOMINGUEZ J. M., SINEIRO J. et DOMINGUEZ H. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry.* **72**: 145–171.
- ✓ **MOYA RAMÍREZ I., TSAOUSI K., RUDDEN M., MARCHANT R., JURADO ALAMEDA E., GARCÍA ROMÁN M., BANAT IM. (2015).** Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour Technol.* **198**: 231-6.

N

- ✓ **NACZK M., SHAHIDI F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *J. of Chromatography A*: 1054: 95–111.
- ✓ **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. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, in press.
- ✓ **NAJAR-SOUISSI S., OUEDERNI A. et RATEL A. (2005).** Adsorption of dyes onto activated carbon prepared from olive stones. *J Environ Sci.* **17**:998–1003.

- ✓ **NASSIF D. (2004).** Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. Mem. DES. INRA, France.42p
- ✓ **NEFFA M., HANINE H., LEKHLIF B., OUAZZANI N. et TAOURIRTE M. (2013).** Improvement of biological process using biocoagulation–flocculation pretreatment aid in olive mill wastewater detoxification. *Desalin. Water Treat.* **52**: 2893–2902.
- ✓ **NIAOUNAKIS M. and HALVADAKIS C.P. (2004).** Olive mill waste management, literature review and patent survey. Athens, Greece: Typothito-George Dardanos, Athens.
- ✓ **NIJVELDT R. J., NOOD E., HOORN D. E., BOELENS 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 EC., STAMATELATOU K., ZAMPRAKA A., KORNAROS M. et LYBERATOS G. (2009).** Exploitation of olive oil mill wastewater for combined biohydrogen and biopolymers production. *Bioresource Technol.***100**:3724–30.

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. of agricul. Food Chem.* **53**: 823-837.
- ✓ **OUABOU E., ANOUAR A. et HILALI S. (2014).** Traitement de la margine brute d'huile d'olive par distillation suivi de neutralisation par la chaux. *J. App. Biosci.* **79**: 6867 – 6872.
- ✓ **OWNAGH A., HASANI A., MARDANI K. et EBRAHIMZADEH S. (2010).** Antifungal Effects of Thyme, Agastache and Satureja Essential Oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veter. Res. Forum.* **(2)**: 99-105.

P

- ✓ **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.
- ✓ **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. *Biores. Technology.* **67**: 111–115.
- ✓ **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)**: 1557–64.
- ✓ **PHAM MINH D., GALLEZOT P., AZABOU S., SAYADI S. et BESSON M. (2008).** Catalytic wet air oxidation of olive oil mill effluents. *Appl. Catal. B Environ.* **84**: 749–757.
- ✓ **PINTO G., POLLIO A., PREVITERA L., STANZIONE M. et TEMUSSI F. (2003).** Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnol Lett.* **25**:1657–9.
- ✓ **PIOTROWSKA A., RAO MA., SCOTTI R. et GIANFREDA L. (2011).** Changes in soil chemical and biochemical properties following amendment with crude and dephenolized olive mill waste water (OMW). *Geoderma.***161**:8–17.

- ✓ **PRAKASH D., UPADHYAY G., BRAHMA N. and SINGH H.B.(2007).** Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food chemistry*. **104** : 783-790.
- ✓ **PRIEGO-CAPOTE F., RUIZ-JIMENEZ J., LUQUE DE CASTRO MD. (2004).** Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis–diode array detection Application to the characterization of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *J Chromatogr (A)*. **1045**:239–46.
- ✓ **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): 3396-402.

Q

- ✓ **QU L., XIN H., SU Y., ZHENG G. and LING C. (2012).** Combined application of macroporous resin and high speed counter-current chromatography for preparative separation of three flavonoid triglycosides from the leaves of *Actinidia valvata* Dunn. *J. Sep Sci*. **35** (7): 883-92.

R

- ✓ **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. et LOPEZ MJ. (1995).** Bioremediation of alpechin. *Int Biodeterior Biodegr*. **35**:249–68.
- ✓ **RANALLI A. (1991a).** The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*. **37** : 30-39.
- ✓ **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.
- ✓ **RINCÓN B., BORJA R., MARTÍN M. et 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.
- ✓ **RINCON B., BORJA R., MARTIN MA. et 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. et BORJA R. (2013).** Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: influence of thermalpretreatment on the process kinetics. *Bioresour. Technol*. **140**: 249–255.
- ✓ **RINCON B., BUJALANCE L., FERMOSE F.G., MARTIN A. ET 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*. **2014**: 648624.
- ✓ **RIGGIO V., COMINO E., ROSSO, M., 2015.** Energy production from anaerobic codigestion processing of cow slurry, olive pomace and apple pulp. *Renewable Energy* **83**: 1043–1049.

- ✓ **RIZZO L., LOFRANO G., GRASSI M. et BELGIORNO V. (2008).** Pre-treatment of olive mill wastewater by chitosan coagulation and advanced oxidation processes. *Sep.Purif. Technol.* **63**: 648–653.
- ✓ **RODRÍGUEZ G., LAMA A., RODRÍGUEZ R., JIMÉNEZ A., GUILLÉN R. et FERNÁNDEZBOLAÑOS J. (2008).** Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technol.* **13**: 5261-5229.
- ✓ **ROIG A., CAYUELA M.L. and SANCHEZ-MONEDERO M.A. (2006).** An overview on olive mill wastes and their valorization methods. *Waste Manage.* **26**: 960–9.
- ✓ **RYAN D., PRENZLER P.D., LAVEE S., ANTOLOVICH M. and ROBARDS K. (2003).** Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 2532–8.

S

- ✓ **SAAVEDRA M., BENITEZ E., CIFUENTES C. et 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. et BASHEER S. (2004).** The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process Biochem.* **39**: 1947–1951.
- ✓ **SAMPEDRO I., MARINARI S., D'ANNIBALE A., GREGO S., OCAMPO JA. et 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 VILLASCLARAS S., MARTINEZ SANCHO ME., ESPEJO CABALLERO MT. et DELGADO PEREZ A. (1996).** Production of microalgae from Olive Mill Wastewater. *Int Biodeterior Biodegrad.* **38**(3-4):245–7.
- ✓ **SAYADI S., ALLOUCHE N., JAOUA M. et ALOUI F. (2000).** Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochem.* **35**: 725–735.
- ✓ **SHAHIDI F. and NACZK M. (2004).** Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ✓ **SHAN B., CAI Y.Z., BROOKS J.D. & CORKE H. (2007).** The in vitro antibacterial activity of diet aryspice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology.* **117**: 112-119.
- ✓ **SINGLETON V.L. and AROSSI J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technol. & Viticultur.* **16**: 144-153.
- ✓ **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.
- ✓ **STEEGMANS R. and FRAGEMAN H. (1992).** Optimierung der anaeroben Verfahrenstechnik zur Reinigung von Organisch Hochverschmutzt Abwassern aus der Olivenolgewinnung Ostwoltz-Schulze-Stiftung. Forschungsbericht AZ 101/81.

T

- ✓ **TANISHO S, KUROMOTO M, KADOKURA N. (1998).** Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *Int J Hydrogen Energy*. **23**:559–63.
- ✓ **TEJEDA-RICARDEZ J., VACA-GARCIA C. et BORREDON ME. (2003).** Design of a batch solvolytic liquefaction reactor for the valorization of residues from the agricultural foodstuff. *Chem Eng Res Des*.1066–70.
(<http://www.cosmoliva.com/>).
- ✓ **TORRES DE PINEDO A., PEN ALVER P., MORALES J.C. (2007).** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relationship. *Food Chemistry*, **103**: 55-61.

U

- ✓ **USAQUEN-CASTRO X., MARTINEZ-RUBIO M., AYA-BAQUERO H. et GONZALEZ-MARTINEZ G. (2006).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from red-grape (*Vitis vinifera*) residues. *IUFoST*:1315–24.

V

- ✓ **VEKIARI S.A., PAPADOPOULOU P. and KOUTSAFTAKIS A. (2002).** Comparison of different olive oil extraction systems and the effect of storage conditions on the quality of the virgin olive oil. *Grasas Aceites*. **53**: 324–9.
- ✓ **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**: 1218–23.
- ✓ **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.
- ✓ **VLSSIDES 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

- ✓ **WILLIAM R. (1994).** Bergey's manual of Determination Bacteriology, 3eme édition. Hensyl, États-unis.

Y

- ✓ **YESILADA O., SIK S. et SAM M. (1997).** Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia troglia*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World J Microbiol Biotechnol.* **14**:37–42.
- ✓ **YRJÖNEN T. (2004).** Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in Analysis of Natural Products, University of Helsinki, Helsinki.

Z

- ✓ **ZAFRA A., JUAREZ MJB., BLANC R., NAVALON A., GONZALEZ J., VILCHEZ JL. (2006).** Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*. **70** :213–8.
- ✓ **ZAHARI A., TAZI A. and AZZI M. (2014).** [Optimization of treatment conditions of Olive Oil Mill Wastewater by superoxidant K₃FexMnyO₈]. *J. Mater. Environ. Sci.* **5 (2)**: 484-489.
- ✓ **ZENJARI B., EL HAJJOUJI H., AIT BADDI G., BAILLY J-R., REVEL J-C., NEJMEDDINE A. et HAFIDI M. (2006).** Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater-straw mixtures. *J Hazard Mater.* **138**:433–7.

- ✓ **Anonyme 1 :**
<http://www.cosmoliva.com/>

Annexe 1 : Préparation des solutions

a) Préparation de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 7%

Dissoudre 7g dans un volume de 100ml d'eau distillée.

b) Préparation de la solution mère d'acide gallique de concentration (200 $\mu\text{g/ml}$)

Une quantité de 5mg (pesée à l'aide d'une balance de précision) est dissoute dans 25 ml d'eau distillée.

➤ Dilutions à partir de la solution mère :

Pour avoir des solutions diluées à partir d'une solution mère, appliquer la règle ($C_1 V_1 = C_2 V_2$).

- C_2 : concentration de la solution diluée que l'on veut préparer (par exemple $C_2 = 100 \mu\text{g/ml}$)
- V_2 : le volume connu de la solution diluée (par exemple $V_2 = 1000 \mu\text{l}$).
- C_1 : Concentration de la solution mère ($C_1 = 200 \mu\text{g/ml}$).
- V_1 : le volume inconnu de la solution mère qu'il faut prélever et ajuster à 1000 μl avec l'eau distillée pour avoir une concentration finale de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Application : $V_1 = C_2 V_2 / C_1$

$$V_1 = 100.1000/200 = 500 \mu\text{l}.$$

Annexe 2: Principe de la coloration de Gram.

- Un frotti bactérien est réalisé en étalant quelques gouttes de la suspension bactérienne sur une lame propre et séchée à la flamme du bec Bunsen
- Le frottis est fixé par passage de la lame 3 fois au dessus de la flamme du côté de l'étalement.
- Après refroidissement de la lame, elle est recouverte par le colorant primaire : le violet de gentiane, qui colore le cytoplasme bactérien pendant 1 minute. Ainsi à cette étape toutes les cellules sont colorées en violet.
- La lame est ensuite traitée au lugol 2 fois pendant 45 secondes, qui sert à renforcer la fixation du violet de gentiane contenu dans le cytoplasme des bactéries.
- De l'alcool est appliqué sur la lame pendant 30 secondes qui sert à éliminer (ou pas) le violet de gentiane du cytoplasme.
- La lame est rincée abondamment et recouverte au colorant secondaire : la fuchsine, pendant 1 minute qui colore en rose le cytoplasme des bactéries décoloré par l'alcool.
- La lame est ensuite récupérée, rincée et séchée, puis observée au microscope optique à l'objectif x100 à l'huile d'immersion : toutes les bactéries colorées en violet sont Gram positif et celles colorées en rose sont Gram négatif.

Annexe 3 : Tableaux des résultats de différents tests.

Tableau I : résultats du dénombrement (UFC/ml).

Souche	Culture	T₀	24h	48h
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Témoin	79.10 ⁴	112.10 ⁶	205.10 ⁵
	Test	79.10 ⁴	102.10 ⁶	165.10 ⁶
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Témoin	232.10 ³	183.10 ⁵	69.10 ⁶
	Test	232.10 ³	92.10 ⁶	269.10 ⁶
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Témoin	68.10 ³	454.10 ⁷	336.10 ⁶
	Test	68.10 ³	377.10 ⁸	41.10 ⁷
<i>Lactobacillus casei</i>	Témoin	164.10 ⁴	94.10 ⁶	176.10 ⁶
	Test	164.10 ⁴	247.10 ⁶	106.10 ⁶
<i>Lactobacillus brevis</i>	Témoin	107.10 ³	241.10 ⁶	162.10 ⁵
	Test	107.10 ³	61.10 ⁶	81.10 ⁶
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Témoin	83.10 ⁴	78.10 ⁶	67.10 ⁴
	Test	83.10 ⁴	34.10 ⁶	269,5.10 ⁴