

**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 des Sciences Agronomiques**



## **THÈSE**

**En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD**

**Filière : Sciences Alimentaires**

**Spécialité : Biomarqueurs et Prédiction de la Qualité des Aliments**

### **Thème**

*Contribution à l'étude du processus industriel de  
la fermentation de différentes variétés d'olives de  
table vertes en Algérie*

**Présentée par : M<sup>elle</sup> SAB Chafiaa**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	<b>Mr. SADOUDI Rabah</b>	<b>M.C.A</b>	<b>UMMTO</b>
<b>Directeur :</b>	<b>Mr. OUELHADJ Akli</b>	<b>Professeur</b>	<b>UMMTO</b>
<b>Co-Directeur :</b>	<b>Mr. MEDINA Eduardo</b>	<b>Docteur</b>	<b>IG-CSIC, Espagne</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>Mme. YAHIAOUI Karima</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Boumerdès</b>
	<b>Mr. TITOUCHE Yacine</b>	<b>M.C.A</b>	<b>UMMTO</b>

**Année universitaire : 2024/2025**

## **REMERCIEMENTS**

*Au terme de ce travail, je tiens tout d'abord à remercier Mr. OUELHADJ Akli, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, de m'avoir proposé ce sujet et d'en avoir effectué la direction. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils précieux et les encouragements qu'il m'a prodigué tout au long de ce travail.*

*Ma gratitude et mes remerciements les plus profonds et les plus sincères s'adressent à Mr. Eduardo MEDINA, Docteur-Chercheur au Département de la Biotechnologie Alimentaire à l'Institut de la Grasa-CSIC (Espagne), pour avoir codiriger cette thèse, pour sa collaboration et l'intérêt qu'il a apporté à ce travail. Je le remercie vivement de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour son aide, ses orientations et pour m'avoir permis de mener mon travail expérimental dans les meilleures conditions.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur SADOUDI Rabah, Maître de Conférence A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury et de juger ce travail.*

*Mes remerciements vont également à Madame YAHIAOUI Karima, professeur à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès pour avoir accepté de juger mon travail, qu'elle me permette de lui exprimer mes sincères remerciements.*

*Mes remerciements les plus cordiaux s'adressent à Monsieur TITOUICHE Yacine, Maître de Conférences A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté de juger mon travail, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.*

*Je remercie le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour le financement de ce travail par l'attribution de la bourse PNE (2019/2020), ce qui m'a permis de finaliser ma thèse en Espagne.*

*Et enfin, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de thèse.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes chers parents*

## Résumé

L'objectif de la présente étude consiste à suivre l'évolution du processus de la fermentation des olives de table de la variété *Sigoise* (Sig.4). Dix-sept échantillons d'olives des variétés *Sevillana*, *Verdale* et *Sigoise* ainsi que des saumures ont été collectés dans trois conserveries. De plus, treize échantillons d'olives table commercialisées en vrac ont été collectés sur le marché en Algérie. Les paramètres physico-chimiques (pH, acidité, taux de sucres, acides organiques, composés phénoliques) et microbiologiques (dénombrements microbiologiques) ont été analysés par titration, HPLC, CG-SM, méthode de culture classique et séquençage des gènes 16S et ITS ARNr. L'étude du processus industriel de la fermentation des olives de table vertes style Espagnol a montré que les valeurs finales de pH atteintes à la fin de la fermentation variaient entre 4,3 et 5,0 et l'acidité titrable était supérieure à 0,4% pour la plupart des échantillons. L'acide lactique et l'acide acétique ont été produits en concentrations moyennes de 0,68% et 0,21%, respectivement, résultant du métabolisme des bactéries lactiques et des levures. Cependant, des acides butyrique, isobutyrique et propionique ont été également détectés, et leur présence est liée à la croissance des micro-organismes d'altération indésirables, responsables des fermentations secondaires. Le séquençage à haut débit du gène 16S ARNr a montré la dominance des espèces de bactéries lactiques appartenant au genre *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, ou *Enterococcus*. D'autres bactéries d'altération ont été identifiées, tels que *Lentilactobacillus Buchneri*, et les genres *Pectinatus* et *Acetobacter*, capables de consommer l'acide lactique et qui jouent un rôle essentiel dans l'apparition de la détérioration. L'étude évaluant la survie des micro-organismes pathogènes ajoutés aux saumures des olives naturelles tournantes caractérisées par des valeurs de pH de 3,6 à 4,3 et acidité de 0,56 à 0,96% ainsi que le taux de sel de 3,3 à 5,5% a montré des durées de survie de ces micro-organismes indésirables et pathogènes les plus courtes parmi les autres types de préparation (olives vertes style Espagnol et olives noires oxydées), et donc des conditions de conservation les plus intéressantes. Notre étude rappelle l'importance d'un contrôle physico-chimique et microbiologique strict de la qualité et des pratiques de production. Le respect des normes établies dans les réglementations internationales pour la transformation des olives de table et la mise en œuvre de mesures de contrôle efficaces garantiront l'amélioration de la qualité et par conséquent la sécurité sanitaire de cet aliment fermenté très prisé par le consommateur.

**Mots clés :** Olive de table, fermentation lactique, qualité microbiologique, altération, analyse métagénomique

## Abstract

The objective of this study is to monitor the fermentation process of *Sigoise* table olives (Sig.4). Seventeen samples of *Sevillana*, *Verdale*, and *Sigoise* olives, as well as brines, were collected from three industries. In addition, thirteen samples of bulk table olives were collected from the Algerian market. Physicochemical (pH, acidity, sugar levels, organic acids, phenolic compounds) and microbiological (microbiological counts) parameters were analyzed by titration, HPLC, GC-MS, microbiological culture methods, and 16S and ITS rRNA gene sequencing. The study of the industrial fermentation process of Spanish-style green table olives showed that the final pH values reached at the end of fermentation ranged between 4.3 and 5.0, and the titratable acidity was higher than 0.4% for most samples. Lactic acid and acetic acid were produced in average concentrations of 0.68% and 0.21%, respectively, resulting from the metabolism of lactic acid bacteria and yeasts. However, butyric, isobutyric, and propionic acids were also detected, and their presence is linked to the growth of unwanted spoilage microorganisms responsible for secondary fermentation. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene showed the dominance of lactic acid bacteria species belonging to the genera *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, or *Enterococcus*. Other spoilage bacteria have been identified, such as *Lentilactobacillus Buchneri*, and the genera *Pectinatus* and *Acetobacter*, capable of consuming lactic acid and which play a key role in the onset of spoilage. The study evaluating the survival of pathogenic microorganisms added to the brines of natural olives characterized by pH values of 3.6 to 4.3 and acidity of 0.56 to 0.96% as well as the salt content of 3.3 to 5.5% showed the shortest survival times of these undesirable and pathogenic microorganisms among the other types of preparation (Spanish-style green olives and oxidized black olives), and therefore the most interesting storage conditions. Our study highlights the importance of strict physicochemical and microbiological control of quality and production practices. Compliance with the standards established in international regulations for the processing of table olives and the implementation of effective control measures will ensure improved quality and, consequently, the safety of this fermented food, which is highly prized by consumers.

**Keywords:** Table olives, lactic fermentation, microbiological quality, spoilage, metagenomic analysis

## ملخص

يهدف هذا البحث إلى متابعة تطور عملية تخمير زيتون المائدة من صنف سيجويز (Sig.4). ولتحقي هذه الغاية، تم جمع سبعة عشر عينة من الزيتون من أصناف سيفيانا وفيردال وسيجويز بالإضافة إلى المحاليل الملحية من ثلاثة مصانع تعليب. بالإضافة إلى ذلك، تم جمع ثلاثة عشر عينة من زيتون المائدة المباع بكميات كبيرة في السوق الجزائرية. تم تحليل المعلمات الفيزيائية والكيميائية (الرقم الهيدروجيني، الحموضة، مستويات السكر، الأحماض العضوية، المركبات الفينولية) والميكروبيولوجية (العدد الميكروبيولوجية) عن طريق المعايير، CG-MS، HPLC، طريقة الثقافة الكلاسيكية وتسلسل جينات 16S و ITS rRNA. أظهرت دراسة العملية الصناعية لتخمير الزيتون الأخضر الإسباني أن قيم الرقم الهيدروجيني النهائية التي تم التوصل إليها في نهاية التخمير تتراوح بين 4.3 و 5.0 وكانت الحموضة القابلة للمعايرة أكبر من 0.4% لمعظم العينات. تم إنتاج حمض اللاكتيك وحمض الخليك بتركيزات متوسطة بلغت 0.68% و 0.21% على التوالي، نتيجة لعملية التمثيل الغذائي لبكتيريا حمض اللاكتيك والخميرة. ومع ذلك، تم الكشف أيضًا عن الأحماض الزبدية والإيزوبوتيريك والبروبيونيك، ويرتبط وجودها بنمو الكائنات الحية الدقيقة غير المرغوب فيها المسببة للتلف، المسؤولة عن التخمير الثانوي. أظهر التسلسل عالي الإنتاجية لجين 16S rRNA هيمنة أنواع بكتيريا حمض اللاكتيك التي تنتمي إلى جنس *Lactiplantibacillus*، و *Leuconostoc*، و *Pediococcus*، و *Oenococcus*، أو *Enterococcus*. وقد تم التعرف على أنواع أخرى من البكتيريا المسببة للتلف، مثل *Lentilactobacillus Buchneri*، و *Pectinatus* و *Acetobacter*، وهي قادرة على استهلاك حمض اللاكتيك وتلعب دورًا رئيسيًا في بداية التلف. أظهرت الدراسة التي تقيم بقاء الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض المضافة إلى المحاليل الملحية للزيتون الناضج الطبيعي الذي يتميز بـ pH تتراوح من 3.6 إلى 4.3 وحموضة تتراوح من 0.56 إلى 0.96% وكذلك محتوى الملح من 3.3 إلى 5.5% أقصر فترات بقاء لهذه الكائنات الحية الدقيقة غير المرغوب فيها والمسببة للأمراض بين أنواع التحضير الأخرى (الزيتون الأخضر على الطريقة الإسبانية والزيتون الأسود المؤكسد) وبالتالي ظروف التخزين الأكثر ملاءمة. تسلط دراستنا الضوء على أهمية الرقابة الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية الصارمة على ممارسات الجودة والإنتاج. إن الالتزام بالمعايير المنصوص عليها في اللوائح الدولية لمعالجة زيتون المائدة وتنفيذ تدابير الرقابة الفعالة سيضمن تحسين الجودة وبالتالي السلامة الصحية لهذا الغذاء المخمر الذي يحظى بتقدير كبير من قبل المستهلكين.

الكلمات المفتاحية: زيتون المائدة، التخمير اللبني، الجودة الميكروبيولوجية، التغيير، التحليل

الميتاجينومي

# *Table des matières*

# Table des matières

Liste des abréviations

Liste des Tableaux

Liste des figures

Introduction ..... 1

## 1<sup>ère</sup> Partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Les olives de table

I.1. Historique .....	4
I.2. Définition des olives de table .....	4
I.3. Principales variétés d'olives de table .....	5
I.3.1 A l'échelle mondiale .....	5
I.3.2. En Algérie .....	5
I.4. Importance économique de secteur des olives de table dans le monde et en Algérie .....	8
I.4.1. A l'échelle mondiale .....	8
I.4.1.1. Production mondiale des olives de table.....	8
I.4.1.2. Consommation mondiale des olives de table.....	8
I.4.2. A l'échelle nationale .....	10
I.4.2.1. Production des olives de table .....	10
I.4.2.2. Marché extérieur (importation et exportation).....	11
I.5. Processus d'élaboration des olives de table .....	11
I.5.1. Style Espagnol .....	12
I.5.2. Style grec .....	14
I.5.3. Style californien .....	15
I.5.4. Olives déshydratées.....	16
I.6. Classification des olives de table .....	16
I.7. Composition nutritionnelle et phytochimique des olives de table .....	17
I.7.1. Composition nutritionnelle .....	17
I.7.2. Composition phytochimique .....	18
I.7.2.1. Composés phénoliques.....	18
I.7.2.2. Composés non-phénoliques .....	19

### Chapitre II : La fermentation des olives de table vertes

II.1. Généralités .....	20
II.2. Types de la fermentation .....	20
II.2.1. Fermentation lactique .....	20
II.2.2. Fermentation alcoolique .....	21
II.2.3. Fermentation acétique.....	21
II.2.4. Fermentation alcaline .....	22
II.3. Fermentation des olives de table.....	22
II.3.1. Fermentation des olives de table vertes au style Espagnol.....	22
II.3.1.1. Phases de la fermentation .....	22

II.3.1.2. Diversité bactérienne de la fermentation des olives de table au style Espagnol .....	24
II.4. Altération et détérioration .....	27
II.4.1. Fermentations secondaires.....	27
II.4.1.1. Fermentation butyrique.....	27
II.4.1.2. Fermentation propionique.....	28
II.4.1.3. Zapateria .....	28
II.4.2. Ramollissement.....	28
II.4.3. Fissurage.....	29
II.4.4. Turbidité et brunissement des saumures.....	29
II.5. Avancée technologique dans le processus d'élaboration des olives de table.....	29
II.5.1. Utilisation des ferments .....	29
II.5.1.1. Bactéries lactiques .....	30
II.5.1.2. Levures .....	30
II.5.2. Substitution du NaOH par KOH.....	30
II.5.3. Réduction et remplacement du NaCl.....	31

### **Chapitre III : Qualité et sécurité des olives de table**

III.1. Normes applicables aux olives de table.....	32
III.2. Risques biologiques .....	33
III.2.1. Présence des microorganismes pathogènes .....	33
III.2.2. Mycotoxines .....	33
III.2.3. Formation des amines biogènes .....	33
III.2.4. Dégradation des acides organiques .....	34
III.3. Prévention des risques biologiques .....	34

## **2<sup>ème</sup> partie : Partie expérimentale**

### **I. Matériel et méthodes**

I.1. Échantillonnage .....	35
I.2. Analyse des échantillons .....	38
I.2.1. Analyses physico-chimiques et biochimiques .....	38
I.2.1.1. Dosage de chlorure de sodium NaCl.....	38
I.2.1.2. Détermination du pH et de l'acidité libre .....	38
I.2.1.3. Analyse des sucres dans la saumure et la pulpe d'olives.....	39
I.2.1.4. Analyse des acides organiques et l'éthanol dans la saumure.....	40
I.2.1.5. Analyse des composés phénoliques .....	41
I.2.1.6. Analyse des acides organiques volatils.....	42
I.2.1.7. Analyse de la couleur.....	43
I.2.1.8. Analyse de la texture.....	44
I.2.1.9. Analyse des acides triterpéniques .....	45
I.2.2. Analyses microbiologiques .....	45
I.2.2.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale .....	46
I.2.2.2. Dénombrement des bactéries lactiques .....	46
I.2.2.3. Dénombrement des entérobactéries .....	46
I.2.2.4. Dénombrement des levures et des moisissures .....	47

I.2.2.5. Identification moléculaire des entérobactéries isolées .....	47
I.2.2.5.1. Isolement et purification des colonies.....	47
I.2.2.5.2. Extraction de l'ADN .....	47
I.2.2.5.3. Amplification du gène 16S ARNr par PCR.....	47
I.2.2.5.4. Purification de l'ADN.....	48
I.2.3. Analyse métagénomique .....	49
I.2.3.1. Extraction de l'ADN.....	49
I.2.4. Etude de la survie des bactéries pathogènes dans la saumure des olives de tables commerciales.....	52
I.2.5. Analyses statistiques .....	52

## **II. Résultats et discussion**

II.1. Résultats des analyses physico-chimiques.....	53
II.1.1. Analyse du NaCl.....	53
II.1.2. Analyse du pH et de l'acidité libre .....	56
II.1.3. Analyse des sucres dans la saumure .....	60
II.1.4. Analyse des sucres dans les olives fraîches et les olives fermentées.....	65
II.1.5. Analyse des composés phénoliques dans la saumure .....	65
II.1.6. Analyse des composés phénoliques dans la pulpe d'olives industrielles et commerciales.....	69
II.1.7. Analyse des acides organiques et l'éthanol.....	74
II.1.7.1. Acide lactique .....	744
II.1.7.2. Acide acétique .....	75
II.1.7.3. Ethanol.....	77
II.1.8. Analyse des acides organiques volatils.....	79
II.1.9. Analyse de la texture des olives fermentées .....	82
II.1.10. Analyse de la couleur superficielle des olives fermentées.....	84
II.1.11. Analyse des acides triterpéniques .....	87
II.2. Résultats des analyses microbiologiques .....	90
II.2.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.....	90
II.2.2. Dénombrement des bactéries lactiques.....	91
II.2.3. Dénombrement des entérobactéries .....	93
II.2.4. Dénombrement des levures et moisissures .....	95
II.2.5. Dénombrement de la population microbienne dans les saumures d'olives de table commerciales.....	97
II.2.6. Résultats du test de la survie des bactéries pathogènes dans la saumure des olives de tables commerciales .....	98
II.3. Résultats de l'analyse métagénomique .....	101

**Conclusion générale et perspectives.....** 107

**Références bibliographiques**

**Annexes**

## Liste des abréviations

<b>BL</b>	Bactéries lactiques
<b>CECT</b>	Collection Espagnole de Cultures de Types
<b>CG/DMS</b>	Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de masse sélectif
<b>CIE</b>	Commission Internationale de l'Eclairage
<b>COI</b>	Conseil Oléicole International
<b>dNTPs</b>	Désoxyribonucléosides Triphosphates
<b>EDA</b>	Acide Elénolique Décarboxymethyle
<b>FISABIO</b>	Fondation pour la Promotion de la Santé et de la Recherche Biomédicale
<b>Hy</b>	Hydroxytyrosol
<b>Hy4Glu</b>	Hydroxytyrosol 4-Glucoside
<b>HyEDA</b>	Acide Elénolique Décarboxymethyle lié à l'Hydroxytyrosol
<b>ITAFV</b>	Institut Technique De L'arboriculture Fruitière Et De La Vigne
<b>ITS</b>	Espaceur Interne Transcrit
<b>IUPAC</b>	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
<b>MADR</b>	Ministère de l'agriculture et du développement rurale
<b>MRS</b>	Milieu de Man-Regosa, Sharpe
<b>OTU</b>	Unité Taxonomique Opérationnelle
<b>P/N</b>	Proportion de la chair par rapport au noyau
<b>pb</b>	Paire de Bases
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>PCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne
<b>ppm</b>	Partie par million
<b>SPME</b>	Micro-Extraction en Phase Solide
<b>TBE</b>	Tris, Borate, EDTA.
<b>Tris</b>	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane.
<b>Ty</b>	Tyrosol
<b>UMA</b>	Unité de Masse Atomique
<b>VRBG</b>	Gélose Glucosée Biliée au Cristal Violet et au Rouge Neutre

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I</b>	Principales variétés d'oliviers destinées à la conservation cultivées dans le monde.....	<b>5</b>
<b>Tableau II</b>	Principales variétés locales à double aptitude (huile d'olive et olive de table	<b>6</b>
<b>Tableau III</b>	Composition nutritionnelle des olives de table vertes.....	<b>17</b>
<b>Tableau IV</b>	Composition phénolique de quelques variétés d'olives de table vertes .....	<b>18</b>
<b>Tableau V</b>	Genres et espèces bactériens identifiés au cours de la fermentation des olives de table vertes au style Espagnol par des techniques de la biologie moléculaire .....	<b>26</b>
<b>Tableau VI</b>	Caractéristiques du processus d'élaboration des olives de table vertes style espagnol prélevées dans les fermentateurs industriels.....	<b>37</b>
<b>Tableau VII</b>	Type de préparation, la variété, les producteurs et les ingrédients des échantillons d'olives de table commerciales du marché algérien... ..	<b>38</b>
<b>Tableau VIII</b>	Concentration du NaCl (%) dans les saumures industrielles... ..	<b>54</b>
<b>Tableau IX</b>	Concentration du NaCl (%) dans les saumures d'olives de table commerciales .....	<b>55</b>
<b>Tableau X</b>	Valeurs du pH et de taux d'acidité libre des échantillons des saumures industrielles... ..	<b>57</b>
<b>Tableau XI</b>	Valeurs du pH, taux d'acidité libre, concentrations de l'acide lactique et l'acide acétique dans les saumures d'olive de table commerciales... ..	<b>60</b>
<b>Tableau XII</b>	Concentrations des sucres de saccharose, glucose, fructose et mannitol dans les échantillons des saumures industrielles... ..	<b>64</b>
<b>Tableau XIII</b>	Concentration (ppm) des sucres dans les olives fraîches et les olives fermentées de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4)... ..	<b>65</b>
<b>Tableau XIV</b>	Concentration (ppm) des composés phénoliques dans les saumures industrielles... ..	<b>68</b>
<b>Tableau XV</b>	Concentration (ppm) des composés phénoliques dans les olives fraîches et les olives fermentées de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4)... ..	<b>69</b>
<b>Tableau XVI</b>	Concentration (ppm) des composés phénoliques dans les olives commerciales.....	<b>73</b>
<b>Tableau XVII</b>	Concentration (ppm) de l'acide lactique dans les échantillons des saumures industrielles... ..	<b>75</b>

<b>Tableau XVIII</b>	Concentration (ppm) de l'acide acétique dans les échantillons des saumures industrielles.....	<b>77</b>
<b>Tableau XIX</b>	Concentration (ppm) de l'éthanol dans les échantillons des saumures industrielles... ..	<b>79</b>
<b>Tableau XX</b>	Concentration (ppm) des acides organiques volatils dans les échantillons des saumures industrielles... ..	<b>81</b>
<b>Tableau XXI</b>	Concentration (ppm) des acides organiques volatils dans les échantillons des saumures d'olive de table commerciales... ..	<b>82</b>
<b>Tableau XXII</b>	Valeurs de la texture (N/G) des olives au cours de la fermentation... ..	<b>83</b>
<b>Tableau XXIII</b>	Valeurs de l'humidité et de la texture dans les échantillons d'olives commerciales... ..	<b>84</b>
<b>Tableau XXIV</b>	Valeurs des paramètres CIE des au cours de la fermentation... ..	<b>85</b>
<b>Tableau XXV</b>	Valeurs des paramètres CIE des olives de table commerciales... ..	<b>86</b>
<b>Tableau XXVI</b>	Concentration (ppm) des acides triterpéniques (acides maslinique et oléanolique) en ppm dans les olives commerciales... ..	<b>90</b>
<b>Tableau XXVII</b>	Résultats du dénombrement des bactéries lactiques dans les échantillons des saumures industrielles .....	<b>93</b>
<b>Tableau XXVIII</b>	Résultats du dénombrement des entérobactéries dans les échantillons des saumures industrielles... ..	<b>94</b>
<b>Tableau XXIX</b>	Résultats du dénombrement des levures dans les échantillons des saumures industrielles... ..	<b>96</b>
<b>Tableau XXX</b>	La population microbienne dans la saumure des olives de table commerciales .....	<b>98</b>
<b>Tableau XXXI</b>	La réduction de 4 unités logarithmiques (valeur 4Dr) pour les différents mélanges de souches pathogènes inoculées dans les saumures d'olives de tables commerciales... ..	<b>99</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b>	Principaux pays producteurs d'olives de table avec indication du pourcentage de la production mondiale, campagne 2019/2020.....	<b>8</b>
<b>Figure 2</b>	Consommation en kg d'olives de table par habitant/an en 2019 dans les pays membres du COI.....	<b>9</b>
<b>Figure 3</b>	Distribution de la production nationale des olives de table par wilaya pour la saison 2019/2020 .....	<b>10</b>
<b>Figure 4</b>	Evolution du commerce extérieur des olives de table en Algérie (2016-2020)....	<b>11</b>
<b>Figure 5</b>	Hydrolyse de l'oleuropéine.....	<b>12</b>
<b>Figure 6</b>	Processus d'élaboration des olives vertes au style Espagnol.....	<b>13</b>
<b>Figure 7</b>	Processus d'élaboration des olives noires naturelles au style Grec.....	<b>14</b>
<b>Figure 8</b>	Processus d'élaboration des olives noires oxydées.....	<b>15</b>
<b>Figure 9</b>	Schéma représentatif des types communs de la fermentation, des microorganismes impliqués, et les produits finis.....	<b>21</b>
<b>Figure 10</b>	Image représentative des échantillons de la saumure et des olives étudiés.....	<b>35</b>
<b>Figure 11</b>	Sites d'échantillonnage des olives de table provenant des différentes industries.....	<b>37</b>
<b>Figure 12</b>	Extraction des sucres de la pulpe d'olive.....	<b>40</b>
<b>Figure 13</b>	Spectrophotomètre Color-view TM BYK-Gardner, modèle 9000.....	<b>43</b>
<b>Figure 14</b>	Représentation tridimensionnelle de l'espace de couleur CIE lab.....	<b>44</b>
<b>Figure 15</b>	Cellule Kramer compression-cisaillement couplé à un analyseur de texture TA.TX plus.....	<b>44</b>
<b>Figure 16</b>	A : Encemenceur spiral ; B : Compteur de colonies automatique Scan 500.....	<b>46</b>
<b>Figure 17</b>	Photos des gels montrant les bandes d'ADN du gène 16S ARNr des 4 colonies isolés.....	<b>48</b>
<b>Figure 18</b>	Protocole d'extraction de l'ADN par le kit d'isolement d'ADN microbien PowerFood®.....	<b>51</b>
<b>Figure 19</b>	Evolution de la concentration du NaCl (%) au cours de la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>53</b>

<b>Figure 20</b>	Evolution du pH et de l'acidité libre (%) au cours de la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>56</b>
<b>Figure 21</b>	Evolution du glucose au cours du processus de fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>61</b>
<b>Figure 22</b>	Evolution du fructose au cours du processus de fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>62</b>
<b>Figure 23</b>	Evolution du mannitol au cours du processus de fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>62</b>
<b>Figure 24</b>	Evolution de l'hydroxytyrosol dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>66</b>
<b>Figure 25</b>	Evolution de tyrosol dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>66</b>
<b>Figure 26</b>	Evolution de l'Hy4Glu dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>67</b>
<b>Figure 27</b>	Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fraîches à 280 nm. (1) hydroxytyrosol, (2) Hy-4-Glu, (3) Salidroside, (4) Tyrosol, (5) standard interne, (6) oleuropéine.....	<b>70</b>
<b>Figure 28</b>	Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fermentées à 280 nm. (1) hydroxytyrosol, (4) Tyrosol, (5) standard interne.....	<b>70</b>
<b>Figure 29</b>	Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fraîches à 240 nm. (1) Secoxyloganine ; (2) secologanoside ; (3) standard interne ; (4) Verbascoside.....	<b>71</b>
<b>Figure 30</b>	Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fermentées à 240 nm. (1) EDA ; (2) Secoxyloganine ; (3) Secologanoside ; (4) standard interne ; (5) Verbascoside.....	<b>72</b>
<b>Figure 31</b>	Evolution de l'acide lactique dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>74</b>
<b>Figure 32</b>	Evolution de l'acide acétique dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>76</b>
<b>Figure 33</b>	Evolution de l'éthanol dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4).....	<b>78</b>
<b>Figure 34</b>	Chromatogramme HPLC à 210 nm de l'extrait d'acides triterpéniques des olives fraîches de la variété <i>Sigoise</i> . Pics : (1) acide maslinique ; (2) acide oléanolique.....	<b>88</b>

<b>Figure 35</b>	Concentration des acides triterpéniques (acides maslinique et oléanolique) en ppm dans les olives fraîches et les olives fermentées de la variété <i>Sigoise</i> .....	<b>88</b>
<b>Figure 36</b>	Evolution de la flore mésophile totale dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4)....	<b>91</b>
<b>Figure 37</b>	Evolution des bactéries lactiques dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4)....	<b>92</b>
<b>Figure 38</b>	Evolution des entérobactéries dans la saumure durant la fermentation de la variété <i>Sigoise</i> (Sig.4)....	<b>94</b>
<b>Figure 39</b>	Evolution des levures dans la saumure de l'échantillon Sig.4.....	<b>95</b>
<b>Figure 40</b>	Courbes représentant la survie de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les saumures d'olives vertes de style Espagnol (panneau A), olives naturelles tournante (panneau B) et d'olives noires oxydées (panneau C).....	<b>100</b>
<b>Figure 41</b>	Abondances relatives (%) des genres ou des familles bactériennes obtenues par séquençage des échantillons de saumures sélectionnées après fermentation.....	<b>105</b>
<b>Figure 42</b>	Abondances relatives (%) de la famille bactérienne dans les saumures d'olive de table commerciale.....	<b>105</b>
<b>Figure 43</b>	Abondances relatives (%) des genres fongiques dans les saumures d'olives de table commerciales.....	<b>10</b>

# *Introduction*

Les aliments fermentés c'est l'une des anciennes technologies développées par l'homme, ils peuvent être classés selon les métabolites de la fermentation, tels que l'alcool (bière et vin); les acides organiques, y compris l'acide lactique et l'acide acétique (légumes, produits laitiers); le dioxyde de carbone (pain) et les acides aminés ou peptides (fermentations du poisson) (Breidt *et al.*, 2013a).

Parmi les aliments fermentés, les olives de table qui sont élaborées à partir du fruit de l'olivier (*Olea europaea*) et sont considérées comme le légume fermenté le plus populaire et le plus apprécié des pays méditerranéens, faisant partie de leur alimentation depuis des siècles.

L'Algérie est l'un des principaux pays producteurs d'olives de table avec une augmentation de la production ces dernières années, estimée à 302 000 tonnes par an représentant plus de 10 % de la production mondiale (COI, 2023).

Les olives crues ne sont pas comestibles en raison du goût amer dû au composé phénolique l'oleuropéine. C'est pour cela que l'objectif principal des procédés d'élaboration des olives de table est d'éliminer l'amertume par hydrolyse de l'oleuropéine pour les rendre comestibles (Brenes et De Castro, 1998). Il existe différentes méthodes d'élaboration selon la région, la variété, le stade de maturation des olives, etc. (Alves et Quintas, 2016 ; Grounta et Panagou, 2017).

Parmi les différents types d'olives de table commerciales, les olives vertes au style Espagnol, qui est la préparation la plus populaire, caractérisée par un traitement alcalin initial avec 2 à 3 % d'hydroxyde de sodium (la lessive) pendant plusieurs heures, qui hydrolyse l'oleuropéine en composés non-amers (Brenes et De Castro, 1998). Ensuite, les fruits sont lavés deux fois à l'eau pour éliminer l'excès d'alcali, et enfin, les olives sont recouvertes de saumure (9-10 % w/v) de chlorure de sodium pour subir une fermentation par le microbiote indigène pendant plusieurs mois (Sánchez-Gómez *et al.*, 2006 ; Heperkan, 2013).

Les nouvelles politiques environnementales de plus en plus restrictives et qui sont appliquées dans de nombreux pays ont contraint les producteurs d'olives de table à éliminer le deuxième lavage dans ce type d'élaboration, en le remplaçant avec un seul, bien que plus intense (12-15 heures), pour réduire le volume des eaux usées (Sánchez-Gómez *et al.*, 2006). Cependant, la réglementation algérienne semble être plus souple à cet égard, et les industries continuent d'effectuer deux lavages (Mettouchi *et al.*, 2016). Une autre tendance actuellement mise en œuvre dans de nombreuses industries, c'est d'effectuer une fermentation contrôlée. Traditionnellement, la fermentation est réalisée par des bactéries lactiques autochtones et des

levures, mais l'ajout de ferments lactiques, une pratique croissante employée par les industries, réduit la probabilité de détérioration (Panagou et Tassou, 2006 ; Rejano-Navarro *et al.*, 2010 ; Benítez-Cabello *et al.*, 2019). Aussi, le contrôle exhaustif des paramètres physico-chimiques lors de l'élaboration des olives de table est nécessaire pour une gestion adéquate de la fermentation. Une concentration de chlorure de sodium correcte, des valeurs de pH environ de 4, et une acidité libre supérieure à 0,6 % à la fin du processus permettent de prolonger la durée de conservation, éviter la détérioration et ainsi maintenir un produit sain (Sánchez *et al.*, 2001 ; COI, 2004).

Les olives de table au style Espagnol présentent parfois des problèmes de détérioration microbienne. La croissance incontrôlée de certains microorganismes comme les *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Propionibacterium* (Medina et Arroyo-López, 2015 ; Grounta et Panagou, 2017), *Cardiobacteriaceae*, *Ruminococcus* (De Castro *et al.*, 2018) et des levures oxydatives (Arroyo-López, *et al.*, 2012) peut provoquer des fermentations secondaires au cours des différentes phases de la fermentation et par conséquent l'augmentation du pH dans la saumure. Les micro-organismes d'altération associés aux olives de table, grâce à leur métabolisme, peuvent convertir l'acide lactique produit par les bactéries lactiques pendant la fermentation, en d'autres acides organiques et la formation des odeurs désagréables comme l'odeur de beurre putride ou rance (Montaño *et al.*, 1992 ; De Castro *et al.*, 2018). Par la suite, le pH élevé qui en résulte peut entraîner la prolifération d'autres micro-organismes pathogènes.

Une acidification inappropriée à un pH supérieur à 4,6 permet la croissance du *Clostridium botulinum* sporulé, responsable de la production de la toxine botulique, générant un risque pour la santé des consommateurs (Medina et Arroyo-López, 2015).

Dans ce cadre, nous nous sommes proposés de mener une étude d'une part sur le processus industriel de la fermentation des olives de table vertes style Espagnol des variétés *Sigoise*, *Verdale* et *Sevillana* produites par 4 industries situées dans différentes régions en Algérie, en utilisant une approche physico-chimique, microbiologique et une approche moderne de la biologie moléculaire (la métagénomique). Pour objectifs d'élucider ce processus traditionnel appliqué par nos industries, qui n'a pas fait l'objet d'étude auparavant et ainsi de contrôler la qualité et la sécurité des olives de table en cours de la fermentation.

Et d'une autre part, nous avons mené à une caractérisation physico-chimique et microbiologique des olives de table commerciales algériennes vendues en vrac incluant les différents types de préparation (olives vertes style Espagnol, naturelles et noires oxydées). De

plus, nous avons étudié la survie des bactéries pathogènes dans ces olives, en analysant leur résistance et leur persistance dans le temps. Les résultats obtenus contribueront de manière significative aux connaissances scientifiques et au développement des stratégies efficaces pour assurer la sécurité et la qualité des olives de table produites et commercialisées en Algérie.

La première partie de la thèse rassemble des données bibliographiques, des généralités et données statistiques à l'échelle nationale et mondiale sur les olives de table, et le processus de la fermentation des olives.

La deuxième partie, correspondant à la partie expérimentale, regroupe la description du matériel et des protocoles mis en application dans ce travail. Cette partie s'articule autour de 3 sous-parties :

La 1<sup>ère</sup> sous-partie : Porte sur une analyse physico-chimique de la saumure (pH, taux de sel et acidité) ; analyse de la composition en sucres, en composés phénoliques et en acides triterpéniques ; analyse des acides organiques et les acides organiques volatils ; analyse de la texture et de la couleur des olives.

La 2<sup>ème</sup> sous-partie : Porte sur une analyse microbiologique, qui a pour objectif de rechercher et dénombrer la flore mésophile totale, les bactéries lactiques, les entérobactéries et les levures dans la saumure, et l'étude de la survie des bactéries pathogènes dans la saumure des olives de table commerciales.

La 3<sup>ème</sup> sous-partie : Consiste à l'identification du microbiote dans des saumures sélectionnées par une analyse métagénomique (séquençage à haut débit).

La troisième partie de ce travail consiste en une analyse des résultats obtenus et une discussion qui met en évidence leur signification par rapport aux données de la littérature scientifique.

Et enfin, le présent travail est clôturé par une conclusion générale suivie des perspectives pour des travaux futurs.

# *Synthèse bibliographique*

## **Chapitre I : Les olives de table**

### **I.1. Historique**

La fermentation des olives de table est traditionnellement présente dans les pays méditerranéens depuis des siècles, comme moyen de rendre ces fruits comestibles ainsi que de les conserver pour longtemps (Lucena-Padrós et Ruiz-Barba, 2019). D'après certains auteurs espagnols (Rodríguez-Gómez, 2015 ; Romero-Gil, 2017), il existe des documents qui indiquent que l'élaboration des olives de table existe depuis le 1<sup>er</sup> siècle de notre ère. Selon les mêmes auteurs, Columelle en quarante-deux ans après J.C., dans son ouvrage *De Re Rustica* indique diverses manières de faire mariner les olives, tandis que Plinio el Viejo, en 77<sup>ème</sup> année après J.C. dans son monumental *Naturalis historia*, décrit également en détail l'élaboration et la transformation de différents types d'aliments, parmi eux les olives de table.

D'autres auteurs (Kailis et Harris, 2007) ont supposé que l'élaboration des olives de table est évoluée par essais et par erreur. Selon ces auteurs, le processus de désamérisation est développé par la déshydratation du fruit au soleil ou par immersion dans l'eau de mer, comme la plupart des olives de l'Ancien Monde poussait près de la mer, en particulier de la méditerranée. De plus, d'après ces auteurs, les premières utilisations des cendres du bois alcalin pour désamériser les olives (au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle), ont été les précurseurs des traitements à la lessive utilisée aujourd'hui.

La transformation des olives de table à l'échelle industrielle est apparue pour la première fois en Espagne et précisément à la province de Séville au XIX<sup>ème</sup> siècle (Ramirez-Castro, 2015).

### **I.2. Définition des olives de table**

Les olives de table sont définies selon la norme commerciale applicable aux olives de table établie par le COI en 2004, comme étant le produit préparé à partir des fruits sains de variétés de l'olivier cultivé (*Olea europaea* L.), choisies pour leur production de fruits dont le volume, la forme, la proportion de chair par rapport au noyau, la finesse de la chair, la saveur, la fermeté et la facilité à se séparer du noyau les rendent particulièrement aptes à la confiserie, soumis à des traitements de désamérisation et conservé par fermentation naturelle, ou par traitement thermique, avec ou sans agent de conservation, et conditionné avec ou sans liquide de couverture.

### I.3. Principales variétés d'olives de table

#### I.3.1 A l'échelle mondiale

Le Tableau I indique les variétés d'olivier destinées à la conservation cultivées dans les principaux pays oléicoles.

**Tableau I :** Principales variétés d'olivier destinées à la conservation cultivées dans le monde (Benrachou, 2013)

Pays	Variétés
Argentine	<i>Arauco</i>
Espagne	<i>Hojiblanca, Manzanilla, Cacerena</i>
Etats –Unis	<i>Manzanilla, Mission</i>
France	<i>Picholine, Tanche,</i>
Grèce	<i>Conservolia, Kalamata</i>
Italie	<i>Noccellara, Belice, Itrana, Ascolana tenera</i>
Maroc	<i>Picholine marocaine</i>
Liban	<i>Soury</i>
Portugal	<i>Galega, Carrasquenha, Redondil</i>
Syrie	<i>Al – Doebly</i>
Tunisie	<i>Meski</i>
Turquie	<i>Gemlik, Memecik, Dornat</i>

#### I.3.2. En Algérie

Selon l'institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV), les ressources génétiques de l'olivier en Algérie comptent 174 variétés, dont 36 locales et 138 étrangères. Le choix variétal prend en considération la destination de la production (huile d'olive ou olive de table), et les caractéristiques climatiques de la zone de production (période gélive, vent et répartition de la pluviométrie).

Les principales variétés locales à double aptitude (huile d'olive et olive de table) sont rapportées dans le Tableau II.

**Tableau II :** Principales variétés locales à double aptitude (huile d'olive et olive de table) (ITAFV, 2006)

Variété	Origine	Forme du fruit	Rapport P/N (%)	Caractéristiques
<i>Aberkane</i>	Akbou (Béjaia)	Allongée	7,09	Variété rustique et de saison, la floraison précoce avec une faible intensité, la productivité faible et alternante.
<i>Aghchren d'El Ousseur</i>	Bougaa (Sétif)	Allongée	4	Variété de saison, résistante au froid et à la sécheresse, la floraison précoce avec une intensité moyenne, la productivité moyenne et alternante.
<i>Aghchren de Titest</i>	Hamam Guergour (Sétif)	Sphérique	9 à 10	Variété de saison résistante au froid, la floraison précoce d'une faible intensité, la pulpe se sépare difficilement du noyau, la productivité élevée et alternante.
<i>Aghenfas</i>	Bougaa (Sétif)	Allongée	7	Variété de saison résistante au froid et la sécheresse, la floraison précoce d'une intensité faible, la pulpe se détache facilement du noyau, la productivité est moyenne et alternante
<i>Agrarez</i>	Tazmalt (Béjaia)	Sphérique	6,50	Variété de saison, la floraison précoce d'une intensité réduite, la pulpe se sépare facilement du noyau, la productivité est faible et alternante.
<i>Aharoun</i>	Haute vallée Soummam (Béjaia)	Allongée	6	Variété de saison, rustique et auto fertile, la pulpe se sépare difficilement du noyau, la productivité élevée et peu alternante.
<i>Akerma</i>	Hamam Guergour (Sétif)	Allongée	5,5	Variété rustique et de saison, la floraison précoce d'une forte intensité, la pulpe se sépare facilement du noyau, la productivité faible et alternante.
<i>Azeradj</i>	Sedouk (Béjaia)	Allongée	8,7	Occupe 10 % de la superficie oléicole nationale, variété de saison résistante à la sécheresse, la floraison précoce avec une intensité faible, la pulpe se sépare difficilement du noyau, la productivité moyenne et alternante.

<i>Bouchouk Guergour</i>	Guergour (Sétif)	Allongée	6	Variété de saison résistante au froid et à la sécheresse, la floraison précoce d'une intensité moyenne, la pulpe se sépare difficilement du noyau, la productivité faible et alternante.
<i>Bouchouk lafayette</i>	Bougaa (Sétif)	Allongée	6	Variété de saison résistante au froid et à la sécheresse, la floraison précoce d'une intensité moyenne, la pulpe se détache difficilement du noyau, la productivité faible et alternante.
<i>Bouchouk Sommam</i>	Sidi-Aich (Béjaia)	Ovoïde	7,5	Variété de saison rustique, la floraison précoce d'une intensité faible, la pulpe se détache difficilement du noyau, la productivité est moyenne et alternante.
<i>Grosse de Hamma</i>	Hamma Constantine	Allongé	7,09	Variété précoce, rustique, résistante au froid et à la sécheresse, la floraison précoce d'une intensité élevée, la pulpe se sépare facilement du noyau, la productivité moyenne et alternante
<i>Longue de Miliana</i>	Miliana (Ain Defla)	Sphérique	7,69	Variété tardive sensible au froid et à la sécheresse, la floraison précoce d'une intensité moyenne, la pulpe se sépare difficilement du noyau, la productivité moyenne et alternante.
<i>Ronde de miliana</i>	Valée de Miliana (Ain Defla)	Allongée	3,42	Variété tardive sensible au froid et à la sécheresse, la floraison précoce d'une intensité moyenne, la pulpe se sépare difficilement du noyau, la productivité moyenne et alternante.
<i>Sigoise</i>	Plane de Sig (Mascara)	Ovoïde	6,44	Occupe 25 % du verger oléicole algérien, variété de saison tolérante aux eaux salées, moyennement résistante au froid et à la sécheresse, la floraison précoce d'une intensité moyenne, la productivité est moyenne et alternante.
<i>Tefah</i>	Sedouk (Béjaia)	Ovoïde	7	Variété rustique de saison, la floraison tardive d'une intensité faible, la pulpe se sépare difficilement du noyau, la productivité moyenne et alternante.

Des variétés sont importées à partir d'autres pays et elles sont cultivées en Algérie, comme la variété *Sevillana*, qui est importée de l'Espagne et précisément de la région de Séville. Elle est cultivée principalement à l'ouest de l'Algérie, c'est une variété à maturation

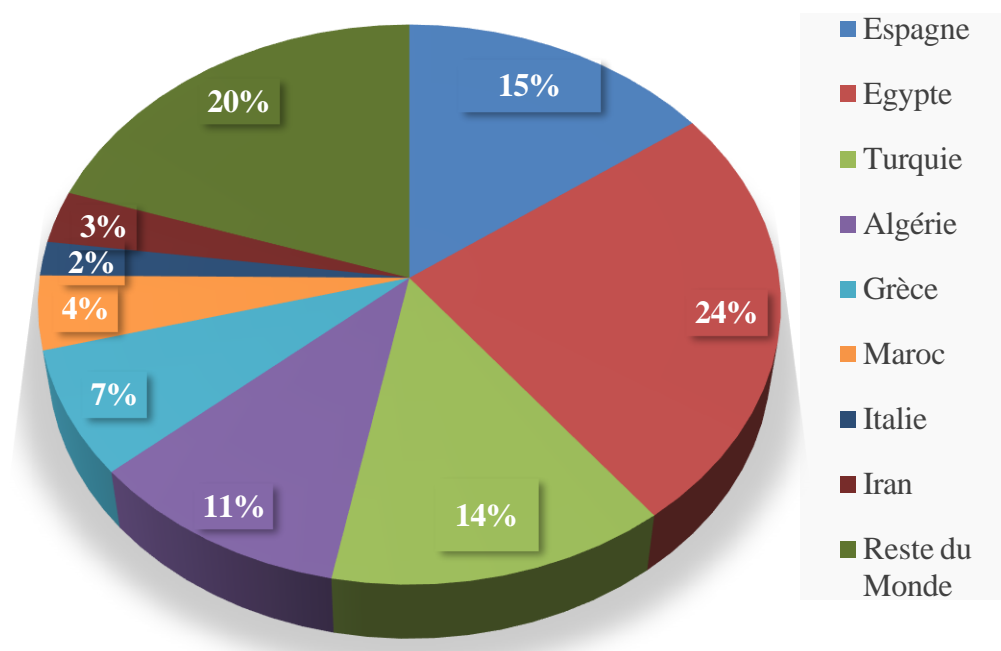
précoce, son fruit est de poids élevé (70/160 fruits/kg), la pulpe est consistante, peu dure et légèrement granulée, et elle adhère fortement au noyau. D'autres variétés sont importées de France et de l'Italie ; comme *Picholine*, *Lucques* et *Cornicabara* (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997).

#### I.4. Importance économique de secteur des olives de table dans le monde et en Algérie

##### I.4.1. A l'échelle mondiale

##### I.4.1.1. Production mondiale des olives de table

L'olivier mondial est constitué de 850 millions d'arbres qui occupent une superficie de 10 millions ha. De cela, plus de 1 million ha est dédié à la production des olives de table (Asesma, 2021).



**Figure 1 :** Principaux pays producteurs d'olives de table avec indication du pourcentage de la production mondiale, campagne 2019/2020 (COI, 2021)

La Figure 1 montre les principaux pays producteurs d'olives de table avec indication du pourcentage de la production mondiale durant la campagne 2019/2020.

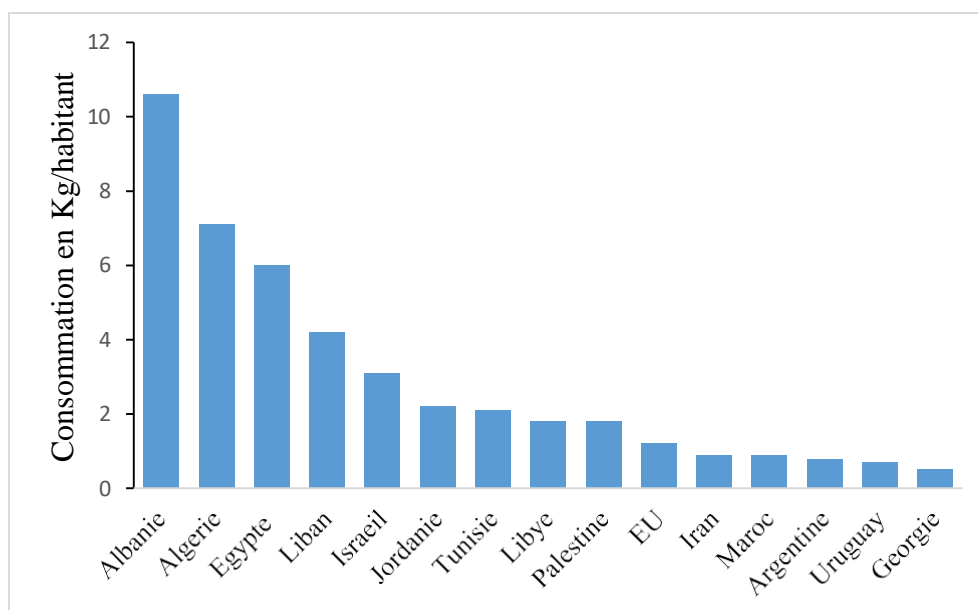
Selon les derniers chiffres communiqués par le COI en 2021, la production d'olives de table dans le monde est passée d'une production de 2 576 000 t en 2015/2016 à 3 057 000 t en 2019/2020, dont 2 755 000 t sont produites par les pays membres du COI. La production européenne a atteint 768 000 t soit 25 % de la production mondiale. L'Espagne est le leader européen de la production des olives de table avec un chiffre de 458 000 t produites en 2019/2020, suivie de la Grèce (222 000 t), de l'Italie (60 000 t) et du Portugal (22 000 t). Pour

les autres pays non-européens membres du COI, l'Égypte est en tête avec une production de 750 000 t, suivie de la Turquie (414 000 t), l'Algérie (323 000 t), et du Maroc (130 000 t). Les autres pays ont enregistré des valeurs inférieures à 100 000 t. La production dans l'ensemble des autres pays non-membres du COI est de 302 000 t en 2019/2020, elle représente 10 % de la production mondiale.

#### I.4.1.2. Consommation mondiale des olives de table

Selon les dernières données statistiques communiquées par le COI (2021), la consommation mondiale des olives de table de ces cinq dernières années a augmenté de 18 % en 2019/2020 avec 3 049 000 t par rapport à la campagne 2015/2016 (2 500 000 t). La plus forte augmentation de la consommation est enregistrée dans les pays producteurs membres du COI avec une augmentation de 29 %. Parmi ces pays, l'Égypte qui est passée d'une consommation de 319 000 t en 2015/2016 à une consommation de 650 000 t en 2019/2020, et l'Algérie qui a également vu sa consommation augmenter au cours de cette période de 234 000 t en 2015/2016 à 325 000 t en 2019/2020.

Cependant, une diminution de la consommation de 2 % est enregistrée pour les pays de l'Union Européenne durant ces 5 dernières campagnes. En ce qui concerne le groupe des pays non-membres du COI, et les pays non-producteurs, leur consommation a augmenté de 5 et 17 %, respectivement durant la même période.



**Figure 2 :** Consommation en kg d'olives de table par habitant/an en 2019 dans les pays membres du COI (COI, 2021)

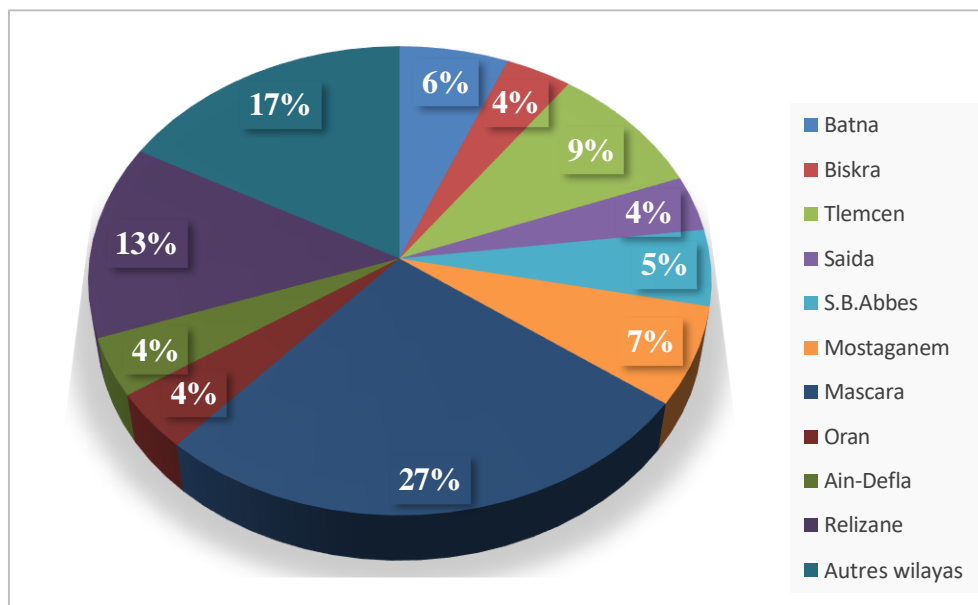
Les données de la consommation annuelle par habitant (Figure 2), ont montré que parmi les pays membres du COI en 2019, l'Albanie apparaît comme leader avec 10,6 kg par habitant et par an, suivi de l'Algérie avec 7,1 kg, l'Égypte avec 6 kg et de la Turquie avec 4,2 kg. Les habitants des autres pays consomment moins de 4 kg par an.

#### I.4.2. A l'échelle nationale

##### I.4.2.1. Production des olives de table

En Algérie, la superficie totale cultivée d'oliviers est de 438 827 ha (MADR, 2021), avec plus de 63 millions d'arbres. Cette superficie est localisée majoritairement dans les wilayas de Béjaïa, Bouira, Tlemcen, Tizi-Ouzou, Jijel, Sétif, Mascara, et Bordj-Bou-Argeridj.

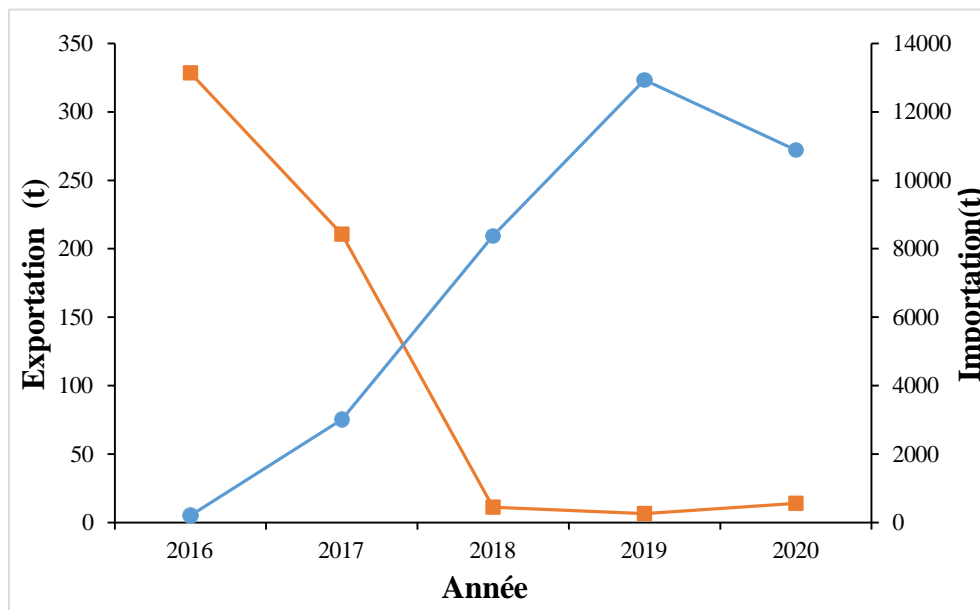
La production nationale moyenne d'olives des cinq dernières saisons (2016-2020) a été de 837 987 t dont près de 300 000 t sont destinées à la production des olives de table, 27 % de cette production est localisée à la wilaya de Mascara, suivie de la wilaya de Relizane (13%), Tlemcen (9 %), Mostaganem (7 %), Batna (6 %), Sidi-Bel-Abbès (5 %), Oran ; Ain Defla ; Saida ; et Biskra (4 %). La Figure 3 montre la distribution de la production d'olives destinée à la conservation par wilaya.



**Figure 3 :** Distribution de la production nationale des olives de table par wilaya pour la saison 2019/2020 (MADR, 2021).

### I.4.2.2. Marché extérieur (importation et exportation)

L'évolution du commerce des olives de table en Algérie durant les dernières cinq années indiquées dans le graphe (Figure 4) a montré une diminution des importations de 95 % en 2020 par rapport à l'année 2016. En revanche, les exportations ont augmenté de 98 % en 2019 par rapport à l'année 2016, bien qu'en 2020, l'exportation a marqué une baisse de 15 % par rapport à l'année précédente.

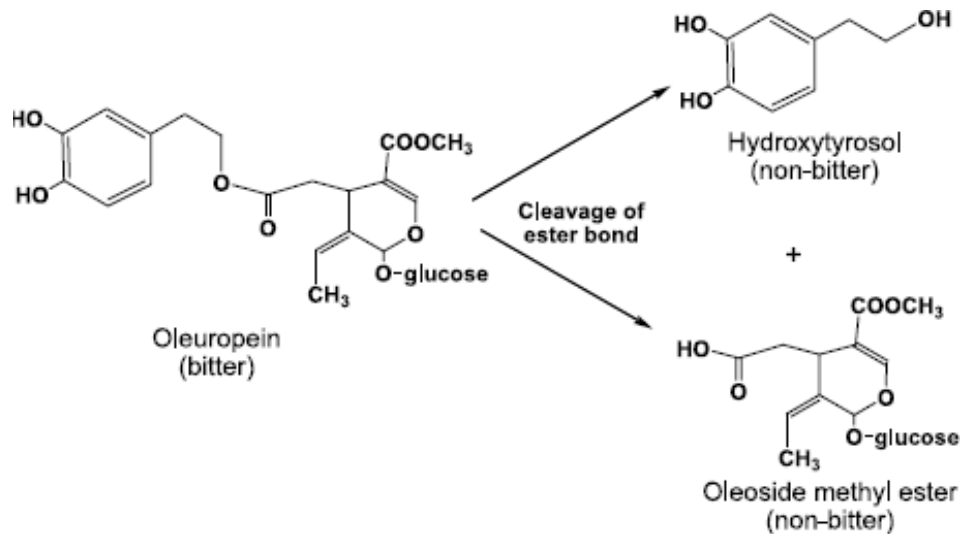


**Figure 4 :** Evolution du commerce extérieur des olives de table en Algérie (2016-2020) (MADR, 2021).

### I.5. Processus d'élaboration des olives de table

Les olives de table sont élaborées selon des différentes méthodes pour créer des types variables d'olives comestibles, ces méthodes ont pour objectif la désamérisation par hydrolyse de composé amer l'oleuropéine en composé non-amer (Figure 5). Cette réaction peut être chimique ou enzymatique. Les méthodes d'élaboration varient selon la variété, la maturité et les habitudes de consommation.

Les préparations industrielles les plus importantes sont : (1) Style Espagnol (olives vertes traitées) ; (2) Style californien (olives noircies par oxydation) ; (3) Style grec (olives noires naturelles) et (4) Olives déshydratées (Panagou *et al.*, 2008).



**Figure 5** : Hydrolyse de l'oleuropéine (Frankel, 2011)

### I.5.1. Style Espagnol

Les olives de table vertes au style Espagnol sont les plus populaires parmi les autres types commerciaux. Le processus d'élaboration de ce type de préparation est représenté en Figure 6. Les principales étapes de la préparation sont décrites comme suit :

#### a) Récolte

Les olives sont recueillies lorsqu'elles prennent la couleur verte à verte jaunâtre, récoltées manuellement ou en utilisant des techniques mécaniques. La récolte se fait durant le mois de septembre et le mois de novembre de chaque campagne en fonction de la région, de la variété, et des conditions climatologiques (Lucena-Padros, 2016). Après la récolte, les olives sont transportées vers l'industrie d'élaboration, et elles sont triées pour éliminer les olives endommagées et classées par taille (Sánchez-Gómez, 2006).

#### b) Traitement alcalin, lavage et saumurage

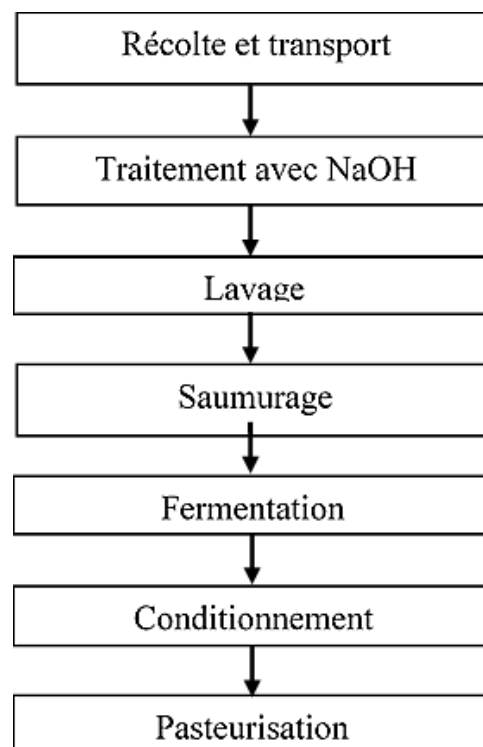
L'étape cruciale dans ce type d'élaboration est le traitement alcalin, durant cette phase, les olives sont immergées dans une solution d'hydroxyde de sodium (la lessive) qui exerce l'effet d'hydrolyse du glucoside amer l'oleuropéine qui confère l'amertume aux olives, de plus ce traitement perméabilise la pulpe des olives, ce qui induit par la suite la diffusion des substances nécessaires au cours de la fermentation (Bautista-Gallego, 2012).

La concentration de la lessive et la durée du traitement alcalin dépend de la température ambiante, de la variété et de la taille des olives, ainsi que du degré de maturation. Généralement, une concentration de (1,3 - 2,6 % w/v) de NaOH, pour une durée variable entre 4 et 15 h sont

appliqués (Evangelou *et al.*, 2018). Ce traitement se termine quand la lessive pénètre 2/3 de la pulpe (Bautista-Gallego, 2012).

L'étape finale du traitement alcalin est le lavage, dont l'objectif principal est d'éliminer au maximum la lessive qui a pénétré dans la pulpe. Cependant, le lavage ne doit pas être excessif pour éviter la perte des composés hydrosolubles nécessaires à la fermentation. Un seul lavage d'environ 5 - 6 h est recommandé (Rodríguez-Gómez, 2015).

Après l'élimination des eaux de lavage, les olives sont immergées dans une saumure de 10 à 12 % du NaCl, dans laquelle va se dérouler la fermentation spontanée (Lucena-Padrós, 2016).



**Figure 6 :** Processus d'élaboration des olives vertes au style Espagnol (Medina, 2008)

### c) Fermentation

Le processus de la fermentation des olives de table vertes se déroule en différentes phases successives selon le type des microorganismes présents et les caractéristiques physico-chimiques de la saumure.

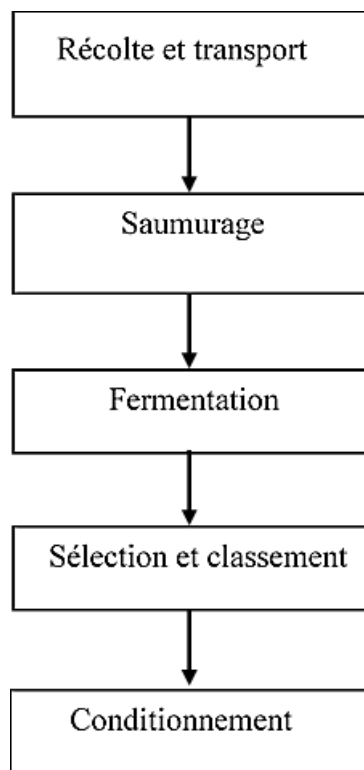
La première phase est caractérisée par la croissance des bactéries Gram négatif qui appartiennent principalement à la famille des entérobactéries, et lorsque le pH diminue au environ de 7, le développement exponentiel des bactéries lactiques et des levures commence,

et leur croissance est maintenu jusqu'à la fin de la fermentation. Une fois la fermentation terminée, les olives sont conditionnées entières, dénoyautées, farcies, etc., et elles sont habituellement pasteurisées (Medina, 2008).

### I.5.2. Style grec

Pour ce type de préparation, les olives sont récoltées lorsqu'elles sont complètement mûres, avec une couleur noire. Après la récolte, les olives sont lavées et directement immergées dans une saumure de 8 - 10 % de NaCl, (voir Figure 7) (Rocha *et al.*, 2020).

Une fermentation naturelle et spontanée commence, et elle est effectuée principalement par les levures et les bactéries lactiques à travers les estérases et  $\beta$ -glucosidase (Evangelou *et al.*, 2018). Pour ce type de processus, la fermentation est lente, elle prend plusieurs mois (8-12 mois), à cause de la diffusion lente des composés fermentescibles du fruit vers la saumure. Elle peut se faire en aérobie ou en anaérobie.



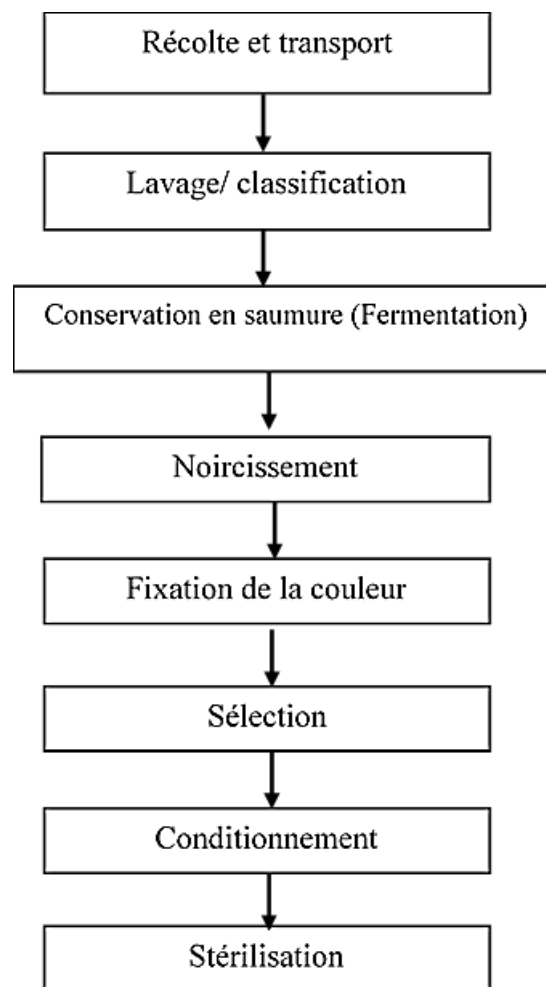
**Figure 7 :** Processus d'élaboration des olives noires naturelles au style grec (Medina, 2008)

Lors de la fermentation dans des conditions d'anaérobie, la quantité du CO<sub>2</sub> produite par les microorganismes augmente dans la saumure, ce qui induit la détérioration des olives par la formation de poches de gaz, donc pour cette raison, il est important de placer des colonnes d'air

dans les fermenteurs pour obtenir un bullage d'air et ainsi de se débarrasser du CO<sub>2</sub> dans la saumure. Après la fermentation, les olives sont conditionnées dans une saumure d'un pH environ 4,0 - 4,2 et d'une concentration de sel entre 6 - 8 % (Sánchez-Gómez, *et al.*, 2006).

### I.5.3. Style californien

Ce style d'olives de table est d'origine californienne mais la méthode s'est répandue dans divers pays du monde. Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation alcaline des olives mûres qui sont récoltées en stade de maturité précoce (couleur tournante).



**Figure 8 :** Processus d'élaboration des olives noires oxydées (Ramirez-Castro, 2015)

Les olives sont d'abord préservées dans une saumure de 5 à 10 % NaCl, où une légère fermentation est effectuée par des levures, permettant la diffusion des nutriments dans la saumure. L'ajout des acides est crucial dans cette phase pour atteindre un pH de 4, afin de prévenir les microorganismes pathogènes. Les olives sont ensuite immergées dans une solution de NaOH (1 – 2 %) pour une durée de 2 à 24 h pendant 3 à 7 jours, jusqu'à la pénétration totale de lessive dans la pulpe. Durant le traitement à lessive, des intervalles de lavage à l'eau et un

pompage d'air sont appliqués pour induire l'oxydation des composés phénoliques et la formation de la couleur noire. Cette dernière est fixée par l'utilisation de gluconates ferriques. A la fin, les olives sont conditionnées et stérilisées (Frankel, 2011 ; Evangelou *et al.*, 2018) (voir Figure 8).

#### **I.5.4. Olives déshydratées**

Bien que tous les types d'olives puissent être déshydratées, les plus courantes sont les olives noires, typiquement d'origine grecque, additionnées de sel sec. Ils peuvent être soumis ou non à un traitement alcalin doux ; dans les deux cas, ils sont bien lavés et placés dans des paniers avec des couches alternées de sel sec jusqu'à une concentration finale d'environ 15 %. La déshydratation peut être accélérée par l'application de la chaleur (Portilha-Cunha *et al.*, 2020).

#### **I.6. Classification des olives de table**

Comme nous l'avons mentionné dans la section précédente, la désamérisation des olives peut se faire par traitement alcalin, par immersion dans un liquide pour la dilution du composé amer, ou par des procédés biologiques. Le produit obtenu peut être conservé en saumure selon ses propres caractéristiques, au sel sec, en atmosphère modifiée, par traitement thermique, au moyen d'agents conservateurs ou d'agents acidifiants. Le COI en 2004 a établi la classification des préparations d'olives de table comme suit :

##### **a) Olives confites**

Olives vertes ou tournantes ou noires ayant subi un traitement alcalin, conditionnées en saumure dans laquelle elles subissent une fermentation totale ou partielle, conservées par adjonction d'agents acidifiants ou non. Selon leur couleur, on distingue : Olives vertes confites en saumure, olives tournantes confites en saumure et olives noires confites.

##### **b) Olives naturelles**

Olives vertes ou tournantes ou noires traitées directement à la saumure dans laquelle elles subissent une fermentation totale ou partielle et conservées par adjonction d'agents acidifiants ou non. Selon leur couleur, on distingue : olives vertes naturelles, olives tournantes naturelles et olives noires naturelles.

**c) Olives déshydratées et/ou ridées**

Olives vertes, tournantes ou noires ayant subi ou non un léger traitement alcalin, conservées en saumure ou partiellement déshydratées au sel sec et/ou par chauffage ou tout autre procédé technologique. Ce type inclus : olives vertes déshydratées et/ou ridées, olives tournantes déshydratées et/ou ridées et olives noires déshydratées et/ou ridées.

**d) Olives noircies par oxydation**

Olives vertes ou tournantes conservées en saumure, fermentées ou non, noircies par oxydation en milieu alcalin et conservées dans des récipients hermétiques par stérilisation thermique. Leur coloration est noire uniforme. Leur appellation est : olives noires.

**I.7. Composition nutritionnelle et phytochimique des olives de table****I.7.1. Composition nutritionnelle**

La composition chimique des olives fermentées dépend de la variété et du style d'élaboration, la composition nutritionnelle approximative de la pulpe d'olives de table vertes est montrée dans le Tableau III. Outre l'eau (60 - 81 %), les lipides sont les constituants majeurs de la pulpe avec un taux qui varie de 6 à 30 %. Le taux de protéines est faible, et selon Rocha *et al.* (2020), cela ne varie pas beaucoup avec le style d'élaboration. Ces protéines sont de haute qualité, car elles contiennent des acides aminés essentiels comme l'acide aspartique et l'acide glutamique. Les glucides sont pratiquement absents dû à leur transformation au cours de la fermentation.

**Tableau III** : Composition nutritionnelle des olives de table vertes (Rocha *et al.*, 2020)

<b>Composant</b>	<b>Taux (%)</b>
Humidité	60 - 81
Lipides	6 - 30
Protéines	1,0 – 2,2
Sucres	Absent
Fibres	1,5 - 3
Minéraux	2 – 6,9

Les olives de table sont une source précieuse de fibres alimentaires, en particulier de pectine, d'hémicellulose, de cellulose et de lignine. La concentration totale en fibres est variable de 1,5 à 3 %. En plus, les olives fermentées contiennent aussi des minéraux avec une teneur de l'ordre de 2,0 à 6,9 %. Les autres composés sont présents en faible quantité (Rocha *et al.*, 2020).

## I.7.2. Composition phytochimique

En plus des nutriments, les olives de table sont de riches sources de composés phytochimiques qui sont dérivés aux composés phénoliques et composés non phénoliques.

### I.7.2.1. Composés phénoliques

La composition qualitative et quantitative des olives de table en composés phénoliques est différente de celle des olives non traitées, puisque ces olives ont subi une désamérisation qui a causé la diffusion ou la décomposition de ces substances. La composition dépend de la variété, du stade de maturation et du processus d'élaboration.

Les composés majeurs les plus communs identifiés dans les olives de table vertes appartiennent à 5 classes et sont : les alcools phénoliques (hydroxytyrosol et tyrosol), flavones (lutéoline, lutéoline-7-O-glucoside, apigénine et apigénine-7-O-glucoside), anthocyanes (cyanidine-3-O-glucoside), acides phénoliques (acide caféique) et un dérivé de l'acide hydroxycinnamique (verbascoside) (Uylaser et Yildiz, 2014 ; Boskou *et al.*, 2015 ; Boskou, 2017).

**Tableau IV** : Composition phénolique de quelques variétés d'olives de table vertes (Rocha *et al* 2020)

Composés phénoliques	<i>Tsakistes</i> (mg/100g de pulpe)	<i>Azeiteira, Carrasquenha, Redondil et Conserva</i> (mg/100g du poids sec)	<i>Chalkidiki</i> (mg/100g de pulpe)	<i>Conservolea</i> (mg/100g de pulpe)	<i>Tonda di Cagliari</i> (mg/100g de pulpe)
Hydroxytyrosol	114	287,4	42,4	14,8	41
Tyrosol	21	18	7,6	2,8	0,4
Lutéoline	-	25	0,6	0,5	10,6
Lutéoline-7-O-glucoside	-	2,6	-	-	2,8
Apigénine	-	-	-	-	2,3
Verbascoside	-	-	-	-	4,8

La composition moyenne des composés phénoliques pour certaines variétés d'olives de table vertes est indiquée dans le Tableau IV. D'après ce tableau, l'hydroxytyrosol est le composé phénolique présent avec la plus grande quantité, sa valeur varie de 14,8 à 144 mg/100g de la pulpe. Le tyrosol est présent en plus faible quantité comparativement à l'hydroxytyrosol, les valeurs décrites se situaient entre 0,4 et 21 mg/100g de la pulpe. Les autres composés sont présents en faible quantité.

#### **I.7.2.2. Composés non phénoliques**

En ce qui concerne les composés non-phénoliques et précisément les acides triterpéniques, les olives de table retiennent une forte quantité de ces composés malgré leur diffusion au cours de l'élaboration. Romero *et al.* (2010) ont rapporté des concentrations élevées d'acides triterpéniques (acide maslinique et l'acide oléanolique) allant de 460 à 2000 mg/kg dans la pulpe, dans de nombreux échantillons d'olives de table noires et vertes de différentes variétés.

## Chapitre II : La fermentation des olives de table vertes

### II.1. Généralités

Selon Bourdichon *et al.* (2012), l'utilisation de la fermentation pour la conservation des matières premières périssables, existe depuis la période néolithique (environ 10 000 ans avant J.C.). Cependant, ce n'est qu'au milieu du XIXe siècle que les agents de fermentation ont été découverts comme étant des micro-organismes (Terefe, 2016). L'évolution historique de la fermentation est bien discutée par Barnett (2003).

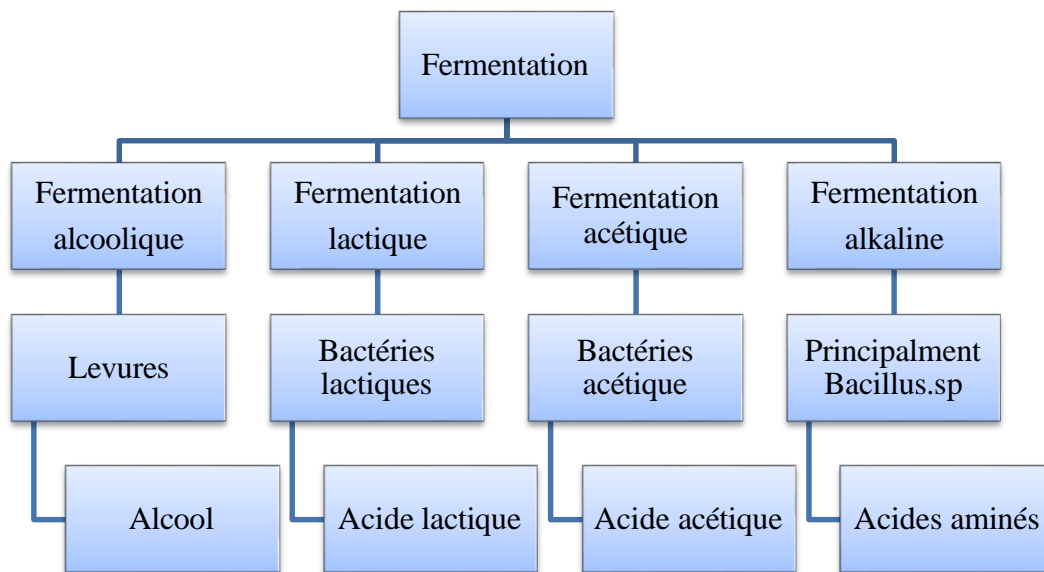
La fermentation est définie comme étant le métabolisme anaérobique des glucides par des microorganismes (Malo et Urquhart, 2016). Le catabolisme des glucides crée un flux de protons et d'électrons, en absence d'oxygène le récepteur final est le pyruvate ou l'acetyl CoA. L'oxydation progressive des sucres induit le transfert des ions d'hydrogène des produits intermédiaires de la voie vers le récepteur final. La voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) est utilisée dans la plupart des cas pour décomposer le glucose en pyruvate par les souches homofermentaires. La voie Entner-Doudoroff décompose le lactose, tandis que les souches hétérofermentaires décomposent les pentoses et d'autres sucres à travers la voie de la phosphoacétylase. Les produits finis dépendent du substrat ainsi que de l'espèce du micro-organisme (Voidarou *et al.*, 2021).

### II.2. Types de fermentation

Il existe 4 types de processus de fermentation, à savoir la fermentation lactique, alcoolique, acétique et alcaline, comme montré dans la Figure 9 ci-dessous.

#### II.2.1. Fermentation lactique

La fermentation lactique est l'une des méthodes de préservation les plus courantes, utilisée pour la préservation des produits laitiers (Rakhmanova *et al.*, 2018), des végétaux (Breidt *et al.*, 2013a) et des viandes (Erkmen et Bozoglu, 2016). Elle est effectuée principalement par les bactéries lactiques comme *Lactobacillus* spp., *Lactococci*, *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostocs* qui sont capables de convertir les sucres en acide lactique qui inhibe la croissance des bactéries indésirable (Malo et Urquhart, 2016). Il existe deux types de fermentation lactique (homofermentation et hétérofermentation) :



**Figure 9 :** Schéma représentatif des types communs de la fermentation, des micro-organismes impliqués et les produits finis (Anal, 2019)

La fermentation homolactique est effectuée par les bactéries appartenant aux genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, et *Pediococcus*, et par quelques espèces du genre *Lactobacillus*. Toutes ces bactéries transforment le sucre principalement en acide lactique par glycolyse. Tandis que la fermentation hétérolactique est effectuée par les bactéries du genre *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et les *lactobacillus* hétérofermentaires. Les produits finis de cette fermentation sont l'acide lactique, l'éthanol et le CO<sub>2</sub> (Ciani *et al.*, 2013).

### II.2.2. Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est impliquée dans de nombreux processus de transformation, de stabilisation, et de préservation des substrats riches en sucre comme les grains de céréales, les fruits et les jus de fruits et légumes, utilisée pour la production des vins et du pain. C'est un processus durant lequel des espèces fongiques (*Amylomyces rouxii*, et *Endomycopsis*) et bactériens (*Zymomonas mobilis*) convertissent les sucres (glucose, fructose, et saccharose) et produisent de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> (Ciani *et al.*, 2013 ; Malo et Urquhart, 2016 ; Anal, 2019).

### II.2.3. Fermentation acétique

La fermentation acétique est produite par les bactéries acétiques appartenant à la famille des *Acetobacteriaceae*. Ce processus est utilisé pour la production du vinaigre à partir de divers

substrats comme les fruits, les grains, le malt, etc., grâce à la production de l'acide acétique par certaines espèces de cette famille, par oxydation de l'éthanol (Xu *et al.*, 2011 ; Gomes *et al.*, 2018).

#### **II.2.4. Fermentation alcaline**

La fermentation alcaline se produit dans les aliments riches en protéines. Le genre *Bacillus*, et d'autres groupes comme les bactéries lactiques, les *staphylococcus*, et les *micrococcus* impliquent une protéolyse qui libère des peptides et des acides aminés essentiels. Ensuite, ces acides aminés sont dégradés en composés alcalins comme l'ammoniac, qui provoquent une augmentation du pH (8–10) (Wang et Fung, 1996 ; Anal, 2019). Ce type de fermentation est très répandu en Asie et en Afrique (Parkouda *et al.*, 2009).

### **II.3. Fermentation des olives de table**

La fermentation des olives de table est une méthode traditionnelle qui a été modifiée et appliquée actuellement à l'échelle industrielle. C'est un processus qui se fait spontanément par le microbiote de l'olive, sans ajout de levain. Il est effectué principalement par les bactéries lactiques qui permettent l'acidification de la saumure par la production de l'acide lactique à partir des sucres diffusés de l'olive, résultant la diminution du pH, assurant la stabilité microbiologique du produit final ainsi qu'une durée de conservation prolongée. Les levures aussi jouent un rôle important dans ce processus, elles contribuent à la détermination de l'arôme et du goût, en produisant des métabolites volatiles, de plus elles améliorent la croissance des bactéries lactiques par la dégradation des composés phénoliques qui inhibe ces bactéries lactiques (Bonatsou *et al.*, 2017).

#### **II.3.1. Fermentation des olives de table vertes au style Espagnol**

La fermentation des olives de table vertes élaborées au style Espagnol est un processus complexe qui se déroule en différentes phases, durant chaque phase, interviennent de nombreux paramètres physico-chimiques et microbiologiques.

##### **II.3.1.1. Phases de la fermentation**

Durant les premiers jours, juste après la mise des olives en saumure, la valeur du pH de la saumure est basique (8 - 10 unités), en raison de la concentration du NaOH résiduelle qui diffuse de la pulpe. La concentration initiale en sel est généralement de 10 %.

Tout au long des différentes étapes de la fermentation, la succession des divers microorganismes, fait chuter le pH à des valeurs de 4 unités, voire moins, ce qui facilite une conservation adéquate à long terme. Le processus de la fermentation spontanée des olives de table élaborées au style Espagnol se divise en 4 phases en fonction des populations microbiennes prédominantes et les caractéristiques physico-chimiques de la saumure.

La première phase commence dès la mise des olives traitées en saumure, jusqu'aux 5 - 7 jours. Durant cette phase, le pH est environ de 6 et la concentration en sel atteint l'équilibre (5 - 7 %). Sur le plan microbiologique, cette phase est caractérisée par la présence de divers groupes de microorganismes, parmi eux se distingue les plus fréquents, qui sont les microorganismes alkali-tolérants, les bacilles Gram négatif (*Enterobacter* et autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*), les bactéries Gram positif sporulées, les coques lactiques (principalement *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*), les levures et les moisissures. Les bacilles à Gram négatif contribuent à la première baisse du pH, favorisant le développement ultérieur des bactéries lactiques. Cependant, ils peuvent provoquer des altérations, pour cela l'ajout des acides organiques comme l'acide lactique ou l'acide acétique est recommandé (Benítez-Cabello, 2019).

A la fin de cette phase, la concentration des bactéries à Gram négatif décline pour pratiquement disparaître, tandis que les espèces du genre *Lactobacillus* commencent déjà à apparaître. Cette phase a généralement une durée comprise entre 5 et 15 jours environ, en fonction de plusieurs facteurs tels que la température, l'inoculum microbien initial (spontané ou non), le nombre et l'intensité du lavage après traitement alcalin (Lucena-Padrós, 2016).

Actuellement, cette phase est raccourcie en acidifiant initialement la saumure avec du HCl ce qui permet la neutralisation du NaOH résiduelle et ainsi l'abaissement rapide du pH (Rodríguez-Gómez, 2015).

La seconde phase commence à la croissance des espèces appartenant au genre *Lactobacillus*, et d'autres espèces des genres *Leuconostoc* et *Pediococcus*. Cette phase se caractérise aussi par la présence des espèces de levures. La croissance exponentielle des bactéries lactiques fait baisser le pH jusqu'à des valeurs approximatives de 4,5 ; une valeur qui est généralement atteinte 15 à 20 jours après le saumurage grâce à la production de l'acide lactique, ce qui forme une acidité libre de la saumure située entre 0,25 - 0,5 %. Les paramètres de la saumure durant cette phase induisent la disparition des bactéries Gram négatif (Benítez-Cabello, 2019).

Durant la troisième phase, la croissance des bactéries lactiques se stabilise, l'épuisement des sucres commence et ainsi la production de l'acide lactique. Les valeurs du pH atteintes sont environ de 4, avec une acidité libre de 0,8 à 1,2 %. Cette phase est la plus longue, elle dure jusqu'à 2 mois. Les paramètres physico-chimiques atteints durant cette phase permettent de garantir la conservation des olives jusqu'à leur classification et conditionnement (Lucena-Padrós, 2016).

Une fois la fermentation lactique terminée, la conservation des olives commence, si les conditions physico-chimiques adéquates ne sont pas établies, une quatrième phase peut se déclencher. Il s'agit d'une phase indésirable durant laquelle le genre *Propionibacterium* peut se développer, ce qui induit la consommation de l'acide lactique produit durant la phase précédente et par conséquent une augmentation du pH. Dans ces conditions, des contaminations par des bactéries d'altération voire pathogènes peuvent apparaître. Pour cela, et pour éviter l'apparition de ces espèces, à la fin de la fermentation lactique, la concentration en NaCl doit être augmentée à plus de 8 % pour garantir la conservation adéquate des olives fermentées (Benítez-Cabello, 2019).

### **II.3.1.2. Diversité bactérienne de la fermentation des olives de table au style Espagnol**

L'écologie microbienne de la fermentation des olives de table est un processus complexe et dynamique où le microbiote subit des changements séquentiels au fil du temps. L'étude du microbiote des olives de table a été réalisée par de nombreux chercheurs dans différents pays, sur différents types d'élaboration et sur différentes variétés, pour objectifs de contrôler le processus de la fermentation et éviter les altérations, pour la sélection des ferments adéquats et pour maintenir la sécurité sanitaire de ce produit (Valero *et al.*, 2017).

L'apparition des techniques modernes de la biologie moléculaire, basées sur l'ADN pour l'identification des espèces et l'étude de la diversité microbienne a remplacé les anciennes méthodes d'identification des isolats basée sur la morphologie, la physiologie et le profil biochimique. Ces méthodes ont laissé de côté un grand nombre d'espèces qui ne pourraient pas être cultivées.

L'application de ces méthodes pour l'étude du microbiote associé à la fermentation des olives de table vertes au style Espagnol a permis de décrire la biodiversité de cet écosystème de manière précise, plus rapide et économique.

Portilha-Cunha *et al.* (2020) ont listé dans leur article de synthèse, les bactéries lactiques identifiées dans les olives de table au cours des deux dernières décennies, dans différents pays du bassin méditerranéen et sur différentes variétés. Plus de 40 espèces appartenant aux 9 genres de bactéries lactiques sont décrites. Les espèces identifiées dans la fermentation des olives de table vertes au style Espagnol sont rapportées dans le Tableau V.

En plus de quelques espèces de bactéries lactiques citées par (Portilha-Cunha *et al.*, 2020), (Lucena-Adrós *et al.*, 2014), en étudiant le microbiote associé à la fermentation des olives de table style Espagnol, ont identifié les espèces citées dans le Tableau V, en utilisant la méthode de culture dépendante. Les auteurs ont rapporté aussi la détection des genres *Brachybacterium*, *Paenibacillus*, *Sporolactobacillus*, *Paracoccus* et *Yersinia* pour la première fois dans les olives de table.

Lucena-Adrós et Ruiz-Barba (2016) ont étudié la présence des bactéries halophiles et alcalophiles au stade initial de la fermentation des olives de table verte au style Espagnol élaborées dans deux grandes industries en Espagne. En utilisant les techniques de culture dépendante et indépendante (PCR-DGGE), les auteurs ont pu identifier 13 espèces bactériennes (Tableau V), dont 4 genres ont été rapportés pour la première fois dans les olives de table et qui sont *Amphibacillus*, *Natronobacillus*, *Catenococcus* et *Streptohalobacillus*.

De Castro *et al.* (2018) ont étudié la composition microbienne associée à des altérations malodorantes des olives de table au style Espagnol en utilisant la technique de séquençage à haut débit. Les auteurs ont constaté la dominance de la famille des *Cardiobacteriaceae* et de genre *Ruminococcus*. Les différents genres identifiés sont rapportés dans le Tableau V.

Dans les travaux menés par Lucena-Adrós et Ruiz-Barba en (2019) pour examiner la biographie de la communauté microbienne associée à la fermentation des olives de table dans différentes régions en Espagne, 16 nouvelles espèces bactériennes ont été identifiées pour la première fois dans les olives de table (Tableau V).

Très récemment, Arroyo-Lopez *et al.* (2021), ont appliqué la métagénomique pour l'étude de la diversité bactérienne de la fermentation des olives de table style Espagnol, altérées et non altérées à l'échelle industrielle. Les genres identifiés sont rapportés dans le Tableau V. Leur étude a révélé que les genres *Enterococcus*, *Leuconostoc*, et *Atlantibacter* sont associés à la fermentation butyrique, les genres *Alkalibacterium*, *Marinilactibacillus*, *Halomonas* et *Halanaerobium* sont associés à la fermentation sulfidique.

**Tableau V** : Genres et espèces bactériens identifiés au cours de la fermentation des olives de table vertes au style Espagnol par des techniques de biologie moléculaire

Les espèces / Les genres	Références
<p><i>Lactobacillus acidipiscis</i>; <i>Lb brevis</i>; <i>Lb coryniformis</i>; <i>Lb oligofermentans</i>; <i>Lb paracasei</i>; <i>Lb paracollinoides</i>; <i>Lb parafarraginis</i>; <i>Lb paraplantarum</i>; <i>Lb pentosus</i>; <i>Lb plantarum</i>; <i>Lb rapi</i>; <i>Lb rhamnosus</i>; <i>Lb sanfranciscensis</i> ; <i>Aerococcus viridans/urinaeequi</i>; <i>Enterococcus casseliflavus</i>; <i>E casseliflavus</i> ; <i>E faecalis</i>; <i>E faecium</i>; <i>E gallinarum</i>; <i>E olivae</i>; <i>Lactococcus formosensis/garviae</i>; <i>Leuconostoc mesenteroides</i>; <i>Pediococcus acidilactici</i>; <i>P ethanolidurans</i>; <i>P parvulus</i>; <i>P pentosaceus</i>; <i>Sporolactobacillus inulinus/terrae</i> ; <i>Weissella paramesenteroides</i>; <i>W paramesenteroides/hellenica</i>.</p>	<p>Portilha-Cunha <i>et al.</i> (2020)</p>
<p><i>Marinilactibacillus psychrotolerans/piezotolerans</i>; <i>Vibrio olivae</i>; <i>Amphibacillus tropicus</i>; <i>Alkalibacterium indicireducens/ pelagium/thalassium</i>; <i>Halolactibacillus halophilus/miurensis</i> ; <i>Natronobacillus azotifigens</i>; <i>Streptohalobacillus salinus</i>; <i>Natronobacillus azotifigens</i>; <i>Alkalibacterium psychrotolerans</i>; <i>Catenococcus thiocycli</i>; <i>Halomonas mongoliensis</i>; <i>Enterococcus olivae</i>; <i>Aerococcus viridans/urinaeequi</i>.</p>	<p>Lucena-Padros et Ruiz-Barba (2016)</p>
<p><i>Vibrio furnissii/fluvialis</i>; <i>Staphylococcus spp.</i>; <i>Clostridium xylanovorans</i>; <i>Propionibacterium acnes</i>; <i>Escherichia spp.</i>; <i>Pantoea agglomerans</i>; <i>Bacillus circulans</i>; <i>Bacillus weihenstephanensis</i>; <i>Brachybacterium muris</i>; <i>Clostridium jejuense</i>; <i>Clostridium sartagoforme</i>; <i>Clostridium schirmacherense</i>; <i>Enterobacter hormaechei</i>; <i>Enterobacter radicincitatus</i>; <i>Paenibacillus illinoisensis</i>; <i>Enterococcus saccharolyticus</i>; <i>Enterobacter kobei</i>; <i>Paracoccus carotinifaciens</i>; <i>Yersinia enterocolitica</i>.</p>	<p>Lucena-Padrós <i>et al.</i> (2014)</p>
<p><i>Shewanella</i> ; <i>Ruminococcus</i> ; <i>Leuconostoc</i> ; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Enterococcus</i> ; <i>Sporolactobacillus</i> ; <i>Oceanobacillus</i> ; <i>Natronobacillus</i> ; <i>Propionibacterium</i> ; <i>Corynebacterium</i>.</p>	<p>De Castro <i>et al.</i> (2018)</p>
<p><i>Vibrio caribbeanicus</i>; <i>Virgibacillus proomii</i>; <i>Bacillus niacini/drentensis</i>; <i>Staphylococcus saprophyticus group</i>; <i>Staphylococcus warneri group</i>; <i>Paenibacillus barengoltzii</i>; <i>Paenibacillus vini</i>; <i>Bacillus nealsonii</i>; <i>Corynebacterium simulans</i>; <i>Lactococcus formosensis/garviae</i>; <i>Paenibacillus lautus</i>; <i>Paenibacillus spp.</i>; <i>Pantoea eucrina</i>; <i>Staphylococcus lugdunensis</i>; <i>Staphylococcus simulans</i>; <i>Vibrio variabilis</i>.</p>	<p>Lucena-Padrós et Ruiz-Barba (2019)</p>
<p><i>Lactiplantibacillus</i>; <i>Enterococcus</i>; <i>Acinetobacter</i>; <i>Leuconostoc</i>; <i>Gibbsiella</i>; <i>Clostridium sensu stricto</i>; <i>Melissococcus</i>; <i>Halomonas</i>; <i>Amphibacillus</i>; <i>Raoultella</i>; <i>Enterobacter</i>; <i>Mangrovibacter</i>; <i>Sporolactobacillus</i>; <i>Klebsiella</i>; <i>Lactococcus</i>; <i>Escherichia/Shigella</i>; <i>Pseudomonas</i>; <i>Cronobacter</i>; <i>Citrobacter</i>; <i>Atlantibacter</i>; <i>Pediococcus</i>; <i>Halolactibacillus</i>; <i>Aerococcus</i>; <i>Serratia</i>; <i>Paraliobacillus</i>; <i>Alkalibacterium</i>; <i>Catenococcus</i>; <i>Natronobacillus</i>; <i>Celerinatantimonas</i>;</p>	<p>Arroyo-Lopez <i>et al.</i> (2021)</p>

<i>Marinilactibacillus; Halanaerobium; Kosakonia; Arcobacter; Salinivibrio; Weissella; Vibrio; Idiomarina; Enterococcus; Acinetobacter; Leuconostoc; Gibbsiella; Clostridium sensu stricto; Melissococcus; Halomonas; Amphibacillus; Raoultella; Enterobacter; Mangrovibacter; Sporolactobacillus; Klebsiella; Lactococcus; Escherichia/Shigella; Pseudomonas; Cronobacter; Citrobacter; Atlantibacter; Pediococcus; Halolactibacillus; Aerococcus; Serratia; Paraliobacillus; Alkalibacterium; Catenococcus; Natronobacillus; Celerinatantimonas; Marinilactibacillus; Halanaerobium; Kosakonia; Arcobacter; Salinivibrio; Weissella; Vibrio; Idiomarina.</i>	Arroyo-Lopez <i>et al.</i> (2021)
--	-----------------------------------

## II.4. Altération et détérioration

### II.4.1. Fermentations secondaires

Lorsque les paramètres physico-chimiques au cours de la fermentation ne sont pas contrôlés, la saumure peut constituer un milieu favorable pour des microorganismes indésirables qui peuvent se développer en dehors du processus normal, c'est ce qui s'appelle la fermentation secondaire.

Selon le groupe bactérien responsable et les métabolites produits, on distingue les types de fermentations secondaires :

#### II.4.1.1. Fermentation butyrique

La fermentation butyrique est une caractéristique des bactéries anaérobies (*Clostridium*, *Butyrivibrio* spp, *Bacillus* spp, etc.), leur métabolisme fermentaire les rend aptes à oxyder les sucres et produire divers métabolites comme l'acide butyrique, le butanol, l'acétone, l'isopropanol, l'acétate, et l'éthanol. La fermentation butyrique est assez courante dans les milieux où le pH n'est pas suffisamment bas, et la production du CO<sub>2</sub> durant cette fermentation peut aussi contribuer à l'augmentation du pH, et ainsi l'inhibition de l'activité des bactéries lactiques (Ciana *et al.*, 2013 ; Voidarou *et al.*, 2021). La fermentation butyrique des olives de table génère une odeur désagréable qui ressemble à l'odeur du beurre rance, et selon (Kiritsakis *et al.*, 2011), ce type de fermentation apparaît lorsque la concentration en sel est faible et la température est élevée. Pour éviter son apparition, il est recommandé de maintenir la concentration de sel supérieure à 5 % (Rodríguez-Ortiz, 2012).

#### **II.4.1.2. Fermentation propionique**

La fermentation propionique est effectuée par les bactéries appartenant aux genres *Propionibacterium*, *Veilonella*, *Bacteroides*, et quelques espèces de *Clostridium*. Ces bactéries utilisent les sucres et l'acide lactique comme substrat initial et produisent l'acide propionique et l'acide acétique (Voidarou *et al.*, 2021). L'apparition de ce type de fermentation dans les olives de table est favorisée par le pH et la température élevés et la faible concentration en sel (Kiritsakis, 2011). C'est pour cela que l'augmentation de la concentration du NaCl à plus de 9 % à la fin de la fermentation lactique peut prévenir cette altération (Sánchez-Gómez *et al.*, 2006).

#### **II.4.1.3. Zapateria**

La détérioration qui provoque une mauvaise odeur est connue sous le nom de Zapatera ou Zapateria, cette détérioration induit la dégradation du goût de l'olive et le dégagement des odeurs désagréables, tout en diminuant sa cohésion et sa texture. Elle est associée à une faible acidité de la saumure et elle est causée par le développement des bactéries propioniques (*Propionibacterium* spp. et *Clostridium* spp.) dans la saumure. Les meilleurs moyens pour éviter cette détérioration, c'est l'abaissement du pH de la saumure à 3,6 - 3,8 ; l'augmentation de la teneur en sel de la saumure au-dessus 8,5 % ; et le maintien des conditions d'hygiène pendant la fermentation et le stockage (Kiritsakis *et al.*, 2011).

Il existe aussi des altérations qui ne sont pas liées à une fermentation secondaire mais à d'autres facteurs comme la déformation de la structure, formation de fissures et de gaz dans la pulpe, etc.

#### **II.4.2. Ramollissement**

Le développement excessif des microorganismes à activité pectinolytique et protéolytique comme les bacilles, les levures et les moisissures provoquent un ramollissement des olives. Cette altération est également due à un excès d'addition d'acides qui endommagent la structure des fruits. Pour éviter cette altération, il est recommandé de limiter la disponibilité d'O<sub>2</sub>, pour inhiber le développement de ces microorganismes au cours de la conservation (Romero-Gil, 2017).

### **II.4.3. Fissurage**

Le développement excessif des bactéries Gram négatif conduit à la formation des fissures à l'extérieur des olives et de trous internes dans la pulpe et parfois la formation des pochettes de gaz sous l'épicarpe. Elle est évitée en ajustant la valeur initiale du pH (Rodriguez-Gomez, 2015).

### **II.4.4. Turbidité et brunissement des saumures**

La turbidité est due à la croissance de micro-organismes, le noircissement quant à lui est lié à l'oxydation de certains composés phénoliques qui donne naissance à des tons bruns. Cette altération est particulièrement négative dans l'emballage et suppose une perte de la qualité dans le produit final. Elle est évitée par l'ajustement du pH à moins de 3,3 en conditionnement ou en pasteurisation (Romero-Gil, 2017).

## **II.5. Avancée technologique dans le processus d'élaboration des olives de table**

Les innovations technologiques appliquées au processus d'élaboration des olives de table visent à améliorer les performances et la durabilité industrielle, ainsi que le développement de nouveaux produits qui répondent efficacement à des consommateurs de plus en plus exigeants. Un produit présentant des caractéristiques nutritionnelles optimales, une qualité et une sécurité élevées, des caractéristiques organoleptiques améliorées et une réduction des additifs sont très demandés. Parmi ces innovations, nous citant :

### **II.5.1. Utilisation des ferments**

L'utilisation des ferments pour la fermentation des olives de table est fortement recommandée. Un inoculum approprié réduit les effets des micro-organismes d'altération, inhibe la croissance des micro-organismes pathogènes et aide à obtenir un processus contrôlé, en réduisant le temps de désamérisation et en améliorant la qualité sensorielle et hygiénique du produit final. La sélection des souches à utiliser comme ferments se base sur divers critères tels que : la capacité de survivre dans l'environnement de la saumure (faible pH, concentration en sel et faible disponibilité des substances fermentescibles), le pouvoir acidifiant, la capacité d'hydrolyse des composés phénoliques, la production des molécules volatiles qui contribue au profil sensoriel du produit final, et enfin un critère important c'est la capacité de dominer le microbiote endogène (Rodriguez-Gomez, 2015). Deux types de ferment sont utilisés :

### I.5.1.1. Bactéries lactiques

Anagnostopoulos *et al.* (2020a) ont montré l'effet crucial de l'utilisation des bactéries lactiques comme ferment, dans la fermentation des olives de table, leur utilisation conduisait à une acidification et à une diminution plus rapide du pH, et ainsi l'inhibition de la croissance des entérobactéries sur une période plus courte et à une concentration en sel plus faible par rapport à la fermentation spontanée.

Parmi les espèces des bactéries lactiques, les plus souvent proposées comme ferments lactiques sont *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus pentosus* (Corsetti *et al.*, 2012 ; Tofalo *et al.*, 2014). La dominance et l'amélioration du processus de la fermentation des olives de table en terme du temps de fermentation, qualité microbiologique, couleur, profil aromatique et la stabilité des processus inoculés avec ces deux espèces a été démontrée (De Angelis *et al.*, 2015 ; Comunian *et al.*, 2017 ; Randazzo *et al.*, 2017).

### II.5.1.2. Levures

Ces dernières années, plusieurs études se sont focalisées sur l'utilisation des levures, seule, ou en combinaison avec des bactéries lactiques. En effet, la combinaison des souches *L. plantarum* et *L. pentosus* avec les souches *Wickerhamomyces anomalus* et *Pichia membranifaciens* a donné de très bons résultats concernant l'accélération du processus de la fermentation et l'amélioration du profil sensoriel des olives de table de variétés *Bella di Cerignola* et *Conservolea* (De Angelis *et al.*, 2015 ; Grounta *et al.*, 2016). D'autres souches, *P. guilliermondii* et *W. anomalus* ont été sélectionnées pour leurs propriétés technologiques et probiotiques en tant que ferments multifonctionnels prometteurs à utiliser dans la fermentation des olives (Bonatsou *et al.*, 2015).

### II.5.2. Substitution du NaOH par KOH

La lessive et les eaux de lavage utilisées par les industries au cours de l'élaboration des olives de table sont très polluantes, à cause de leur forte concentration en sodium qui provoque une conductivité élevée et limite leur rejet dans les cours d'eau publics, ainsi que leur utilisation à des fins agronomiques. C'est pour cette raison, les chercheurs ont pensé à remplacer la lessive NaOH par le KOH. Récemment, Garcia-Serrano *et al.* (2019) ont étudié la substitution du NaOH par le KOH pour la désamérisation des olives vertes. Ils ont conclu que le remplacement du NaOH par le KOH durant le processus n'influence pas sur la fermentation lactique et le produit final a une couleur et une flaveur similaire à celle traité par le NaOH, cependant, la

texture est légèrement affectée. Ils ont conclu que l'élaboration des olives par le KOH est possible, mais d'autres études sont nécessaires pour résoudre la perte de la texture. De plus, il faut prendre en considération que le traitement avec le KOH est plus coûteux par rapport au traitement avec le NaOH.

L'utilisation du KOH pour le noircissement des olives noires a été aussi étudiée par Garcia Serrano *et al.* (2020b), et ils ont conclu que la substitution du NaOH par le KOH lors de l'étape de noircissement des olives noires mûres n'a pas d'influence significative sur les processus d'oxydation des variétés étudiées. Le produit final obtenu a la même couleur, texture et avec plus de substances bioactives comparativement à celui préparé en utilisant le NaOH.

### **II.5.3. Réduction et remplacement du NaCl**

Au cours de ces dernières années, l'organisation mondiale de la santé recommande la réduction du NaCl dans les olives de table, à cause de l'effet néfaste des doses élevées du sel sur la santé. Pour cela, l'intérêt des chercheurs actuellement est de réduire la concentration du NaCl dans les olives de table et de le remplacer partiellement par d'autres sels chlorides, en préservant la qualité sanitaire et organoleptique des olives au cours de la fermentation ou du produit fini (Anagnostopoulos et Tsaltas, 2022).

Il a été démontré par certaines études que les olives de table produites par substitution partielle de NaCl par le KCl, CaCl<sub>2</sub> et ZnCl<sub>2</sub> ne présentent pas de risque sanitaire (Bautista-Gallego *et al.*, 2010 ; 2011 ; Mantzouridou *et al.*, 2020). Cependant, en utilisant ces alternatives certaines anomalies sensorielles comme les odeurs indésirables ont été signalées (Zinno *et al.*, 2017).

Une nouvelle stratégie récente consiste à l'utilisation des ferments de bactéries lactiques pour réduire le NaCl jusqu'à 5 % sans le remplacer par d'autres sels. Dans les études menées par (Pino *et al.*, 2018 ; 2019 ; Anagnostopoulos *et al.*, 2020a ; 2020b) ont conclu que les olives de table inoculée avec des souches de bactéries lactiques à une concentration réduite en sel ont des caractéristiques sensorielles acceptables et aucune détérioration n'a été observée durant la fermentation.

---

## Chapitre III : Qualité et sécurité des olives de table

### III.1. Normes applicables aux olives de table

Le Conseil oléicole international et le codex alimentarius en (2004) ont établi la norme commerciale applicable aux olives de table qui définit et classe les olives de table en fonction de degré de maturité, type des préparations commerciales et le mode de présentation.

Le COI et le codex alimentarius dans cette norme, ont fixé une échelle de calibre qui représente le nombre de fruits dans un kilogramme ou un hectogramme, en précisant que le calibrage est obligatoire pour les olives présentées entières, dénoyautées et farcies.

Cette norme détaille la composition des olives de table commerciales, en définissant l'ingrédient de base qui est l'olive et la saumure de base qui désigne les dissolutions de sels alimentaires dans l'eau potable, avec ou sans adjonction. Cette saumure doit répondre à certains critères physico-chimiques comme la concentration minimale en chlorure de sodium, limite maximale de pH et acidité lactique minimale. D'autres ingrédients autorisés sont listés dans cette norme.

Les critères de qualité rapportés dans cette norme exhortent que les olives de table doivent présenter la saveur, l'odeur, la couleur et la texture caractéristiques du produit et répondre aux règles d'hygiène définies par la même norme. Parmi ces critères, le classement qualitatif des olives de table en catégorie extra, première, et deuxième, ces critères définissent aussi les défauts et les tolérances. Les agents de conservation, les acidifiants, les antioxydants, les stabilisants, les aromatisants, les exhausteurs de goût et d'autres auxiliaires technologiques seuls ou en combinaison, qui peuvent être utilisés sont listés dans cette norme.

En ce qui concerne l'hygiène, le COI et le codex alimentarius recommandent que les olives de table soient préparées et manipulées conformément aux sections appropriées du code d'usage international recommandé : principes généraux d'hygiène alimentaire (CAC/RCP 1-1969, Rév. 3-1997, amendés en 1999), au code d'usages internationaux recommandés en matière d'hygiène pour les conserves non acidifiées ou acidifiées, des produits alimentaires naturellement peu acides (CAC/RCP 23-1979, Rév.2-1993) et d'autres documents codex pertinents tels que les codes d'usages en matière d'hygiène et autres codes d'usages.

Dans cette norme, le COI et le codex alimentarius recommandent que : les produits doivent être conformes à tout critère microbiologique établi en conformité avec les principes régissant l'établissement et l'application de critères microbiologiques pour les aliments

(CAC/GL 21-1997) ; les olives et la saumure doivent être exemptes de toute substance anormale et dépourvues de toute altération microbiologique provoquée notamment par une fermentation putride, butyrique ou « zapateria » ; exemptes de micro-organismes pathogènes et/ou contaminants susceptibles de se développer dans le produit dans des conditions normales d'entreposage ; et ne doivent contenir aucune substance provenant de micro-organismes en quantités pouvant présenter un risque pour la santé.

Les dernières recommandations de la norme applicable aux olives de table concernent : les récipients, le remplissage et l'étiquetage.

### **III.2. Risques biologiques**

Parmi les risques biologiques les plus importants dans les olives de table, Medina et Arroyo-López, (2015) ont cité dans leur article de synthèse :

#### **III.2.1. Présence des microorganismes pathogènes**

La présence des microorganismes pathogènes tels que *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *Enterobacteriaceae* a été rapportée dans différents types d'olives de table et dans différents pays. Cependant, aucune contamination causée par ces bactéries dans les olives de table n'a été enregistrée. Bien que diverses contaminations à cause de la présence de *C botulinum* dans les olives de table fait maison ont été signalées. L'origine de leur présence est la conservation inadéquate.

#### **III.2.2. Mycotoxines**

Les toxines du type Ochratoxine, Aflatoxine B et Citrinine ont été trouvées dans les olives de table craquées et les olives noires style grec, mais avec des seuils très faibles qui ne causent pas de danger.

#### **III.2.3. Formation des amines biogènes**

La présence des amines biogènes dans les olives de table résulte de la prolifération des microorganismes à une activité de décarboxylation des acides aminés. Ces métabolites ont été détectés dans les olives de table vertes fermentées et altérées par « Zapateria », et dans les olives naturellement fermentées, leur concentration peut augmenter durant le stockage, mais les valeurs mentionnées ne représentent pas un danger pour la santé.

#### **III.2.4. Dégradation des acides organiques**

Certains groupes bactériens (*Lactobacillus buchneri*, *Propionibacterium* et *Pectinatus*) sont capables de convertir l'acide lactique en acide acétique ou en acide propionique, et certaines levures consomment l'acide lactique, ce qui résulte de la diminution de l'auto-préservation des olives sous l'effet de l'augmentation du pH. Ceci va permettre le développement des microorganismes indésirables et par conséquent la perte de la sécurité et la qualité du produit.

#### **III.3. Prévention des risques biologiques**

Pour atteindre le risque zéro, les producteurs d'olives de table doivent suivre les pratiques qui assurent que le fruit destiné à la conservation doit être produit selon les bonnes pratiques agricoles (BPA), transformé selon les principes des bonnes pratiques de fabrication (BPF), dans des conditions suivant strictement les bonnes pratiques d'hygiène (BPH). Toutes ces conditions doivent être prises en compte dans le cadre du système de gestion de la sécurité alimentaire (HACCP) (Medina et Arroyo-López, 2015).

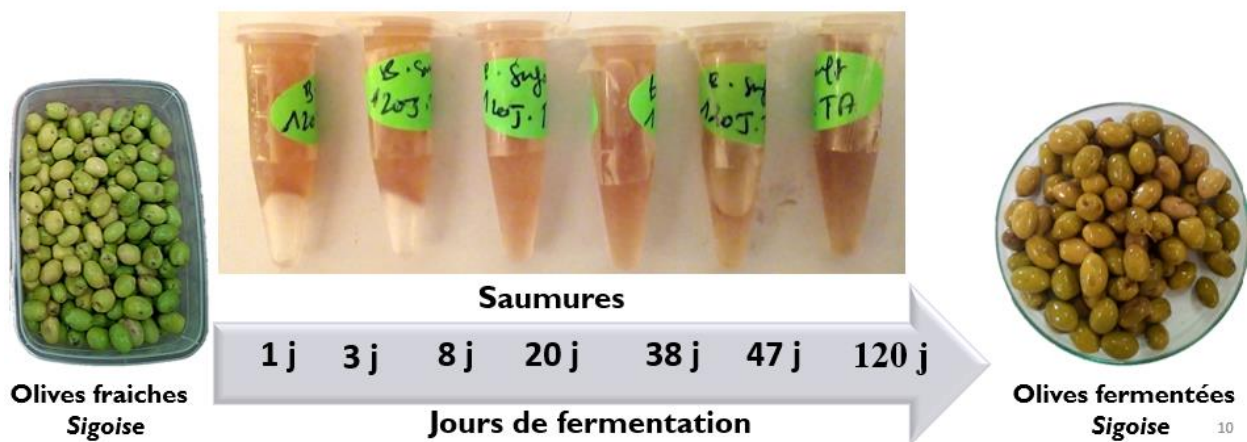
# *Matériel et méthodes*

## I. Matériel et méthodes

### I.1. Échantillonnage

Au cours de deux campagnes oléicoles successives (2018/2019 et 2019/2020), des échantillons de la saumure et d'olives de différentes variétés *Sevillana*, *Verdale* et *Sigoise* élaborés par la méthode style Espagnol ont fait l'objet de l'étude.

Durant la campagne 2018/2019, le travail effectué consiste à l'étude de l'évolution du processus de la fermentation des olives de la variété *Sigoise* (Sig.4) provenant de la région de Sig (Mascara), et qui sont élaborées dans une conserverie située à Tizi-Ouzou (Figure 11). Pour cela, des échantillons de la saumure ont été prélevés à partir du premier jour jusqu'à la fin de la fermentation selon le timing suivant : 1, 3, 8, 20, 38, 47 et 120 jours (Figure10).



**Figure 10** : Image représentative des échantillons de la saumure et des olives étudiés

De plus, des échantillons d'olives fraîches et d'olives fermentées ont été prélevés avant l'élaboration et à la fin du processus de la fermentation, respectivement. Les analyses microbiologiques ont été réalisées le même jour du prélèvement. En ce qui concerne les analyses physico-chimiques, les échantillons de la saumure destinés à l'analyse du pH, du NaCl, de l'acidité, des sucres et des acides organiques ont été conservés directement à -20 °C. Les échantillons de la saumure destinés à l'analyse des composés phénoliques ont été acidifiés par l'ajout de quelques gouttes de l'acide phosphorique (Zhou *et al.*, 2019) et sont ensuite conservés à -20 °C. En ce qui concerne les échantillons d'olives fraîches et d'olives fermentées, les échantillons ont été conservés directement à -20 °C pour l'analyse des sucres. Une extraction au DMSO a été effectuée à partir des olives fraîches et des olives fermentées pour l'analyse des composés phénoliques (Ramirez *et al.*, 2014). Cet extrait phénolique a été ensuite conservé à -20 °C jusqu'à analyse. Pour l'analyse des acides triterpénique, les olives fraîches et les olives

fermentées ont été séchées dans une étuve à 105 °C jusqu'à la stabilité du poids et conservées à température ambiante (Romero *et al.*, 2010).

Un nombre de 17 échantillons de la saumure et d'olives de variétés *Sevillana*, *Verdale* et *Sigoise* ont été collectés durant le mois de février 2020 dans 3 conserveries, deux entre elles se situent à Ain Defla et l'autre à Boumerdes (Figure 10). Les échantillons ont été prélevés dans des fermentateurs industriels de différentes capacités et à différentes phases de fermentation. Ces échantillons ont été transportés dans un sac isotherme en moins de 24 h à l'institut de la Grasa-CSIC, en Espagne pour analyse.

Les variétés étudiées et les paramètres (concentration de NaOH, le temps de désamérisation, la durée des deux lavages, la concentration initiale de NaCl) relatifs au processus d'élaboration pour les 4 industries sont reportés dans le (Tableau VI). Tous les échantillons ont été analysés par duplicata.



**Figure 11 :** Sites d'échantillonnage des olives de table provenant des différentes industries.  
 Industrie 1 et 2 : Ain Defla ; Industrie 3 : Boumerdes ; Industrie 4 : Tizi-Ouzou

En Mars 2023, treize échantillons commerciaux d'olives table en vrac de différentes marques ont été collectés (en double) sur le marché en Algérie. Le Tableau VII montre le type du processus d'élaboration de ces olives (olives vertes style Espagnol, olives naturelles tournantes et olives noires oxydées), la variété (*Sigoise et Sevillana*), le producteur (P1, P2, P3 et P4) et les ingrédients mentionnés sur les étiquettes. Les échantillons ont été transférés dans des sacs en plastique et conservés au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse.

**Tableau VI** : Caractéristiques du processus d'élaboration des olives de table vertes style espagnol prélevées dans les fermentateurs industriels (données fournies par les producteurs)

Echantillons (code*)	Variété	Industrie (Numéro)	Concentration de NaOH %	Temps de désamérisation (h)	Lavage 1 (h)	Lavage 2 (h)	Concentration initiale de NaCl (%)	Temps de fermentation (jours)
Sig.1a	<i>Sigoise</i>	1	1,3	12-14	24	120	16	90
Sig.1b	<i>Sigoise</i>	1	1,3	12-14	24	120	16	90
Sig.1c	<i>Sigoise</i>	1	1,3	12-14	24	120	16	60
Sig.2a	<i>Sigoise</i>	2	2,3	8-10	24	48	12	90
Sig.2b	<i>Sigoise</i>	2	2,3	8-10	24	48	12	90
Sig.3a	<i>Sigoise</i>	3	2,5	12	24	48	10	90
Sig.3.b	<i>Sigoise</i>	3	2,5	12	24	48	10	90
Sig.3.c	<i>Sigoise</i>	3	2,5	12	24	48	10	90
Sig.3.d	<i>Sigoise</i>	3	2,5	12	24	48	10	60
Sig.3.e	<i>Sigoise</i>	3	2,5	12	24	48	10	120
Sig.3.f	<i>Sigoise</i>	3	2,5	12	24	48	10	90
Sig.4	<i>Sigoise</i>	4	2,6	8	04	06	08	120
Ver.1a	<i>Verdale</i>	1	1,3	12-14	24	120	16	120
Ver.1b	<i>Verdale</i>	1	1,3	12-14	24	120	16	120
Ver.2	<i>Verdale</i>	2	2,3	8-10	24	48	12	120
Sev. 1	<i>Sevillana</i>	1	1,3	12-14	24	120	16	120
Sev. 2	<i>Sevillana</i>	2	2,3	8-10	24	48	12	120

\* Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés.

**Tableau VII** : Type de préparation, la variété, les producteurs et les ingrédients des échantillons d'olives de table commerciales du marché algérien.

Type	Echantillons	Variété	Producteurs	Ingrédients
Olives style Espagnol	1	Sigoise	P1	Eau, sel
	2	Sigoise	P2	Eau, sel, E223*, E270*, E330*
	3	Sigoise	P3	Eau, sel, E330*, E260
	4	Sigoise	P4	Eau, sel, E330
	5	Sevillana	P1	Eau, sel
	6	Sevillana	P2	Eau, sel
	7	Sevillana	P3	Eau, sel, E330, E260
Olives naturelles tournantes	8	Sigoise	P1	Eau, sel, E330, E260
	9	Sigoise	P2	Eau, sel, E223, E270, E330
	10	Sigoise	P3	Eau, sel
Olives noires oxydées	11	Sevillana	P1	Inconnu
	12	Sevillana	P2	Inconnu
	13	Sevillana	P3	Inconnu

\*E223, E260, E270 et E330 corresponds aux additifs : métabisulfite sodium, acide acétique, acide lactique et acide citrique, respectivement.

## I.2. Analyse des échantillons

L'appareillage et les réactifs utilisés dans cette étude sont représentés en annexe 1.

### I.2.1. Analyses physico-chimiques et biochimiques

#### I.2.1.1. Dosage de chlorure de sodium NaCl

Le dosage du chlorure de sodium dans la saumure a été effectué selon la méthode décrite par (Garrido-Fernández *et al.*, 1997), par titrage avec le nitrate d'argent (0,086 N) en utilisant le chromate de potassium comme indicateur de coloration caractérisé par une couleur jaunâtre qui vire au rouge brique à la neutralisation. Pour cela, un volume de 0,5 ml de la saumure a été pipeté dans un erlenmeyer, auquel ont été ajoutés 100 ml d'eau distillée, la solution a été bien mélangée, ensuite 2 à 3 gouttes de chromate de potassium ont été ajoutées. Ensuite, la solution a été titrée à l'aide d'une burette digitale (Brand, Allemagne). Le volume de nitrate d'argent utilisé est noté et la concentration de chlorure de sodium est calculée comme suit :

$$\text{NaCl (\%)} = \text{Volume (ml) de la solution nitrate d'argent consommé} \times 0,9371$$

#### I.2.1.2. Détermination du pH et de l'acidité libre

L'acidité libre (exprimée en % de l'acide lactique) et le pH de la saumure ont été analysés par un Titroprocesseur Metrohm 670 (Herisau, Suisse). L'acidité libre a été déterminée par

titrage avec la solution NaOH (0,5 N) (Cortés-Delgado *et al.*, 2016). Pour cela, un volume de 25 ml de la saumure a été utilisé.

### I.2.1.3. Analyse des sucres dans la saumure et la pulpe d'olives

Le contenu en sucres (glucose, fructose, saccharose et mannitol) dans la pulpe d'olive a été déterminé par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) selon la méthode décrite par Medina *et al.* (2007). Brièvement, 25 g de la pulpe d'olive ont été pesés et homogénéisés avec 40 ml d'eau bouillante (100 °C) à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-turrax (Ika, Allemagne) jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement homogénéisé. Le mélange a été transféré dans un tube de téflon de 50 ml et vortexé pendant 1 min, et incubé dans un bain ultrasonique pendant 3 min. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 9000g pendant 5 min à température ambiante et le surnageant a été filtré sous vide avec un papier filtre Whatman N°1 dans une fiole Büchner. La pulpe précipitée a été lavée avec 40 ml d'eau bouillante (100 °C), répétant la même opération décrite antérieurement pour une deuxième extraction. La solution obtenue a été transférée dans une fiole de 100 ml contenant 5 ml de sorbitol (7,5 %, w/v) utilisé comme étalon interne, ensuite la solution est diluée en complétant le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Après, la solution a été bien mélangée, et 2 ml de cette dernière ont été introduits dans un tube contenant 1 g de résine acide Amberlite IR-120 (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) et 1 g de résine basique Amberlite IRA-93 (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) (Figure 11). Le mélange a été soigneusement agité à la main 3 à 4 fois pendant 30 min. 1 ml de la solution a été récupéré à l'aide d'une micropipette et centrifugé à 9000 g pendant 3 min et ensuite filtré à travers un filtre de nylon de 0,22 µm de diamètre des pores (RephiQuik, Chine) et par la suite 20 µl ont été injectés à l'HPLC. La concentration des sucres dans la pulpe est calculée comme suit :

$$C (g) = [\text{Aire (Échantillon)} / \text{Aire (Sorbitol)}] \times C (\text{Étalon en g}) \times 1/F$$

Où F est de :

Saccharose =	0,9
Glucose =	1,0484
Fructose =	1,0017
Mannitol =	1,0327

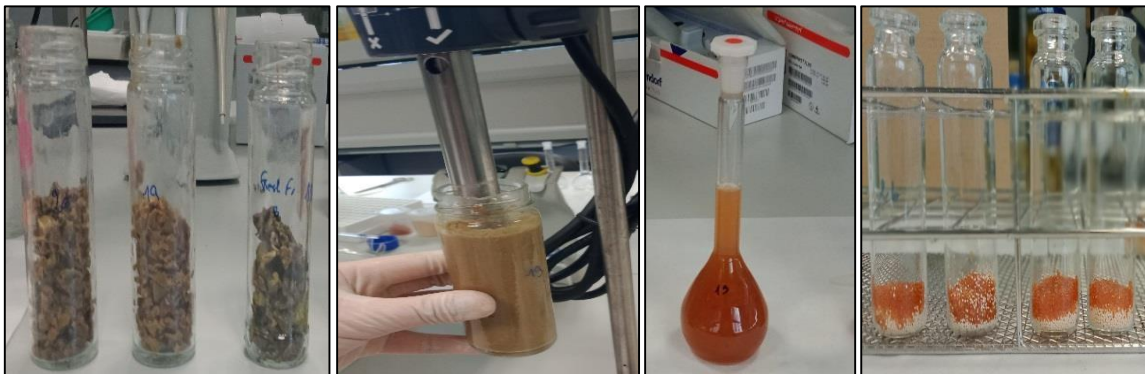
NB : Les résines ont été préparées au préalable en les lavant plusieurs fois avec de l'eau distillée (3 à 4 lavages), et filtrées sous vide dans une fiole Büchner. Le rôle de la résine est l'élimination des anions et les cations présents dans la saumure.

Concernant la détermination des sucres dans la saumure la méthode consiste à mettre en contact dans un tube 0,5 ml de la saumure, 1 g de résine acide Amberlite IR-120 et 1 g de résine basique Amberlite IRA-93, plus 1,5 ml de sorbitol (0,05 %, w/v) utilisé comme étalon interne. Le mélange a été soigneusement agité à la main 3 à 4 fois pendant 30 min. 1 ml de la solution est récupéré et filtré à travers un filtre de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  (RephiQuik, Chine) de diamètre de pores. 20  $\mu\text{l}$  du filtrat obtenu a été injecté à l'HPLC (Waters Inc., Etats-Unis) (Medina *et al.*, 2007). La concentration des sucres dans la saumure est calculée comme suit :

$$C \text{ (mM/kg)} = [\text{Aire (Échantillon)} / \text{Aire (Sorbitol)}] \times C \text{ (Étalon en mM)} \times 1/F.$$

Où F est de :

Saccharose	=	5,438
Glucose	=	8,741
Fructose	=	8,127
Mannitol	=	9,279



**Figure 12 :** Extraction des sucres de la pulpe d'olive

Le système chromatographique utilisé est le même que celui décrit par Medina *et al.* (2007). Il est composé d'un équipement Waters modèle 2695 Alliance (Waters Inc., Etats-Unis), avec une pompe et un injecteur automatique inclus, la détection est effectuée avec un détecteur à indice de réfraction modèle Waters 410 (Waters Inc., Etats-Unis). La colonne utilisée est de type Rezex RCM-Monosaccharide  $\text{Ca}^+$  (8 %) de taille de 300 mm et 7,8 cm de diamètre interne (Phenomenex, Etats-Unis). La température de la colonne est maintenue à 85 °C. L'eau déionisée est utilisée comme éluant à un débit de 0,6 ml/min.

#### **I.2.1.4. Analyse des acides organiques et l'éthanol dans la saumure**

Les acides organiques (acide lactique, acide acétique) et l'éthanol ont été analysés simultanément par la technique de HPLC. Un volume de 1 ml de la saumure a été filtré

directement à travers un filtre de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  de diamètre de pores (RephiQuik, Chine) et a été ensuite injecté à l'HPLC (Medina *et al.*, 2007). La concentration des acides organiques est calculée selon les équations d'étalonnage suivante :

$$\begin{array}{lcl} \text{Acide lactique : } C (\%) & = & \text{Aire du pic}/3,076 \\ \text{Acide acétique : } C (\%) & = & \text{Aire du pic}/2,189 \\ \text{Ethanol : } C (\%) & = & \text{Aire du pic}/1,980 \end{array}$$

Le système chromatographique utilisé est similaire au précédent décrit pour l'analyse des sucres (Voir paragraphe I.2.1.3). La colonne utilisée est une Spherisorb ODS-2 de diamètre de 5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4,6 mm (Waters Inc. Etats-Unis) avec l'eau dionisée (pH ajusté à 2,3 avec l'acide phosphorique) utilisée comme éluant à un débit de 1,2 ml /min (Medina *et al.*, 2007).

#### **I.2.1.5. Analyse des composés phénoliques**

Les composés phénoliques ont été extraits de la pulpe d'olive avec le dimethylsulfoxyde DMSO (Sigma-Aldrich, Allemagne) selon la méthode décrite par Ramirez *et al.* (2014). Dix grammes de la pulpe d'olive ont été mixés avec 30 ml de DMSO à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-turrax (Ika, Allemagne). Après 30 min de contact, la solution a été centrifugée à 6000g pendant 5 min à température ambiante. Un volume de 0,25 ml de surnageant a été introduit dans un tube eppendorf contenant 0,5 ml de DMSO et 0,25 ml d'acide syringique dilué dans du DMSO (0,2 mM) utilisé comme étalon interne. La solution a été filtrée à travers un filtre nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  de diamètre de pores (RephiQuik, Chine) et ensuite 20  $\mu\text{l}$  sont injectés à l'HPLC (Waters Inc., Etats-Unis).

Dans la saumure, les composés phénoliques ont été analysés selon la méthode décrite par Medina *et al.* (2007). Un volume de 0,25 ml de la saumure a été dilué dans 0,5 ml d'eau distillée, auxquels ont été ajoutés 0,25 ml de l'acide syringique (2 mM) utilisé comme étalon interne. La solution a été filtrée à travers un filtre de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  de diamètre des pores, ensuite un volume de 20  $\mu\text{l}$  a été injecté à l'HPLC.

Le système chromatographique utilisé pour l'analyse des composés phénoliques est identique à celui décrit par Ramirez *et al.* (2014). Il est composé d'un auto-injecteur Waters 717 (Waters Inc., Etats-Unis) plus une pompe Waters 600 E (Waters Inc., Etats-Unis), d'un chauffage de colonne Heater module (Waters Inc., Etats-Unis), et d'un détecteur à barrettes de diodes Waters 996 (Waters Inc., Etats-Unis) équipé d'un logiciel Empower (Waters Inc., Etats-Unis).

La colonne utilisée pour la séparation des composés phénoliques est une Spherisorb ODS-2 (Waters Inc. Etats-Unis) de 25 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne, avec un débit de 1 ml/min et à une température de 35 °C.

La séparation a été réalisée en élution par gradient en utilisant de l'eau (A) (pH 2,5 ajusté avec 0,15 % d'acide phosphorique) et du méthanol (B). La composition initiale était de 90 % (A) et 10 % (B). La concentration de B est augmentée à 30 % en 10 min et maintenue pendant 20 min. Par la suite, B est élevé à 40 % en 10 min, et maintenue pendant 5 min, puis augmentée à 50 %. Enfin, B est augmenté à 60, 70 et 100 % en périodes de 5 min. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 280 nm.

#### **I.2.1.6. Analyse des acides organiques volatils**

Les acides organiques volatils (acide butyrique, acide propionique et acide isobutyrique) ont été extraits par la méthode Espace de tête (headspace) micro-extraction en phase solide et analysés par la technique de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, selon la méthode décrite par Garcia-Villalba *et al.* (2012), avec quelques modifications. Brièvement, 2 ml de la saumure ont été acidifiés avec 0,1 ml de HCl (2 N) puis homogénéisés et centrifugés pendant 10 min à 11600 g à température ambiante. Ensuite, 1 ml de surnageant a été mis en contact avec 1 ml d'acétate d'éthyle pendant 2 min et centrifugé à 11600 g pendant 2 min à température ambiante, par la suite, 0,3 ml de la phase organique ont été transférés dans un tube auxquels ont été ajoutés 50 µl de l'acide 2-éthylbutyrique (148 mg / l dans l'acétate d'éthyle) utilisé comme étalon interne (IS). Les acides organiques volatils ont été adsorbés par la fibre SPME introduite dans le flacon pour une durée d'exposition de 60 min.

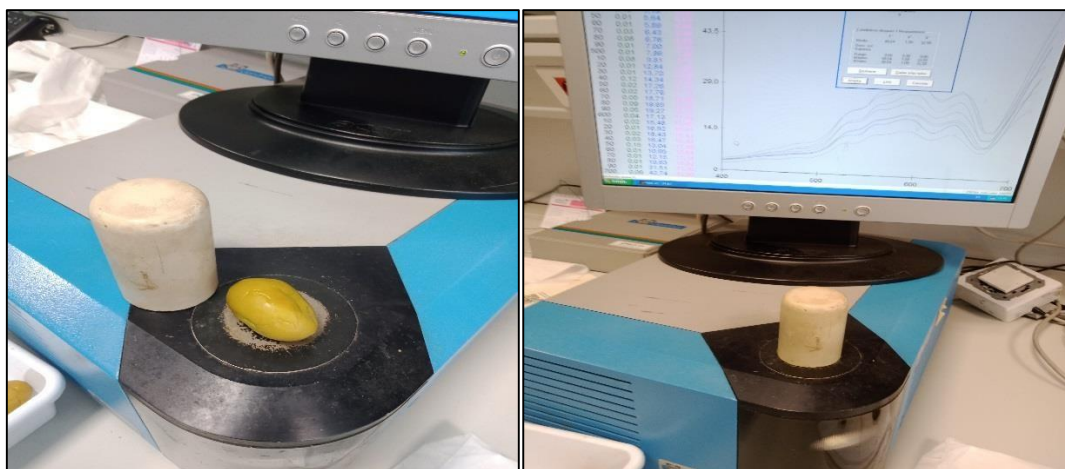
Le système chromatographique se composait d'un Agilent 7890A (Agilent Technologies, Etats-Unis) couplé à un détecteur de masse sélectif Agilent 5975C (Agilent Technologies, Etats-Unis) et à un logiciel CG/DMS ChemStation (version E.02.01.1177). La séparation a été réalisée dans une colonne capillaire Agilent VF-WAXms (Agilent, Etats-Unis) de dimensions (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d'épaisseur de film).

Le gaz de l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 ml/min. L'injection (1 µl) a été réalisée en mode « splitless » et le port de l'injecteur a été chauffé à 250 °C. Pour les conditions du détecteur en masse sélectif, les températures du quadripôle, de la source d'ionisation et de la ligne de transfert ont été maintenues à 150, 230 et 280 °C, respectivement.

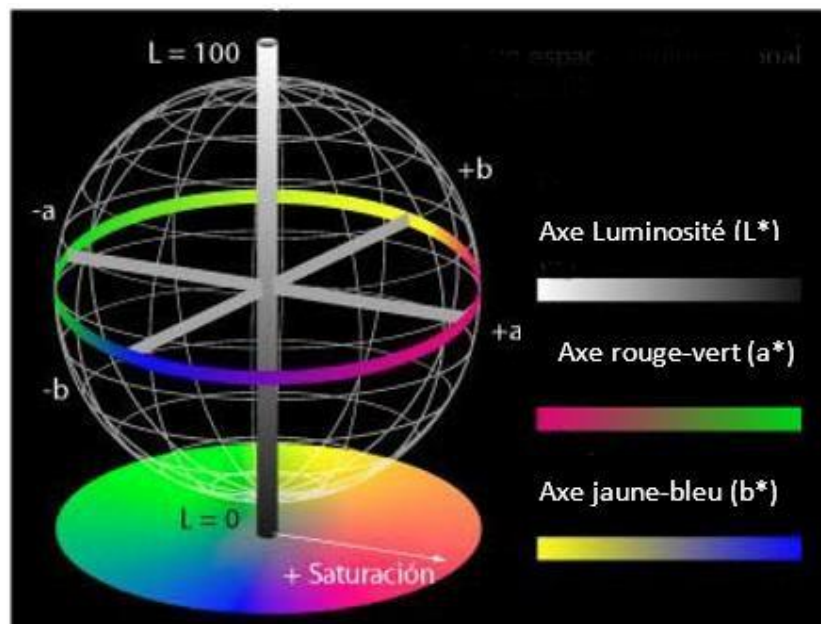
Les spectres de masse d'ionisation électronique ont été enregistrés à 70 eV dans la plage 30-250 UMA. Les pics ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse, leurs temps de rétention et leurs indices de rétention linéaire (RI) à ceux obtenus à partir des étalons authentiques. L'aire de pic de chaque composé a été obtenue à partir du chromatogramme d'extraction d'ions (CEI) en sélectionnant les ions cibles pour chacun. Les concentrations des acides organiques volatils ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage d'acides propionique, isobutyrique, butyrique et 2-éthylbutyrique. Les concentrations ont été exprimées en ppm.

#### I.2.1.7. Analyse de la couleur

La couleur superficielle des olives a été analysée en utilisant un spectrophotomètre Color-view TM BYK-Gardner, modèle 9000 (Silver Spring, Etats-Unis) (Figure 12), équipé d'un système informatique pour calculer les paramètres de couleur CIE (Figure 13) : L\* (luminosité), a\* (intensité rouge-vert), b\* (intensité jaune-bleu), selon la méthode décrite par García-Serrano *et al.* (2020b). Dix olives non endommagées et séchées superficiellement à l'aide d'un papier absorbant, ont été analysées séparément. Les interférences de la lumière ambiante sont minimisées en couvrant les olives à l'aide d'une capsule de couleur noir mat à l'intérieur. Les valeurs de la couleur sont exprimées par la moyenne de 10 mesures.



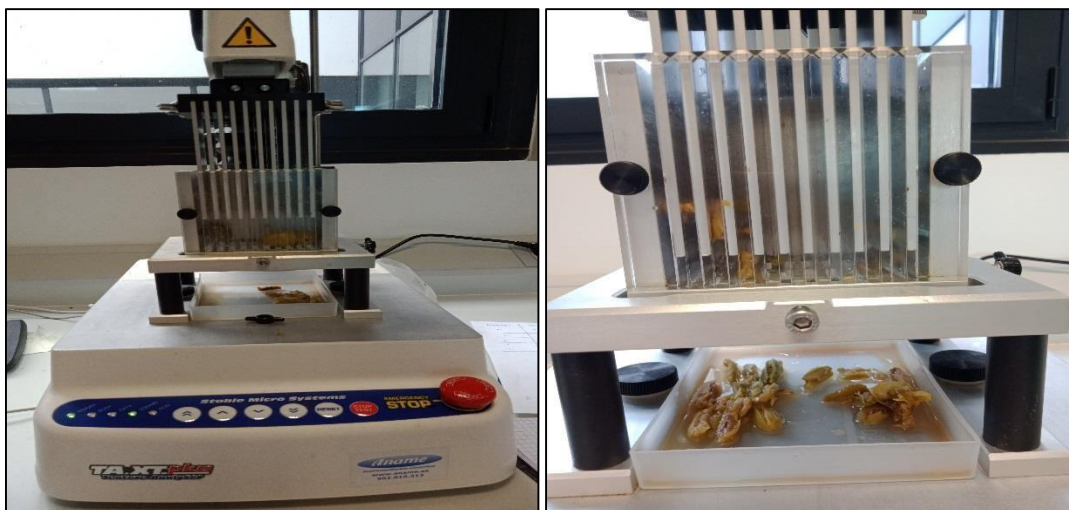
**Figure 13** : Spectrophotomètre Color-view TM BYK-Gardner, modèle 9000 (Silver Spring, Etats-Unis)



**Figure 14** : Représentation tridimensionnelle de l'espace de couleur CIE lab (Bautista-Gallego, 2012)

#### I.2.1.8. Analyse de la texture

La texture a été déterminée en utilisant une cellule Kramer compression-cisaillement couplé à un analyseur de textureur TA.TX plus (Stable Microsystems, Royaume-Uni) (Figure 14). La texture a été déterminée comme la force nécessaire pour casser « mâcher » à une vitesse de compression de 200 mm/min de 3 olives dénoyautées, qui ont été pesées au préalable (García-Serrano *et al.*, 2020b).



**Figure 15** : Cellule Kramer compression-cisaillement couplé à un analyseur de textureur TA.TX plus (Stable Microsystems, Royaume-Uni)

La texture est représentée par la moyenne de 10 mesures, chaque mesure est effectuée sur 3 olives dénoyautées et elle est exprimée en Newton/100 g d'olives dénoyautées.

#### **I.2.1.9. Analyse des acides triterpéniques**

Les acides triterpéniques (acide maslinique et l'acide oléanolique) ont été extraits à partir de la pulpe d'olives fraîches et d'olives fermentées selon la méthode décrite par Romero *et al.* (2010). 20 g de la pulpe d'olive sont broyés et desséchés à 105 °C jusqu'à la stabilité de poids. 1 g d'olives desséchées est mélangé avec 4 ml de la solution méthanol/éthanol (1:1 v/v) dans des tubes de centrifugation de volume de 10 ml. Le mélange est ensuite vortexé pendant 1 min et centrifugé à 9500g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant (solvant) est pipeté à l'aide d'une pipette pasteur et introduit directement dans un ballon d'évaporation. L'extraction est répétée six fois. Le solvant est évaporé de l'extrait à l'évaporateur rotatif (Buchi, Suisse) à une température de 35 - 40 °C jusqu'à l'évaporation totale du solvant, et le résidu sec est ensuite dissous dans 2 ml de méthanol.

La solution a été filtrée à travers un filtre de nylon de 0,22 µm de diamètre des pores (RephiQuik, Chine) et 20 µl ont été injectés à l'HPLC. Le système chromatographique et la colonne sont les mêmes que ceux utilisés pour l'analyse des composés phénoliques (Ramirez *et al.*, 2014).

#### **I.2.2. Analyses microbiologiques**

Les analyses microbiologiques des échantillons de la saumure ont porté sur la recherche et le dénombrement de la flore mésophile totale, des entérobactéries, les bactéries lactiques, les levures et les moisissures.

Des séries de dilutions décimales de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  ont été préparées à partir des échantillons de la saumure dans 9 ml d'eau physiologique (9 g/l NaCl).

Les échantillons de saumure Sig.4 bien homogénéisés, et leurs dilutions décimales appropriées ont étéensemencés, à raison de deux répétitions pour chaque dilution. Pour l'échantillon Sig.4, l'ensemencement en masse a été effectué en incorporant 1 ml de la saumure dans une boîte de pétri vide, ensuite le milieu de culture approprié en surfusion (45 °C) a été coulé. Après une légère homogénéisation par des mouvements circulaires, les boîtes de pétri ont été laissées solidifier et ensuite incubées.

Les échantillons des saumures industrielles bien homogénéisés et leurs dilutions décimales appropriées, ont étéensemencés dans des boîtes de pétri remplies de différents

milieux de cultures gélifiés, en utilisant un encemenceur spiral (Don Whitley Sci. Ltd., Royaume-Uni) (Figure 15). Deux répétitions ont été réalisées pour chaque dilution.



**Figure 16** : A : Encemenceur spiral (Don Whitley Sci. Ltd., Royaume-Uni)  
B : Compteur de colonies automatique Scan 500 (Interscience, France)

Après incubation à une température optimale et une durée appropriée pour chaque groupe microbien, un comptage de colonies a été effectué à l'aide d'un compteur de colonies automatique Scan 500 (Interscience, France) (Figure 15). Les résultats sont exprimés en logarithme décimal Unité Formant Colonie par ml de la saumure (Log UFC/ml).

### **I.2.2.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale**

La recherche et le dénombrement de la flore totale ont été effectués sur la gélose standard de numérotation Plate Count Agar (PCA) (Sigma-Aldrich, Etats-Unis). La lecture des boîtes est faite après 48 h d'incubation à 32 °C.

### **I.2.2.2. Dénombrement des bactéries lactiques**

Le dénombrement des bactéries lactiques a été réalisé sur gélose Man-Regosa-Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostics, France) additionné de 0,02 % (w/v) d'azide de sodium (Sigma-Aldrich, Etats-Unis). La spécificité que confère le milieu MRS avec l'azide de sodium, permet exclusivement la croissance des bactéries lactiques. L'incubation est faite à 32 °C pendant 48h.

### **I.2.2.3. Dénombrement des entérobactéries**

Le dénombrement des entérobactéries a été effectué sur gélose Glucosée Biliée au Cristal Violet et au Rouge Neutre (VRBG) (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) qui est le milieu spécifique des entérobactéries. La lecture des boîtes est faite après 24 h d'incubation à 37 °C.

#### **I.2.2.4. Dénombrement des levures et des moisissures**

La recherche et le dénombrement des levures et des moisissures ont été effectués sur le milieu Yeast Malt Agar (Oxoid Ltd., Royaume-Uni), additionné de l'antibiotique oxytétracycline (0,01 %) (Oxoid Ltd., Royaume-Uni), qui permet exclusivement la croissance des levures et des moisissures. L'incubation est faite à 32 °C pendant 48 h.

#### **I.2.2.5. Identification moléculaire des entérobactéries**

L'identification moléculaire des isolats des entérobactéries est réalisée par le séquençage du gène 16S ARNr, selon les étapes suivantes :

##### **I.2.2.5.1. Isolement et purification des colonies**

Quatre colonies d'entérobactéries isolées sur la gélose VRBG (échantillon Ver.2) ont été sélectionnées selon leurs caractéristiques morphologiques (taille, forme et couleur). Les colonies sélectionnées ont été ensuite purifiées par repiquage sur la gélose VRBG et ceci pour vérifier la pureté des isolats.

##### **I.2.2.5.2. Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN des isolats a été réalisée selon la méthode décrite par Ruiz-Barba *et al.* (2005). A partir d'une culture pure sur la gélose VRBG, une colonie a été prélevée à l'aide d'une anse en plastique stérile et mise en suspension dans 100 µl d'eau distillée stérile dans un tube de microcentrifugeuse. Ensuite, 100 µl de la solution chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1 v/v) ont été ajoutés à la suspension. La solution est vortexée pendant 5 secondes, et ensuite centrifugée à 13000g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant contenant l'ADN en suspension a été pipeté délicatement dans un autre tube pour amplification.

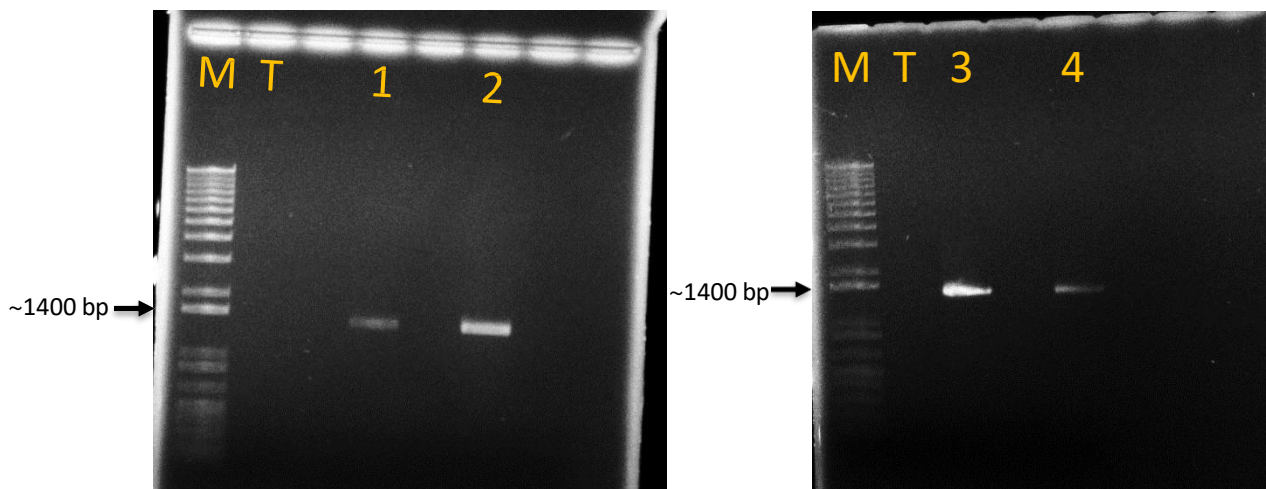
##### **I.2.2.5.3. Amplification du gène 16S ARNr par PCR**

Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (~1400 pb) est amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir des ADNs génomiques extraits précédemment, en utilisant les amorces 8f (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGA-CTT-3'), selon la méthode décrite par Pérez-Díaz *et al.* (2019).

Pour chaque colonie, une réaction d'amplification est réalisée dans des tubes de PCR de 0,2 ml. Le volume final de la réaction est de 25 µl contenant : 5 µl de l'échantillon d'ADN, 12,9 µl d'eau stérile (Biorad, Espagne), 5 µl de tampon (5x) (Bioline, Espagne), 1 µl de l'amorce

direct 8f (10  $\mu$ M) (Biomol, Espagne), 1  $\mu$ l de l'amorce indirect 1492r (10  $\mu$ M) (Biomol, Espagne) et 0,1  $\mu$ l de MyTaq Polymerase (5U/ $\mu$ l) (Bioline, Espagne). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur modèle T100TM Thermal cycler (Bio-Rad, Espagne), selon le programme d'amplification qui consiste à 1 cycle de 4 min à 94 °C suivi de 25 cycles de 1 min à 94 °C, 2 min à 57 °C, et 2 min à 72 °C, avec une étape d'extension finale de 7 min à 72 °C.

Le produit d'amplification est vérifié sur un gel d'agarose à 1 % (w/v) dans le tampon TBE (1x), la migration est effectuée à un voltage de 65 V pendant 45 min. Après la migration des amplicons, le gel d'agarose est plongé dans le bromure d'éthidium (0,5  $\mu$ g/ml) (Thermofisher, Royaume-Uni) pendant 15 min., puis le gel est placé dans un bain d'eau pour rinçage pendant 15 min. Par la suite, le gel est visualisé sous UV (Enduro GDS, Etats-Unis), à une longueur d'onde de 260 nm (Figure 16).



**Figure 17 :** Photos des gels montrant les bandes d'ADN du gène 16S ARNr des 4 colonies isolées

M : Marqueurs de poids moléculaire ; T : Témoin (-)

#### I.2.2.5.4. Purification de l'ADN

La purification des amplicons du gène 16S ARNr a été effectuée en utilisant le kit SureClean Plus (Bioline Reagents Ltd, Royaume-Uni), cette solution élimine les protéines (les polymérase), les amorces, les amorces-dimères et les dNTPs. La purification est réalisée selon le protocole fourni par le fabricant, et qui est décrit comme suit :

Initialement, 6  $\mu$ l co-précipitant rose (réactif 1 du kit SureClean Plus) ont été ajoutés à 20  $\mu$ l de l'échantillon d'ADN, la solution est mélangée délicatement pendant 30 secondes, le co-précipitant est ajouté afin de faciliter la visualisation du précipité d'ADN purifié. Ensuite, un volume de 20  $\mu$ l de la solution SureClean (Bioline Reagents Ltd, Royaume-Uni) a été ajouté à

l'échantillon de l'ADN, et mélangé délicatement. Après le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min, par la suite, la solution est centrifugée à 14000 g pendant 10 min à température ambiante, le surnageant est aspiré délicatement et jeté. Un volume de 40 µl de l'éthanol (70 %) est ajouté et ensuite vortexé pendant 10 secondes, la solution est ensuite centrifugée à 14000 g à température ambiante pendant 10 min, le surnageant a été délicatement aspiré et jeté. Enfin, le précipité a été laissé sécher à l'air libre pour l'évaporation totale de l'éthanol. Le précipité est dilué dans 20 µl dans l'eau distillée et conservé à -20 °C.

Pour l'identification des isolats d'*Enterobacteriaceae*, 10 µl de chaque amplicon d'ADN ont été envoyés au laboratoire STABVIDA (Portugal) pour le séquençage du gène 16S ARNr.

### **I.2.3. Analyse métagénomique**

L'analyse métagénomique est effectuée en analysant le gène 16S ARNr bactérien qui mesure environ 1400 pb et contient neuf régions variables séparées par des régions conservées. Les régions variables du gène 16S ARNr sont utilisées pour l'identification et la classification phylogénétique de la population bactérienne. Dans notre étude, nous avons appliqué cette technique pour identifier l'ensemble du microbiote dans les échantillons de saumures industrielles (Sig.1c ; Ver.1a ; Sev.1 ; Sev.2 ; Ver.2 ; Sig.3a ; Sig.3b et Sig.3d) qui sont sélectionnés à la suite de certaines anomalies révélées par l'analyse des paramètres physico-chimiques et microbiologiques tels que le pH élevé, le taux de sel réduit, la détection des entérobactéries et la détection des acides organiques volatils indésirables. Nous avons également effectué cette analyse sur l'ensemble des échantillons de saumures d'olives de table commerciales. De plus, des séquences d'ADN d'espaceurs à transcription interne (ITS) ont été amplifiées pour l'identification des microorganismes fongiques. Les échantillons de l'ADN purifié (environ 10 ng / µl) extraits à partir des échantillons des saumures sélectionnées ont été envoyés au service de séquençage et de bio-informatique FISABIO (Valence, Espagne) pour le séquençage massif des amplicons du gène 16S ARNr.

#### **I.2.3.1. Extraction de l'ADN**

L'ADN a été extrait à partir des échantillons de la saumure Sig.1c ; Ver.1a ; Sev.1 ; Sev.2 ; Ver.2 ; Sig.3a ; Sig.3b et Sig.3d et dans l'ensemble des échantillons des saumures d'olives de tables commerciale à l'aide d'un kit d'isolement d'ADN microbien PowerFood® (MoBio, Etats-Unis). Ce kit est constitué de 6 solutions nommées de PF1 à PF6, des tubes de collecte de 2 ml, des tubes à microbilles, et des colonnes de filtration. L'extraction de l'ADN est basée sur

---

une lyse mécanique et chimique des cellules microbiennes et une purification. La procédure d'extraction (Figure 17) est réalisée selon le protocole fourni par le fabricant.

Pour chaque échantillon, un volume de 10 ml de la saumure a été centrifugé à 9000 g pendant 20 min à 5 °C, le précipité obtenu a été lavé deux fois avec une solution saline (NaCl 0,9 %), ensuite, il a été mis en suspension dans 450 µl de la solution PF1 préchauffée à 55 °C. Cette solution permet la lyse cellulaire, et l'élimination des matières organiques et inorganiques non ADN.

Après, la suspension a été transférée dans un tube à microbilles et vortexée pendant 10 min, et centrifugée à 13000 g pendant une minute à température ambiante. Dans cette étape, les cellules microbiennes sont lysées en utilisant la combinaison d'une lyse chimique (solution PF1) et mécanique (vortex), et les débris cellulaires sont précipités, tandis que l'ADN reste dans le surnageant.

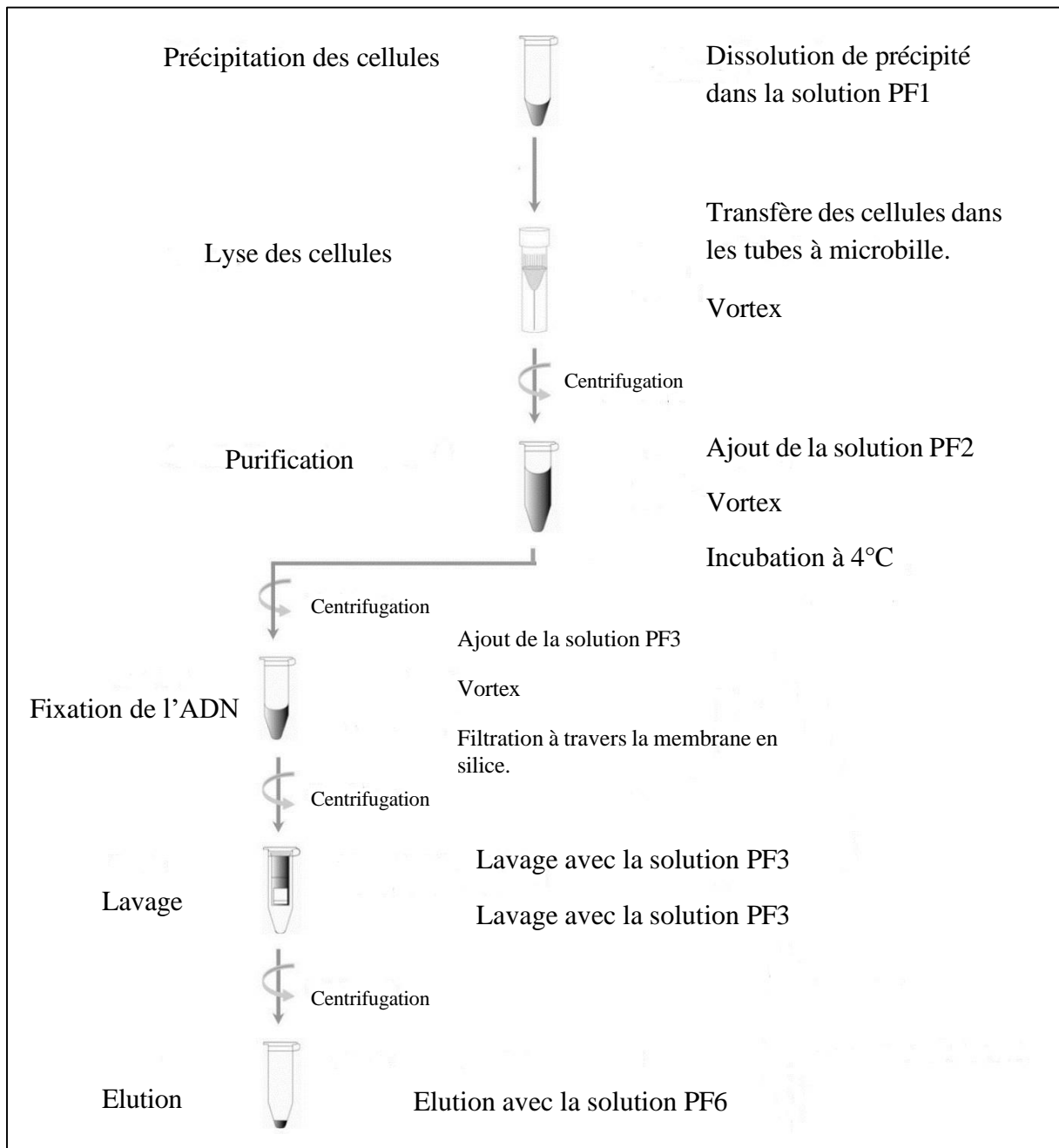
Ensuite, un volume de 400 µl du surnageant a été transféré dans un tube de collecte de 2 ml pour la purification en ajoutant 100 µl de la solution PF2. La solution est vortexée brièvement, et incubée à 4 °C pendant 5 min, et par la suite centrifugée à 13000 g pendant une minute à température ambiante. La solution PF2 est utilisée pour éliminer les matières organiques et inorganiques autres que l'ADN, y compris les débris cellulaires et les protéines.

Le surnageant a été transféré dans un autre tube de collecte de 2 ml, puis additionné de 900 µl de la solution PF3 hautement saline, cela ajustera la concentration en sel dans la solution d'ADN pour permettre la liaison de l'ADN à la membrane en silice dans l'étape suivante.

Par la suite, un volume de 650 µl du surnageant a été chargé dans une colonne de filtration avec une étape de centrifugation à 13000 g pendant une minute à la température ambiante. La solution filtrée est ensuite jetée et cette opération est répétée deux fois. Dans cette étape, l'ADN est sélectivement lié à la membrane de silice.

La colonne de filtration a été placée dans un autre tube de collecte de 2 ml, auquel ont été ajoutés 650 µl de la solution PF4 bien agitée, la solution est ensuite centrifugée à 13000 g pendant une minute à la température ambiante. La solution PF4 est une solution de lavage à base d'alcool utilisée pour nettoyer davantage l'ADN lié à la membrane filtrante en silice, elle élimine le sel résiduel et d'autres contaminants tout en permettant à l'ADN de rester lié à la membrane de silice. La solution est jetée, et pour éliminer totalement la solution PF4, un volume de 650 µl de la solution PF5 a été ajouté, suivi d'une centrifugation à 13 000 g pendant une

minute à la température ambiante, la solution est jetée, et centrifugé à nouveau à 13 000 g pendant 2 min.



**Figure 18** : Protocole d'extraction de l'ADN par le kit d'isolement d'ADN microbien PowerFood® (MoBio, Etats-Unis)

Enfin, la colonne de filtration a été placée dans un autre tube de 2 ml, pour l'élution de l'ADN retenu dans la membrane de la colonne, 100 µl de la solution PF6 ont été ajoutés au centre de la membrane, et centrifugé à 13000 g pendant une minute à la température ambiante, la membrane a été jetée. Lorsque la solution PF6 traverse la membrane, l'ADN qui a été lié en

présence d'une forte teneur en sel est sélectivement libéré. La solution contenant l'ADN est immédiatement conservée à -20 °C pour analyse ultérieure.

#### **I.2.4. Etude de la survie des bactéries pathogènes dans la saumure des olives de tables commerciales**

Quatre bactéries pathogènes ont été choisies pour étudier leur survie dans la saumure. Quatre souches de chaque espèce ont été obtenues auprès de la Collection Espagnole de Cultures de Types (CECT) (Valence, Espagne). *Listeria monocytogenes* CECT 4031T, CECT 4032, CECT 5366 et CECT 7467 ont été incubées à 37 °C dans le bouillon BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid Ltd., Royaume-Uni) avec ou sans 1,5 % d'agar. *Staphylococcus aureus* CECT 86T, CECT 239, CECT 240 et CECT 976 ; *Salmonella enterica* CECT 722T, CECT 443, CECT 4156, et CECT 4300 ; *Escherichia coli* CECT 434, CECT 4267, CECT 4782 et CECT 5947 ont été incubées à 37 °C dans un bouillon nutritif préparé avec 5 g/l de poudre d'extrait de bœuf (Oxoid Ltd., Royaume-Uni), 10 g/l de peptone bactériologique neutralisé (Oxoid Ltd., Royaume-Uni), 5 g/l de NaCl et 15 g/l de l'agar dans le cas d'un milieu solide (pH 7,2). Toutes les espèces ont été maintenues à -80 °C dans des bouillons de culture adéquats contenant 20 % de glycérol. Avant les expérimentations, chaque souche est incubée en deux fois dans leurs bouillons respectifs avec une phase de préadaptation préalable où du NaCl (3%) a été ajouté pour adapter les bactéries aux saumures des olives. Les cultures d'une nuit ont été centrifugées, lavées et remises en suspension dans une solution saline stérilisée (NaCl à 0,9%). Des mélanges de chaque espèce ont été obtenus en associant des quantités égales des souches correspondantes. Les volumes ont été calculés pour obtenir 7,09 à 7,32 log UFC/ml comme inoculum initial lorsque 50 µl de la suspension ont été ajoutés à 5 ml des différentes saumures testées. Les saumures d'olives de table commerciales ont été stérilisées sur filtre (taille des pores de 0,22 µm) avant l'inoculation. Les tests de survie ont été réalisés en double à température ambiante (20 ± 2 °C). Des échantillons de chaque tube ont été prélevés à différents moments et étalés sur le milieu solide approprié pour compter les cellules cultivables.

#### **I.2.5. Analyses statistiques**

Les données sont exprimées en valeurs moyennes ± écart type. Le logiciel Statistical version 7.0 (Statistical for Windows, Etats-Unis) a été utilisé pour le traitement des données. La comparaison entre les valeurs moyennes a été effectuée par une analyse de la variance unidirectionnelle suivie par le test de plage multiple de Duncan. Les différences étaient considérées significatives lorsque  $p < 0,05$ .

## *Résultats et discussion*

## II. Résultats et discussion

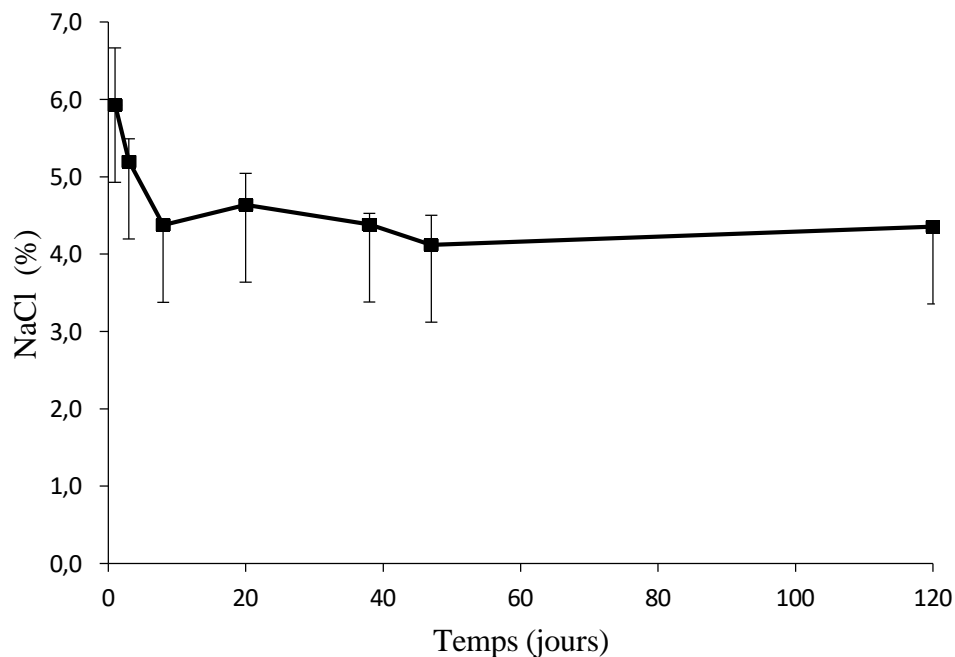
### II.1. Résultats des analyses physico-chimiques

#### II.1.1. Analyse du NaCl

Le sel est un composant essentiel dans la fermentation des olives de table. Il est ajouté principalement pour inhiber les microorganismes indésirables par réduction de l'activité de l'eau, de plus, il est ajouté pour améliorer le goût et la texture. En plus, il joue un rôle important dans la diffusion des différents composants dans la saumure qui sont nécessaires à la fermentation (Mateus *et al.*, 2016). Selon la norme commerciale applicable aux olives de table (COI, 2004), la concentration minimale de NaCl de la saumure à l'équilibre est de 5 %.

La concentration initiale du NaCl des échantillons de saumures analysées est variable entre les 4 industries, elle est comprise entre 8 et 16 % (Tableau VIII).

En ce qui concerne l'évolution du NaCl durant la fermentation des olives de la variété *Sigoise* (Sig.4), au premier jour de la fermentation, la concentration du NaCl est de l'ordre de  $5,9 \pm 0,7$  %. Nous remarquons que la concentration diminue dès le premier jour de la fermentation par rapport à la concentration initiale qui était de 8 %. Ceci est dû à la pénétration du sel dans la pulpe d'olive. Après une semaine, la concentration continue de diminuer légèrement pour atteindre l'équilibre à une valeur de  $4,3 \pm 0,0$  % à la fin du processus (Figure 18).



**Figure 19 :** Evolution de la concentration du NaCl (%) au cours de la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Selon le Tableau VIII, la concentration du NaCl dans les différents échantillons de la saumure est comprise entre  $3,2 \pm 0,6$  et  $12,6 \pm 0,5$  %. Les résultats révèlent que presque la moitié des échantillons des saumures analysées ont un taux de sel inférieur à 5 %, ces résultats nous amènent à supposer qu'il y avait un manque de contrôle et de correction par l'ajout du sel pour maintenir la concentration minimale nécessaire, afin de prévenir l'altération et d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes pendant le processus de la fermentation. Hurtado *et al.* (2012) ont considéré que la concentration du NaCl dans la saumure est l'un des paramètres les plus importants qui doivent être contrôlés, non seulement pour s'assurer que la fermentation est correcte, mais aussi pour maintenir la concentration constante et ajouter le sel si nécessaire.

**Tableau VIII** : Concentration du NaCl (%) dans les saumures industrielles

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Concentration du NaCl (%)
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	$8,4 \pm 0,2^a$
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	$8,4 \pm 0,2^a$
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	$7,4 \pm 0,0^a$
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	$6,2 \pm 0,4^b$
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	$6,3 \pm 0,3^b$
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	$4,3 \pm 0,1^{cde}$
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	$3,2 \pm 0,6^{cde}$
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	$7,6 \pm 0,0^a$
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	$3,9 \pm 0,1^{cde}$
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	$4,3 \pm 0,2^{cde}$
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	$5,8 \pm 0,2^b$
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	$4,3 \pm 0,0^{de}$
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	$12,6 \pm 0,5^{cde}$
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	$5,2 \pm 1,6^{cde}$
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	$3,6 \pm 0,2^{cde}$
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	$4,0 \pm 0,1^f$
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	$3,8 \pm 0,2^{be}$

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Comparativement aux travaux réalisés par De Castro *et al.* (2018 et 2019) et Lucena-Padros et Ruiz-Barba (2019), durant le processus de la fermentation des olives de table de variétés *Manzanilla* et *Gordal*, la concentration du NaCl à l'équilibre est comprise entre 5,4 et 7 %, et elle est maintenue à 6,4 % tout au long du processus dans les travaux de Bautista-Gallego *et al.* (2013).

De Castro *et al.* (2018) ont remarqué que les échantillons de la saumure à faible concentration en NaCl (3,5 - 3,9 %) dégagent une odeur désagréable typique de la fermentation butyrique et putride. De plus, Tataridou et Kotzekidou (2015) ont considéré qu'une concentration du NaCl inférieure à 4 % est insuffisante pour les fermentations spontanées, car le pH diminue lentement au cours du processus. Cette faible concentration induit à la formation d'une couche de moisissure à la surface des cuves de fermentation, ce qui provoque également l'altération des olives fermentées.

**Tableau IX:** Concentration du NaCl (%) dans les saumures d'olive de table commerciales

Type	Echantillon	NaCl (%)
Olives vertes style Espagnol	1	3,6 ± 0,1 <sup>g</sup>
	2	5,4 ± 0,0 <sup>b</sup>
	3	2,6 ± 0,0 <sup>j</sup>
	4	4,6 ± 0,0 <sup>d</sup>
	5	3,7 ± 0,1 <sup>f</sup>
	6	6,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
	7	4,1 ± 0,0 <sup>e</sup>
Olives naturelles tournantes	8	5,5 ± 0,1 <sup>b</sup>
	9	5,3 ± 0,1 <sup>c</sup>
	10	3,3 ± 0,0 <sup>i</sup>
Olives noires oxydées	11	3,4 ± 0,0 <sup>hi</sup>
	12	3,4 ± 0,1 <sup>hi</sup>
	13	3,5 ± 0,1 <sup>h</sup>

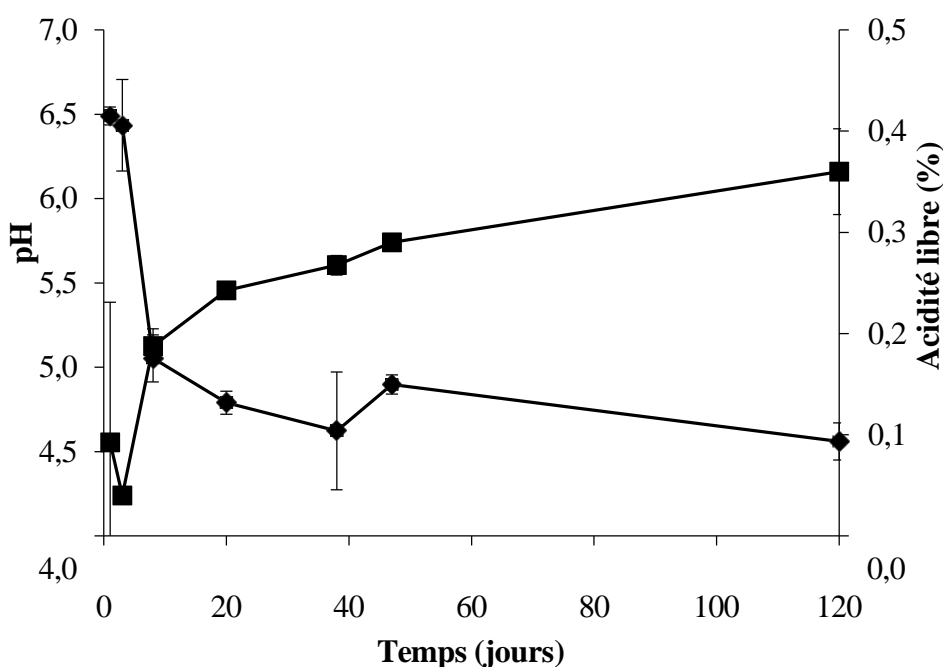
Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart-type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Dans le cas des olives de tables commerciales, la concentration du NaCl est également cruciale pour déterminer la qualité du produit final. La norme Codex établit une concentration minimale de 5 % pour les olives non pasteurisées de style Espagnol et de 6 % pour les olives naturelles. Compte tenu de ce paramètre, seuls les échantillons 2 et 6 se situent dans la plage autorisée, les autres échantillons présentent des concentrations inférieures aux limites minimales établies (Tableau IX). Le non-respect de ces réglementations met en évidence la nécessité d'ajuster les processus de production et d'emballage pour garantir la sécurité et la qualité du produit fini. La norme Codex est plus souple lorsque le produit fini a subi un traitement de pasteurisation atteignant un minimum de 15 Unités de Létabilité. Dans ce cas, il n'y a pas d'exigences concernant les valeurs minimales du sel, mais une valeur maximale du pH de 4,3 doit toujours être respectée. Le maintien d'une concentration appropriée du NaCl influence

à la fois les caractéristiques organoleptiques et la stabilité microbiologique du produit (Kailis et Harris, 2007 ; Medina-Pradas et Arroyo-López, 2015 ; Medina-Pradas *et al.*, 2017). Des faibles concentrations du sel permettent la croissance des micro-organismes indésirables, notamment d'altération et pathogènes, compromettant la sécurité sanitaire des consommateurs.

### II.1.2. Analyse du pH et de l'acidité libre

Les courbes illustrées en Figure 19, représentent l'évolution du pH et l'acidité libre dans la saumure au cours de la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4). Tandis que le Tableau X, indique les valeurs du pH et de l'acidité libre des échantillons des saumures industrielles.



**Figure 20 :** Evolution du pH et de l'acidité libre (%) au cours de la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Au premier jour, avant que la fermentation s'installe, le pH était de  $6,4 \pm 0,05$  et à partir de la première semaine de la fermentation, le pH diminue progressivement pour atteindre une valeur de  $4,6 \pm 0,11$  au 120<sup>ème</sup> jour de la fermentation. La diminution du pH est relativement liée à la production de l'acidité (Sánchez *et al.*, 2000).

Les valeurs du pH indiquées dans le Tableau X varient entre 4,3 et 5. Nous avons remarqué que plus de la moitié des échantillons analysés ont montré des valeurs de pH élevées (4,7 - 5,0), rappelant que les échantillons Sig. 2a ; Sig. 2b ; Sig. 3a et Sig. 3b sont au troisième mois de la fermentation et les échantillons Sig. 3e ; Ver. 1a ; Ver. 1b et Sev. 2 sont au quatrième

mois de la fermentation. Les résultats des valeurs du pH sont supérieurs par rapport à celles rapportées par d'autres auteurs (Aponte *et al.*, 2012 ; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2013 et 2014 ; Tataridou et Kotzekidou, 2015 ; Lucena-Padrós et Ruiz-Barba, 2019) qui ont trouvé des valeurs de pH inférieures à 4,6 à la phase finale de la fermentation des différentes variétés d'olives de table vertes élaborées à la méthode style Espagnol. Le pH élevé de certaines saumures industrielles au-dessus de 4,6 indique qu'une fermentation lactique appropriée ne s'est pas produite.

**Tableau X** : Valeurs du pH et de taux d'acidité libre des échantillons des saumures industrielles

Echantillon (code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	pH	Acidité libre (%)
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	4,5 ± 0,0 <sup>ab</sup>	0,79 ± 0,04 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	4,6 ± 0,0 <sup>bc</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>a</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	4,8 ± 0,1 <sup>cd</sup>	0,66 ± 0,02 <sup>ab</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	5,0 ± 0,1 <sup>e</sup>	0,49 ± 0,09 <sup>cb</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	5,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,47 ± 0,08 <sup>cb</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	4,8 ± 0,1 <sup>cd</sup>	0,63 ± 0,05 <sup>ab</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	4,8 ± 0,1 <sup>df</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>c</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	4,4 ± 0,0 <sup>ga</sup>	0,43 ± 0,06 <sup>cb</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	4,7 ± 0,1 <sup>bcd</sup>	0,46 ± 0,07 <sup>cb</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	4,9 ± 0,1 <sup>def</sup>	0,27 ± 0,08 <sup>c</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	4,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	0,61 ± 0,06 <sup>ab</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	4,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>c</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	4,3 ± 0,0 <sup>bcd</sup>	0,85 ± 0,11 <sup>c</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	4,5 ± 0,0 <sup>ef</sup>	0,64 ± 0,07 <sup>ab</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	4,7 ± 0,1 <sup>ab</sup>	0,38 ± 0,05 <sup>a</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	4,9 ± 0,1 <sup>g</sup>	0,63 ± 0,31 <sup>a</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	4,6 ± 0,0 <sup>ab</sup>	0,74 ± 0,08 <sup>ab</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Le pH est considéré comme un facteur principal dans la fermentation des produits végétaux et précisément les olives de table, il est largement discuté dans la littérature scientifique. En effet, Lanza *et al.* (2013) ont considéré qu'une diminution lente du pH pendant la fermentation induit une détérioration due aux entérobactéries et à d'autres groupes microbiens. Le maintien du pH en dessous de 4,6 est recommandé afin de prévenir la germination des spores de *Clostridium botulinum* (Medina *et al.*, 2017 ; Valero *et al.*, 2017 et 2020).

Concernant l'acidité libre, une augmentation a été observée durant toute la phase de la fermentation allant d'une concentration de  $0,09 \pm 0,14$  % jusqu'à  $0,36 \pm 0,04$  % à la fin de la fermentation comme l'indique la Figure 19. L'augmentation de l'acidité libre au cours du processus de fermentation est expliquée selon Mateus *et al.* (2016) par l'effet des différents facteurs : la diffusion progressive et la solubilisation des composés comme les acides organiques (acide citrique, acide malique) à partir des tissus de l'olive ; la production des acides organiques (l'acide acétique et l'acide lactique) résultant de l'activité de certains microorganismes ; l'augmentation des acides gras libres résultant de l'activité enzymatique des estérases et lipases présents dans le tissu de l'olive ou produites par des micro-organismes.

D'après le Tableau X, la majorité des échantillons des saumures industrielles ont une acidité comprise entre 0,43 et 0,85 %. Cependant les échantillons Sig. 3e ; Sig. 3b ; Sig. 4 et Ver. 2 maintiennent une faible acidité avec des valeurs de  $0,27 \pm 0,08$  ;  $0,34 \pm 0,02$  ;  $0,36 \pm 0,04$  et  $0,38 \pm 0,05$  %, respectivement.

Généralement, une acidité élevée est atteinte à la phase finale de la fermentation. En effet, Lucena-Pradós et Ruiz-Barba (2019) ont trouvé des taux d'acidité plus élevés (0,7 - 1,02 %) au stade final de la fermentation (92 - 177 jours) dans des saumures d'olives de table industrielles de la variété *Manzanilla*. À l'inverse, Chranioti *et al.* (2018) ont signalé une faible acidité lors de la fermentation des olives de la variété *Conservolea* et ceci a été attribué à la faible teneur en sucres dans la saumure, comme observé dans notre étude (voir paragraphe II.1.3). De Castro *et al.* (2019) ont également obtenu des valeurs d'acidité inférieures à 0,4 % dans des saumures d'olives de table non inoculées de variétés *Manzanilla* et *Gordal* au 120<sup>ème</sup> jour de la fermentation, et cette faible concentration a été corrigée par l'addition du glucose pour atteindre des valeurs d'environ 0,6 % en prolongeant le temps de la fermentation.

En général, une combinaison d'une concentration de sel supérieure à 5 % et un pH inférieur à 4,0 sont des facteurs limitant la croissance microbienne indésirable et garantissent les bonnes conditions de conservation (Rejano-Navarro *et al.*, 2010 ; Arroyo-López *et al.*, 2012 ; Tataridou et Kotzekidou, 2015).

Les valeurs du pH retrouvées dans les saumures d'olive de tables commerciales variaient entre 3,6 et 4,7 pour les olives vertes style Espagnol et les olives naturelles tournantes (Tableau XI). La réglementation du Codex (Codex Alimentarius, 2013) établit une limite maximale du pH de 4,3 pour ces types d'olives conditionnées, cela signifie que 4 échantillons ne sont pas conformes.

Comme nous l'avons discuté, au cours de la cette fermentation, il y a une diminution du pH et une augmentation de l'acidité, et normalement une valeur du pH de 4,3 est atteinte. Plusieurs raisons peuvent empêcher d'atteindre ces limites, comme une faible concentration des sucres initiaux dans le fruit, les traitements alcalins vigoureux, les multiples étapes de lavage qui réduisent considérablement la matière fermentescible, ou encore la prédominance des levures au lieu des BL (Mettouchi *et al.*, 2016 ; Sab *et al.*, 2021). Dans les échantillons de saumures commerciales, le taux des sucres (saccharose, glucose, fructose et mannitol) dans la saumure est inférieure à 0,1 % (données non présentées), ce qui signifie probablement qu'une fermentation active a eu lieu, mais l'évolution du microbiote au cours de la fermentation est inconnue.

La norme Codex n'a pas établi de limites minimales d'acidité. Cependant, la « Norme commerciale applicable aux olives de table » du Conseil Oléicole International (COI, 2004) fixe la limite d'acidité minimale de 0,5 % (acide lactique) pour les olives de table style Espagnol et de 0,3 % pour les olives naturelles, respectivement. Malgré la teneur en acide lactique et acétique (Tableau XI), aucun échantillon des 7 échantillons d'olive de table vertes style Espagnol ne répondrait à la norme, ils présentent des valeurs d'acidité libre inférieures. Il convient de noter que les acides organiques peuvent être libres dans la saumure ou combinés sous forme de sel, de sorte que la teneur analysée par HPLC est la somme de ces deux formes.

Généralement, le pH final des olives conditionnées peut être corrigé en ajoutant certains acides comestibles (Medina-Pradas *et al.*, 2017). Cependant, malgré l'ajout d'acide lactique, acétique et/ou citrique lors du conditionnement de certains échantillons comme mentionné sur les étiquettes (Tableau VII), cela n'est pas suffisant pour répondre aux exigences de qualité.

Les olives noires oxydées, en raison de leurs conditions chimiques et de leur pH élevé, nécessitent un traitement de stérilisation obligatoire après emballage (COI, 2004, Sanchez-Gomez *et al.*, 2006 ; Kailis et Harris, 2007 ; Medina *et al.*, 2018). Étonnamment, les échantillons 11, 12 et 13 sont vendus dans un emballage non stérilisé avec des conditions de pH autour de 6, une teneur en sel d'environ 3,4 % de NaCl et une acidité libre faible (0,15 %). Ces conditions ne sont pas adéquates et présentent un risque pour la santé des consommateurs.

**Tableau XI** : Valeurs du pH, taux l'acidité libre et concentrations de l'acide lactique et l'acide acétique dans les saumures d'olives de table commerciales

Type	Echantillon	pH	Acidité libre (%)	Acide lactique	Acide acétique
Olives vertes style Espagnol	1	4,7 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>f</sup>	2374 ± 127 <sup>e</sup>	561 ± 31 <sup>fg</sup>
	2	4,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>f</sup>	1950 ± 11 <sup>e</sup>	340 ± 20 <sup>g</sup>
	3	4,2 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>e</sup>	5004 ± 90 <sup>c</sup>	1144 ± 63 <sup>cd</sup>
	4	4,7 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>fg</sup>	926 ± 42 <sup>f</sup>	970 ± 31 <sup>de</sup>
	5	4,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>e</sup>	2285 ± 58 <sup>e</sup>	335 ± 9 <sup>g</sup>
	6	4,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>e</sup>	5487 ± 133 <sup>c</sup>	770 ± 9 <sup>ef</sup>
	7	4,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>e</sup>	1906 ± 209 <sup>e</sup>	1165 ± 0 <sup>bcd</sup>
Olives naturelles tournantes	8	3,8 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>a</sup>	9790 ± 251 <sup>b</sup>	2238 ± 115 <sup>a</sup>
	9	3,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,02 <sup>b</sup>	12302 ± 510 <sup>a</sup>	1503 ± 89 <sup>b</sup>
	10	4,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,06 <sup>c</sup>	3660 ± 348 <sup>d</sup>	1372 ± 145 <sup>bc</sup>
Olives noires oxydées	11	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>g</sup>	ND	1409 ± 298 <sup>bc</sup>
	12	6,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>fg</sup>	ND	1426 ± 50 <sup>bc</sup>
	13	6,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>fg</sup>	ND	1413 ± 33 <sup>bc</sup>

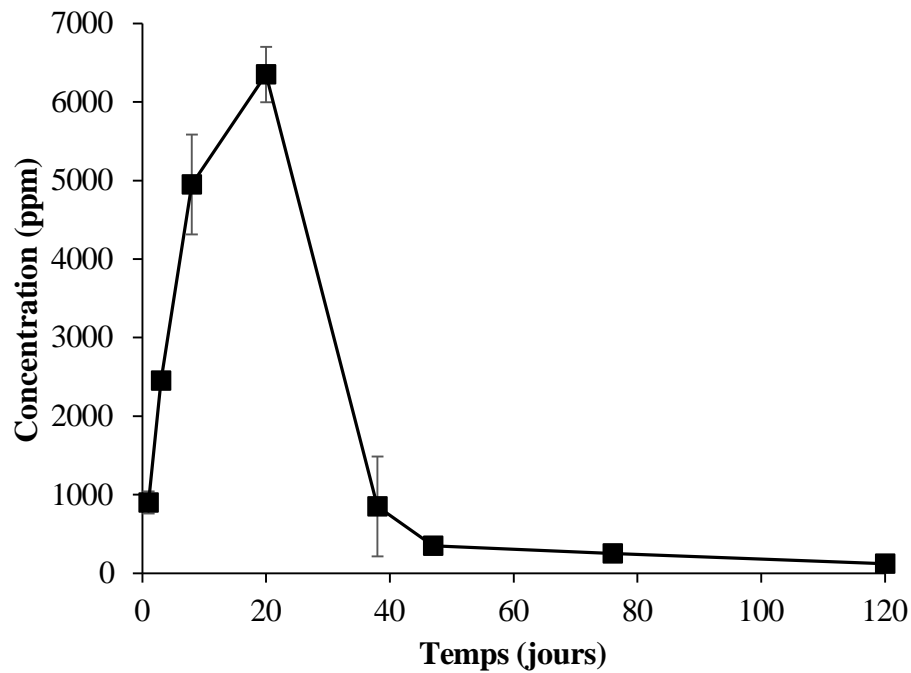
Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ). L'acide citrique, l'acide sorbique et l'acide benzoïque ne sont pas détectés dans aucun des échantillons.

### II.1.3. Analyse des sucres dans la saumure

Les sucres jouent un rôle important lors de la fermentation des olives, ils constituent une source de carbone pour les micro-organismes (Chranioti *et al.*, 2018) hétérofermentaires ou homofermentaires qui transforment ces sucres en acide lactique (Lanza, 2013), qui est essentiel à la stabilité du processus de la fermentation (Anagnostopoulos *et al.*, 2020a).

Les résultats obtenus pour l'évolution des sucres (glucose, fructose et mannitol) au cours de la fermentation sont indiqués dans les Figures 20 ; 21 et 22.

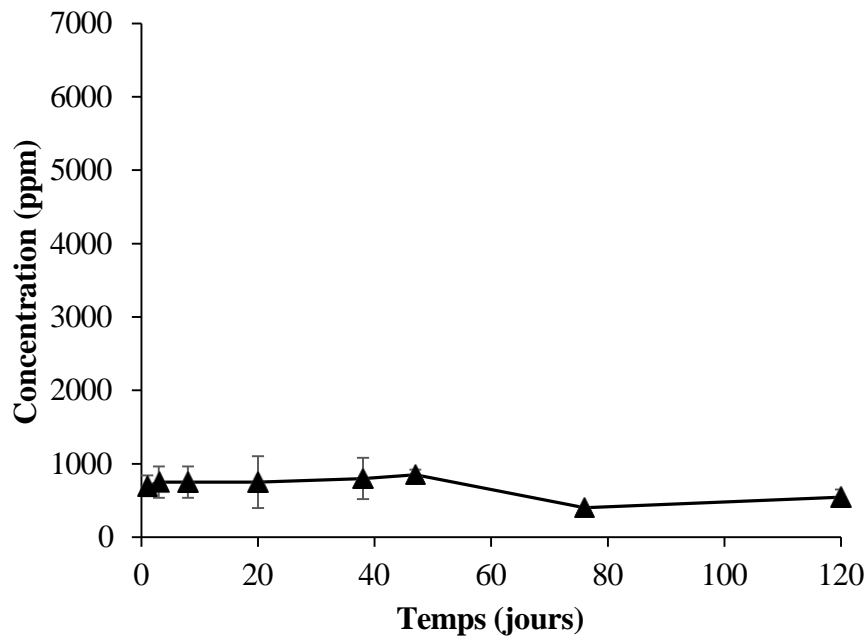
Le glucose est le principal sucre dans la saumure des olives, sa concentration atteint le maximum à une valeur de  $6350 \pm 353$  ppm au 20<sup>ème</sup> jour de la fermentation, ensuite elle diminue drastiquement au 40<sup>ème</sup> jour quand le glucose est entièrement consommé, pour atteindre une concentration de  $122 \pm 43$  ppm à la fin de la fermentation (Figure 20).



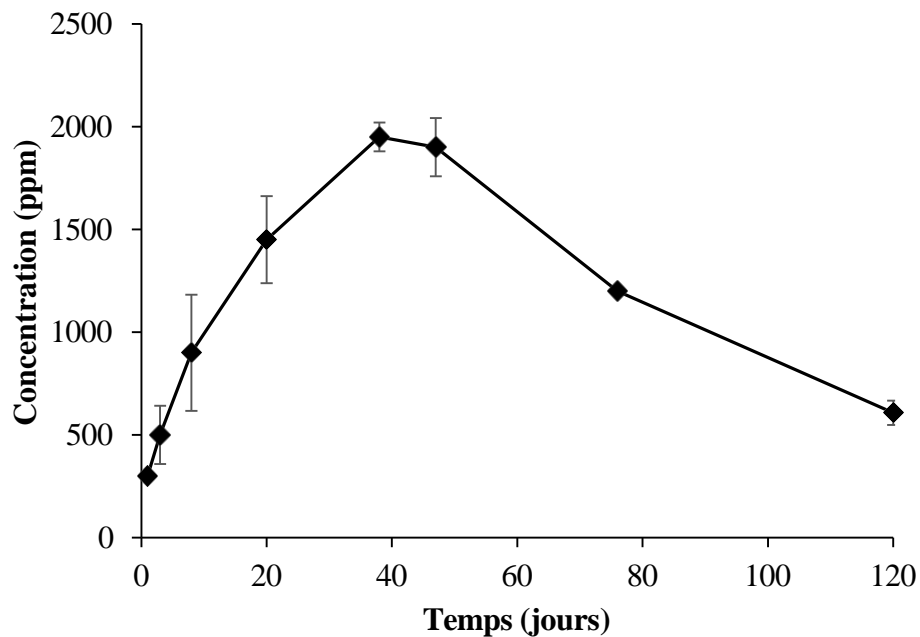
**Figure 21 :** Evolution du glucose au cours du processus de fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

L'évolution du fructose représenté dans la Figure 21 ne montre pas de changement remarquable durant la fermentation, sa concentration est faible tout au long du processus. Elle évolue à partir de  $700 \pm 141$  ppm au début de la fermentation pour atteindre  $545 \pm 103$  ppm à la fin de la fermentation.

Le mannitol atteint sa concentration maximale ( $1950 \pm 71$  ppm) dans la saumure au 40<sup>ème</sup> jour environ (Figure 22), sa consommation est faible par rapport à celle du glucose. Il montre ensuite une diminution jusqu'à la fin de la fermentation pour atteindre  $608 \pm 59$  ppm. Le saccharose n'est pas détecté au cours de la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4).



**Figure 22 :** Evolution du fructose au cours du processus de fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)



**Figure 23:** Evolution du mannitol au cours du processus de fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Selon Saúde *et al.* (2017), l'augmentation de la concentration des sucres au cours de la première phase de la fermentation résulte de leur diffusion à partir de la pulpe des olives vers la saumure, et leur diminution dans la seconde phase s'explique par leur métabolisation par des micro-organismes. La fermentation peut être considérée finie lorsque les sucres sont complètement épuisés (Tataridou et Kotzekidou, 2015).

Dans d'autres études, Sánchez *et al.* (2000) et Rodríguez-Gómez *et al.* (2012), la concentration des sucres atteint le pic durant les 4 premiers jours de la fermentation des olives de table vertes style Espagnol de variétés *Gordal* et *Manzanilla*. De plus, les concentrations signalées dans ces études sont supérieures par rapport aux valeurs trouvées dans notre étude au cours de la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4).

La diffusion tardive du glucose et sa faible concentration dans la saumure expliquent le développement retardé et la faible abondance des bactéries lactiques comme montré dans le paragraphe II.2.2.

En ce qui concerne la concentration des sucres dans les saumures industrielles résumées dans le Tableau XII, nous remarquons que le saccharose n'est pas détecté dans la plupart des échantillons. Cependant, il est détecté en faible concentration dans certains échantillons (Tableau XII), ceci est probablement dû à sa métabolisation en glucose et en fructose (Kailis et Harris, 2004).

Le glucose est détecté avec des concentrations situées entre  $57 \pm 13$  et  $4447 \pm 1398$  ppm, et il n'est pas détecté dans certains échantillons, car il est totalement métabolisé par les microorganismes. Les concentrations de fructose dans les saumures ne sont pas très variables pour tous les échantillons analysés. Comme nous l'avons constaté dans la courbe de la Figure 21, son évolution est presque stable durant la fermentation.

Le mannitol est détecté en concentration allant de  $17 \pm 1$  à  $5977 \pm 469$  ppm, sa concentration est élevée dans plusieurs échantillons. En effet, le mannitol est produit à partir du fructose par les bactéries lactiques hétéro fermentaires appartenant aux genres *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus* (Carvalho *et al.*, 2011) qui sont identifiés par le séquençage à haut débit dans nos échantillons.

**Tableau XII :** Concentrations des sucres de saccharose, glucose, fructose et mannitol en ppm dans les échantillons des saumures industrielles

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Saccharose	Glucose	Fructose	Mannitol
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	100 ± 19 <sup>a</sup>	4447 ± 1398 <sup>a</sup>	2879 ± 171 <sup>a</sup>	5977 ± 467 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	126 ± 30 <sup>ab</sup>	1905 ± 56 <sup>b</sup>	1126 ± 11 <sup>b</sup>	2848 ± 3 <sup>b</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	119 ± 50 <sup>ab</sup>	813 ± 105 <sup>cd</sup>	946 ± 116 <sup>bc</sup>	3063 ± 64 <sup>b</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	115 ± 19 <sup>ab</sup>	187 ± 23 <sup>cd</sup>	923 ± 42 <sup>bc</sup>	3408 ± 98 <sup>c</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	125 ± 19 <sup>ab</sup>	184 ± 13 <sup>cd</sup>	810 ± 28 <sup>cd</sup>	3398 ± 47 <sup>c</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	84 ± 25 <sup>a</sup>	599 ± 92 <sup>cd</sup>	657 ± 49 <sup>ef</sup>	1373 ± 61 <sup>d</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	ND <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	490 ± 30 <sup>ef</sup>	521 ± 34 <sup>efg</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	ND <sup>c</sup>	57 ± 13 <sup>d</sup>	640 ± 96 <sup>def</sup>	346 ± 16 <sup>efg</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	ND <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	492 ± 98 <sup>ef</sup>	17 ± 1 <sup>g</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	ND <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	542 ± 152 <sup>ef</sup>	ND <sup>g</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	148 ± 27 <sup>b</sup>	461 ± 20 <sup>cd</sup>	942 ± 47 <sup>bc</sup>	5560 ± 8 <sup>a</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	ND <sup>c</sup>	122 ± 43 <sup>d</sup>	545 ± 103 <sup>ef</sup>	608 ± 59 <sup>ef</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	ND <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	385 ± 17 <sup>f</sup>	24 ± 34 <sup>g</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	ND <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	451 ± 27 <sup>ef</sup>	ND <sup>g</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	12 ± 18 <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	354 ± 11 <sup>f</sup>	63 ± 9 <sup>fg</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	ND <sup>c</sup>	937 ± 16 <sup>c</sup>	904 ± 159 <sup>c</sup>	719 ± 26 <sup>e</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	ND <sup>c</sup>	ND <sup>d</sup>	446 ± 130 <sup>ef</sup>	27 ± 39 <sup>g</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. ND : Non détecté. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ). Valeurs en ppm.

#### II.1.4. Analyse des sucres dans les olives fraîches et les olives fermentées

Les substrats fermentescibles pour la fermentation lactique se trouvent dans la pulpe, il s'agit notamment des sucres solubles. La concentration des sucres dans la pulpe dépend de la variété, du stade de maturation, de l'origine et de la saison (Marsilio *et al.*, 2001 ; Susamci *et al.*, 2017). Le Tableau XIII montre la concentration des sucres dans les olives fraîches avant élaboration et les olives fermentées après 120<sup>ème</sup> jours de la fermentation. Les principaux sucres dans la pulpe d'olive fraîche sont le glucose et le fructose avec des concentrations de  $23856 \pm 2374$  et  $2111 \pm 64$  ppm, respectivement. Ces valeurs concordent avec les valeurs rapportées par d'autres auteurs et dépassent le niveau minimal (2 %) considéré favorable pour la fermentation (Kailis et Harris, 2004).

D'après l'analyse des sucres dans les olives fermentées, nous avons constaté une forte diminution comparativement aux olives fraîches notamment pour le glucose et le fructose avec des taux de réductions de 96,85 et 83,95 %, respectivement (Tableau XIII). Cette perte est due au procédé d'élaboration, et précisément au traitement alcalin et aux lavages multiples. Marsilio *et al.* (2005) ont noté que la teneur en sucre des olives fermentées style Espagnol a diminuée de 90 % par rapport aux olives fraîches, dont 49 % de pertes se sont produites lors de l'étape de désamérisation et de lavage. Ceci est confirmé par les études de De Castro et Brenes (2001) et García-Serrano *et al.* (2019) qui ont trouvé des concentrations élevées de sucres dans les eaux résiduelles de désamérisation et de lavage, utilisées pour l'élaboration des olives de table vertes style Espagnol.

**Tableau XIII:** Concentration (ppm) des sucres dans les olives fraîches et les olives fermentées de la variété *Sigoise* (Sig.4).

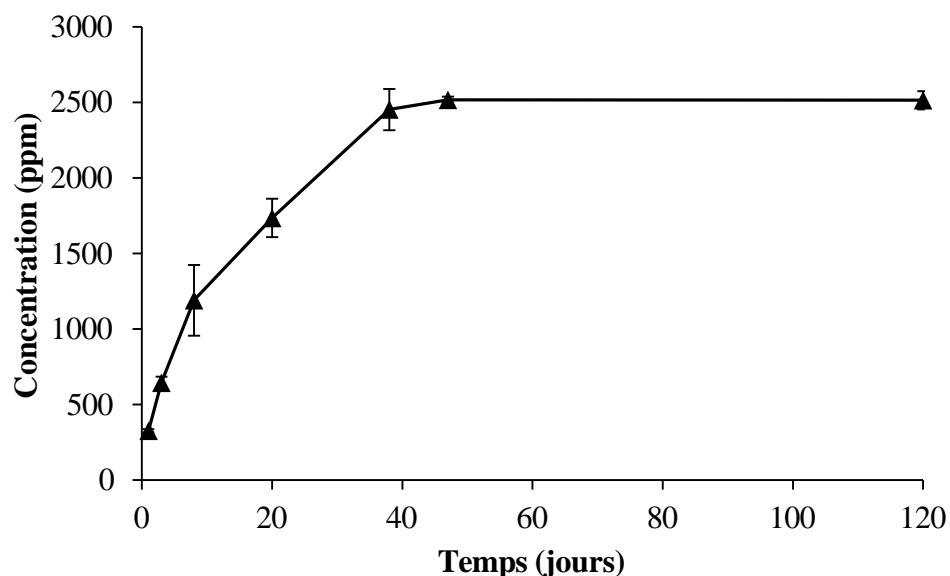
	Sucrose	Glucose	Fructose	Mannitol
Olives fraîches	$554 \pm 207$	$23856 \pm 2374$	$2111 \pm 64$	$972 \pm 448$
Olives fermentées	ND*	$751 \pm 218$	$339 \pm 228$	$696 \pm 44$
% de Réduction	100 %	96,85 %	83,95 %	28,32 %

\*ND : Non détecté

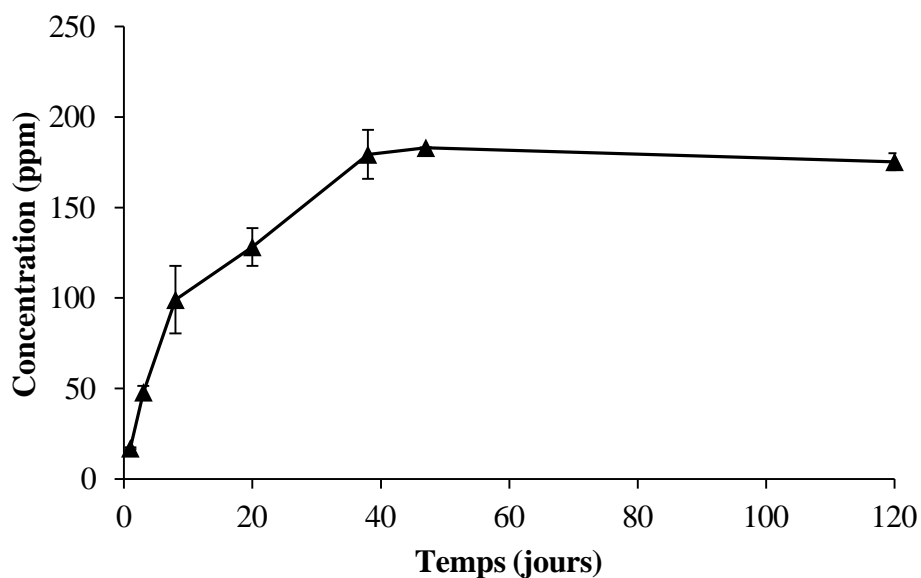
Comparativement aux olives style grec qui n'ont pas subi du traitement alcalin ni de lavages, nous remarquons que la pulpe contient plus de sucre à la fin de la fermentation, par rapport aux olives style Espagnol. Dans l'étude réalisée par Tofalo *et al.* (2012), les concentrations de glucose, le fructose et le saccharose sont de 3915,9 ; 505,3 et 67,25 mg/100g de pulpe, respectivement, détectées dans la pulpe des olives fermentées de la variété *Itrana bianca*, élaborées par la méthode style grec.

### II.1.5. Analyse des composés phénoliques dans la saumure

Dans la présente étude, nous avons étudié l'évolution des composés phénoliques dans la saumure durant le processus de la fermentation allant du premier jour jusqu'à la fin de la fermentation. Les composés majeurs identifiés dans la saumure sont l'hydroxytyrosol ; hydroxytyrosol 4-glucoside ; Salidroside et le tyrosol.



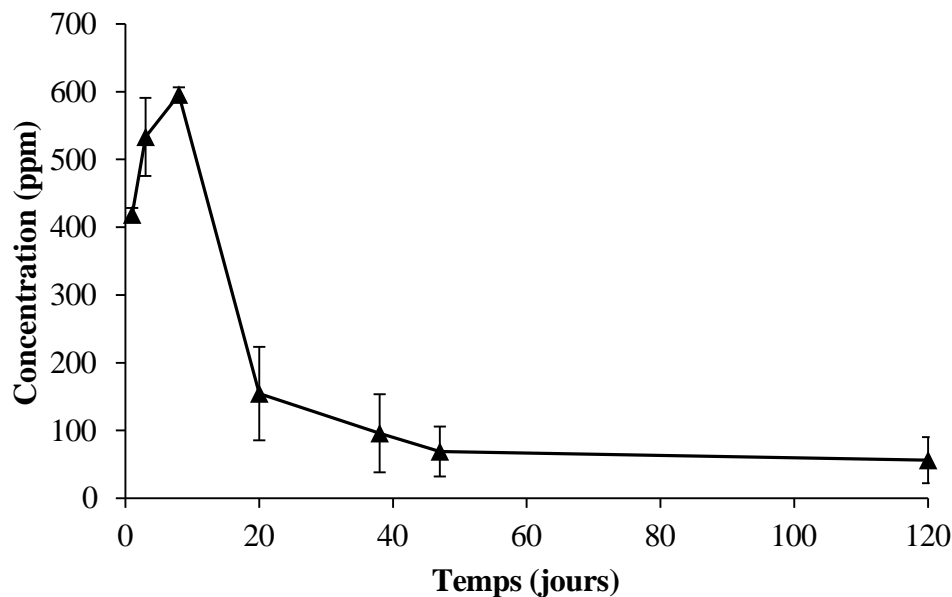
**Figure 24:** Evolution de l'hydroxytyrosol dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)



**Figure 25 :** Evolution de tyrosol dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

L'hydroxytyrosol et le tyrosol suivent la même évolution, leurs concentrations augmentent graduellement pour se stabiliser à partir du 47<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de la fermentation (Figures 23 et 24). L'augmentation de la quantité de ces composés durant cette phase de fermentation résulte de l'hydrolyse de l'oleuropéine (Ízli, 2017).

L'hydroxytyrosol 4-glucoside, est formé par hydrolyse de l'oleuropéine (Medina *et al.*, 2008). C'est l'un des composés phénoliques les plus dominants dans la pulpe d'olive (Charoenprasert et Mitchell, 2012). D'après la courbe de son évolution (voir Figure 25), nous remarquons que sa concentration a marqué une augmentation durant la première semaine de la fermentation ce qui est due à sa diffusion à partir de l'olive vers la saumure, puis sa concentration diminue par effet d'hydrolyse de ce composé (Romero *et al.*, 2002), et sa concentration se stabilise à partir du 47<sup>ème</sup> jour à une valeur de  $69 \pm 37$  ppm.



**Figure 26 :** Evolution de l'Hy4Glu dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

L'acide élénolique décarboxyméthyle lié à l'hydroxytyrosol (HyEDA) possédant un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques et sur d'autres micro-organismes (Medina *et al.*, 2010 et 2013) n'est pas détecté dans la saumure, bien qu'il soit détecté dans les olives fraîches (Tableau XV). Ceci est probablement dû à son hydrolyse en hydroxytyrosol durant les phases d'élaboration (Medina *et al.*, 2019). En ce qui concerne l'analyse des composés phénoliques majeurs dans les différentes saumures industrielles, leurs concentrations sont représentées dans le Tableau XIV.

**Tableau XIV** : Concentration (ppm) des composés phénoliques dans les saumures industrielles

Échantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Hy	Hy4Glu	Salidroside	Ty	Total des polyphénols
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	292,7 ± 11,2	134,4 ± 11,5	10,1 ± 5,2	237,0 ± 3,1	674 ± 31 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	584,1 ± 2,6	195,6 ± 41,1	9,0 ± 3,7	282,6 ± 0,2	1071 ± 48 <sup>b</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	961,2 ± 61,1	214,5 ± 20,8	19,3 ± 0,3	251,8 ± 0,8	1447 ± 83 <sup>c</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	2103,9 ± 37,7	162,0 ± 6,2	22,4 ± 1,4	370,4 ± 0,2	2659 ± 46 <sup>de</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	2417,3 ± 5,9	55,2 ± 4,0	22,4 ± 2,0	294,8 ± 27,4	2790 ± 39 <sup>ef</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	1302,2 ± 37,9	43,1 ± 0,1	22,3 ± 0,8	331,1 ± 4,3	1699 ± 43 <sup>g</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	1612,6 ± 97,0	124,0 ± 50,6	6,6 ± 0,3	117,1 ± 129,2	1860 ± 277 <sup>h</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	2379,4 ± 16,7	0,0 ± 0,0	14,4 ± 0,5	118,1 ± 9,3	2512 ± 27 <sup>i</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	2474,9 ± 60,2	47,8 ± 32,3	13,7 ± 1,7	9,7 ± 3,3	2546 ± 98 <sup>di</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	2090,2 ± 12,3	56,1 ± 40,8	13,7 ± 0,9	201,4 ± 33,3	2361 ± 87 <sup>j</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	2528,0 ± 92,0	599,7 ± 7,4	61,3 ± 22,3	184,9 ± 23,4	3374 ± 145 <sup>k</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	2514,7 ± 59,5	56,1 ± 33,8	175,3 ± 4,6	0,00 ± 0,00	2746 ± 98 <sup>ef</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	1797,9 ± 36,5	144,5 ± 3,7	1,5 ± 0,5	67,4 ± 2,3	2011 ± 43 <sup>l</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	2469,0 ± 54,9	154,2 ± 2,5	0,0 ± 0,0	72,1 ± 0,4	2695 ± 58 <sup>e</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	594,1 ± 40,7	137,6 ± 23,6	9,9 ± 0,9	80,0 ± 0,5	822 ± 66 <sup>m</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	2655,7 ± 9,2	139,7 ± 59,3	9,7 ± 1,6	83,9 ± 1,4	2889 ± 72 <sup>f</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	310,3 ± 8,8	75,3 ± 2,0	5,3 ± 0,2	86,9 ± 0,6	478 ± 12 <sup>n</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ). ND : Non détecté

Les saumures ont montré une moyenne totale de 1821 ppm. La concentration des composés est variable entre les différents échantillons, cette différence peut être expliquée par l'effet variétal, le stade de la fermentation, et les conditions d'élaboration. Les composés phénoliques antibactériens (HyEDA et EDA) ne sont pas détectés.

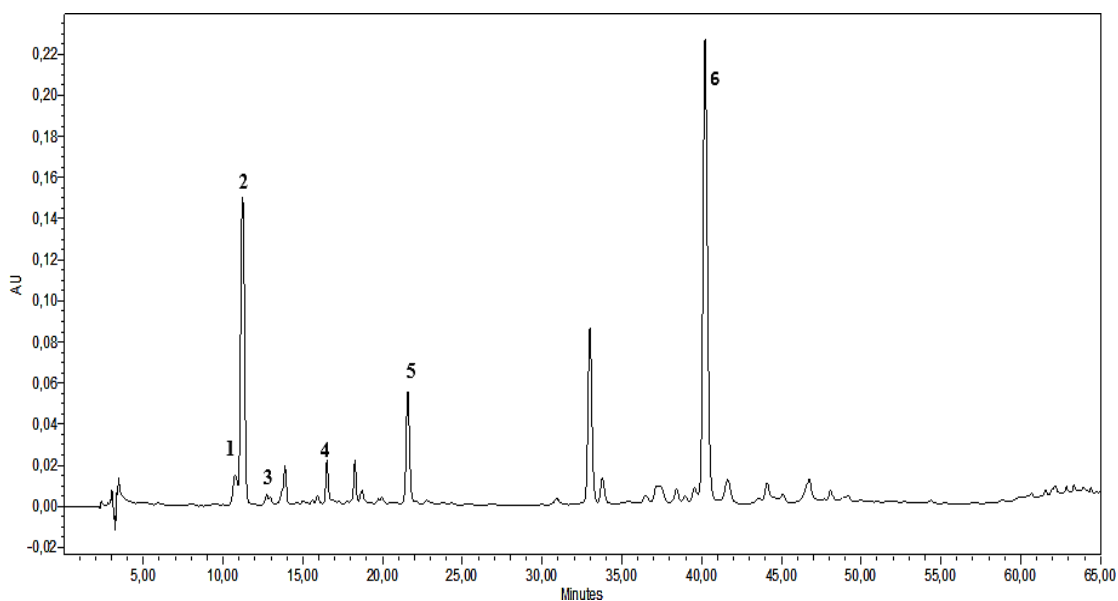
### II.1.6. Analyse des composés phénoliques dans la pulpe d'olives industrielles et commerciales

Il a été rapporté que la composition et la quantité des composés phénoliques dans l'olive dépendent de la variété, du degré de maturité, du sol et des conditions climatiques (Izli *et al.*, 2017), et en plus des méthodes d'élaboration pour les olives de table (Boskou, 2010).

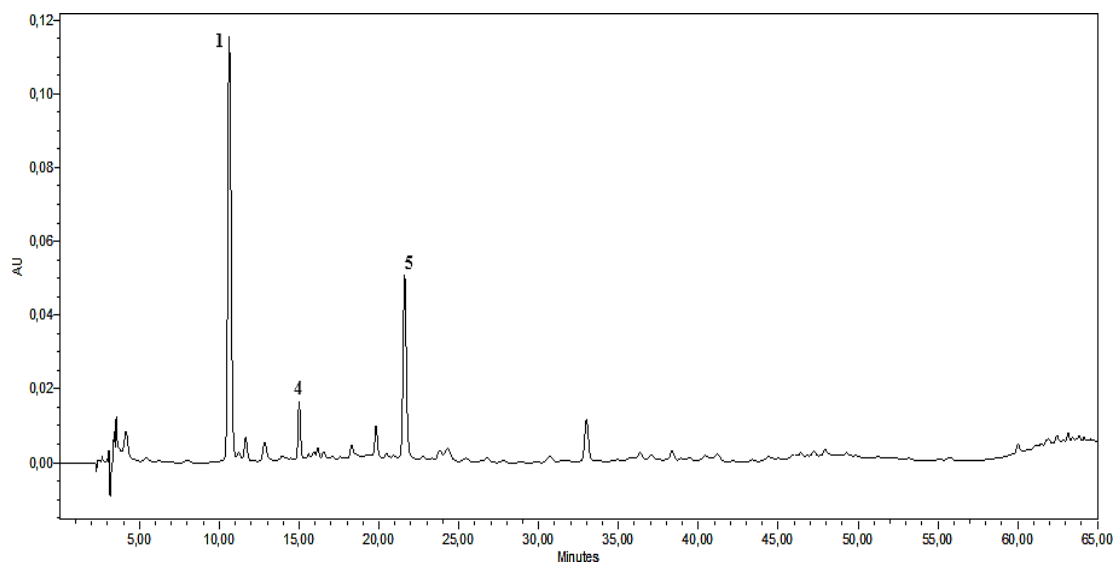
**Tableau XV :** Concentration (ppm) des composés phénoliques dans les olives fraîches et les olives fermentées de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Les composés phénoliques	Olives fraîches	Olives fermentées
Hy	178,00 ± 8,46	1253,57 ± 27,03
Hy4Glu	6942,93 ± 613,56	78,62 ± 8,29
Salidroside	142,08 ± 4,32	10,44 ± 0,12
Ty	11,32 ± 0,60	132,99 ± 6,72
Verbascoside	681,96 ± 110,64	122,00 ± 28,69
EDA	0,00	40,28 ± 3,70
Secoxyloganine	1085,07 ± 224,89	17,31 ± 1,29
Secologanoside	5315,75 ± 666,73	15,22 ± 3,14
Oleoside 11-methyl ester	0,00	45,58 ± 3,00
HyEDA	168,71 ± 124,75	33,96 ± 15,27
Oleuropéine	8560,87 ± 1075,33	0,00

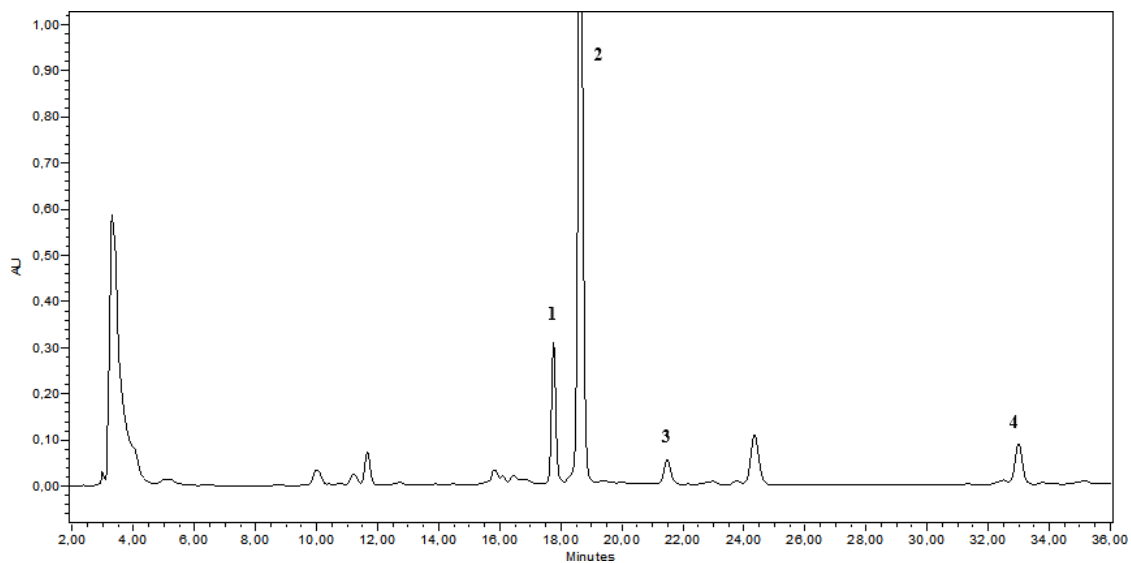
Les chromatogrammes des Figures 26 ; 27 ; 28 et 29 montrent la différence observée en composés phénoliques retrouvés dans les olives fraîches et dans les olives fermentées. Leurs concentrations sont mentionnées dans le Tableau XV. Le sécoiridoïde amer l'oleuropéine est le prédominant dans les olives fraîches (8560,87 ± 1075,33 ppm). Cependant, il n'est pas détecté dans les olives fermentées. Comparativement à d'autres variétés, la concentration de l'oleuropéine retrouvée est proche de celle rapportée précédemment pour la variété algérienne *Azzeradj* qui est de 994,27 mg/100 g (Mettouchi *et al.*, 2016), et elle est supérieure à celle trouvée par Ben Othman *et al.* (2009) qui est de 266 ± 11, 2 mg/100 g pour la variété tunisienne *Chétoui*. Un autre composé a été détecté en concentration élevée, c'est l'Hy4Glu (6942,93 ± 613,56 ppm), cette concentration est considérablement supérieure à celles rapportées par Romero *et al.* (2017) pour deux variétés espagnoles *Picual* et *Arbequina*.



**Figure 27:** Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fraîches à 280 nm. (1) hydroxytyrosol, (2) Hy-4-Glu, (3) Salidoside, (4) Tyrosol, (5) standard interne, (6) oleuropéine.



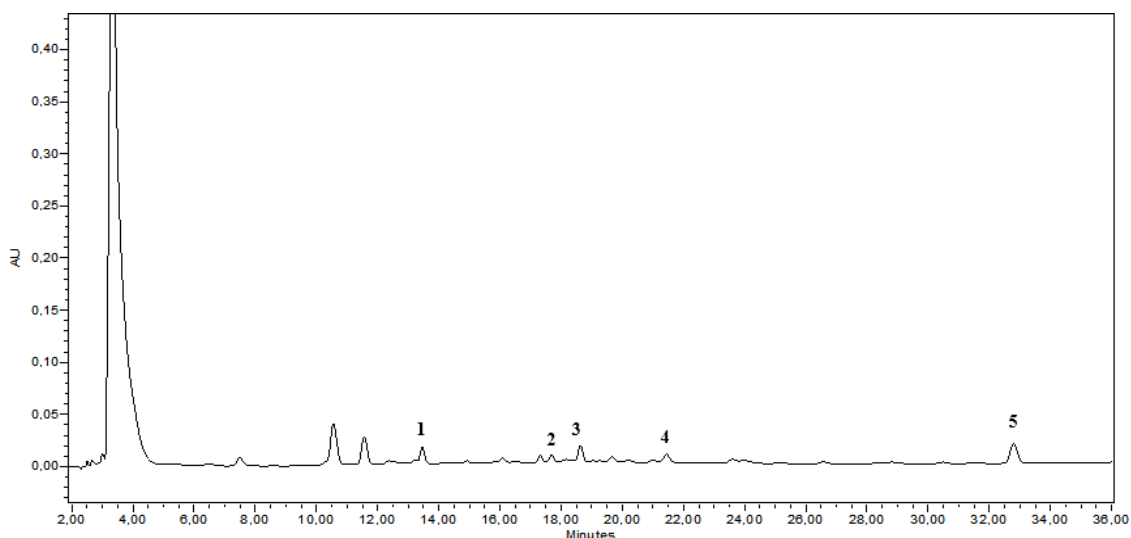
**Figure 28 :** Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fermentées à 280 nm. (1) hydroxytyrosol, (4) Tyrosol, (5) standard interne.



**Figure 29 :** Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fraîches à 240 nm. (1) Secoxyloganine ; (2) Secologanoside ; (3) standard interne ; (4) Verbascoside

Une grande différence de la composition en composés phénoliques entre les olives fraîches et les olives fermentées a été observée, certains composés ont été synthétisés et d'autres sont hydrolysés. Il est bien connu que l'oleuropéine est hydrolysé durant le traitement alcalin par le NaOH (Frankel, 2011). Nous rappelons que l'oleuropéine n'est pas détecté au cours de la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4), ceci nous permet de dire qu'il est totalement hydrolysé à la phase d'élaboration. Cette hydrolyse contribue à la formation du tyrosol et l'hydroxytyrosol qui représente les deux composés majeurs détectés dans les olives fermentées à des concentrations de  $132,99 \pm 6,72$  et  $1253,57 \pm 27,03$  ppm, respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Marsilio *et al.* (2005) et Montaña *et al.* (2010) qui ont constaté que le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont les composés majeurs détectés dans les olives fermentées au style Espagnol.

La teneur en composés phénoliques des olives est considérablement affectée par le traitement alcalin et les lavages successifs (Ambra *et al.*, 2017). Mettouchi *et al.* (2016) ont confirmé qu'une diminution remarquable de la teneur en phénols a été observée après le traitement alcalin de sept variétés d'olives algériennes élaborées au style Espagnol. Plus récemment, Ait Chabane *et al.* (2019) ont signalé également une perte de plus de 50 % des composés phénoliques totaux de la variété *Sigoise* après l'élaboration (désamérisation et lavage).



**Figure 30 :** Chromatogramme HPLC de l'extrait phénolique des olives fermentées à 240 nm. (1) EDA ; (2) Secoxyloganine ; (3) Secologanoside ; (4) standard interne ; (5) Verbascoside.

Ces composés ont été retrouvés en concentration élevée dans les solutions alcalines et les eaux de lavage utilisées pour l'élaboration des olives au style Espagnol des variétés *Manzanilla*, *Hojiblanca* et *Gordal* (Medina *et al.*, 2008 ; Garcia-Serrano *et al.*, 2019). Les pertes sont observées aussi durant la fermentation, ce qui est dû à la diffusion des composés phénoliques de l'olive vers la saumure (Chranioti *et al.*, 2018).

Le profil phénolique des olives commerciales inclut des composés comme l'EDA (la forme dialdéhydrique de l'acide décarboxyméthylélénolique) et l'HyEDA (EDA lié à l'hydroxytyrosol), principalement détectés dans les olives naturelles tournantes (Tableau XVI), qui présentent par coïncidence les taux de survie les plus bas (voir Tableau XXXI). L'effet combiné des caractéristiques physicochimiques du produit fermenté et de la concentration de ces antimicrobiens phénoliques déterminera la survie des micro-organismes pathogènes (Medina *et al.*, 2013 ; Medina-Pradas et Arroyo-Lopez, 2015).

**Tableau XVI:** Concentration (ppm) des composés phénoliques dans les olives commerciales

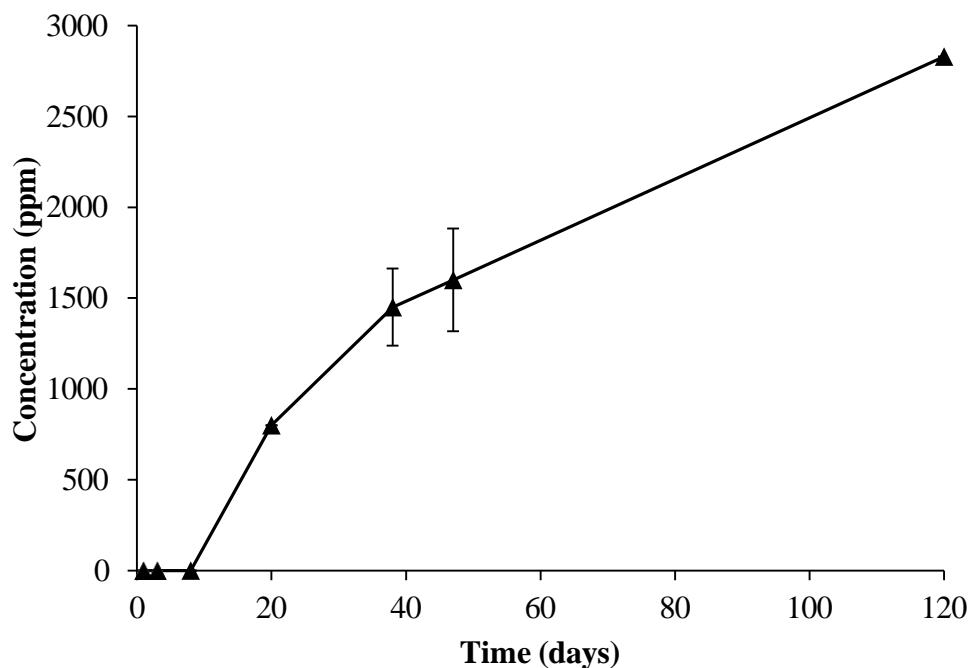
Type	Echantillon	Hy	Hy-4-Glu	Ty	Verbascoside	HyEDA	Oleuropeine	EDA
Olives vertes style Espagnol	1	371 ± 2 <sup>e</sup>	54 ± 6 <sup>de</sup>	36 ± 1 <sup>gh</sup>	ND	ND	ND	ND
	2	310 ± 26 <sup>efg</sup>	55 ± 18 <sup>de</sup>	32 ± 2 <sup>i</sup>	14 ± 10 <sup>c</sup>	ND	ND	ND
	3	704 ± 92 <sup>d</sup>	103 ± 14 <sup>cd</sup>	72 ± 2 <sup>d</sup>	ND	12 ± 0 <sup>d</sup>	ND	4 ± 0 <sup>c</sup>
	4	247 ± 6 <sup>g</sup>	42 ± 5 <sup>de</sup>	25 ± 4 <sup>j</sup>	ND	ND	ND	ND
	5	250 ± 25 <sup>g</sup>	104 ± 39 <sup>cd</sup>	24 ± 2 <sup>j</sup>	17 ± 7 <sup>c</sup>	ND	ND	ND
	6	338 ± 10 <sup>efg</sup>	148 ± 29 <sup>c</sup>	32 ± 1 <sup>hi</sup>	35 ± 25 <sup>c</sup>	ND	ND	12 ± 1 <sup>c</sup>
	7	276 ± 13 <sup>fg</sup>	71 ± 8 <sup>de</sup>	39 ± 1 <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND
Olives naturelles tournantes	8	1321 ± 36 <sup>b</sup>	365 ± 31 <sup>a</sup>	81 ± 2 <sup>b</sup>	731 ± 119 <sup>b</sup>	32 ± 4 <sup>a</sup>	652 ± 105 <sup>a</sup>	40 ± 2 <sup>a</sup>
	9	1495 ± 26 <sup>a</sup>	416 ± 42 <sup>a</sup>	77 ± 2 <sup>c</sup>	958 ± 127 <sup>a</sup>	24 ± 5 <sup>b</sup>	289 ± 40 <sup>b</sup>	39 ± 10 <sup>b</sup>
	10	774 ± 8 <sup>c</sup>	263 ± 61 <sup>b</sup>	85 ± 1 <sup>a</sup>	ND	19 ± 1 <sup>c</sup>	224 ± 68 <sup>b</sup>	40 ± 0 <sup>b</sup>
Olives noires oxydées	11	173 ± 36 <sup>h</sup>	27 ± 9 <sup>e</sup>	63 ± 0 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND
	12	170 ± 3 <sup>h</sup>	24 ± 1 <sup>e</sup>	61 ± 1 <sup>ef</sup>	ND	ND	ND	ND
	13	157 ± 8 <sup>h</sup>	22 ± 4 <sup>e</sup>	59 ± 0 <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND

Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan (p < 0,05). ND : Non détecté

## II.1.7. Analyse des acides organiques et l'éthanol

### II.1.7.1. Acide lactique

L'acide lactique est le métabolite le plus important durant la fermentation des olives de table. Il induit une diminution du pH qui inhibe la croissance des micro-organismes d'altération et pathogènes (Tofalo *et al.*, 2014). C'est le principal acide organique détecté dans les saumures étudiées.



**Figure 31 :** Evolution de l'acide lactique dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

D'après la courbe de son évolution (Figure 30) au cours de la fermentation dans la saumure de la variété *Sigoise* (Sig.4), nous constatons que l'acide lactique est produit à partir de la première semaine de la fermentation, il présente une augmentation graduelle pendant le processus, atteignant sa concentration maximale au cours des derniers jours de la fermentation avec une valeur de l'ordre de  $2825 \pm 56$  ppm. Son évolution est corrélée avec l'évolution des bactéries lactiques (Figure 36) due à leur métabolisme fermentatif.

Selon les résultats du Tableau XVII, la concentration de l'acide lactique dans les échantillons de la saumure varie entre  $1914 \pm 18$  et  $14143 \pm 79$  ppm. Les valeurs retrouvées à l'exception de l'échantillon Sev.1 sont inférieures à celles rapportées par Montañó *et al.* (2003) et Rodríguez-Gómez *et al.* (2012) dans les saumures industrielles des olives de table

vertes de variétés *Gordal*, *Manzanilla* et *Hojiblanca*. Ces auteurs ont trouvé des concentrations de l'acide lactique comprise entre 13 et 16 g/l.

**Tableau XVII:** Concentration (ppm) de l'acide lactique dans les échantillons des saumures industrielles

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Acide lactique
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	9629 ± 27 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	9551 ± 136 <sup>a</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	8487 ± 74 <sup>b</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	5360 ± 13 <sup>c</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	5072 ± 142 <sup>d</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	8721 ± 257 <sup>b</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	4159 ± 109 <sup>ef</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	4047 ± 134 <sup>f</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	6816 ± 15 <sup>g</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	6683 ± 16 <sup>g</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	4380 ± 229 <sup>e</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	2825 ± 56 <sup>h</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	2918 ± 169 <sup>h</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	1914 ± 18 <sup>i</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	11628 ± 18 <sup>j</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	14143 ± 79 <sup>k</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	9138 ± 5 <sup>l</sup>

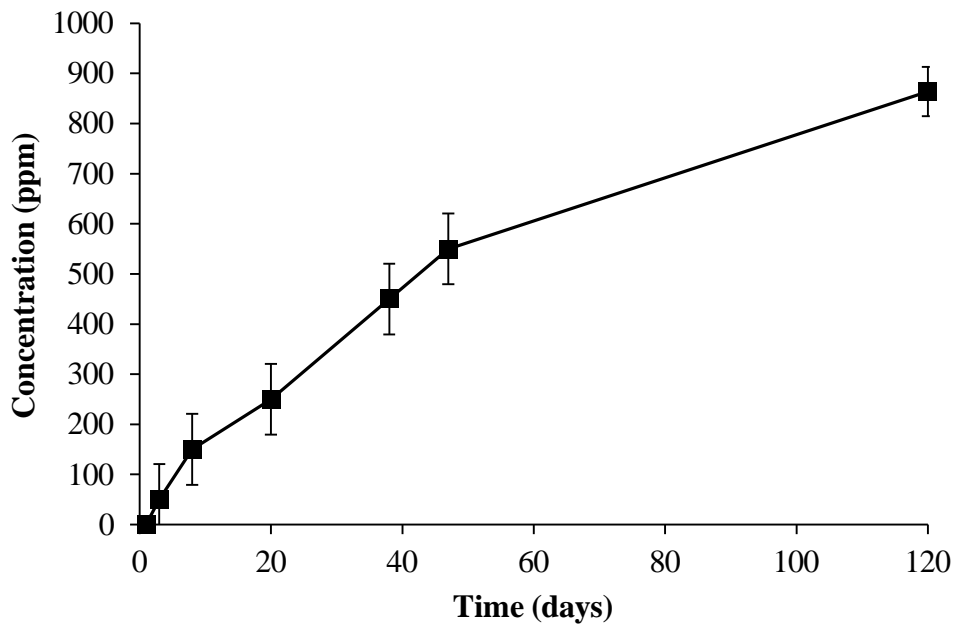
\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Il est à noter que la faible concentration de l'acide lactique produite dans la plupart des échantillons des saumures industrielles (Tableau XVII) est peut-être due au manque des sucres fermentescibles dans la saumure (Tableau XII), causé par les rinçages successifs durant l'étape de l'élaboration. Pour augmenter la production de l'acide lactique, il est recommandé d'ajouter le glucose (Chorianopoulos *et al.*, 2005 ; Panagou et Katsaboxakis, 2006).

### II.1.7.2. Acide acétique

L'acide acétique est un représentant du métabolisme des levures (Bleve *et al.*, 2015), et c'est l'un des métabolites des bactéries lactiques hétérofermentaires (Breidt *et al.*, 2013a ; Yang *et al.*, 2019). Dans notre étude, c'est le deuxième acide organique le plus abondant détecté dans

la saumure en concentrations inférieures à celles de l'acide lactique. Les valeurs sont comprises entre  $50 \pm 71$  et  $864 \pm 49$  ppm pour l'échantillon Sig.4 (Figure 31).



**Figure 32 :** Evolution de l'acide acétique dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Ses concentrations varient entre  $864 \pm 49$  et  $3125 \pm 17$  ppm dans les saumures industrielles montrées dans (Tableau XVIII). Selon De Castro *et al.* (2019), l'acide acétique se produit probablement par la fragmentation des sucres durant le traitement alcalin où il peut être aussi produit par les *Propionibacterium*, les *Clostridium*, les bactéries acétiques et les levures en métabolisant l'acide lactique (Lanza *et al.*, 2016). A titre d'exemple, nous citons *Lentilactobacillus buchneri* qui produit l'acide acétique à partir de la consommation de l'acide lactique en anaérobiose (Johanningsmeier et McFeeters, 2013). Cette espèce a été identifiée dans nos échantillons. Comparativement aux études précédentes, l'acide acétique n'a pas été détecté au cours de la fermentation des olives de tables vertes style Espagnol de la variété *Gordal* (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012). Cependant, il a été détecté avec une concentration qui varie de 1,80 g/l à 2,7 g/l après la fermentation des olives vertes style Espagnol de variété *Gordal*, *Manzanilla* et *Hojiblanca* (Sánchez *et al.*, 2018), et avec une concentration de 14,02 µg/l dans la saumure des olives vertes naturelles de variété *Nocellara Etnea* (Randazzo *et al.*, 2017).

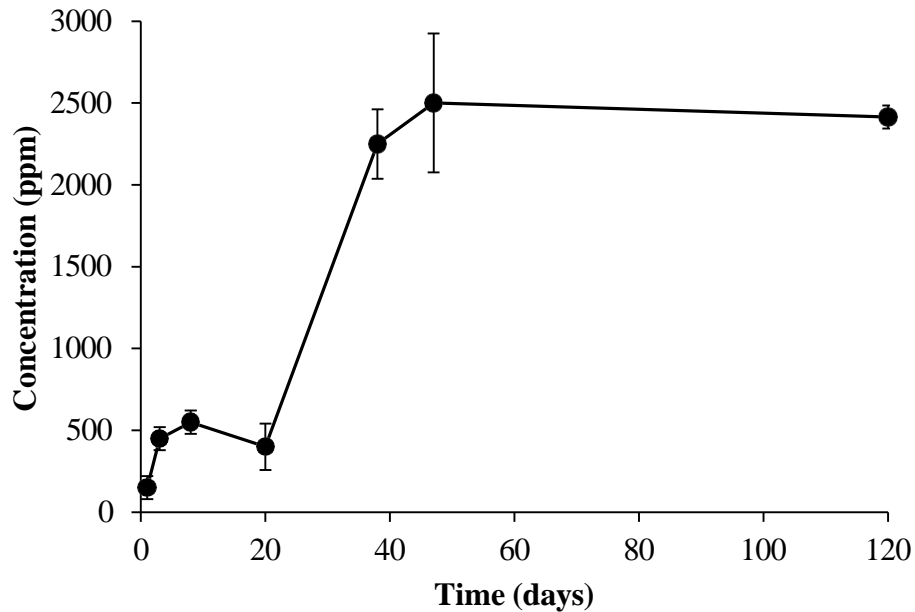
**Tableau XVIII :** Concentration (ppm) de l'acide acétique dans les échantillons des saumures industrielles

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Acide acétique (ppm)
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	3119 ± 42 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	3125 ± 17 <sup>a</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	2278 ± 11 <sup>bc</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	2788 ± 17 <sup>d</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	2607 ± 143 <sup>e</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	2153 ± 20 <sup>c</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	1998 ± 4 <sup>e</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	1171 ± 7 <sup>f</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	2190 ± 11 <sup>bc</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	2148 ± 4 <sup>c</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	2176 ± 174 <sup>bc</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	864 ± 49 <sup>g</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	1529 ± 18 <sup>h</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	1704 ± 2 <sup>i</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	1825 ± 14 <sup>j</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	2271 ± 4 <sup>bc</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	2297 ± 19 <sup>b</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

### II.1.7.3. Ethanol

L'éthanol comme l'acide acétique est produit dans les olives de table par les levures et les bactéries lactiques hétéro fermentaires à partir de sucres. En ce qui concerne son évolution durant la fermentation de l'échantillon Sig.4, nous remarquons qu'il est produit à partir du premier jour et se stabilise à partir du 47<sup>ème</sup> jour, et sa concentration est supérieure à celle de l'acide lactique durant la période située entre le 25<sup>ème</sup> jour et le 100<sup>ème</sup> jour (Figure 32), ceci est probablement dû à la dominance des levures.



**Figure 33 :** Evolution de l'éthanol dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Dans les saumures industrielles (Tableau XIX), les concentrations de l'éthanol obtenu à l'exception des échantillons Sig. 3d ; Sig. 3e et Sig. 3f sont beaucoup plus supérieures à celles retrouvées par (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2013, 2014) qui ont rapporté des valeurs de l'éthanol qui varient de 0,3 à 0,8 g/l à la fin de la fermentation des olives verte style Espagnol de la variété *Manzanilla*. Ces valeurs sont proches de celles trouvées par Tzamourani *et al.* (2021) au cours de la fermentation des olives vertes style Espagnol de la variétés *Halkidiki* et *Conservolea* avec des concentrations comprises entre 1,4 et 3,6 g/l.

La teneur relativement élevée en éthanol détectée dans la saumure Sig.4 et les saumures indiquées dans le Tableau XIX peuvent être attribuées à l'activité des levures qui sont détectées en abondance dans ces échantillons (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2014). En outre, il peut être aussi produit par les *Propionibacterium*, les *Clostridium*, ou les bactéries acétiques en métabolisant l'acide lactique (Lanza *et al.*, 2016).

L'éthanol est un précurseur d'esters éthyliques qui est un composé généralement indésirable à une concentration qui dépasse 200 mg/l dans les produits fermentés, car il confère une odeur désagréable (Panagou et Tassou, 2006).

**Tableau XIX :** Concentration (ppm) de l'éthanol dans les échantillons des saumures industrielles

Echantillon (Code *)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Ethanol
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	1761 ± 66 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	1709 ± 13 <sup>b</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	1554 ± 5 <sup>c</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	4849 ± 2 <sup>d</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	4875 ± 21 <sup>d</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	1347 ± 1 <sup>e</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	943 ± 2 <sup>f</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	691 ± 1 <sup>g</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	619 ± 20 <sup>h</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	614 ± 7 <sup>h</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	5015 ± 10 <sup>i</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	2414 ± 70 <sup>j</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	887 ± 14 <sup>k</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	1621 ± 9 <sup>l</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	1528 ± 5 <sup>c</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	969 ± 7 <sup>f</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	1147 ± 7 <sup>m</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Enfin, la formation de l'acide acétique et l'éthanol dans nos échantillons implique une forte activité du métabolisme des levures. La dominance des levures pendant le processus de la fermentation donne un produit au goût plus doux et une autoconservation faible en raison de la concurrence des nutriments avec les bactéries lactiques et de la faible production d'acide qui en résulte (Arroyo-López *et al.*, 2012).

### II.1.8. Analyse des acides organiques volatils

Parmi les acides organiques volatils, nous avons détecté la présence d'acides butyrique, isobutyrique et propionique dans de nombreux échantillons de la saumure qui sont énumérés dans le (Tableau XX). L'acide butyrique est détecté dans 8 échantillons, il est le plus abondant parmi les acides organiques volatils analysés, avec une concentration maximale de l'ordre de

900 ± 40 ppm, détecté dans l'échantillon Ver.2, suivi de l'acide propionique détecté presque dans tous les échantillons analysés avec une concentration maximale de 132 ± 13 ppm. Leur présence dans la saumure est liée à la croissance des micro-organismes d'altération, qui est favorisée par les paramètres physico-chimiques (pH, NaCl et acidité) inadéquats (De Castro *et al.*, 2018). Dans notre étude, nous notons que ces deux métabolites ont été détectés avec une concentration significative dans les échantillons ayant un pH élevé (4,6 - 4,9) et un taux de NaCl bas (3,6 – 4 %).

Seul l'échantillon Sig. 1c qui n'a pas montré la présence d'acides butyrique, isobutyrique et propionique, ce qui est probablement lié à l'absence des genres *Pectinatus* et *Acetobacter*. L'altération de l'arôme et la présence des mauvaises odeurs (beurre rance, putride, etc.), ont été observés dans la plupart des saumures au moment de l'échantillonnage.

L'acide butyrique est le métabolite volatile responsable de l'altération butyrique caractérisée par l'odeur de beurre rance (De Castro *et al.*, 2018). Généralement, la fermentation butyrique est apparue lorsque la concentration de sel est faible (Kiritsakis *et al.*, 2011). Cette altération est causée par la prolifération des micro-organismes anaérobiques comme *Clostridium butyricum* (Gililand et Vaughn, 1943), *Enterobacter cloacae* (Pérez-Díaz *et al.*, 2019), *Ruminococcus*, *Cardio-bacteriaceae* (De Castro *et al.*, 2018), et *Clostridium tyrobutyricum* rapporté récemment comme étant le producteur majeur de l'acide butyrique dans les fromages altérés (Brändle *et al.*, 2018). Cette dernière a été détectée dans les échantillons des saumures Ver.2 et Sev.2.

La présence de l'acide propionique indique peut-être une initiation d'une fermentation secondaire qui se déclenche à l'épuisement des sucres dans la saumure et au début de la phase de conservation (Sánchez-Gómez, 2006 ; Lanza *et al.*, 2016). Elle est caractérisée par l'augmentation de pH (Breidt *et al.*, 2013a) et de l'acidité (Medina *et al.*, 2016a). Cette fermentation secondaire est due à la croissance des *Lactiplantibacillus buchenri* et *Pectinatus* qui fermentent l'acide lactique produit au cours de la fermentation lactique et produisent de l'acide propionique comme il a été décrit dans d'autres études pour la fermentation des cornichons (Breidt *et al.*, 2013b ; Johanningsmeier et McFeeters, 2013 ; Medina *et al.*, 2016a). L'acide butyrique et l'acide propionique ont été largement détectés au cours des processus de la fermentation des olives de table. Des concentrations de l'acide butyrique et propionique de l'ordre de 2,8 - 300 et 27 - 1077 ppm, respectivement, ont été rapportés au cours de la fermentation des olives (Panagou et Tassou, 2006 ; Martorana *et al.*, 2016 et 2017 ; De Castro *et al.*, 2018).

**Tableau XX :** Concentration (ppm) des acides organiques volatils dans les échantillons des saumures industrielles

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Acide butyrique	Acide isobutyrique	Acide propionique	Acide valérique	Acide caproïque
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	14 ± 1 <sup>ab</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	12 ± 1 <sup>ac</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	20 ± 21 <sup>b</sup>	ND <sup>a</sup>	16 ± 5 <sup>ab</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	56 ± 12 <sup>c</sup>	ND <sup>a</sup>	6 ± 1 <sup>cdef</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	49 ± 1 <sup>c</sup>	ND <sup>a</sup>	21 ± 1 <sup>b</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	44 ± 0 <sup>bc</sup>	ND <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>g</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	68 ± 0 <sup>c</sup>	ND <sup>a</sup>	8 ± 1 <sup>acef</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	2 ± 1 <sup>def</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	6 ± 1 <sup>cdef</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	10 ± 0 <sup>acf</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	9 ± 0 <sup>acf</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	900 ± 40 <sup>d</sup>	3 ± 1 <sup>b</sup>	132 ± 13 <sup>h</sup>	4 ± 0 <sup>b</sup>	4 ± 0 <sup>b</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	107 ± 3 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>c</sup>	101 ± 1 <sup>i</sup>	ND <sup>a</sup>	2 ± 0 <sup>c</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	92 ± 0 <sup>a</sup>	1 ± 0 <sup>c</sup>	125 ± 0 <sup>j</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>

\* Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermenteurs analysés. ND : Non détecté. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ )

Les résultats de l'analyse de la concentration de l'acide propionique et l'acide butyrique dans les échantillons d'olives de table commerciales sont représentés dans le Tableau XXI, La valeur la plus élevée de ces deux composés est enregistrés pour l'échantillon 7 avec des concentrations de  $546 \pm 112$  et  $751 \pm 72$  ppm pour l'acide propionique et l'acide butyrique respectivement.

**Tableau XXI** : Concentration en ppm des acides organiques volatils dans les échantillons des saumures d'olives de table commerciales

Type	Echantillon	Acide propionique	Acide butyrique
Olives vertes style Espagnol	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND
	5	ND	ND
	6	ND	ND
	7	$546 \pm 112^a$	$751 \pm 72^a$
Olives naturelles tournantes	8	ND	ND
	9	$157 \pm 157^b$	ND
	10	$190 \pm 190^b$	ND
Olives noires oxydées	11	ND	ND
	12	$171 \pm 171^b$	ND
	13	ND	ND

Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ). ND : Non détecté

### II.1.9. Analyse de la texture des olives fermentées

La texture a un impact important sur l'acceptation du produit par le consommateur. C'est l'une des caractéristiques organoleptiques les plus affectées par le procédé d'élaboration (Jimenez *et al.*, 1995). La texture de la chair de l'olive crue dépend de la variété et de la maturation (Kailis et Harris, 2007) et elle diminue durant le processus d'élaboration. Jimenez *et al.* (1995) ont attribué cette diminution à la décomposition des liaisons entre les polysaccharides pectiques et hémi cellulosiques pendant le traitement alcalin, et aux enzymes exogènes dérivées de micro-organismes qui peuvent conduire à la dégradation de la paroi cellulaire de l'olive (Sherahi *et al.*, 2018).

Les résultats de l'analyse de la texture des olives fermentées sont présentés dans le Tableau XXII. Les valeurs sont exprimées en Newton/grammes d'olives dénoyautées (N/G). Nous remarquons que les valeurs de la texture sont comprises entre  $24,34 \pm 7,07$  et  $58,94 \pm 7,25$  (N/G).

**Tableau XXII :** Valeurs de la texture (N/G) des olives au cours de la fermentation

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Texture (N/G)
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	$41,72 \pm 3,97^a$
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	$36,19 \pm 4,44^b$
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	$36,46 \pm 6,01^b$
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	$58,94 \pm 7,25^{bc}$
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	$45,72 \pm 10,72^d$
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	$33,67 \pm 4,03^c$
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	$33,45 \pm 4,18^c$
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	$32,88 \pm 5,46^c$
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	$33,83 \pm 5,08^c$
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	$28,91 \pm 3,73^e$
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	$38,14 \pm 4,96^j$
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	NA*
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	$41,04 \pm 7,89^a$
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	$40,31 \pm 4,12^a$
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	$27,5 \pm 7,87^e$
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	$24,34 \pm 7,07^f$
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	$31,9 \pm 5,84^i$

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. NA\*: Non analysé. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

L'échantillon Sig.2a a montré la valeur de la texture la plus élevée qui est de l'ordre de  $58,94 \pm 7,25$  (N/G). Cette valeur est plus élevée que celle trouvée par (García-Serrano *et al.*, 2019 ; Mantzouridou *et al.*, 2020) pour les variétés *Chalkidiki*, *Manzanilla* et *Hojiblanca*, qui ont rapporté des valeurs de la texture situées entre 21,33 et 48 N/G. Cette différence peut être expliquée par une récolte précoce des olives. En effet, Cabrera-Bañegil *et al.* (2018) ont indiqué que si les olives sont récoltées avant le stade optimal, les olives de table auraient des problèmes lors de l'élaboration, et le produit final aurait une texture dure.

Les échantillons Ver. 2 ; Sev. 1 et Sig. 3e ont montré une fermeté faible qui varie de  $24,34 \pm 7,0$  à  $28,91 \pm 3,73$  (N/G) et ceci peut être expliqué par l'activité enzymatique élevée de la population des levures trouvées dans la saumure de ces olives et/ou à la faible concentration de NaCl.

En effet, De Castro *et al.* (2007) ont constaté que la fermeté de l'olive de table de la variété *Manzanilla* augmente avec l'augmentation de la concentration de NaCl. Les résultats obtenus pour les échantillons Sig. 1a ; Sig. 1b ; Sig. 1c ; Sig. 3c et Ver. 1a concordent avec cette conclusion.

**Tableau XXIII:** Valeurs de l'humidité et de la texture dans les échantillons d'olives commerciales

Type	Echantillon	Humidité (%)	Texture (N/G)
Olives vertes style Espagnol	1	$72,1 \pm 0,1$ <sup>b</sup>	$25,7 \pm 2,7$ <sup>d</sup>
	2	$66,1 \pm 1,1$ <sup>c</sup>	$35,8 \pm 2,5$ <sup>bc</sup>
	3	$72,5 \pm 1,0$ <sup>b</sup>	$32,7 \pm 3,5$ <sup>bc</sup>
	4	$74,1 \pm 0,9$ <sup>b</sup>	$44,5 \pm 1,0$ <sup>a</sup>
	5	$78,5 \pm 1,2$ <sup>a</sup>	$24,3 \pm 2,2$ <sup>d</sup>
	6	$75,1 \pm 1,1$ <sup>b</sup>	$25,0 \pm 0,5$ <sup>d</sup>
	7	$78,7 \pm 1,2$ <sup>a</sup>	$31,6 \pm 0,1$ <sup>c</sup>
Olives naturelles tournantes	8	$62,8 \pm 0,0$ <sup>d</sup>	$15,8 \pm 1,1$ <sup>e</sup>
	9	$64,0 \pm 0,4$ <sup>c</sup>	$17,7 \pm 0,3$ <sup>e</sup>
	10	$72,4 \pm 0,4$ <sup>b</sup>	$22,7 \pm 0,8$ <sup>d</sup>
Olives noires oxydées	11	$73,8 \pm 0,3$ <sup>b</sup>	$17,1 \pm 2,6$ <sup>e</sup>
	12	$73,6 \pm 0,3$ <sup>b</sup>	$15,8 \pm 0,3$ <sup>e</sup>
	13	$75,1 \pm 0,3$ <sup>b</sup>	$15,5 \pm 0,1$ <sup>e</sup>

Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

La teneur moyenne en humidité des échantillons d'olives commerciales est de 72,2%, elle se situe dans la fourchette attendue pour ce type de produit (Tableau XXIII), bien que les échantillons 2, 8 et 9 présentent des valeurs plus faibles, probablement en raison de différence de la maturité au moment de la récolte et la méthode de transformation utilisée (Montano *et al.*, 2010 ; Ünal et Nergiz, 2003).

Concernant la texture, les olives vertes style Espagnol se distinguent par leur fermeté, tandis que les olives naturels tournante et les olives noires oxydées ont une texture plus tendre

(Tableau XXIII). Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures qui démontrent comment le stade élevé de la maturation des olives de couleur tournante affecte leur texture (Lanza *et al.*, 2010). En revanche, la perte de la texture des olives noires oxydées pourrait être attribuée aux traitements appliqués tout au long de leur transformation (Rallo *et al.*, 2018)

### II.1.10. Analyse de la couleur superficielle des olives fermentées

La couleur des olives de table, est aussi un facteur crucial dans l'acceptation du produit. La couleur superficielle s'exprime en fonction des paramètres colorimétriques CIE: L\* (la clarté), a\* (composante de la couleur rouge/vert, les valeurs négatives indiquent le vert, tandis que les valeurs positives indiquent la rougeur) et b\* (composante de la couleur jaune/bleu). Les résultats obtenus pour ces 3 paramètres sont énumérés dans le Tableau XXIV.

**Tableau XXIV:** Valeurs des paramètres CIE des olives au cours de la fermentation

Echantillon (Code*)	Variété	Temps de fermentation (Jours)	Couleur		
			L *	a*	b*
Sig. 1a	<i>Sigoise</i>	90	50,4 ± 3,39 <sup>a</sup>	0,08 ± 1,44 <sup>a</sup>	33,27 ± 1,79 <sup>b</sup>
Sig. 1b	<i>Sigoise</i>	90	54,92 ± 1,82 <sup>b</sup>	0,84 ± 1,3 <sup>a</sup>	35,9 ± 12,9 <sup>a</sup>
Sig. 1c	<i>Sigoise</i>	60	47,2 ± 7,3 <sup>ef</sup>	1,45 ± 1,89 <sup>b</sup>	31,45 ± 8,65 <sup>j</sup>
Sig. 2a	<i>Sigoise</i>	90	45,27 ± 2,87 <sup>cd</sup>	0,92 ± 0,86 <sup>a</sup>	28,69 ± 2,51 <sup>f</sup>
Sig. 2b	<i>Sigoise</i>	90	49,73 ± 2,78 <sup>e</sup>	1,85 ± 1,01 <sup>b</sup>	35,15 ± 3,68 <sup>a</sup>
Sig. 3a	<i>Sigoise</i>	90	55,39 ± 2,12 <sup>b</sup>	0,84 ± 2,35 <sup>a</sup>	42,42 ± 2,29 <sup>de</sup>
Sig. 3b	<i>Sigoise</i>	90	53,1 ± 1,93 <sup>j</sup>	1,18 ± 0,73 <sup>b</sup>	37,67 ± 3,58 <sup>e</sup>
Sig. 3c	<i>Sigoise</i>	90	53,77 ± 4,23 <sup>j</sup>	1,05 ± 0,68 <sup>b</sup>	37,48 ± 4,22 <sup>e</sup>
Sig. 3d	<i>Sigoise</i>	60	49,25 ± 3,06 <sup>e</sup>	-0,01 ± 1,04 <sup>k</sup>	33,46 ± 2,72 <sup>b</sup>
Sig. 3e	<i>Sigoise</i>	120	57,56 ± 2,64 <sup>i</sup>	2,29 ± 0,89 <sup>c</sup>	39,56 ± 3,83 <sup>d</sup>
Sig. 3f	<i>Sigoise</i>	90	55,76 ± 4,1 <sup>b</sup>	4,55 ± 2,78 <sup>ef</sup>	36,83 ± 6,86 <sup>a</sup>
Sig. 4	<i>Sigoise</i>	120	NA*	NA*	NA*
Ver. 1a	<i>Verdale</i>	120	51,8 ± 4,44 <sup>a</sup>	2,11 ± 4,44 <sup>c</sup>	37,41 ± 5,69 <sup>e</sup>
Ver. 1b	<i>Verdale</i>	120	55,17 ± 3,99 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,82 <sup>a</sup>	40,09 ± 4,24 <sup>d</sup>
Ver. 2	<i>Verdale</i>	120	51,01 ± 2,94 <sup>a</sup>	2,91 ± 1,15 <sup>c</sup>	34,28 ± 3,67 <sup>b</sup>
Sev. 1	<i>Sevillana</i>	120	50,4 ± 2,85 <sup>a</sup>	2,67 ± 0,77 <sup>c</sup>	34,6 ± 4,76 <sup>b</sup>
Sev. 2	<i>Sevillana</i>	90	50,55 ± 3,5 <sup>a</sup>	1,86 ± 1,26 <sup>b</sup>	37,93 ± 5,54 <sup>e</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. NA\* : Non analysé. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan (p < 0,05).

D'après ces résultats, nous remarquons que le paramètre L\* varie de 45,27 ± 2,87 à 57,56 ± 2,64, le b\* varie de 28,69 ± 2,51 à 42,42 ± 2,29. En général, aucune différence significative n'a été observée entre les échantillons pour ces 2 paramètres. Tandis que le paramètre a\* révèle une différence significative entre certains échantillons, prenant exemple l'échantillon Sig. 3f,

où la valeur du paramètre  $a^*$  est de  $4,55 \pm 2,78$ , ce qui signifie que l'olive est plus rougeâtre, par contre l'échantillon Sig. 3d a montré une valeur négative ( $-0,10 \pm 1,04$ ) et par conséquent, la couleur est plus verdâtre.

Comparativement à d'autres études, les résultats des paramètres  $L^*$  et  $b^*$  sont proches des résultats signalés dans les travaux de (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2013 et 2014 ; Garcia-Serrano *et al.*, 2019 et 2020a ; Mantzouridou *et al.*, 2020) pour les olives de table style Espagnol de variétés *Manzanilla*, *Hojiblanca* et *Chalkidiki*. Par contre, les valeurs du paramètre  $a^*$  pour la majorité de nos échantillons ne sont pas proches des résultats des travaux cités. Cette différence est peut-être liée au stade de maturation des olives à la récolte ou à la différence variétale. En conclusion, les procédés d'élaboration appliqués n'ont pas d'effets significatifs sur la couleur des olives de table étudiées.

Les paramètres de couleur pour les olives de tables commerciales sont présentés dans le Tableau XXV. Le paramètre  $L^*$  est plus élevé pour les olives vertes et les olives de couleur tournante comparativement aux olives noires oxydées, car ces dernières ont une composante de couleur noire plus élevée.

**Tableau XXV:** Valeurs des paramètres CIE des olives de table commerciales

Type	Echantillon	Couleur		
		$L^*$	$a^*$	$b^*$
Olives vertes style Espagnol	1	$39,9 \pm 1,4$ <sup>bc</sup>	$2,3 \pm 0,2$ <sup>b</sup>	$24,6 \pm 0,1$ <sup>b</sup>
	2	$42,9 \pm 2,1$ <sup>a</sup>	$1,0 \pm 0,3$ <sup>cd</sup>	$26,2 \pm 1,0$ <sup>a</sup>
	3	$39,7 \pm 1,5$ <sup>cd</sup>	$2,4 \pm 0,3$ <sup>b</sup>	$24,0 \pm 1,0$ <sup>b</sup>
	4	$39,7 \pm 0,6$ <sup>bc</sup>	$2,9 \pm 0,1$ <sup>b</sup>	$26,7 \pm 0,4$ <sup>a</sup>
	5	$41,9 \pm 0,6$ <sup>ab</sup>	$1,5 \pm 0,2$ <sup>bcd</sup>	$23,8 \pm 0,7$ <sup>b</sup>
	6	$40,4 \pm 0,8$ <sup>bc</sup>	$1,6 \pm 0,1$ <sup>bcd</sup>	$23,1 \pm 1,2$ <sup>bc</sup>
	7	$37,3 \pm 0,9$ <sup>de</sup>	$2,1 \pm 0,2$ <sup>bc</sup>	$22,2 \pm 0,2$ <sup>c</sup>
Olives naturelles tournantes	8	$26,8 \pm 0,9$ <sup>f</sup>	$2,8 \pm 1,8$ <sup>b</sup>	$10,2 \pm 0,5$ <sup>e</sup>
	9	$35,2 \pm 0,2$ <sup>e</sup>	$6,6 \pm 0,2$ <sup>a</sup>	$10,2 \pm 0,8$ <sup>e</sup>
	10	$38,4 \pm 1,3$ <sup>cd</sup>	$6,4 \pm 0,8$ <sup>a</sup>	$16,8 \pm 0,7$ <sup>d</sup>
Olives noires oxydées	11	$18,6 \pm 0,3$ <sup>g</sup>	$0,4 \pm 0,0$ <sup>d</sup>	$0,0 \pm 0,2$ <sup>f</sup>
	12	$18,6 \pm 0,5$ <sup>g</sup>	$0,4 \pm 0,1$ <sup>d</sup>	$-0,0 \pm 0,2$ <sup>f</sup>
	13	$18,1 \pm 0,2$ <sup>g</sup>	$0,4 \pm 0,0$ <sup>d</sup>	$-0,1 \pm 0,1$ <sup>f</sup>

Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à pages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

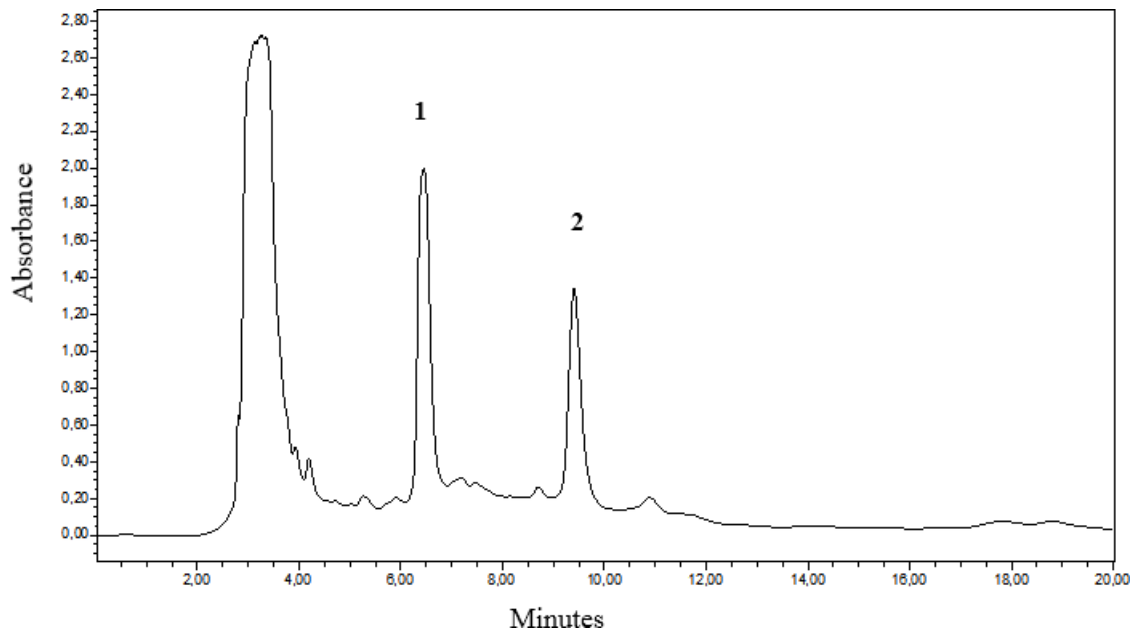
Des valeurs plus élevées de paramètre a\* ont été attribuées aux olives naturelles en raison de leur couleur violette, des valeurs plus proches du vert pour les olives de style Espagnol et des valeurs plus proches de zéro pour les olives noires oxydées. Les valeurs du paramètre b\* indiquent une teinte plus jaunâtre pour les olives vertes de type Espagnol et une couleur plus bleutée pour les olives de couleur tournante naturelle. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment par d'autres chercheurs (Rallo *et al.*, 2018).

#### **II.1.11. Analyse des acides triterpéniques**

Les olives de table sont connues par leur richesse en acides triterpéniques en particulier l'acide maslinique et l'acide oléanolique. Ces deux composés bioactifs ont été rapportés dans divers travaux scientifiques pour leurs multiples activités biologiques (anti-inflammatoire, antioxydant, antimicrobien, antiviral, cardio-protecteur, anti-hyperglycémie, anti-hypertension, anti- hyperlipidémie et activités anti-tumeurs) (Medina *et al.*, 2012 ; Alexandraki *et al.*, 2014 ; Rufino-Palomares *et al.*, 2022).

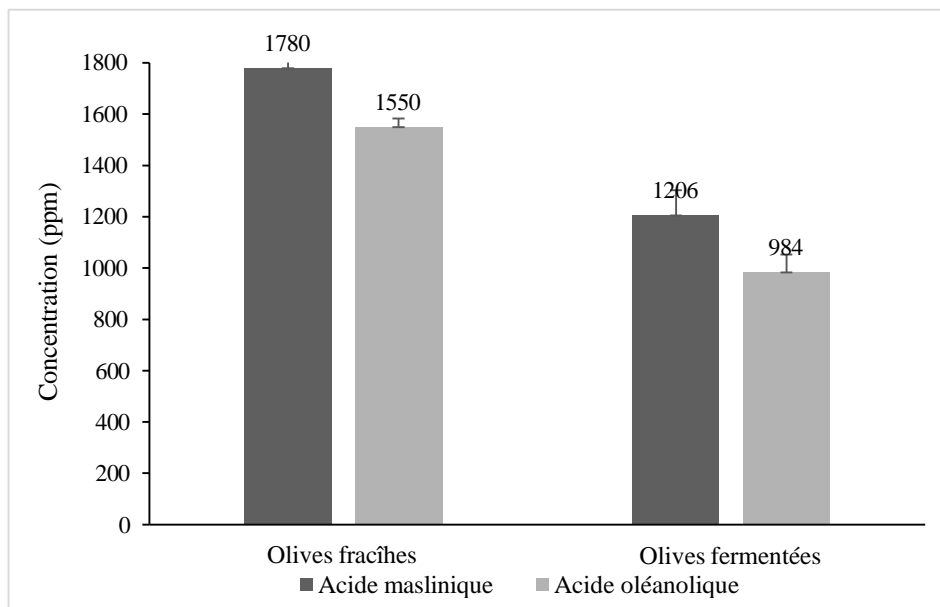
Les acides triterpéniques (maslinique et oléanolique) ont été quantifiés dans la pulpe d'olive pour la première fois par Romero *et al.* (2010) dans 17 variétés. Le présent travail est la première étude qui s'est intéressée à l'analyse de ces composés dans les olives de la variété *Sigoise*.

Dans cette étude, les acides oléanolique et maslinique ont été extraits des olives, préalablement séchées pour éviter les interférences de l'eau lors de l'analyse, avec un mélange de méthanol/éthanol (1:1). Une bonne séparation des acides oléanolique et maslinique a été observée comme le montre le chromatogramme à la Figure 33. Le pic 1 correspond à l'acide maslinique et le pic 2 correspond à l'acide oléanolique.



**Figure 34 :** Chromatogramme HPLC à 210 nm de l'extrait d'acides triterpéniques des olives fraîches de la variété *Sigoise*. Pics : (1) acide maslinique ; (2) acide oléanolique.

La concentration initiale d'acides maslinique et oléanolique dans les olives fraîches est respectivement de  $1780 \pm 67$  et  $1550 \pm 98$  ppm (Figure 34), et leurs concentrations dans les olives fermentées (120<sup>ème</sup> jours de la fermentation) sont de  $1206 \pm 33$  et  $984 \pm 69$  ppm, respectivement.



**Figure 35 :** Concentration des acides triterpéniques (acides maslinique et oléanolique) en ppm dans les olives fraîches et les olives fermentées de la variété *Sigoise*

Nous notons que la somme des acides maslinique et oléanolique dans les olives fraîches atteint plus de 3000 ppm. Ces résultats montrent la richesse de la variété *Sigoise* algérienne en acides triterpéniques par rapport aux 17 variétés étudiés par (Romero *et al.*, 2010). Par contre,

la concentration totale des acides triterpéniques dans les olives fermentées est inférieure à celles rapportées pour les olives noires naturelles variétés *Empeltre* (Medina *et al.*, 2019), *Manzanilla* et *Hojiblanca* (Garcia *et al.*, 2018), et elle est supérieure à celles rapportées pour les olives vertes style Espagnol de la variété *Conservolea* (Alexandraki *et al.*, 2014).

D'après la Figure 34, la concentration de l'acide maslinique est supérieure à la concentration de l'acide oléanolique. Ces résultats concordent avec les données rapportées par (Romero *et al.*, 2010 ; Medina *et al.*, 2012 ; Alexandraki *et al.*, 2014).

Une réduction de 32 et 36 % de la concentration des acides maslinique et oléanolique, respectivement, a été observée dans les olives fermentées comparativement à leurs concentrations dans les olives fraîches. Cette réduction est attribuée au processus d'élaboration par la méthode style Espagnol. En effet, Alexandraki *et al.* (2014) ont signalé que la réduction de la concentration de l'acide maslinique est affectée durant le traitement alcalin et durant le rinçage. Selon Romero *et al.* (2010), cette réduction est due à l'augmentation de la solubilité des acides triterpénique dans un pH alcalin. Contrairement à l'acide oléanolique, la réduction de sa concentration est légèrement affectée par le procédé d'élaboration, mais une réduction importante a été observée durant la fermentation, et ceci a été attribué à sa nature chimique selon Alexandraki *et al.* (2014).

En outre, Romero *et al.* (2010) ont également trouvé des quantités élevées d'acides maslinique et oléanolique dans la solution utilisée pour le traitement alcalin et dans l'eau utilisée pour le premier rinçage, ce qui indique une perte de ces deux acides triterpéniques du fruit lors de ces lavages.

Bien que le processus d'élaboration induise des pertes importantes en acides triterpénique présents dans les olives crues, la concentration finale en ces composés, fait de l'olive de table verte variété *Soigoise* une bonne source de ces composés bioactifs.

L'analyse des acides triterpéniques dans les olives de tables commerciales a montré que ces composés sont présentes en forte concentration dans les olives naturelles tournantes, suivie des olives vertes style Espagnol et enfin des olives noires oxydées (Tableau XXVI). La perte de ces composés bioactifs est intimement liée au nombre d'étapes de lavage lors de la transformation, expliquant la plus faible concentration dans les olives noires oxydées (Romero *et al.*, 2004 ; Mettouchi *et al.*, 2016 ; Johnson *et al.*, 2018 ; Ait Chabane *et al.*, 2021).

**Tableau XXVI** : Concentration (ppm) des acides triterpéniques (acides maslinique et oléanolique) dans les olives commerciales

Type	Echantillon	Acide maslinique	Acide oléanolique
Olives vertes style Espagnol	1	637 ± 39 <sup>e</sup>	190 ± 32 <sup>de</sup>
	2	1670 ± 525 <sup>d</sup>	532 ± 29 <sup>d</sup>
	3	2412 ± 20 <sup>bc</sup>	1389 ± 134 <sup>abc</sup>
	4	2101 ± 15 <sup>cd</sup>	1052 ± 222 <sup>c</sup>
	5	462 ± 2 <sup>e</sup>	110 ± 6 <sup>e</sup>
	6	593 ± 35 <sup>e</sup>	143 ± 30 <sup>e</sup>
	7	2434 ± 582 <sup>bc</sup>	1613 ± 418 <sup>a</sup>
	8	3758 ± 662 <sup>a</sup>	1615 ± 232 <sup>a</sup>
Olives naturelles tournantes	9	2853 ± 269 <sup>b</sup>	1466 ± 130 <sup>ab</sup>
	10	2631 ± 107 <sup>bc</sup>	1190 ± 96 <sup>bc</sup>
	11	90 ± 0 <sup>e</sup>	62 ± 5 <sup>e</sup>
Olives noires oxydées	12	103 ± 14 <sup>e</sup>	85 ± 12 <sup>e</sup>
	13	54 ± 11 <sup>e</sup>	58 ± 24 <sup>e</sup>

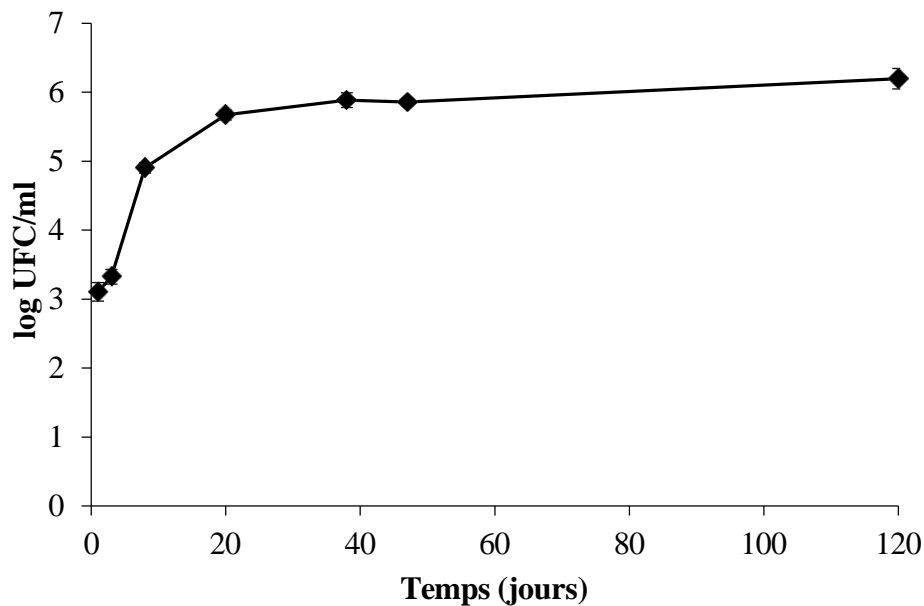
Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

## II.2. Résultats des analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques ont porté sur le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale, des bactéries lactiques, des entérobactéries et des levures au cours du processus de la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig. 4) et dans les échantillons des saumures industrielles et commerciales.

### II.2.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

La flore mésophile aérobie totale représente toutes les populations microbiennes naturellement présentes dans le milieu (olives, saumure et matériel) (Rokni *et al.*, 2015). Ce dénombrement donne des informations sur la qualité hygiénique et sensorielle, sur l'application des bonnes pratiques de fabrication et de la durée de conservation du produit (Romeo, 2012).



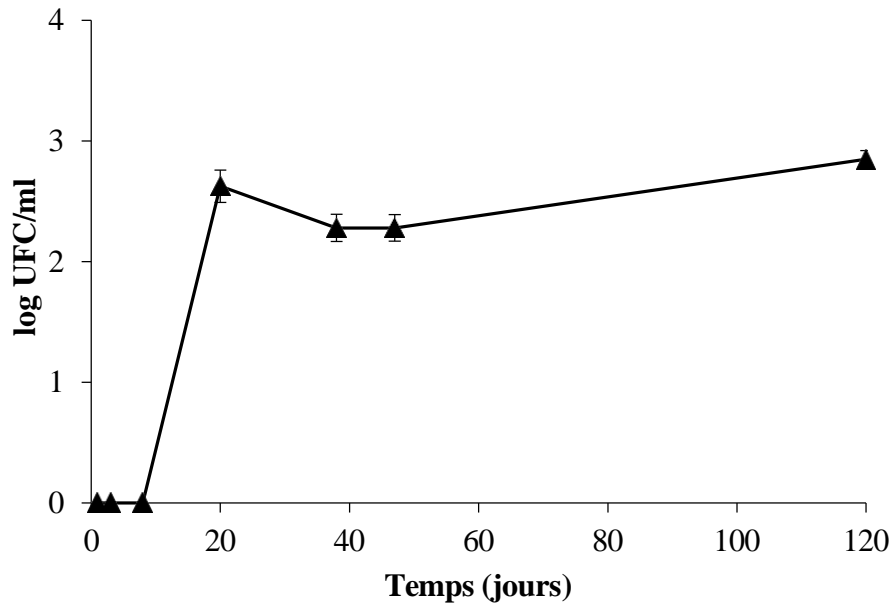
**Figure 36:** Evolution de la flore mésophile totale dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Cette flore constitue le principal groupe détecté dans la saumure Sig.4 avec une population supérieure à 5 log UFC/ml au cours des premiers jours de saumurage, une croissance légère est remarquée pour se stabiliser à partir du 20<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de la fermentation à une valeur de  $6,20 \pm 0,15$  log UFC/ml (Figure 35). Ces valeurs sont supérieures par rapport à celles signalées par Abriouel *et al.* (2011) au cours de la fermentation naturelle des olives de table vertes de la variété *Aloreña*. Cependant, elles restent proches des résultats rapportés par (Martín-Vertedor *et al.*, 2021) qui ont noté des valeurs allant de 1,42 à 5,05 log UFC/ml du 5<sup>ème</sup> au 120<sup>ème</sup> jours de la fermentation des olives de table style Espagnol de la variété *Manzanilla Cacereña*.

### II.2.2. Dénombrement des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques n'ont pas été détectées pendant les premiers jours de la fermentation dans la saumure de variété *Sigoise* (Sig.4) comme le montre la Figure 36. Leur présence a été détectée après le 20<sup>ème</sup> jours de la fermentation pour atteindre une valeur de  $2,85 \pm 0,07$  log UFC/ml à la fin de la fermentation.

La population des bactéries lactiques est très faible par rapport à celle retrouvée par d'autres auteurs dans la fermentation spontanée des olives de table style Espagnol de différentes variétés tels que *Conservolea* (Chranioti, *et al.*, 2018), *Manzanilla* et *Gordal* (De Castro *et al.*, 2018 et 2019).



**Figure 37** : Evolution des bactéries lactiques dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

Habituellement, les bactéries lactiques sont détectées après 48 à 72 h de saumurage (Lanza, 2013). Cependant, dans notre étude nous avons remarqué que la croissance des bactéries lactiques était tardive. Parmi les facteurs qui auraient pu limiter l'adaptation des bactéries lactiques, c'est l'environnement de la saumure et la disponibilité des nutriments (Grounta et Panagou, 2017). La faible concentration de sucres que nous avons trouvés au début de la fermentation et sa consommation par d'autres micro-organismes comme les aérobies mésophiles, les levures ou les entérobactéries ont retardé la croissance des bactéries lactiques.

À l'inverse, les saumures industrielles ont montré une forte population des bactéries lactiques dans une fourchette de  $4,32 \pm 0,22$  à  $7,52 \pm 0,02$  log UFC/ml à la fin de la fermentation (Tableau XXVII). Ces valeurs sont similaires à celles observées par les auteurs précédents, sauf pour les échantillons Sig.3f ; Sig.4 et Sev. 1.

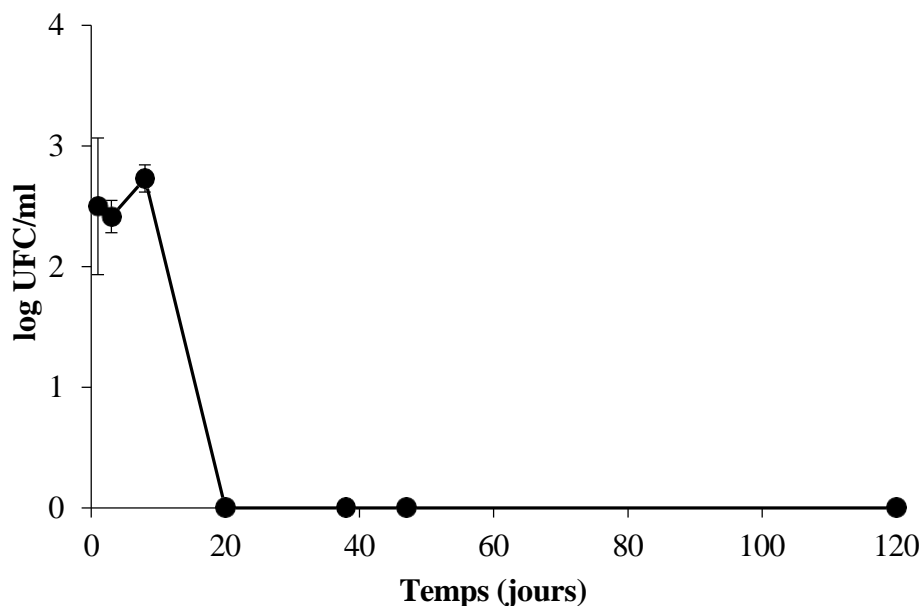
**Tableau XXVII:** Résultats du dénombrement des bactéries lactiques dans les échantillons des saumures industrielles

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Bactéries lactiques (log UFC/ml)
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	6,00 ± 0,29 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	5,44 ± 0,01 <sup>b</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	4,32 ± 0,22 <sup>c</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	7,52 ± 0,02 <sup>de</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	7,57 ± 0,01 <sup>de</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	7,50 ± 0,01 <sup>de</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	5,74 ± 0,01 <sup>ab</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	6,50 ± 0,28 <sup>f</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	6,89 ± 0,7 <sup>fg</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	5,49 ± 0,27 <sup>b</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	2,21 ± 0,0 <sup>h</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	2,85 ± 0,07 <sup>i</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	7,25 ± 0,01 <sup>dg</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	7,52 ± 0,02 <sup>dg</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	7,46 ± 0,00 <sup>dg</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	2,72 ± 0,01 <sup>i</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	7,83 ± 0,01 <sup>e</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ).

### II.2.3. Dénombrement des entérobactéries

La famille des entérobactéries est fréquemment retrouvée dans les olives de table après saumurage lorsque le pH est encore alcalin ou neutre et diminue durant la fermentation. En effet, plusieurs auteurs ont signalé la présence des entérobactéries au début de la fermentation et leur disparition durant la fermentation (Sánchez *et al.*, 2001 ; De Castro *et al.*, 2002 ; Lanza, 2013 ; Heperkan, 2013 ; Anagnostopoulos *et al.*, 2020b ; Benítez-Cabello *et al.*, 2020). Dans nos échantillons, les entérobactéries sont présentes dans la saumure Sig.4 (Figure 37) durant les premiers jours de saumurage, atteignant une concentration de  $2,73 \pm 0,11$  UFC/ml au 8<sup>ème</sup> jour, et elles n'ont pas été détectées par étalement après 20 jours, ceci peut être expliqué par la diminution du pH au-dessous de 5 (Figure 19). En outre, elles n'ont pas été détectées dans tous les échantillons industriels (Tableau XXVIII) à l'exception de la saumure Ver. 2 au 120<sup>ème</sup> jour qui a montré une abondance des entérobactéries de l'ordre de  $4,52 \pm 0,26$  log UFC/ml.



**Figure 38** : Evolution des entérobactéries dans la saumure durant la fermentation de la variété *Sigoise* (Sig.4)

**Tableau XXVIII** : Résultats du dénombrement des entérobactéries dans les échantillons des saumures industrielles

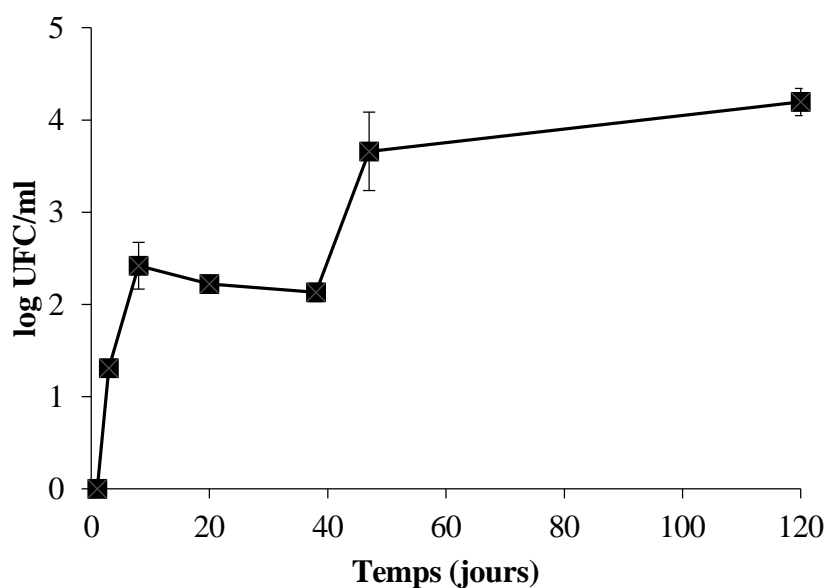
Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Entérobactéries (log UFC/ml)
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	ND
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	ND
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	ND
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	ND
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	ND
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	ND
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	ND
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	4,52 ± 0,26
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	ND
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	ND

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. ND : Non détecté.

La présence des entérobactéries dans la saumure de l'échantillon Ver. 2 au stade de la fermentation (120<sup>ème</sup> jour), peut être expliquée par les conditions favorables à leur prolifération, avec un pH de 4,7, la faible acidité (0,38 %) et le taux de sel bas (3,6 %). D'après ces données, ces paramètres sont optimaux pour la croissance des entérobactéries. Mastralexi *et al.* (2019) ont détecté les entérobactéries viables dans la saumure tout au long du processus de la fermentation des olives de table verte de la variété *Prasines Elies Chalkidikis* élaborée au style Espagnol avec une concentration maximale de 2 log UFC/ml à la fin de la fermentation. Les mêmes auteurs ont noté que ces résultats peuvent remettre en cause le statut hygiénique de ce produit, et ils ont appuyé sur l'importance du contrôle du pH au cours de la fermentation, et la correction de l'acidité par l'ajout des acides organiques comme l'acide lactique et l'acide citrique.

#### II.2.4. Dénombrement des levures et moisissures

L'évolution des levures dans la saumure de l'échantillon Sig. 4 tout au long du processus de la fermentation est représentée dans la Figure 38. D'après les résultats, la population des levures augmente considérablement durant la première semaine de la fermentation, puis se stabilise à partir du 20<sup>ème</sup> jour à une valeur de  $2,22 \pm 0,01$  log UFC/ml, pour augmenter de nouveau à partir du 38<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de la fermentation pour atteindre une valeur maximale de l'ordre de  $4,20 \pm 0,15$  log UFC/ml.



**Figure 39** : Evolution des levures dans la saumure de l'échantillon Sig.4

L'évolution des levures dans la saumure de l'échantillon Sig.4 est similaire à celle rapportée par Marsilio *et al.* (2005), au cours de la fermentation des olives de table verte de la variété *Ascolana tenera* élaborée au style Espagnol.

Les levures ont un effet désirable et un effet indésirable dans la fermentation des olives de table. Dans certains cas, la dominance des levures dans la fermentation, induit à une compétitivité nutritive avec les bactéries lactiques, et par conséquent la diminution de la production de l'acide lactique et ceci a été constaté dans notre étude. De plus, une croissance excessive des levures pourrait également conduire à une production vigoureuse de CO<sub>2</sub> qui pourrait pénétrer dans les olives et endommager les fruits en raison de la formation des pochettes de gaz (Arroyo-López *et al.*, 2012).

**Tableau XXIX :** Résultats du dénombrement des levures dans les échantillons des saumures industrielles

Echantillon (Code*)	Industrie (Numéro)	Variété	Temps de fermentation (jours)	Levures (log UFC/ml)
Sig. 1a	1	<i>Sigoise</i>	90	4,08 ± 0,09 <sup>a</sup>
Sig. 1b	1	<i>Sigoise</i>	90	4,09 ± 0,16 <sup>a</sup>
Sig. 1c	1	<i>Sigoise</i>	60	5,58 ± 0,00 <sup>bc</sup>
Sig. 2a	2	<i>Sigoise</i>	90	6,24 ± 0,90 <sup>cd</sup>
Sig. 2b	2	<i>Sigoise</i>	90	5,94 ± 0,23 <sup>bcd</sup>
Sig. 3a	3	<i>Sigoise</i>	90	5,25 ± 0,07 <sup>b</sup>
Sig. 3b	3	<i>Sigoise</i>	90	5,95 ± 0,18 <sup>bcd</sup>
Sig. 3c	3	<i>Sigoise</i>	90	5,93 ± 0,11 <sup>bcd</sup>
Sig. 3d	3	<i>Sigoise</i>	60	6,22 ± 0,79 <sup>cd</sup>
Sig. 3e	3	<i>Sigoise</i>	120	5,61 ± 0,43 <sup>bc</sup>
Sig. 3f	3	<i>Sigoise</i>	90	6,06 ± 0,02 <sup>bcd</sup>
Sig. 4	4	<i>Sigoise</i>	120	4,20 ± 0,15 <sup>a</sup>
Ver. 1a	1	<i>Verdale</i>	120	6,32 ± 0,03 <sup>cd</sup>
Ver. 1b	1	<i>Verdale</i>	120	6,21 ± 0,19 <sup>cd</sup>
Ver. 2	2	<i>Verdale</i>	120	6,20 ± 0,80 <sup>cd</sup>
Sev. 1	1	<i>Sevillana</i>	120	6,66 ± 0,11 <sup>d</sup>
Sev. 2	2	<i>Sevillana</i>	90	6,38 ± 0,32 <sup>cd</sup>

\*Signification du code échantillon : Les trois lettres font référence à la variété, le numéro fait référence au numéro de l'industrie et la dernière lettre fait référence aux différents fermentateurs analysés. Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan (p <0,05).

D'autre part, les levures contribuent à l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des olives par la production du glycérol, l'éthanol, les esters, et d'autres composés volatils (Arroyo-López *et al.*, 2012). Elles peuvent aussi contribuer à la désamérisation naturelle des olives grâce à leur habilité de dégrader l'oleuropéine. De plus, certaines espèces de levures

renforcent le développement de *Lactiplantibacillus plantarum* et *Lactiplantibacillus pentosus*, par la synthèse des substances comme les vitamines et les acides aminés qui sont essentiels à la croissance de ces espèces de *Lactiplantibacillus*. En plus, les levures possèdent une activité inhibitrice sur un nombre considérable d'espèces fongiques (Arroyo-López *et al.*, 2012).

Les valeurs de la population des levures dans les saumures industrielles mentionnées dans le Tableau XXIX, sont généralement élevées dans la plupart des échantillons. Elles se situent entre 4 et 6 log UFC/ml.

### **II.2.5. Dénombrement de la population microbienne dans les saumures d'olives de table commerciales**

Le Tableau XXX représente le dénombrement de la population microbienne dans les échantillons d'olives de table commerciales algériennes étudiés. La flore mésophiles aérobies est assez élevée pour tous les échantillons, dépassant 7 log UFC/ml dans les échantillons d'olives noires oxydées (11, 12 et 13). Il est normal de trouver des niveaux bactériens aussi élevés dans les olives conditionnées sans traitement thermique (Medina *et al.*, 2018 ; Sab *et al.*, 2021). La population de levures varie entre 4,66 et 6,47 UFC/ml, étant abondante dans tous les échantillons quel que soit le type de préparation. Les bactéries lactiques ont été détectées à des concentrations plus élevées dans les olives naturelles tournante et à des niveaux plus faibles dans les olives noires oxydées. Étonnamment, les BL ont été détectées que dans deux échantillons d'olives vertes à l'espagnole, ces micro-organismes sont généralement prédominants dans ce type de transformation et ont tendance à rester dans le produit même après la fermentation (Sab *et al.*, 2021).

Les Entérobactéries n'ont pas été détectées dans les olives vertes et naturelles, car ces micro-organismes ne se développent pas dans des conditions à pH acide. Or, elles ont bien été détectés dans olives noires oxydées, avec des valeurs moyennes de 5,8 UFC/ml. Ce groupe a été identifié dans tous les échantillons, probablement en raison de leur présence au cours des étapes initiales du processus de la fermentation, lorsque les valeurs du pH ont tendance à être plus alcalines. Les entérobactéries constituent un groupe de bactéries qui comprennent des agents pathogènes potentiels et servent d'indicateurs d'une mauvaise hygiène dans le processus de production ou de conditionnement, ce qui est préoccupant du point de vue sécurité alimentaire (Medina-Pradas *et al.*, 2017).

**Tableau XXX** : La population microbienne dans la saumure des olives de table commerciales

Type	Echantillon	Log UFC/ml			
		MAT	Levures	LAB	Entérobactéries
Olives vertes style Espagnol	1	5,57 ± 0,15 <sup>c</sup>	5,56 ± 0,25 <sup>abc</sup>	<LD	<LD
	2	5,49 ± 0,04 <sup>c</sup>	5,46 ± 0,07 <sup>abc</sup>	<LD	<LD
	3	6,45 ± 0,06 <sup>b</sup>	6,47 ± 0,14 <sup>a</sup>	5,76 ± 0,01 <sup>ab</sup>	<LD
	4	5,57 ± 0,34 <sup>c</sup>	5,52 ± 0,11 <sup>abc</sup>	<LD	<LD
	5	5,06 ± 0,04 <sup>d</sup>	4,68 ± 0,05 <sup>bc</sup>	<LD	<LD
	6	4,58 ± 0,11 <sup>e</sup>	5,17 ± 0,65 <sup>abc</sup>	<LD	<LD
	7	6,15 ± 0,12 <sup>b</sup>	6,12 ± 0,09 <sup>abc</sup>	6,14 ± 0,04 <sup>a</sup>	<LD
Olives naturelles tournantes	8	6,25 ± 0,10 <sup>b</sup>	6,05 ± 0,04 <sup>abc</sup>	5,27 ± 0,18 <sup>b</sup>	<LD
	9	6,44 ± 0,17 <sup>b</sup>	5,60 ± 0,09 <sup>abc</sup>	6,48 ± 0,15 <sup>a</sup>	<LD
	10	6,43 ± 0,16 <sup>b</sup>	6,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,26 <sup>c</sup>	<LD
Olives noires oxydées	11	7,96 ± 0,23 <sup>a</sup>	5,82 ± 0,14 <sup>abc</sup>	1,54 ± 0,34 <sup>c</sup>	5,95 ± 0,47 <sup>a</sup>
	12	7,73 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,66 ± 0,08 <sup>c</sup>	2,24 ± 0,34 <sup>c</sup>	5,72 ± 0,06 <sup>a</sup>
	13	7,80 ± 0,09 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,68 <sup>ab</sup>	2,30 ± 1,41 <sup>c</sup>	5,93 ± 0,06 <sup>a</sup>

Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan ( $p < 0,05$ ). LD : Limite de Détection.

### II.2.6. Résultats du test de la survie des bactéries pathogènes dans la saumure des olives de tables commerciales

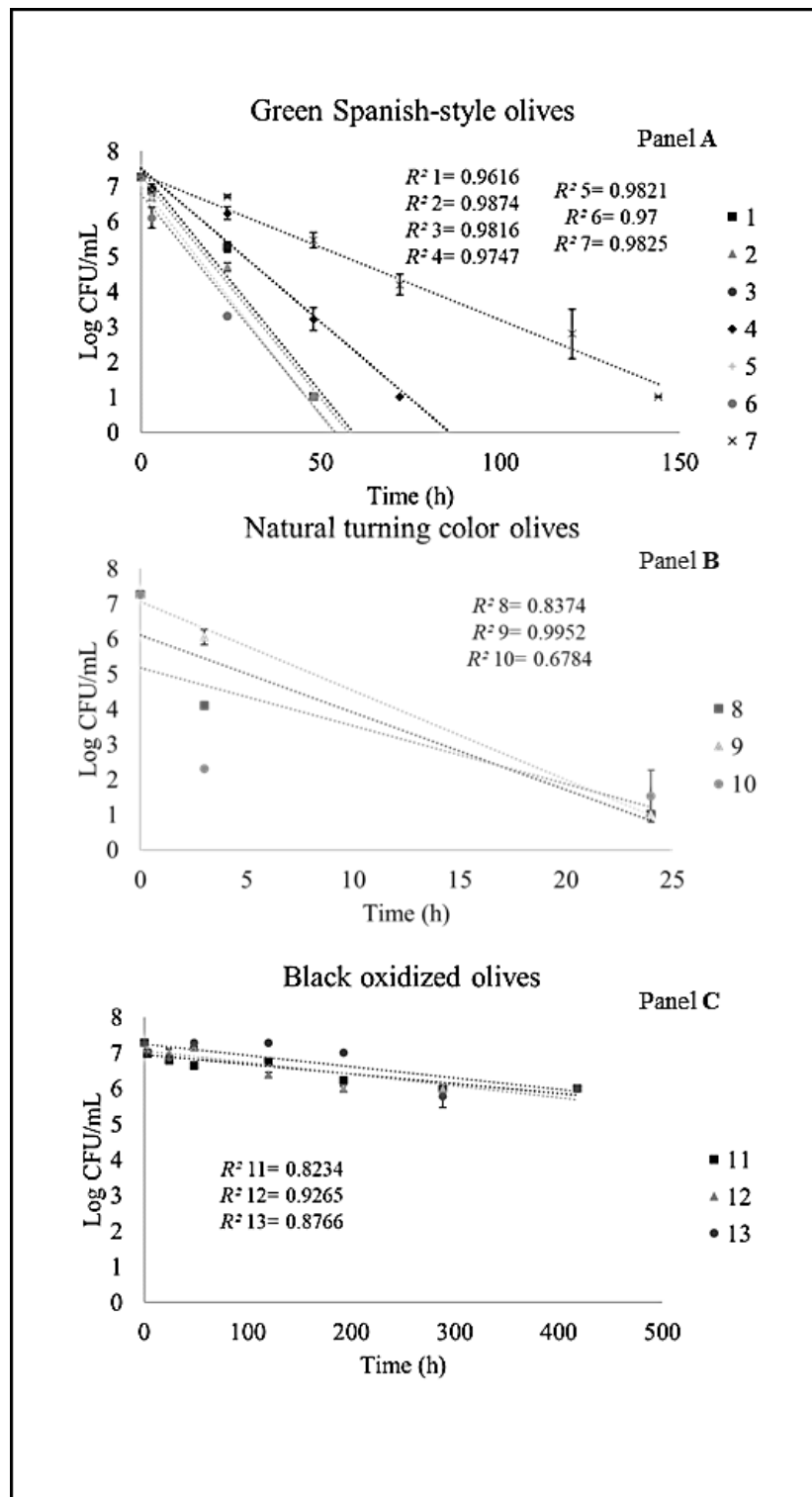
Le test a été réalisé pour étudier le comportement de certains microorganismes pathogènes et leur survie dans les saumures d'olive de table commerciales algériennes. La réduction de 4 unités logarithmiques (valeur 4Dr) pour les différents mélanges de souches pathogènes testées est présentée dans le Tableau XXXI. Les olives naturelles montrent les valeurs 4Dr les plus faibles pour les agents pathogènes testés, suivies par les olives vertes style Espagnol, avec des valeurs moyennes de 12,6 h et 52,6 h, respectivement. L'échantillon 7, qui présente des signes de détérioration, a la durée de survie la plus longue, atteignant 171,9 h pour *S. aureus* et plus de 100 h pour les autres micro-organismes testés.

**Tableau XXXI :** La réduction de 4 unités logarithmiques (valeur 4Dr) pour les différents mélanges de souches pathogènes inoculées dans les saumures d'olives de tables commerciales

Type	Echantillon	4Dr (h)			
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
Olives vertes style Espagnol	1	33,2 ±0,4 <sup>d</sup>	31,8±4,3 <sup>d</sup>	80,4 ±1,3 <sup>d</sup>	33,2 ±0,7 <sup>d</sup>
	2	31,7 ±0,2 <sup>de</sup>	27,7 ±0,1 <sup>e</sup>	68,8 ±0,9 <sup>d</sup>	28,1 ±0,6 <sup>e</sup>
	3	28,7 ±0,0 <sup>ef</sup>	29,8 ±0,7 <sup>de</sup>	27,3 ±1,4 <sup>e</sup>	27,0 ±0,0 <sup>e</sup>
	4	70,1 ±0,6 <sup>c</sup>	63,1 ±0,5 <sup>c</sup>	105,4 ±3,9 <sup>c</sup>	43,7 ±3,9 <sup>c</sup>
	5	28,6 ±0,0 <sup>ef</sup>	28,3 ±0,1 <sup>e</sup>	27,3 ±0,3 <sup>e</sup>	27,0 ±0,0 <sup>e</sup>
	6	27,9 ±0,3 <sup>f</sup>	28,2 ±0,0 <sup>e</sup>	22,4 ±5,5 <sup>e</sup>	27,0 ±0,0 <sup>e</sup>
	7	99,2 ±4,5 <sup>b</sup>	171,9 ±1,6 <sup>b</sup>	123,5 ±6,3 <sup>b</sup>	131,5 ±0,5 <sup>b</sup>
Olives naturelles tournantes	8	12,9 ±0,1 <sup>g</sup>	10,2 ±0,0 <sup>g</sup>	10,0 ±2,6 <sup>e</sup>	2,0 ±0,0 <sup>g</sup>
	9	14,9 ±0,2 <sup>g</sup>	15,2 ±0,0 <sup>g</sup>	15,1 ±0,0 <sup>e</sup>	15,1 ±0,0 <sup>f</sup>
	10	11,7 ±2,0 <sup>g</sup>	10,2 ±0,0 <sup>g</sup>	16,7 ±4,2 <sup>e</sup>	2,0 ±0,0 <sup>g</sup>
Olives noires oxydées	11				
	12		> 45 jours		
	13				

Les valeurs sont la moyenne des analyses en double (écart type). Les valeurs d'une colonne avec la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Duncan (p <0,05).

Les olives noires oxydées présentaient des valeurs de 4Dr supérieures à 45 jours, car elles présentaient des conditions physico-chimiques moins restrictives (Tableaux IX et XI). La figure 39 montre les courbes de survie de *Listeria monocytogenes* pour chaque saumure de différents types de préparation d'olives de table. La cinétique d'inactivation a suivi un modèle cinétique log-linéaire, obtenant des coefficients R2 adéquats. Ces valeurs correspondent à celles trouvées par les auteurs précédents pour diverses méthodes de transformation des olives de table (Grounta *et al.*, 2013 ; Medina *et al.*, 2013 ; Panagou *et al.*, 2013). La survie de ces agents pathogènes dans les saumures dépend principalement du pH, du sel et des niveaux d'acidité (Medina-Pradas et Arroyo-Lopez, 2015). En fait, dans cette étude, une faible survie a été observée dans les saumures qui ont un pH plus bas et des concentrations du sel et d'acidité plus élevées (Tableaux IX et XI).



**Figure 40** : Courbes représentant la survie de *Listeria monocytogenes* dans les saumures d'olives vertes de style Espagnol (panneau A), olives naturelles tournante (panneau B) et d'olives noires oxydées (panneau C). Les barres d'erreur désignent l'écart type des doublons. Les droites de régression et leurs coefficients  $R^2$  sont également affichés. Limite de détection 1 log CFU/mL.

### II.3. Résultats de l'analyse métagénomique

Compte tenu des multiples facteurs qui influenceront le microbiote indésirable, à la fois altérant et pathogène, il a été jugé pertinent de réaliser une analyse génomique pour connaître l'abondance relative des différents micro-organismes présents dans des échantillons des saumures industrielles et commerciales sélectionnés.

Le genre *Lactiplantibacillus* est l'OTU bactérienne prédominante dans tous les échantillons analysés, montrant une abondance relative de 46,2 à 87,5 %. Ce genre a été aussi identifié comme le plus abondant dans les olives de table naturelles (Anagnostopoulos *et al.*, 2020b ; López-García *et al.*, 2021) et dans des olives commerciales (Benítez-Cabello *et al.*, 2020).

La dominance des espèces telles que *Lactiplantibacillus pentosus* et *Lactiplantibacillus plantarum* a été bien décrite dans la fermentation des olives de table comme des micro-organismes producteurs majoritaire d'acide lactique (Benítez-Cabello *et al.*, 2019 ; Bautista-Gallego *et al.*, 2020). Cependant, à nos connaissances ces deux espèces n'ont pas été identifiées par séquençage du gène 16S ARNr.

D'autres espèces telles que *Levilactobacillus brevis*, *Loigolactobacillus coryniformis* et *Paucilactobacillus oligofermentans* ont été détectées dans les saumures avec des valeurs d'abondances relatives maximales de 8,2 ; 22,1 et 20,4 %, respectivement dans les échantillons Ver.2 ; Sig.3a et Sev.2.

D'autres bactéries lactiques appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* et *Enterococcus*, précédemment décrites par d'autres auteurs dans les fermentations des olives de table (De Castro *et al.*, 2002 ; Medina *et al.*, 2018 ; Anagnostopoulos *et al.*, 2020b ; Benítez-Cabello *et al.*, 2020 ; López-García *et al.*, 2021) ont été également détectées avec une large représentation dans les échantillons.

En ce qui concerne les saumures commerciales, l'analyse métagénomique (Figure 41) a permis d'identifier le genre *Lactiplantibacillus* comme le groupe prédominant dans les olives vertes de style Espagnol et les olives naturelle tournante, ceci indique leur présence pendant le processus de fermentation. D'autres BL appartenant aux genres *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*, typiques de la fermentation des olives, ont également été décrites précédemment par d'autres auteurs (Benítez-Cabello *et al.*, 2019 ; Lucena-Padros et Ruiz-Barba, 2019 ; Sab *et al.*, 2021).

La famille des *Enterobacteriaceae* est fréquemment retrouvée dans les olives de table au saumurage lorsque le pH est alcalin ou neutre et elle diminue au cours des premiers jours de la fermentation (Lanza, 2013 ; Anagnostopoulos *et al.*, 2020b ; Benítez-Cabello *et al.*, 2020). En fait, les entérobactéries n'ont pas été détectées par étalement après 20 jours dans la saumure Sig. 4 (Figure 40), et dans tous les échantillons des saumures industrielles en fin de la fermentation, à l'exception de la saumure Ver. 2 au 120<sup>ème</sup> jours avec une valeur de 4,52 log UFC/ml. Cependant, les entérobactéries ont été détectées avec une forte abondance dans les échantillons analysés par séquençage (Figure 40). Benítez-Cabello *et al.* (2020) ont trouvé aussi des *Enterobacteriaceae* présentes dans les olives de table commerciales mais avec une valeur moyenne inférieure à 0,15 % d'abondance relative. Généralement, leur présence ne provoque pas d'effets secondaires, mais il est bien connu que certaines espèces ou souches peuvent provoquer des maladies.

Les colonies sélectionnées à partir de la gélose VRBG, isolées de la saumure Ver. 2 ont été identifiées par séquençage du gène 16S ARNr comme ; *Providencia rettgeri*, *Providencia vermicola* et *Proteus vulgaris*, précédemment identifiées dans les fermentations d'olives de table de la variétés *Arbequina* (Hurtado *et al.*, 2008) et *Nocellara Etnea* (Randazzo *et al.*, 2017). Ces espèces peuvent causer des gastro-entérites et des infections des voies urinaires (Chart, 2012 ; Wang et Pan, 2014). Outre les espèces pathogènes incluses dans cette famille, ces bactéries provoquent la formation de poches de gaz dans les olives et produisent des métabolites qui génèrent des odeurs et des saveurs désagréables dans le produit final (Lanza, 2013).

Dans les saumures d'olives de table commerciales, la famille des *Enterobacteriaceae* est identifiée dans tous les échantillons analysés (Figure 41) et ceci est probablement dû à leur présence durant les phases initiales de la fermentation quand les valeurs du pH étaient plus alcalines.

Le pH élevé (> 4,6) de certaines saumures industrielles (Tableau X) indique qu'une fermentation lactique appropriée n'a pas eu lieu. De plus, selon les faibles concentrations en NaCl, des micro-organismes indésirables responsables de fermentations secondaires pourraient agir. La présence de *Pectinatus brassicae* dans 5 des 7 échantillons analysés (Sig. 3b, Sig. 3d, Ver. 1a, Ver. 2 et Sev. 2) et de *Lentilactobacillus buchneri* dans les saumures Ver. 2 et Sev. 2, suggère l'initiation d'une fermentation secondaire comme décrit précédemment pour les fermentations des cornichons (Breidt *et al.*, 2013b ; Johanningsmeier et McFeeters, 2013, Medina *et al.*, 2016a). Ces micro-organismes peuvent métaboliser l'acide lactique produit par fermentation, en acide propionique, qui est détecté dans ces saumures (voir paragraphe II.1.8).

Le genre *Pectinatus* est aussi détecté dans l'échantillon 7 des saumures d'olives de table commerciales, suggérant l'étape initiale d'une fermentation secondaire (Breidt *et al.*, 2013 ; Medina *et al.*, 2016 ; Medina-Pradas *et al.*, 2017 ; Sab *et al.*, 2021). Le métabolite de ce genre (acide propionique) est détecté dans les saumures d'olive de table commerciales 7, 9, 10 et 12 (Tableau XXI).

De même, le genre *Acetobacter* a été identifié dans cinq des sept saumures industrielles (saumures Sig. 3b, Sig. 3d, Ver. 1a, Ver. 2 et Sev. 2) et dans presque tous les échantillons des saumures d'olives de table commerciales avec une abondance plus élevée dans l'échantillon 3 (Figure 41). La présence de ce microorganisme avec certaines levures oxydatives joue un rôle essentiel dans l'apparition de l'altération par conversion de l'acide lactique en acide acétique (Johanningsmeier et McFeeters, 2013 ; Medina *et al.*, 2016a ; Franco et Pérez-Díaz, 2012 ; Medina et Arroyo-López, 2015 ; Medina-Pradas *et al.*, 2017 ; Sab *et al.*, 2021). Seul l'échantillon de saumure Sig. 1c qui n'a pas montré la présence d'acides butyrique, isobutyrique et propionique, ce qui est peut-être lié à l'absence des genres *Pectinatus* et *Acetobacter* (Tableau XX).

La consommation de l'acide lactique dans les olives de table compromet le pouvoir conservateur des olives fermentées et augmente les valeurs de pH, ce qui peut permettre la croissance d'autres micro-organismes indésirables comme les genres *Clostridium* et *Enterobacter*, qui sont présents dans certains échantillons (Sev.2 ; Ver.2 ; Sig.3b ; Sig.3d ; Sig.3a et Ver.1a). Ces microorganismes peuvent métaboliser l'acide lactique et générer l'acide butyrique et l'acide propionique (Franco et Pérez-Díaz, 2012 ; Breidt *et al.*, 2013b). L'échantillon 7 des saumures d'olives de table commerciales montre une abondance relative de 6 % de genre *Clostridium*.

Ces deux composés génèrent des arômes de fumier, de matière organique en décomposition ou de beurre rance, et ils sont considérés comme des indices d'une fermentation putride et butyrique (Gililand et Vaughn, 1943) ou promoteurs de l'altération « zapatería » dans les olives de table altérées (Kawatomari et Vaughn, 1956 ; Plastourgos et Vaughn, 1957 ; Bautista-Gallego *et al.*, 2020). Cette fermentation malodorante produit des olives qui sont totalement inacceptables pour le consommateur.

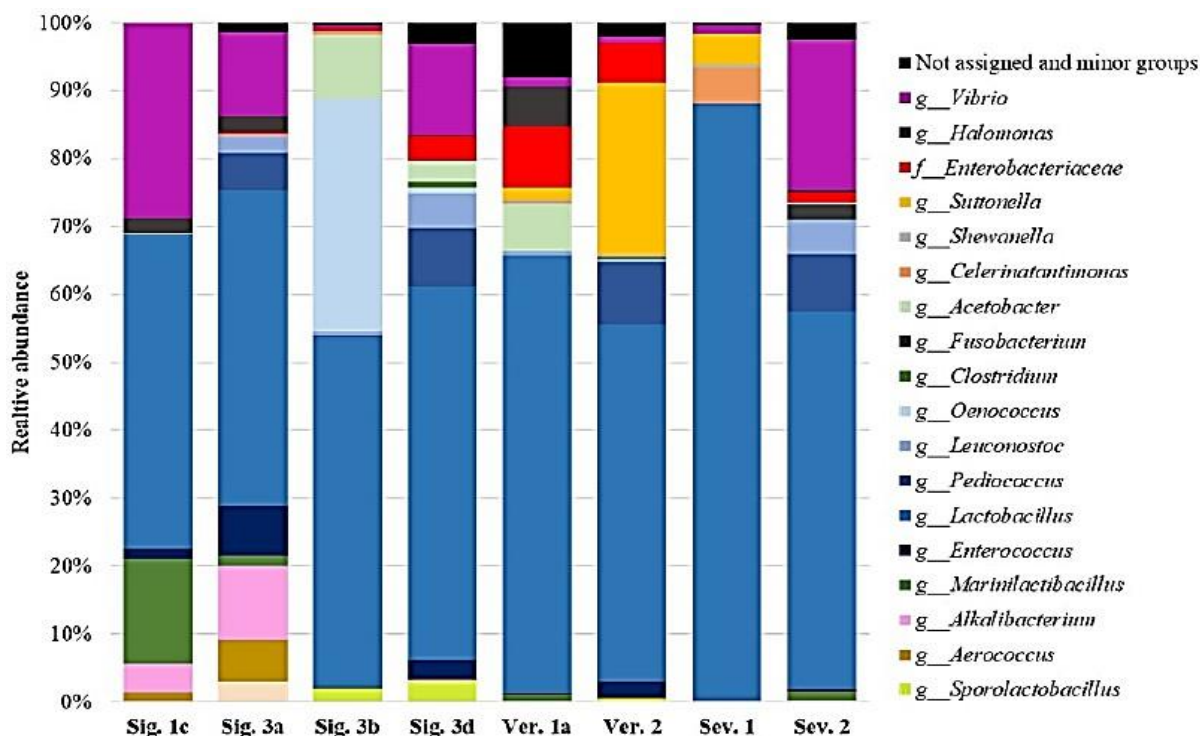
De point de vue sécurité alimentaire, la plupart des saumures analysées dans cette étude présentaient un pH supérieur à 4,6, ce qui pourrait favoriser la germination des spores de *C. botulinum* (Medina et Arroyo-López, 2015). Bien que cette espèce ne soit pas identifiée dans

nos échantillons par séquençage massif, ces paramètres physico-chimiques ne garantissent pas la sécurité du produit. Les olives de table après la fermentation doivent maintenir un pH < 4,0 et le NaCl dans la saumure > 5 % pour éviter toute possibilité de croissance de cet agent pathogène d'origine alimentaire (Lanza, 2013).

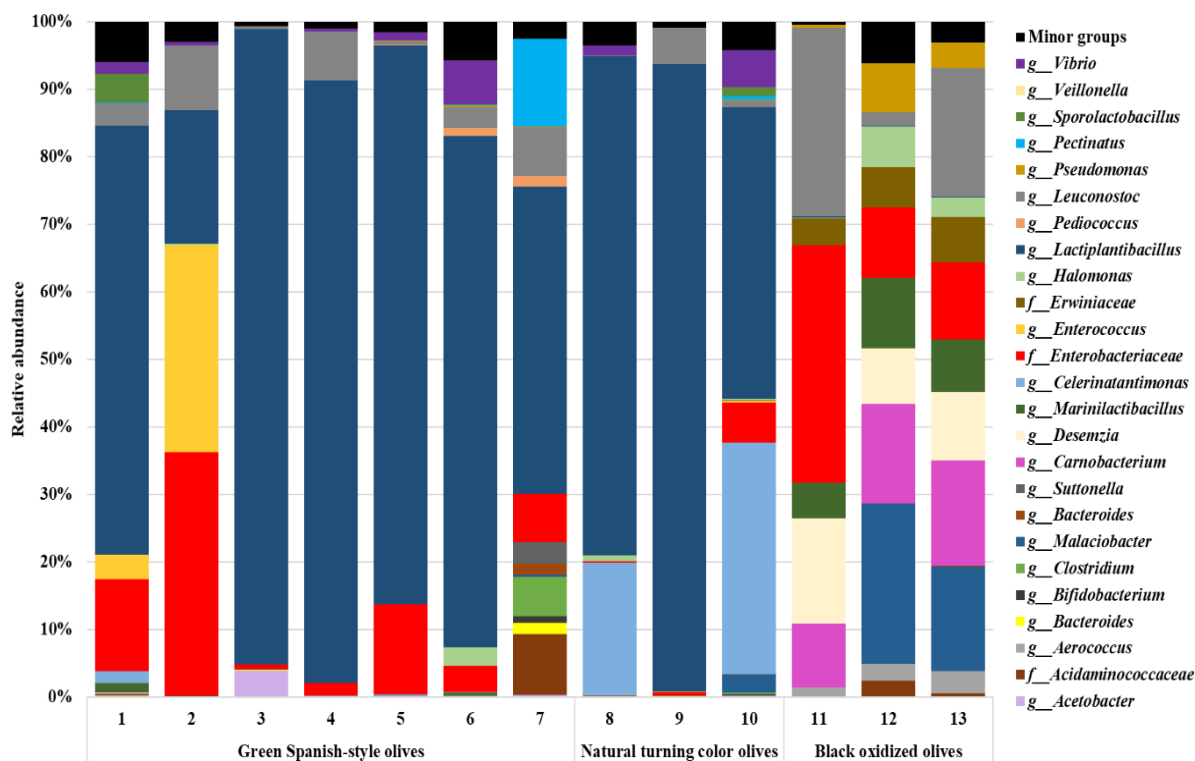
Le genre *Vibrio* était également présent dans tous les échantillons avec une abondance relative supérieure à 20 % dans les saumures Sig.1c et Ver.2 (Figure 40). Il est courant de trouver ce genre dans les saumures de fermentation d'olives de table et son origine est le sel ou les sources marines utilisées pour les saumures (Lucena-Padrós *et al.*, 2015 ; Medina *et al.*, 2018 ; Lucena-Padrós et Ruiz-Barba, 2019 ; Benitez-Cabello *et al.*, 2020). Cependant, au sein de ce genre, *Vibrio metschnikovii* a été identifié comme une bactérie pathogène associée à des maladies humaines provoquant des gastro-entérites ou des septicémies (Matté *et al.*, 2007).

Outre les micro-organismes susmentionnés, il convient également de souligner la présence prédominante des genres spécifiques dans les saumures industrielles et les saumures d'olives de table commerciales étudiées, comme le genre *Celerinatantimonas* qui est détecté en forte abondance dans les saumures industrielles et les olives de table commerciales de type style Espagnol et les olives naturelles tournantes, ce groupe est précédemment identifié à la fin de la fermentation des olives de table directement saumurées (Medina *et al.*, 2018 ; López-García *et al.*, 2021), dans les olives de table commerciales (Benítez-Cabello *et al.*, 2020) et aussi comme bactérie dominante dans la fermentation naturelle des olives noires (Penland *et al.*, 2020). Le rôle joué par ce microorganisme lors de la fermentation des olives de table est encore inconnu, mais selon Penland *et al.* (2020), il était lié à la diminution du pH et à la production d'acide acétique, citrique et lactique. La présence de ce genre avec des *Enterobacteriaceae* pendant les premières étapes de la transformation entraîne la formation du gaz à l'intérieur du fruit, provoquant un « alambrado » (Medina *et al.*, 2017 ; Ruiz-Barba *et al.*, 2022).

En outre, la présence du genre *Marinilactibacillus*, précédemment identifié dans les fermentations d'olives de table vertes (Lucena-Padrós et Ruiz-Barba, 2016 ; López-García *et al.*, 2021), et dans les biofilms d'olives de table commercialisés (Benítez-Cabello *et al.*, 2020). Le genre *Suttonella*, précédemment trouvé dans les olives de table altérées (De Castro *et al.*, 2018 ; López-García *et al.*, 2021) a été aussi détecté.

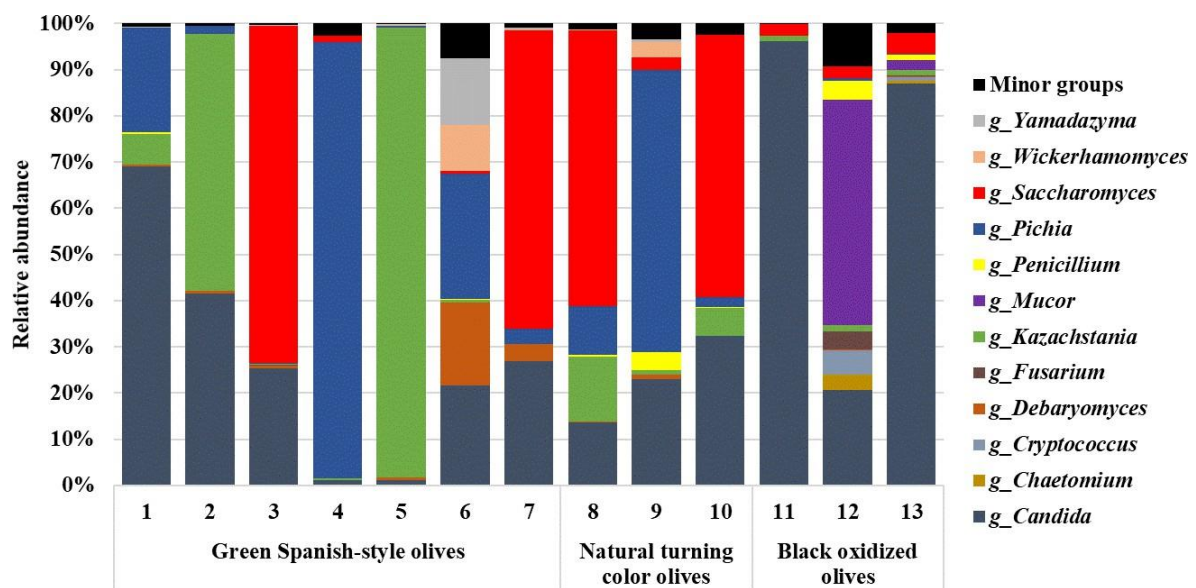


**Figure 41 :** Abondances relatives (%) des genres et familles bactériens obtenues par séquençage des échantillons de saumures sélectionnées après fermentation.



**Figure 42:** Abondances relatives (%) de la famille bactérienne dans les saumures d’olives de table commerciales.

L'analyse métagénomique de la population fongique (Figure 42) a révélé la présence de divers genres caractéristiques des olives de table. Les genres *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia* et *Kazachstania* sont prédominants dans la plupart des échantillons, bien que d'autres groupes ont également été détectés en faible abondance, comme *Wickerhamomyces*, *Debaryomyces*...etc. Tous ces groupes ont été identifiés précédemment et sont caractéristiques de la transformation des olives de table (Benítez -Cabello *et al.*, 2022 ; Lucena-Padros et Ruiz-Barba, 2019 ; Medina *et al.*, 2018). Les levures sont des micro-organismes typiques de la fermentation des olives et contribuent au profil aromatique de ce produit fermenté (Benítez-Cabello *et al.*, 2019).



**Figure 43:** Abondances relatives (%) des genre fongiques dans les saumures d’olives de table commerciales.

*Conclusion générale et  
perspectives*

L'élaboration des olives de table est un processus biochimique complexe où le microbiote indigène présent dans les fruits consomme les nutriments pour effectuer une fermentation lactique, afin d'obtenir une bonne préservation.

Les olives de table au style Espagnol présentent parfois des problèmes de détérioration microbienne, en raison de la croissance incontrôlée de certains microorganismes si les paramètres physico-chimiques (pH, taux de sel, acidité, etc...) de la saumure ne sont pas contrôlés. Ces microorganismes peuvent provoquer des fermentations secondaires au cours des différentes phases de la fermentation et par conséquent l'augmentation du pH dans la saumure, ce qui peut entraîner la prolifération d'autres micro-organismes pathogènes générant un risque pour le consommateur.

Les analyses physico-chimiques effectuées sur les échantillons d'olives de table et de la saumure provenant des quatre industries algériennes, ont révélé que les valeurs adéquates de pH, de sel et d'acidité pour certains échantillons n'ont pas été atteintes pour garantir la qualité et la sécurité des olives de table. Les valeurs élevées de pH et l'acidité faible ont été attribuées aux faibles concentrations initiales des sucres, ou à la consommation de ces sucres par d'autres micro-organismes différents des bactéries lactiques. La plupart des saumures analysées présentaient un pH supérieur à 4,6, ce qui peut favoriser la germination des spores de *C. botulinum* (microorganisme de référence).

Le dénombrement microbiologique a montré que dans certains échantillons, la population des bactéries lactiques était faible et insuffisante pour garantir une bonne fermentation lactique. En outre, l'analyse microbiologique nous a permis de détecter la présence d'entérobactéries viables dans l'échantillon de Ver. 2 à la phase finale de la fermentation. Ces entérobactéries ont été isolées et identifiées par séquençage ; les espèces recensées sont : *Providencia rettgeri*, *Providencia vermicola* et *Proteus vulgaris*.

Le séquençage massif à haut débit a révélé la présence dans les saumures industrielles analysées des micro-organismes d'altérations (*Pectinatus*, *Acetobacter* et *Lactiplantibacillus buchenri*), responsable de la fermentation secondaire, et des microorganismes pathogènes (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Arcobacter*, *Aerococcus* et *Pseudomonas*). Par conséquent, la stabilité microbienne n'est pas assurée dans ces olives de table fermentées.

Dans ce travail nous avons menés aussi une étude approfondie sur les olives de table commerciales du marché algérien, une caractérisation physico-chimique détaillée a été réalisée, révélant des écarts importants avec la réglementation internationale, indiquant un non-respect des normes. L'étude fournit un aperçu de la qualité des olives de table disponibles dans les points de vente interrogés.

Les olives vertes style Espagnol et les olives naturelle tournantes, pour la plupart, ne répondaient pas aux normes établies en termes de pH et de concentration en sel. Par ailleurs, des échantillons d'olives noires oxydées, qui devraient subir une stérilisation en raison de leur pH élevé, ont été retrouvés dans des emballages non stérilisés. Les implications en matière de sécurité associées à ce type de préparation sont particulièrement préoccupantes, comme l'indique le délai prolongé pour obtenir une réduction de 4 unités logarithmiques (valeur 4Dr) des agents pathogènes et population élevée d'entérobactéries.

Il est crucial de respecter les normes internationales de transformation des olives de table et de respecter les limites définies, notamment concernant les olives noires oxydées. La stérilisation de ce produit est indispensable pour maintenir la stabilité microbiologique, compte tenu de ses valeurs de pH proches de la neutralité.

L'analyse microbiologique a révélé des populations élevées d'entérobactéries et d'autres micro-organismes d'altérations dans les saumures, indiquant des carences potentielles dans les pratiques d'hygiène pendant la production.

L'étude évaluant la survie des micro-organismes pathogènes dans les échantillons a indiqué que les conditions physico-chimiques du produit, telles que le pH et la concentration en sel, jouent un rôle crucial dans la prévention de la survie de ces pathogènes. De plus, un effet antimicrobien de certains composés phénoliques présents dans les olives a été observé, soulignant l'importance de ces composés pour la sécurité alimentaire.

En conclusion, notre étude fournit un aperçu sur les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de divers échantillons d'olives de table à l'échelle industriel et commerciale en Algérie. Il faut toutefois souligner les limites liées à la taille de l'échantillonnage et à l'absence des informations détaillées sur le processus de production.

En perspectives, il serait intéressant de :

Améliorer le processus de production des olives de table algériennes peut être par la réduction du nombre de lavage à un seul lavage (6-12 h). Cela éviterait la perte de matières

fermentescibles et d'autres biocomposés, et aiderait aussi à réduire la quantité des eaux usées générées dans le procédé, minimisant ainsi l'impact environnemental.

De même, l'addition de matière fermentescible externe et/ou d'acide au début du saumurage est une pratique industrielle répandue, contribuant à une bonne croissance des bactéries lactiques et l'inhibition d'entérobactéries et d'autres microorganismes indésirables, évitant les fermentations secondaires qui rendent le produit inacceptable pour le consommateur.

En outre, l'utilisation des cultures de démarrage (ferments) favorise la croissance des bactéries lactiques, en dominant le microbiote indigène indésirable et assurant une bonne fermentation pour préserver les bonnes conditions de conservation.

Les olives de table doivent maintenir une concentration de NaCl supérieure à 5 % pendant tout le processus de la fermentation et maintenir des valeurs de pH inférieures à 4 après la fermentation. En plus, il est recommandé d'augmenter le NaCl au-dessus de 8 % pour éviter toute possibilité de croissance de micro-organismes d'altération et pathogènes d'origine alimentaire et garantir ainsi un niveau de qualité élevé. Pour cela, il est vivement recommandé aux producteurs de procéder à un contrôle répété de ces paramètres essentiels, au cours du processus de la fermentation.

L'utilisation des conservateurs et des traitements thermiques ainsi que l'application des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène sont des outils essentiels comme mesures de contrôle pour réduire les altérations des olives de table. Un contrôle microbiologique strict et l'optimisation des processus au sein des industries algériennes pourraient améliorer considérablement la qualité du produit final et son acceptation par le consommateur, garantissant simultanément sa sécurité et sa stabilité microbiologique.

Enfin, pour des travaux futurs, il est recommandé :

- D'élargir cette étude en sélectionnant d'autres variétés et sur d'autres régions productrices d'olives de table comme la région de Sig (Mascara) qui est bien connue par sa grande production d'olives de table.
- Analyser un grand nombre d'échantillons d'olives de tables.
- Réaliser une analyse sensorielle pour évaluer la qualité organoleptique des olives de table commercialisées.

## *Références bibliographiques*

---

**Références bibliographiques**

**Abriouel H. ; Benomar N. ; Lucas R. ; Gálvez A. (2011).** Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (3): 487-496.

**Ait Chabane F. ; Rovellini P. ; Boucheffa S. ; Medina E. ; Tamendjari A. (2019).** Quality of lipid fraction during Spanish-style table olives processing of Sigoise and Azzeradj cultivars. *Food Control*, 111: e107059.

**Ait Chabane F. ; Tamendjari A. ; Rovellini P. ; Romero C. ; Medina E. (2021).** Chemical parameters and antioxidant activity of turning color natural-style table olives of Sigoise cultivar. *Grasas y Aceites*, 72(3), e419.

**Alexandraki V. ; Georgalaki M. ; Papadimitriou K. ; Anastasiou R. ; Zoumpopoulou G. ; Chatzipavlidis, I., Tsakalidou, E. (2014).** Determination of triterpenic acids in natural and alkaline-treated Greek table olives throughout the fermentation process. *LWT-Food Science and Technology*, 58 (2): 609-613.

**Alves M. ; Quintas C. (2016).** Traditional green table olives from the south of Portugal in Traditional foods. In: Kristbergsson K., Oliveira J.(eds), Integrating food science and engineering knowledge into the food chain. Springer, Boston. 367-375.

**Ambra R. ; Lucchetti S. ; Moneta E. ; Peperai M. ; Nardo N. ; Baiamonte I. ; Pastore G. (2017).** Effect of partial substitution of sodium with potassium chloride in the fermenting brine on organoleptic characteristics and bioactive molecules occurrence in table olives debittered using Spanish and Castelvetrano methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(3): 662-670.

**Anagnostopoulos D.A. ; Goulas V. ; Xenofontos E. ; Vouras C. ; Nikoloudakis N. ; Tsaltas D. (2020a).** Benefits of the use of lactic acid bacteria starter in green cracked cypriot table olives fermentation. *Foods*, 9:17.

**Anagnostopoulos D.A. ; Kamilari E. ; Tsaltas D. (2020b).** Evolution of bacterial communities, physicochemical changes and sensorial attributes of natural whole and cracked picual table olives during spontaneous and inoculated fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 11:1128.

- Anagnostopoulo D.A. ; Tsaltas D. (2022).** Current Status, Recent Advances, and Main Challenges on Table Olive Fermentation: The Present Meets the Future. *Frontiers in Microbiology*, 12: 797295.
- Anal A. K. (2019).** Quality ingredients and safety concerns for traditional fermented foods and beverages from Asia: A review. *Fermentation*, 5 (1): 8.
- Aponte M. ; Blaiotta G. ; La Croce F. ; Mazzaglia A. ; Farina V. ; Settanni L. ; Moschetti G. (2012).** Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, 30: 8-16.
- Arroyo-López F.N. ; Romero-Gil V. ; Bautista-Gallego J. ; Rodríguez-Gómez F. ; Jiménez-Díaz R. ; García-García P. (2012).** Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 160: 42-49.
- Arroyo-López F.N. ; Benítez-Cabello A. ; Romero-Gil V. ; Rodríguez-Gómez F. ; Garrido-Fernández A. (2021).** Delving into the bacterial diversity of spoiled green Manzanilla Spanish-style table olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 359: 109415.
- Asociación de Exportadores de Aceitunas de Mesa (Asesma).** (2021). Informations générales du secteur.
- Barnett J.A. (2003).** Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology*, 149 (3): 557-567.
- Bautista-Gallego J. ; Arroyo-López F.N. ; Durán-Quintana M.C. ; Garrido-Fernández A. (2010).** Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixtures. *Food Microbiology*. 27: 403-412.
- Bautista-Gallego J. ; Arroyo-López F.N. ; López-López A. ; Garrido-Fernández A. (2011).** Effect of chloride salt mixtures on selected attributes and mineral content of fermented cracked Aloreña olives. *LWT Food Sciences and Technology*, 44: 120-129.
- Bautista-Gallego J. (2012).** Efecto de diferentes nutrientes minerales en la elaboración de aceitunas de mesa. Thèse de doctorat. Univesité de Séville. Espagne
- Bautista-Gallego J. ; Arroyo-López F.N. ; Rantsiou K. ; Jiménez-Díaz R. ; Garrido-Fernández A. ; Cocolin L. (2013).** Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50 (1): 135-142.

- Bautista-Gallego J. ; Medina E. ; Sánchez B. ; Benítez-Cabello A. ; Arroyo-López F.N. (2020).** Role of lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Grasas y Aceites*, 71: e358.
- Ben Othman N. ; Roblain D. ; Chammen N. ; Thonart P. ; Hamdi M. (2009).** Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116: 662-669.
- Benítez-Cabello A. (2019).** Formación y control de comunidades polimicrobianas sobre la epidermis de las aceitunas de mesa : bases para un nuevo alimento multifuncional. Thèse de doctorat. Université Pablo de Olavide. Espagne
- Benítez-Cabello A. ; Rodríguez-Gómez F. ; Morales M.L. ; Garrido-Fernández A. ; Jiménez-Díaz R. ; Arroyo-López F.N. (2019).** Lactic acid bacteria and yeast inocula modulate the volatile profile of Spanish-style green table olive fermentations. *Foods*, 8 (8): e280.
- Benítez-Cabello A. ; Romero-Gil V. ; Medina-Pradas E. ; Garrido-Fernández A. ; Arroyo-López F.N. (2020).** Exploring bacteria diversity in commercialized table olive biofilms by metataxonomic and compositional data analysis. *Scientific Reports*, 10, 11381.
- Benítez-Cabello A. ; Ramiro-García J. ; Romero-Gil V. ; Medina E. ; Arroyo-López F.N. (2022).** Fungal biodiversity in commercial table olive packages. *Food Microbiology*, 107, Article 104082.
- Benrachou N. (2013).** Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Bleve G. ; Tufariello M. ; Durante M. ; Grieco F.; Ramires F.A. ; Mita G. ; Tasioula-Margari M. ; Logrieco A.F. (2015).** Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food Microbiology*, 46: 368-382.
- Bonatsou S. ; Benítez A. ; Rodríguez-Gómez F. ; Panagou E.Z. ; Arroyo-López F.N. (2015).** Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46: 66-73.
- Bonatsou S. ; Tassou C.C. ; Panagou E.Z. ; Nychas G.J.E. (2017).** Table olive fermentation using starter cultures with multifunctional potential. *Microorganisms*, 5 (2): 30.

- Boskou D. ; Camposeo S. ; Clodoveo M.L. (2015).** Table olives as sources of bioactive compounds. *In: Olive and olive oil bioactive constituents.* Boskou D. (ed), Elsevier, Londres. 217-259.
- Boskou D. (2017).** Table olives: a vehicle for the delivery of bioactive compounds. *Journal of Experimental Food Chemistry*, 3 (123): 2472-0542.
- Boskou G. (2010).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *In: Olives and olive oil in health and disease prevention.* Preedy V.R., Watson R.R. (eds), Elsevier, Londres. 925-934.
- Bourdichon F. ; Casaregola S. ; Farrokh C. ; Frisvad J.C. ; Gerds M.L. ; Hammes W.P., Hansen E.B. (2012).** Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154 (3): 87-97.
- Brändle J. ; Fraberger V. ; Berta J. ; Puglisi E. ; Jami M. ; Kneifel W. ; Domig K.J. (2018).** Butyric acid producing clostridia in cheese—Towards the completion of knowledge by means of an amalgamate of methodologies. *International Dairy Journal*, 86: 86-95.
- Breidt F. ; McFeeters R.F. ; Perez-Diaz I. ; Lee C. (2013a).** Fermented vegetables. *In: Food microbiology: Fundamentals and frontiers.* (4th Ed). Doyle M. P., Buchanan R. L. (Eds.), ASM Press, Washington. 841-855.
- Breidt F. ; Medina E. ; Wafa D. ; Pérez-Díaz I. ; Franco W. ; Huang H ; Johanningsmeier S.D. ; Kim J.H. (2013b).** Characterization of Cucumber Fermentation Spoilage Bacteria by Enrichment Culture and 16S rDNA Cloning. *Journal of Food Science*, 78 (3): M470-M476.
- Brenes M. ; De Castro A. (1998).** Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77 (3): 353-358.
- Brenes M. ; Romero C. ; García P. ; Garrido A. (2004).** Absorption of sorbic and benzoic acids in the flesh of table olives. *European Food Research Technology*, 219, 75–79.
- Brenes M. ; Romero C. ;García, P. (2017).** Optimization of ripe olive processing with a single lye treatment. *Journal of Food Science*, 82, 2078–2084.
- Cabrera-Bañegil M. ; Pérez-Navado F. ; Montañó A. ; Pleite R. ; Martín-Vertedor D. (2018).** The effect of olive fruit maturation in Spanish style fermentation with a controlled temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 91: 40-47.

- Carvalho F. ; Moniz P. ; Duarte L. ; Esteves M. ; Gírio M. (2011).** Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38: 221-227.
- Charoenprasert S. ; Mitchell A. (2012).** Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7081-7095.
- Chart H. (2012).** *Klebsiella, Enterobacter, Proteus* and other Enterobacteria: Pneumonia; urinary tract infection. In: *Opportunist infection in Medical Microbiology* (8<sup>th</sup> Edition). Greenwood D., Barer M., Slack R., and Irving W. (Eds), Elsevier, Londres. 290-297.
- Chorianopoulos N.G. ; Boziaris I.S. ; Stamatiou A. ; Nychas G.J.E. (2005).** Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*, 22: 117-124.
- Chranioti C. ; Kotzekidou P. ; Gerasopoulou D. (2018).** Effect of starter cultures on fermentation of naturally and alkali-treated cv. Conservolea green olives. *LWT - Food Science Technology*, 89: 403-408.
- Ciani M. ; Comitini F. ; Mannazu I. (2013).** Fermentation. Elsevier, Londres. 1-12.
- Cocolin L. ; Alessandria V. ; Botta C. ; Gorra R. ; De Filippis F. ; Ercolini D. ; Rantsiou K. (2013).** NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *PLoS One*, 8 (7): e69074.
- Codex Alimentarius. (2013).** *Standard for table olives*. CODEX STAN. 66-1981. Revision. 1987. Retrieved from [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B66-1981%252FCXS\\_066e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B66-1981%252FCXS_066e.pdf). Accessed October 10, 2023
- Conseil oléicole international, COI. 2004.** Trade standard applying to table olives. Document COI/OT/NC no. 1. Madrid, Espagne.
- Conseil oléicole international, COI. 2021.** Valable en ligne : <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/12/OT-W901-23-11-2020-P.pdf> .
- Conseil oléicole international, COI. 2021.** Janvier/Février 2021. NEWSLETTER. Olives de table - Campagne provisoire 2019/20 et estimation 2020/2021.

**Conseil oléicole international, COI (2023).** *World table olive figures*. Retrieved from <http://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>.

Consulté le 10 Octobre 2023

**Comunian R. ; Ferrocino I. ; Paba A. ; Daga E. ; Campus M. ; Di Salvo R. ; Cocolin L. (2017).** Evolution of microbiota during spontaneous and inoculated Tonda di Cagliari table olives fermentation and impact on sensory characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 84: 64-72.

**Corsetti A. ; Perpetuini G. ; Schirone M. ; Tofalo R. ; Suzzi G. (2012).** Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Frontiers in Microbiology*, 3: 248.

**Cortés-Delgado A. ; Sánchez A.H. ; De Castro A. ; López-López A. ; Beato V.M. ; Montaña A. (2016).** Volatile profile of Spanish-style green table olives prepared from different cultivars grown at different locations. *Food Research International*, 83: 131-142.

**De Angelis M. ; Campanella D. ; Cosmai L. ; Summo C. ; Rizzello C.G. ; Caponio F. (2015).** Microbiota and metabolome of un-started and started Greek-type fermentation of Bella di Cerignola table olives. *Food Microbiology*, 52: 18-30.

**De Castro A. ; Brenes M. (2001).** Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, 36: 797-802.

**De Castro A. ; Montaña A. ; Casado F.J. ; Sánchez ; A.H. ; Rejano L. (2002).** Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter culture for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, 19: 637-644.

**De Castro A. ; Garcia P. ; Romero C. ; Brenes M. ; Garrido A. (2007).** Industrial implementation of black ripe olive storage under acidic conditions. *Journal of Food Engineering*, 80: 1206-1212.

**De Castro A. ; Sánchez A.H. ; López-López A. ; Cortés-Delgado A. ; Medina E. ; Montaña A. (2018).** Microbiota and metabolite profiling of spoiled Spanish-style green table olives. *Metabolites*, 8: e73.

**De Castro A. ; Sánchez A.H. ; Cortés-Delgado A. ; López-López A. ; Montaña A. (2019).** Effect of Spanish-style processing steps and inoculation with *Lactobacillus pentosus* starter culture on the volatile composition of cv. Manzanilla green olives. *Food Chemistry*, 271: 543-549.

- Erkmen O. ; Bozoglu T.F. (2016).** Food Microbiology: Principles into Practice. (volume 2), John Wiley and Sons, Hoboken.1-944.
- Evangelou E. ; Kiritsakis K. ; Sakellaropoulos N. ; Kiritsakis A. (2018).** Table olives production, postharvest processing, and nutritional qualities. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, 727-744.
- Franco W. ; Pérez-Díaz I.M. (2012).** Role of selected oxidative yeasts and bacteria in cucumber secondary fermentation associated with spoilage of the fermented fruit. *Food Microbiology*, 32 (2): 338-344.
- Frankel E. (2011).** A critical literature review on the processing of table olives. *Lipid Technology*, 23 (10): 223-226.
- Garcia P. ; Romero C. ; Brenes M. (2018).** Bioactive substances in black ripe olives produced in Spain and the USA. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66: 193-198.
- García-Serrano P. ; Sánchez A.H. ; Romero C. ; García-García P. ; De Castro A. ; Brenes M. (2019).** Processing of table olives with KOH and characterization of the wastewaters as potential fertilizer. *Science of Total Environment*, 676: 834-839.
- García-Serrano P. ; Los Santos B. ; Sánchez A.H. ; Romero C. ; Aguado A. ; García-García P. ; Brenes M. (2020a).** Progress on green table olive processing with KOH and wastewaters reuse for agricultural purposes. *Science of The Total Environment*, 746: 141150.
- García-Serrano P. ; Romero C. ; García-García P. ; Brenes M. (2020b).** Influence of the type of alkali on the processing of black ripe olives. *LWT - Food Science and Technology*, 126: 109318.
- Garcia-Villalba R. ; Giménez-Bastida J.A. ; Garcia-Conesa ; M.T. ; Tomás-Barberán F.A. ; Espín J.C. ; Larrosa M. (2012).** Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *Journal of Separation Science*, 35: 1906-1913.
- Garrido-Fernández A. ; Fernández-Díez M.J. ; Adams M.R. (1997).** Table Olives: Production and Processing (1<sup>st</sup> edition). Chapman and Hall, Londres. 1- 496.
- Gililand J.R. ; Vaughn R.H. (1943).** Characteristics of butyric acid bacteria from olives. *Journal of Bacteriology*, 46 (4): 315-22.

- Gomes R. J. ; Borges M.D.F. ; Rosa M.D.F. ; Castro-Gómez R.J.H. ; Spinosa W.A. (2018).** Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (2): 139-151.
- Grounta A. ; Nychas G.J.E. ; Panagou E.Z. (2013).** Survival of food-borne pathogens on natural black table olives after post-processing contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 197-202.
- Grounta A. ; Doulgeraki A.I. ; Nychas G.J.E. ; Panagou E.Z. (2016).** Biofilm formation on Conservolea natural black olives during single and combined inoculation with a functional *Lacto-bacillus pentosus* starter culture. *Food Microbiology*, 56: 35-44.
- Grounta A. ; Panagou P. (2017).** Olives fermentation. *In: Lactic acid fermentation of fruits and vegetables (1<sup>st</sup> Edition)*. Paramithiotis S., (Ed), CRC Press, Boca Raton.157-180.
- Heperkan D. (2013).** Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in Microbiology*, 4, e143.
- Hurtado A. ; Reguant C. ; Esteve-Zarzoso B. ; Bordons A. ; Rozès N. (2008).** Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*, 41: 738-744.
- Hurtado A. ; Reguant C. ; Bordons A. ; Rozès N. (2012).** Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, 31: 1-8.
- Institut Technique De L'arboriculture Fruitière et De La Vigne (ITAFV). 2006.** Catalogue des variétés algériennes de l'olivier.
- İzli G. (2017).** Phenolic compounds change in Table Olives. *Nutrition and Food Science International Journal*, 3 (5): 555621.
- Jimenez A. ; Guillen R. ; Sanchez C. ; Fernandez-Bolanos J. ; Heredia A. (1995).** Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during " Spanish green olive" processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (8): 2240-2246.
- Johanningsmeier S.D. ; McFeeters R.F. (2013).** Metabolism of lactic acid in fermented cucumbers by *Lactobacillus buchneri* and related species, potential spoilage organisms in reduced salt fermentations. *Food Microbiology*, 35 (2): 129-135.

- Johnson R. ; Melliou E. ; Zweigenbaum J. ; Mitchell A.E. (2018).** Quantitation of oleuropein and related phenolics in cured Spanish-style green, California-style black ripe and Greek-style natural fermentation olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66, 2121-2128.
- Jung J.Y. ; Lee S.H. ; Lee H.J. ; Seo H.Y. ; Park W.S. ; Jeon C.O. (2012).** Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (3): 378-387.
- Kailis S. ; Harris D. (2004).** Establish Protocols and Guidelines for Table Olive Processing in Australia, Australian Government, Rural Industries Research and Development Corporation in Australia. Rural Industries Research and Development Corporation, Sydney. 1-106.
- Kailis S. ; Harris D.J. (2007).** Producing Table Olives. Landlinks Press, Collingwood.1-16.
- Kawatomari T. ; Vaughn R.H. (1956).** Species of *Clostridium* associated with zapatera spoilage of olives. *Journal of Food Science*, 21: 481-490.
- Kiritsakis K. ; Kiritsakis A. ; Manousaki-Karacosta E. ; Genigeorgis F. (2011).** Table olives and olive oil: Production, processing, composition, and nutritional qualities. *In: Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*. Sinha N.K., Hui Y. H., Özgül Evranuz E., Siddiq M., Ahmed J., (Eds), Wiley-Blackwell, New York.663-682.
- Klindworth A. ; Pruesse E. ; Schweer T. ; Peplies J. ; Quast C. ; Horn M. ; Glöckner F.O. (2013).** Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1): e1-e1.
- Lanza B. ; Di Serio M.G. ; Iannucci E. ; Russi F. ; Marfisi P. (2010).** Nutritional, textural and sensorial characterisation of Italian table olives (*Olea europaea* L. cv. 'Intosso d'Abruzzo'). *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 67-74.
- Lanza B. (2013).** Abnormal fermentations in table-olive processing: Microbial origin and sensory evaluation. *Frontiers in Microbiology*, 4: e91.
- Lanza B. ; Di Serio M.G. ; Di Giacinto L. (2016).** Fatty-acid alkyl esters in table olives in relation to abnormal fermentation and poorly conducted technological treatments. *Grasas y aceites*, 67: e130.
- López-García E. ; Benítez-Cabello A. ; Ramiro-García J. ; Romero-Gil V. ; Rodríguez-Gómez F. ; Arroyo-López F.N. (2021).** New Insights into Microbial Diversity of the Traditional Packed Table Olives Aloreña de Málaga through Metataxonomic Analysis. *Microorganisms*, 9: 561.

- Lucena-Adrós H. ; Caballero-Guerrero B. ; Maldonado-Barragán A. ; Ruiz-Barba J.L. (2014).** Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies through culture-dependent techniques. *Food Microbiology*, 42: 154-165.
- Lucena-Adrós H. ; González J.M. ; Caballero-Guerrero B. ; Ruiz-Barba J.L. ; Maldonado-Barragán A. (2015).** *Vibrio olivae* sp. nov., isolated from Spanish-style green-olive fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 1895-1901.
- Lucena Adrós H. (2016).** Análisis de la diversidad microbiana asociada a la fermentación de aceitunas verdes de mesa por técnicas moleculares dependientes e independientes de cultivo. Thèse de doctorat. Université Pablo de Olavide. Espagne.
- Lucena-Adrós H. ; Ruiz-Barba J.L. (2016).** Diversity and enumeration of halophilic and alkaliphilic bacteria in Spanish-style green table-olive fermentations. *Food Microbiology*. 53: 53-62.
- Lucena-Adrós H. ; Ruiz-Barba J.L. (2019).** Microbial biogeography of Spanish-style green olive fermentations in the province of Seville, Spain. *Food Microbiology*, 82: 259-268.
- Malo P.M. ; Urquhart E.A. (2016).** Fermented Foods: Use of Starter Cultures. In Encyclopedia of Food and Health. Caballero B., Finglas P.M., Toldrá F., (Eds), Elsevier, Londres.681-685.
- Mantzouridou F.T. Mastralexi A. ; Filippidou M. ; Tsimidou M.Z. (2020).** Challenges in the processing line of Spanish Style cv. Chalkidiki green table olives spontaneously fermented in reduced NaCl content brines. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122: 1-9.
- Marsilio V. ; Campestre C. ; Lanza B. ; De Angelis M. (2001).** Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes. *Food Chemistry*, 72: 485-490.
- Marsilio V. ; Seghetti L. ; Iannucci E. ; Russi F. ; Lanza B. ; Felicioni M. (2005).** Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1084-1090.
- Martín-Vertedor D. ; Schaide T. ; Boselli E. ; Martínez M. ; Arias-Calderón R. ; Pérez-Nevado F. (2021).** Effects of Different Controlled Temperatures on Spanish-Style Fermentation. Processes. *Foods*, 10 (3) : 666.

- Martorana A. ; Alfonzo A. ; Settanni L. ; Corona O. ; La Croce F. ; Caruso T. ; Francesca N. (2016).** Effect of the mechanical harvest of drupes on the quality characteristics of green fermented table olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (6): 2004-2017.
- Martorana A. ; Alfonzo A. ; Gaglio R. ; Settanni L. ; Corona O. ; La Croce F. ; Francesca N. (2017).** Evaluation of different conditions to enhance the performances of *Lactobacillus pentosus* OM13 during industrial production of Spanish-style table olives. *Food Microbiology*, 61: 150-158.
- Mastralexi A. ; Mantzouridou F.T. ; Tsimidou M.Z. (2019).** Evolution of safety and other quality parameters of the Greek PDO table olives “Prasines Elies Chalkidikis” during industrial scale processing and storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121 (3): 1800171.
- Mateus T. ; Santo D. ; Saúde C. ; Pires-Cabral P. ; Quintas C. (2016).** The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*, 218: 57-65.
- Matté M.H. ; Baldassi L. ; Barbosa M.L. ; Malucelli M.I.C. ; Nitrini S.M.O.O. ; Matté G.R. (2007).** Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. *Food Control*. 18 (6): 747-751.
- Medina E. ; Brenes M. ; Romero C. ; García A. ; De Castro A. (2007).** Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (24): e9817- 9823.
- Medina E. (2008).** Antimicrobianos polifenólicos y oleosídicos en alimentos derivados de la aceituna thèse de doctorat. Université de Séville. Espagne.
- Medina E. ; Romero C. ; De Castro A. ; Brenes M. ; García A. (2008).** Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. *Food Chemistry*, 110: 932-937.
- Medina E. ; Gori C. ; Servili M. ; De Castro A. ; Romero C. ; Brenes M. (2010).** Main variables affecting the lactic acid fermentation of table olives. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 1291-1296.
- Medina E. ; Morales-Sillero A. ; Ramírez E.M. ; Rallo P. ; Brenes M. ; Romero C. (2012).** New genotypes of table olives: profile of bioactive compounds. *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (11): 2334-2341.

- Medina E. ; Brenes M. ; Romero C. ; Ramirez E. ; De Castro A. (2013).** Survival of foodborne pathogenic bacteria in table olive brines. *Food Control*, 34: 719-724.
- Medina E. ; Arroyo-López F.N. (2015).** Presence of toxic microbial metabolites in table olives. *Frontiers in Microbiology*, 6: 873.
- Medina E. ; Pérez-Díaz ; I.M. ; Breidt F. ; Hayes J. S. ; Franco W. ; Butz N. ; Azcarate-Peril M.A. (2016a).** Bacterial ecology of fermented cucumber rising pH spoilage as determined by non-culture based methods. *Journal of Food Science*, 81: M121 - M129.
- Medina E. ; Ruiz-Bellido M.A. ; Romero-Gil V. ; Rodríguez-Gómez F. ; Montes-Borrego M. ; Landa B.B. ; Arroyo-López F.N. (2016b).** Assessment of the bacterial community in directly brined Aloreña de Málaga table olive fermentations by metagenetic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 236: 47-55.
- Medina E. ; Pérez-Díaz I.M. ; Garrido-Fernández A. ; Arroyo-López F.N. (2017).** Review of vegetable fermentations with particular emphasis on processing modifications, microbial ecology, and spoilage. *In: The microbiological quality of food: foodborne spoilers.* Bevilacqua A., Corbo M.R., Sinigaglia M., (eds), Elsevier, Londres. 211-230.
- Medina E. ; Brenes M. ; García-García P. ; Romero C. ; De Castro A. (2018).** Microbial ecology along the processing of Spanish olives darkened by oxidation. *Food Control*, 86: 35-41.
- Medina E. ; Garcia-Garcia P. ; Romero C. ; De Castro A. ; Brenes M. (2019).** Aerobic industrial processing of Empeltre cv. natural black olives and product characterisation. *International Journal of Food Science and Technology*, 55: 534-541.
- Metagenomic Sequencing Library Preparation (Cod. 15044223 Rev. A).** Valable en ligne : [https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)
- Mettouchi S. ; Sacchi R. ; Ould-Moussa Z.E.D. ; Paduano A. ; Savarese M. ; Tamendjari A. (2016).** Effect of Spanish style processing on the phenolic compounds and antioxidant activity of Algerian green table olives. *Grasas y Aceites*, 67: e114.
- Ministère de l'Agriculture et du Développement Rurale (MADR).** 2021. Données statistiques.

- Montaño A. ; De Castro A. ; Rejano L. ; Sánchez A.H. (1992).** Analysis of zapatera olives by gas and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 594: 259–267.
- Montaño A. ; Sánchez A.H. ; Casado F.J. ; De Castro A. ; Rejano L. (2003).** Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82: 297-302.
- Montaño A. ; Sánchez A.H. ; López-López A. ; De Castro A. ; Rejano L. (2010).** Chemical composition of fermented green olives: acidity, salt, moisture, fat, protein, ash, fiber, sugar, and polyphenol. In : *Olives and olive oil in health and disease prevention.* ( 1<sup>st</sup> edition). Preedy V. R., Watson R. R., (Eds.), Elsevier, Amsterdam. 291-297.
- Panagou E.Z ; Tassou C.C. (2006).** Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology*, 23: 738-746.
- Panagou E.Z. ; Katsaboxakis C.Z. (2006).** Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish method. *Food Microbiology*, 23: 199-204.
- Panagou E.Z. ; Schillinger U. ; Franz C.M. ; Nychas G.J.E. (2008).** Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25 (2): 348-358.
- Panagou E.Z. ; Nychas G.J.E. ; Sofos J.N. (2013).** Types of traditional Greek foods and their safety. *Food Control*, 29, 32-41.
- Parkouda C. ; Nielsen D.S. ; Azokpota P. ; Ivette Irène Ouoba L. ; Amoa-Awua W.K. ; Thorsen L. ; Jakobsen M. (2009).** The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Critical Reviews in Microbiology*, 35 (2): 139-156.
- Penland M. ; Deutsch S.M. ; Falentin H. ; Pawtowski A. ; Poirier E. ; Visenti G. ; Le Meur C. ; Maillard M.B. ; Thierry A. ; Mounier J. ; Coton M. (2020).** Deciphering Microbial Community Dynamics and Biochemical Changes During Nyons Black Olive Natural Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 11: 586614.
- Pérez-Díaz I.M. ; Hayes J. S. ; Medina E. ; Webber A.M. ; Butz N. ; Dickey A.N. ; Lu Z. ; Azcarate-Peril M.A. (2019).** Assessment of the non-lactic acid bacteria microbiota in fresh

cucumbers and commercially fermented cucumber pickles brined with 6% NaCl. *Food Microbiology*, 77: 10-20.

**Pino A. ; De Angelis M.D. ; Todaro A. ; Van Hoorde K.V. ; Randazzo C.L. ; Caggia C. (2018).** Fermentation of Nocellara Etnea table olives by functional starter cultures at different low salt concentrations. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1125.

**Pino A. ; Vaccalluzzo A. ; Solieri L. ; Romeo F.V. ; Todaro A. ; Caggia C. (2019).** Effect of sequential inoculum of beta-glucosidase positive and probiotic strains on brine fermentation to obtain low salt Sicilian table olives. *Frontiers in Microbiology*, 10: 174.

**Plastourgos S. ; Vaughn R.H. (1957).** Species of *Propionibacterium* associated with zapatera spoilage of olives. *Applied Microbiology*, 5: 267-271.

**Portilha-Cunha M.F. ; Macedo A.C. ; Malcata F.X. (2020).** A review on adventitious lactic acid bacteria from table olives. *Foods*, 9 (7): 948.

**Rakhmanova A. ; Khan Z.A. ; Shah K. (2018).** A mini review fermentation and preservation: role of lactic acid bacteria. *MOJ Food Processing and Technology*, 6 (5): 414-417.

**Ramírez E. ; Medina E. ; Brenes M. ; Romero C. (2014).** Endogenous enzymes involved in the transformation of oleuropein in Spanish table olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 9569-9575.

**Ramirez-Castro E. (2015).** Estudio de la Degradación Enzimática del Glucósido Amargo Oleuropeína Durante el Procesamiento de Aceitunas de Mesa. Thèse de doctorat. Université de Séville. Espagne.

**Randazzo C. ; Todaro A. ; Pino A. ; Pitino I. ; Corona O. ; Caggia C. (2017).** Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of Nocellara Etnea table olives. *Food Microbiology*, 65:136-148.

**Rejano-Navarro L. ; Montañó A. ; Casado F.J. ; Sánchez A.H. ; De Castro A. (2010).** Table olives: Varieties and variations. *In: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (1<sup>st</sup> Edition). Preedy, V.R., Watson, R.R. (Eds.), Elsevier, Londres. 5-15.

**Rocha J. ; Borges N. ; Pinho O. (2020).** Table olives and health: a review. *Journal of Nutritional Science*, 9.

- Rodríguez Gómez F. ; Bautista Gallego J. ; Romero Gil V. ; Arroyo López F.N. ; Garrido García P. (2012).** Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT- Food Science and Technology*, 46: 56-63.
- Rodríguez-Gómez F. ; Bautista-Gallego J. ; Arroyo-López F.N. ; Romero-Gil V. ; Jiménez-Díaz R. ; García-García P. ; Garrido-Fernández A. (2013).** Table olive fermentation with multifunctional *Lactobacillus pentosus* strains. *Food Control*, 34: 96-105.
- Rodríguez-Gómez F. ; Romero-Gil V. ; Bautista-Gallego J. ; García-García P. ; Garrido-Fernández A. ; Arroyo-López F.N. (2014).** Production of potential probiotic Spanish-style green table olives at pilot plant scale using multifunctional starters. *Food Microbiology*, 44: 278-287.
- Rodríguez-Gómez F. (2015).** Elaboración de aceitunas de mesa utilizando cultivos iniciadores de bacterias lácticas con potencial probiótico. Thèse de doctorat. Université de Séville. Espagne.
- Rodríguez-Ortiz S.L. (2012).** estudio comparativo, constructivo y microbiológico, de los sistemas de fermentación industrial de aceitunas de mesa en la provincia de Córdoba. Thèse de doctorat. Université de Cordoba. Espagne.
- Rokni Y. ; Ghabbour N. ; Chihib N.E. ; Thonart P. ; Asehraou A. (2015).** Physico-Chemical and Microbiological Characterization of the Natural Fermentation of Moroccan Picholine Green Olives Variety. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6 (6): 1740-1751.
- Romeo F.V. (2012).** Microbiological aspects of table olives. In: Olive Germplasm-The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy. Muzzalupo I. (ed), InTechOpen, Londres, 321-342.
- Romero C. ; Brenes M. ; García P. ; Garrido A. (2002).** Hydroxytyrosol 4- $\beta$ -D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3835-3839.
- Romero C. ; Brenes M. ; Yousfi K. ; Garcia P. ; Garcia A. ; Garrido A. (2004).** Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 479-484.
- Romero C. ; García A. ; Medina E. ; Ruíz-Méndez M.V. ; De Castro A. ; Brenes M. (2010).** Triterpenic acids in table olives. *Food Chemistry*, 118 (3): 670-674.

- Romero C. ; Medina E. ; Mateo M.A. ; Brenes M. (2017).** Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruits. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 97: 1725-1732.
- Romero-Gil V. (2017).** Mejora de la calidad y seguridad alimentaria de envasados de aceitunas de mesa con DOP Aloreña de Málaga. Thèse de Doctorat. Université de Cordoba. Espagne.
- Ruiz-Barba J.L. ; Maldonado A. ; Jimenez-Díaz R. (2005).** Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347: 333-335.
- Ruiz-Barba J.L. ; De Castro A. ; Romero C. ; Sánchez A.H. ; García P. ; Brenes M. (2022).** Study of the factors affecting growth of *Celerinatantimonas* sp. and gas pocket formation in Spanish-style green olives. *Food Control*, 141, Article 109208.
- Rufino-Palomares E.E. ; Pérez-Jiménez A. ; García-Salguero L. ; Mokhtari K. ; Reyes-Zurita F.J. ; Peragón-Sánchez J. ; Lupiáñez J.A. (2022).** Nutraceutical role of polyphenols and triterpenes present in the extracts of fruits and leaves of *Olea europaea* as antioxidants, anti-infectives and anticancer agents on healthy growth. *Molecules*, 27, Article 2341.
- Sab C. ; Romero C. ; Brenes M. ; Montaña A. ; Ouelhadj A. Medina E. (2021).** Industrial processing of Algerian table olive cultivars elaborated as Spanish style. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 729436.
- Sánchez A.H. ; De Castro A. ; Rejano L. ; Montaña A. (2000).** Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5975-5980.
- Sánchez A.H. ; Rejano L. ; Montaña A. ; De Castro A. (2001).** Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 115-122.
- Sánchez-Gómez A.H. ; García-García P. ; Rejano-Navarro L. (2006).** Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, 57, 86-94.
- Sánchez A.H. ; López-López A. ; Cortés-Delgado A. ; Beato V.M. ; Medina E. ; De Castro A. ; Montaña A. (2018).** Effect of post-fermentation and packing stages on the volatile composition of Spanish-style green table olives. *Food Chemistry*, 239: 343-353.
- Sánchez-Gómez A.H. ; García-García P. ; Rejano-Navarro L. (2006).** Trends in table olive production. *Grasas y Aceites*, 57: 86-94.

- Saúde C. ; Barros T. ; Mateus T. ; Quintas C. ; Pires-Cabral P. (2017).** Effect of chloride salts on the sensory and nutritional properties of cracked table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *Food Bioscience*, 19: 73-79.
- Sherahi M.H.A. ; Shahidi F. ; Yazdi F.T. ; Hashemi S.M.B. (2018).** Effect of *Lactobacillus plantarum* on olive and olive oil quality during fermentation process. *LWT Food Science and Technology*, 89: 572-580.
- Susamci E. ; Romero C. ; Tuncay O. ; Brenes M. (2017).** An explanation for the natural de-bittering of Hurma olives during ripening on the tree. *Grasas y Aceites*, 68: e182.
- Tataridou M. ; Kotzekidou M. (2015).** Fermentation of table olives by oleuropeinolytic starter culture in reduced salt brines and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *International journal of Food Microbiology*, 208: 122-130.
- Terefe N.S. (2016).** Emerging Trends and Opportunities in Food Fermentation. *In: Reference Module in Food Science*. Elsevier, Londres.1-9.
- Tofalo R. ; Schirone M. ; Perpetuini G. ; Angelozzi G. ; Suzzi G. ; Corsetti A. (2012).** Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102 (1) : 121-131.
- Tofalo R. ; Perpetuini G. ; Schirone M. ; Ciarrocchi A. ; Fasoli G. ; Suzzi G. ; Corsetti A. (2014).** *Lactobacillus pentosus* dominates spontaneous fermentation of Italian table olives. *LWT-Food Science and Technology*, 57 (2): 710-717.
- Tzamourani A.P. ; Di Napoli E. ; Paramithiotis S. ; Economou-Petrovits G. ; Panagiotidis S. ; Panagou E.Z. (2021).** Microbiological and physicochemical characterisation of green table olives of Halkidiki and Conservolea varieties processed by the Spanish method on industrial scale. *International Journal of Food Science and Technology*, 56 (8): 3845-3857.
- Ünal K. ; Nergiz C. (2003).** The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas y Aceites*, 54, 71-76.
- Uylaşer V. ; Yildiz G. (2014).** The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*, 54 (8): 1092-1101.

- Valero A. ; Medina E. ; Arroyo-López F.N. (2017).** Microbial hazards and their implications in the production of table olives. In *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*. Singh O. V., (Ed.), John Wiley and Sons, Hoboken. 119-138.
- Valero A. ; Olague E. ; Medina-Pradas E. ; Garrido-Fernández A. ; Romero-Gil V. ; Cantalejo M.J. ; García-Gimeno R.M. ; Pérez-Rodríguez F. ; Posada-Izquierdo G.D. ; Arroyo-López F.N. (2020).** Influence of acid adaptation on the probability of germination of *Clostridium sporogenes* spores against pH, NaCl and time. *Foods*, 9 (2): 127.
- Voidarou C. ; Antoniadou M. ; Rozos G. ; Tzora A. ; Skoufos I. ; Varzakas T. ; Bezirtzoglou E. (2021).** Fermentative Foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. *Foods*, 10 (1): 69.
- Wang J. ; Fung D.Y. (1996).** Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. *Critical Reviews in Microbiology*, 22 (2): 101-138.
- Wang Y. ; Pan X. (2014).** Bacteria: Proteus. In: *Encyclopedia of Food Safety*. Motarjemi, Y. (Ed.), Elsevier, Londres. 486-489.
- Xu Z. ; Shi Z. ; Jang L. (2011).** Acetic and Propionic Acids. *Comprehensive Biotechnology*, 189-199.
- Yang X. ; Hu W. ; Jiang A. ; Xiu Z. ; Ji Y. ; Guan Y. ; Yang X. (2019).** Effect of salt concentration on quality of Chinese northeast sauerkraut fermented by *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Bioscience*, 30: 100421.
- Zhou L. ; Liao T. ; Liu J. ; Zou L. ; Liu C. ; Liu W. (2019).** Unfolding and Inhibition of Polyphenoloxidase Induced by Acidic pH and Mild Thermal Treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 12(11): 1907-1916.
- Zinno P. ; Guantario B. ; Perozzi G. ; Pastore G. ; Devirgiliis C. (2017).** Impact of NaCl reduction on lactic acid bacteria during fermentation of Nocellara del Belice table olives. *Food Microbiology*, 63 : 239-247.

# *Annexes*

---

**Annexe 1 : Appareillage et réactifs****1. Appareillage**

- Auto-injecteur Waters 717 (Waters Inc., Etats-Unis).
- Burette digitale Titrette (Brand, Allemagne).
- Cellule de Kramer et un analyseur de textureur TA.TX plus
- Chauffage de colonne Waters heater module (Waters Inc., Etats-Unis).
- Chromatographie Gazeuse modèle 7890A (Agilent Technologies, Etats-Unis).
- Colonne capillaire VF-WAX MS (Agilent Technologies, Etats-Unis)
- Colonne de type Rezex RCM-Monosaccharide Ca+ (8%) (Phenomenex, Etats-Unis).
- Colonne de type Spherisorb ODS-2 (Waters Inc., Etats-Unis).
- Compteur de colonies automatique Scan 500 (Interscience, France).
- Détecteur à barrettes de diodes Waters 996 (Waters Inc., Etats-Unis).
- Détecteur à indice de réfraction Waters 410 (Waters Inc., Etats-Unis).
- Détecteur de masse sélectif Agilent 5975C (Agilent Technologies, Etats-Unis)
- Encemenceur spirale (Don Whitley Sci. Ltd., Royaume-Uni).
- Equipment HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Inc., Etats-Unis).
- Fibre de divinylbenzène / carboxène / polydiméthylsiloxane (Supelco, Etats-Unis).
- Homogénéisateur Ultra-turrax (Ika, Allemagne)
- Logiciel Empower (Waters Inc., Etats-Unis).
- Metrohm 670 Titroprocessor (Herisau, Suisse).
- Pompe à injection Waters 600 E (Waters Inc., Etats-Unis).
- Spectromètre de masse modèle 5975C (Agilent Technologies, Californie).
- Spectrophotomètre Color-view TM BYK-Gardner, modèle 9000 (Silver Spring, Etats-Unis)
- Thermocycleur modèle T100TM Thermal cyler (Bio-Rad, Espagne)
- Séquenceur (Illumina, Etats-Unis)

**2. Produits et réactifs**

Nitrate d'argent ; chromate de potassium ; hydroxyde de sodium ; Sorbitol ; résine acide Amberlite IR-120 ; résine basique Amberlite IRA-93 ; DMSO ; acide syringique ; Acide chlorhydrique ; acide 2-éthylbutyrique ; éthanol ; méthanol ; PCA agar, MRS agar, VRBG agar, Yeast Malt agar, azide de sodium ; oxytetracycline, chloroforme, alcool isoamylique, TBE, Tris ; Kit d'isolement d'ADN microbien PowerFood® ; kit de purification d'ADN SureClean ; kit à billes AMPure XP ; kit Nextera XT ; kit Phi-X ; kit MiSeq v3 (MS-102-300)





## Characterization and safety of commercial table olives from the Algerian market

Chafia Sab<sup>a</sup>, Eva María Ramírez<sup>b</sup>, Concepción Romero<sup>b</sup>, Mercedes Brenes-Álvarez<sup>b</sup>, Akli Ouelhadj<sup>c</sup>, Eduardo Medina<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Food Quality and Food Safety Laboratory, University of Mouloud Mammeri, 15000, Tizi Ouzou, Algeria

<sup>b</sup> Food Biotechnology Department, Instituto de La Grasa (IG), CSIC. Crta. Utrera Km 1, Ed. 46, 41013, Seville, Spain

<sup>c</sup> Ecology, Biotechnology and Health Laboratory, University of Mouloud Mammeri, 15000, Tizi Ouzou, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Spanish-style olives  
Natural turning color olives  
Oxidized black olives  
Microbial safety  
Challenge test  
Spoilage

### ABSTRACT

In this study, a comprehensive physicochemical characterization of commercial table olives from the Algerian market was conducted, revealing significant discrepancies with international regulations and indicating non-compliance with established standards. Spanish-style green olives and natural turning color olives, for the most part, did not meet the established standards regarding pH and salt concentration. Additionally, samples of oxidized black olives were found, which, due to their high pH, should undergo sterilization but were stored in non-sterilized containers. Microbiological analysis revealed high populations of Enterobacteriaceae and other spoilage microorganisms in the brines, indicating possible deficiencies in hygiene practices during production. The study evaluating the survival of pathogenic microorganisms in the samples indicated that the physicochemical conditions of the product, such as pH and salt concentration, played a crucial role in the non-survival of these pathogens. Furthermore, an antimicrobial effect of certain phenolic compounds present in olives was observed, highlighting the importance of these compounds in food safety.

In summary, this study provides a snapshot of the quality of table olives available in the outlets surveyed and underscores the importance of strict microbiological control, quality, and appropriate production practices in the table olive industry in Algeria. The use of preservatives and heat treatments, along with good manufacturing and hygiene practices, are useful tools as control measures to reduce spoilage in table olives. Adhering to established standards in international regulations for table olive processing and implementing effective control measures are essential steps to ensure the quality, safety, and consumer acceptance of this traditionally valued food product.

### 1. Introduction

Table olives are a widely consumed and appreciated food product worldwide, especially in the Mediterranean area. Algeria is one of the major table olives-producing countries with an increased production in recent years estimated at 302.500 tons annually representing more than 10% of the world's production (IOC, 2023).

Raw olives cannot be eaten because the polyphenol oleuropein makes them bitter. Hence, the main purpose of the table olives elaboration process is to remove the bitterness and make the olives tasty through oleuropein hydrolysis (Brenes & de Castro, 1998). Three main types of preparations are widely used to reduce bitterness: Spanish-style, Californian-style, and natural or Greek-style olives (Sánchez-Gómez et al., 2006). Spanish-style green olives are the most popular process,

converting oleuropein into non-bitter compounds through alkaline treatment (2–3% sodium hydroxide) for several hours. Then, the fruits are washed with tap water to remove excess alkali, and covered with brine (9–10% sodium chloride) for microbial fermentation carried out by autochthonous lactic acid bacteria (LAB) and yeasts for several months (Benítez-Cabello et al., 2019; Lucena-Padrós & Ruiz-Barba, 2019; Sánchez-Gómez et al., 2006). Californian-style olive processing involves several stages (Brenes et al., 2017; De Castro et al., 2007). First, the fruits are preserved in an acidic solution for several months followed by a darkening stage where the olives are treated with a dilute NaOH solution (lye) and then washed with tap water. The next step involves immersing the olives in a ferrous solution (lactate or gluconate) while air is bubbled through them. The final product, black ripe olives, has a pH range of 6.0–7.0 and must be sterilized to ensure microbial safety. While

\* Corresponding author. Instituto de la Grasa (IG), CSIC. Crta. Utrera km 1, Ed. 46, 41013, Seville, Spain.

E-mail address: [emedina@ig.csic.es](mailto:emedina@ig.csic.es) (E. Medina).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110324>

Received 3 November 2023; Received in revised form 9 January 2024; Accepted 18 January 2024

Available online 19 January 2024

0956-7135/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

the above processes use a dilute sodium hydroxide solution to hydrolyze the oleuropein molecule into non-bitter compounds, the natural or Greek-style method involves direct brining without using any chemical treatment (Panagou et al., 2013).

The physicochemical characterization of commercial table olives provides detailed information on the physical and chemical properties of these products. This enables the assessment of their quality, the identification of potential spoilage or defects, and the guarantee of compliance with quality and food safety standards. Furthermore, table olives contain numerous bioactive compounds, with polyphenols and triterpenic acids being prominent among them. Characterizing these compounds provides valuable insights into the sensory profile's quality and potential health impact. All this information can be utilized by producers to optimize their production processes and ensure consistency and quality in their products.

The fermentative microbiota plays a fundamental role in all methods of table olive production. LAB in Spanish-style olives, yeasts in natural olives, or acetic acid bacteria in Californian olives are the predominant microorganisms in these processes (Benítez-Cabello et al., 2019; Lucena-Padrós & Ruiz-Barba, 2019; Medina et al., 2018). They are responsible, in part, for the acidification of the medium, contributing to the preservation of the product, as well as inducing changes in the flavor, aroma, color, and texture of the final product. The diversity of the fermentative microbiota may vary depending on factors such as olive variety, the fermentation process, and conditions. This variation influences the different populations of microorganisms coexisting during the fermentation and storage of table olives.

In Algerian markets, table olives are typically available in bulk or containers with a capacity of 10 kg and they are sold at ambient temperature, so this is a favorable environment for microbial growth, which is not the case for packaged table olives in plastic, glass, and metal containers. Nevertheless, the quality of the olives can be compromised by the development of spoilage microorganisms responsible for secondary fermentations or by the presence of pathogenic microorganisms, which could pose a risk to consumer health, especially in presentations without heat treatments. (Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015; Medina-Pradas et al., 2017).

Indeed, the survival of foodborne pathogenic microorganisms in olives is a critical aspect that demands special attention. Evaluating their survival is essential to ensure the safety of the final product. Therefore, a comprehensive understanding of the microbial ecology associated with Algerian commercial olives is crucial for ensuring quality and microbiological stability, as well as for implementing effective control and safety measures.

In this study, we have conducted a comprehensive physicochemical and microbiological characterization of Algerian commercial olives, including their green Spanish-style, natural, and oxidized black variants. Additionally, the survival of pathogens has been investigated within

these olives, analyzing their resistance and persistence over time. The results obtained will significantly contribute to scientific knowledge and the development of effective strategies to ensure the safety and quality of Algerian commercial table olives.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Table olives sampling

Thirteen commercial samples of table olives were purchased (by duplicate) in bulk at different producers in the Algerian market. Table 1 shows the type of elaboration process (green Spanish-style, natural turning color, or black oxidized olives), the cultivar (Sigoise and Sevillana cv.), the producer (P1, P2, P3, and P4), and the ingredients on the label. Samples were transferred to plastic bags and kept refrigerated until analysis.

### 2.2. Physicochemical analysis

Titrate acidity (expressed as % of lactic acid) and brine pH were measured using a Metrohm 670 Titrprocessor (Herisau, Switzerland). The concentration of NaCl was analyzed by titration with a silver nitrate solution (0.086 N) and expressed as percent (%). Twenty grams of destoned and crushed olive pulp were desiccated by oven at 105 °C until weight stabilization to measure the moisture.

The color of olive fruits was measured using a HunterLab ColorFlex EZ spectrophotometer (Hunter Associates Laboratory Inc., VA, USA), equipped with computer software to calculate the CIE  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (redness), and  $b^*$  (yellowness) parameters. Interference by stray light was minimized by covering samples with a box that had a matte black interior. The data from each measurement is the average of 10 olives.

The firmness of the fruits was determined using a Kramer Shear Cell of one blade coupled to a Texture Analyzer TA. TX plus (Stable Microsystems, Godalming, UK). Two halves of each olive were placed facing the blade. The crosshead speed was 200 mm/min. Firmness was the mean of 10 replicate measurements and expressed as Newton/fruit.

### 2.3. Analysis of sugars

Sugars (sucrose, glucose, fructose, and mannitol) were extracted and analyzed from olive fruits as described elsewhere (Medina et al., 2007). The concentration of sugars in olive brine was determined by mixing 0.5 mL of brine with 1 g of the acidic resin Amberlite IR-120, 1 g of the basic resin Amberlite IRA-93, and 1.5 ml of sorbitol (0.05%). After 30 min of occasional agitation, the mixture was filtered through a 0.22 µm pore size nylon filter and injected in the HPLC. The chromatographic system for the analysis of the sugars was the same as described by Medina et al. (2007). All samples were analyzed in duplicate.

**Table 1**

Elaboration process, cultivar, producer, and ingredients of Algerian commercial table olives samples.

Preparation	Samples	Cultivar	Producers	Ingredients
Green Spanish-style olives	1	Sigoise cv.	P1	Water, salt
	2	Sigoise cv.	P2	Water, salt, E223, E270, E330
	3	Sigoise cv.	P3	Water, salt, E330, E260
	4	Sigoise cv.	P4	Water, salt, E330
	5	Sevillana cv.	P1	Water, salt
	6	Sevillana cv.	P2	Water, salt
	7	Sevillana cv.	P3	Water, salt, E330, E260
Natural turning color olives	8	Sigoise cv.	P1	Water, salt, E330, E260
	9	Sigoise cv.	P2	Water, salt, E223, E270, E330
	10	Sigoise cv.	P3	Water, salt
Black oxidized olives	11	Sevillana cv.	P1	Unknown
	12	Sevillana cv.	P2	Unknown
	13	Sevillana cv.	P3	Unknown

E223, E260, E270, and E330 correspond to the additives sodium metabisulfite, acetic, lactic, and citric acid, respectively.

#### 2.4. Analysis of organic acids

The organic acids were analyzed by directly filtering 1 ml of brine through a 0.22 µm pore size nylon filter and aliquots of 20 µl were injected in the HPLC. The chromatographic system for the organic acids was the same as described by Medina et al. (2007). The sorbic and benzoic acids were determined following the method described by Brenes et al. (2004). All samples were analyzed in duplicate.

#### 2.5. Analysis of phenolic compounds

The phenolic compounds were extracted from the olive pulp with dimethyl sulfoxide (DMSO) as described by Ramírez et al. (2014). Small pieces of pulp were cut from 10 olives up to a total of 10 g that were mixed with 30 mL of DMSO. The mixture was crushed with an Ultra-Turrax homogenizer and, after 30 min of resting contact, it was centrifuged at 9000 g for 5 min. An aliquot of 0.25 ml of the supernatant brines was diluted in 0.5 ml of DMSO and 0.25 ml of syringic acid (2 mM). The mixtures were filtered through a 0.22 µm pore size nylon filter, and aliquots of 20 µl were injected in the HPLC. Separation and quantification of each compound were carried out by HPLC following the method described by Medina et al. (2007). All samples were analyzed in duplicate.

#### 2.6. Analysis of triterpenic acids

Triterpenic acids were analyzed in both olives and processing solutions following the procedure described by Romero et al. (2010). Firstly, 1 g of dried olive pulp was mixed in a 10 mL centrifuge tube with 4 mL of methanol/ethanol (1:1, v/v) and vortexed for 1 min, centrifuged at 6000 g for 5 min, and the solvent was separated from the solid phase. This step was repeated six times, and the pooled solvent extract was vacuum evaporated. The residue was dissolved in 4 mL of methanol, which was filtered through a 0.22 µm pore size nylon filter, and an aliquot (20 µL) was injected into the HPLC chromatograph. The chromatographic system and conditions have been described elsewhere (Romero et al., 2010). All samples were analyzed in duplicate.

#### 2.7. Microbiological analysis of brines

Microbiological analysis was performed to determine the viability and microbial presence in table olive fermentation brines. Brines and decimal dilutions thereof (in 9 g/L NaCl) were plated using a Spiral Plater (Don Whitley Sci. Ltd., Shipley, UK). Different microorganisms were counted on specific bacterial agar as VRBG agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for Enterobacteriaceae, Plate Count agar (Sigma-Aldrich) for mesophilic aerobic bacteria, Yeast Malt agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) with oxytetracycline for yeasts, and De Man-Rogosa and Sharpe agar (Biokar diagnostic, Beauvais, France) supplemented with 0.02% sodium azide (Sigma-Aldrich) was used for LAB. Enterobacteriaceae were incubated at 37 °C for 24 h, mesophilic aerobic were incubated at 22 °C for 48h, yeast, and LAB were set at 32 °C for 48 h, and the numbers of colony-forming units were counted with a Scan 500 colony counter (Interscience, St. Nom la Breteche, France). All samples were analyzed by duplicate.

#### 2.8. Metagenomic analysis

Culture-independent methods were applied to assess the whole microbiota in the industrial samples. A volume of 5 mL of brine was spun at 9000 g for 5 min. Then the pellet was washed twice with saline solution (0.9% NaCl). DNA isolation was performed using the PowerFood® Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, Calif.) according to the manufacturer's instructions. Purified DNA samples (~10 ng/µL) were sent to the Sequencing and Bioinformatic Service of FISABIO (Valencia, Spain) for the amplification and library preparation of the

16S rRNA gene of bacteria. Bioinformatic analysis was carried out as described elsewhere (Medina et al., 2018).

#### 2.9. Survival of pathogenic bacteria in olive brines

Four foodborne pathogenic bacteria were chosen to investigate their survival in brines. Four strains of each species were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain). *Listeria monocytogenes* CECT 4031T, CECT 4032, CECT 5366, and CECT 7467 were cultured at 37 °C in Brain Heart Infusion (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) with or without 1.5% agar. *Staphylococcus aureus* CECT 86T, CECT 239, CECT 240, and CECT 976; *Salmonella enterica* CECT 722T, CECT 443, CECT 4156, and CECT 4300; *Escherichia coli* CECT 434, CECT 4267, CECT 4782 and CECT 5947 were all cultured at 37 °C in nutrient broth prepared with 5 g/L Lab-Lemco powder (Oxoid), 10 g/L of neutralized bacteriological peptone (Oxoid), 5 g/L NaCl, and 15 g/L of agar in the case of solid medium (pH 7.2). All the species were maintained at -80 °C in adequate culture broths with 20% glycerol. Before the experiments, each strain was cultured twice in their respective broths with a previous pre-adaptation phase where NaCl (3%) was added to acclimatize the microorganisms to the olive brines. Overnight cultures were centrifuged, washed, and resuspended in sterilized saline solution (0.9% NaCl). Cocktails of each species were obtained by mixing equal quantities of the corresponding strains. The volumes were calculated to obtain 7.09–7.32 log CFU/mL as initial inoculum when 50 µl of the suspension was added to 5 mL of the different tested brines. Industrial brines were filter-sterilized (0.22 µm pore size) before inoculation. The challenge tests were performed in duplicate at room temperature (20 ± 2 °C). Samples from each tube were removed at different times and plated on the appropriate solid media to count cultivable cells.

#### 2.10. Statistical analysis

Statistical software version 7.0 was used for data processing (Statistical for Windows, Tulsa, OK, USA). Data were expressed as mean values ± standard deviation. Comparison among mean values was performed by one-way analysis of variance followed by Duncan's multiple range test, and the differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

The physicochemical characterization of commercial Algerian table olive samples is detailed in Table 2. The pH values found in the brines ranged between 3.8 and 4.7 for Spanish-style green olives and naturally turning color olives. The Codex regulations (Codex Alimentarius, 2013) establish a maximum pH limit of 4.3 for these types of olives packaging, meaning that 4 of these samples would be out of compliance. In the production of table olives, there is a crucial fermentation stage in which sugars from the fruit are consumed by microorganisms, especially LAB, and yeasts to produce organic acids, mainly lactic and acetic acid, respectively (Benítez-Cabello et al., 2022; Kailis & Harris, 2007). During this fermentation, there is a decrease in pH and an increase in acidity, and the established pH value of 4.3 is typically reached. Several reasons may prevent reaching these limits, such as a low concentration of initial sugars in the fruit, vigorous alkaline treatments, the inclusion of multiple washing stages that significantly reduce the fermentable material, or the dominance of yeasts instead of LAB (Mettouchi et al., 2016; Sab et al., 2021). In these samples, the level of sugars (sucrose, glucose, fructose, and mannitol) in the brines was below 0.1% (data not shown), which probably means that an active fermentation took place, but the evolution of the microbiota during the fermentation was unknown.

The Codex standard does not establish minimum acidity limits. Instead, the "Trade Standard Applying to Table Olives" (IOC, 2004) sets minimum acidity limits of 0.5% (lactic acid) for Spanish-style olives and 0.3% for natural olives, respectively. Despite their lactic and acetic acid

**Table 2**

pH, NaCl concentration, titratable acidity, and organic acids concentration in brine of commercial table olives from the Algerian market.

Type	Sample	pH	NaCl	Acidity	Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butiric acid
			(%)	(% lactic acid)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Green Spanish-style olives	1	4.7 (0.0) <sup>b</sup>	3.6 (0.1) <sup>g</sup>	0.20 (0.01) <sup>f</sup>	2374 (127) <sup>e</sup>	561 (31) <sup>fg</sup>	ND	ND
	2	4.6 (0.0) <sup>b</sup>	5.4 (0.0) <sup>b</sup>	0.20 (0.00) <sup>f</sup>	1950 (11) <sup>e</sup>	340 (20) <sup>g</sup>	ND	ND
	3	4.2 (0.0) <sup>b</sup>	2.6 (0.0) <sup>j</sup>	0.32 (0.01) <sup>e</sup>	5004 (90) <sup>c</sup>	1144 (63) <sup>cd</sup>	ND	ND
	4	4.7 (0.0) <sup>b</sup>	4.6 (0.0) <sup>d</sup>	0.19 (0.01) <sup>fg</sup>	926 (42) <sup>f</sup>	970 (31) <sup>de</sup>	ND	ND
	5	4.0 (0.0) <sup>b</sup>	3.7 (0.1) <sup>f</sup>	0.34 (0.01) <sup>e</sup>	2285 (58) <sup>e</sup>	335 (9) <sup>g</sup>	ND	ND
	6	4.0 (0.0) <sup>b</sup>	6.7 (0.1) <sup>a</sup>	0.47 (0.01) <sup>e</sup>	5487 (133) <sup>c</sup>	770 (9) <sup>ef</sup>	ND	ND
	7	4.5 (0.0) <sup>b</sup>	4.1 (0.0) <sup>e</sup>	0.30 (0.01) <sup>e</sup>	1906 (209) <sup>e</sup>	1165 (0) <sup>bcd</sup>	546 (112) <sup>a</sup>	751 (72) <sup>a</sup>
Natural turning color olives	8	3.8 (0.0) <sup>b</sup>	5.5 (0.1) <sup>b</sup>	0.96 (0.00) <sup>a</sup>	9790 (251) <sup>b</sup>	2238 (115) <sup>a</sup>	ND	ND
	9	3.6 (0.0) <sup>b</sup>	5.3 (0.1) <sup>c</sup>	0.91 (0.02) <sup>b</sup>	12302 (510) <sup>a</sup>	1503 (89) <sup>b</sup>	157 (157) <sup>b</sup>	ND
	10	4.3 (0.0) <sup>b</sup>	3.3 (0.0) <sup>i</sup>	0.56 (0.06) <sup>c</sup>	3660 (348) <sup>d</sup>	1372 (145) <sup>bc</sup>	190 (190) <sup>b</sup>	ND
Black oxidized olives	11	6.2 (0.1) <sup>a</sup>	3.4 (0.0) <sup>hi</sup>	0.14 (0.02) <sup>g</sup>	ND	1409 (298) <sup>bc</sup>	ND	ND
	12	6.0 (0.1) <sup>a</sup>	3.4 (0.1) <sup>hi</sup>	0.17 (0.01) <sup>fg</sup>	ND	1426 (50) <sup>bc</sup>	171 (171) <sup>b</sup>	ND
	13	6.1 (0.0) <sup>a</sup>	3.5 (0.1) <sup>h</sup>	0.16 (0.02) <sup>fg</sup>	ND	1413(33) <sup>bc</sup>	ND	ND

Values are the mean of the duplicate analyses with the standard deviation in brackets. ND means not detected. Column values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ). Citric, sorbic and benzoic acids were not detected in any sample.

content (Table 2), none of the 7 Spanish-style green samples would meet the standard, as they exhibited lower values of free acidity. It must be noted that organic acids may be free in brine or combined as salt so that the content analyzed by HPLC is the sum of these two forms. Typically, the final pH in packaging can be corrected by adding certain edible acids (Medina-Pradas et al., 2017). However, despite the addition of lactic, acetic, and/or citric acid during packaging for some samples (Table 1), it was not sufficient to meet the quality requirements.

In addition to pH and free acidity, the concentration of NaCl is also crucial in determining the quality of the final product. The Codex standard establishes for non-pasteurized olives a minimum concentration of 5% for Spanish-style olives and 6% for natural olives. Considering this parameter, only samples 2 and 6 were within the allowed range, as the rest showed lower concentrations than the established minimum limits (Table 2). Non-compliance with these regulations highlights the need to adjust production and packaging processes to ensure the safety and quality of the final product. The Codex standard is more flexible when the final packaging has undergone a pasteurization treatment reaching a minimum of 15 lethality units. In this case, there are no requirements for minimum salt values, but a maximum pH value of 4.3 must always be respected. Maintaining an appropriate NaCl concentration influences both the organoleptic characteristics and the microbiological stability of the product (Kailis & Harris, 2007; Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015; Medina-Pradas et al., 2017). Low salt concentrations allow the growth of undesirable microorganisms, including spoilage and pathogenic, compromising consumer safety.

Oxidized black olives, due to their chemical conditions and high pH,

require mandatory sterilization treatment after packaging (IOC, 2004; Sánchez-Gómez et al., 2006; Kailis & Harris, 2007; Medina et al., 2018). Surprisingly, samples 11, 12, and 13 were purchased in non-sterilized packaging with conditions of pH around 6, a salt content at approximately 3.4% NaCl, and a low free lactic acidity of 0.15%. These conditions are not suitable for consumption and pose a health risk to consumers.

The average moisture content of the samples (72.2%) falls within the expected range for this type of food (Table 3), although samples 2, 8, and 9 exhibit lower values, possibly due to differences in olive maturity, harvest time, and the processing method used (Montaño et al., 2010; Únal & Nergiz, 2003).

Regarding texture, Spanish-style green olives stand out for their firmness, whereas natural turning color olives and oxidized black olives have a softer texture (Table 3). These results are consistent with previous studies demonstrating how the higher ripening stage of turning color olives affects their texture (Lanza et al., 2010). In contrast, the loss of texture in oxidized black olives could be attributed to specific treatments applied throughout their processing (Rallo et al., 2018).

The color parameters studied are shown in Table 3. The  $L^*$  parameter is higher for green olives and turning color olives compared to oxidized black olives, since the latter have a greater black color component. Higher values of  $a^*$  were assigned to natural olives due to their purple color, values closer to green for Spanish-style olives, and values closer to zero for oxidized black olives. The  $b^*$  parameter values indicated a more yellowish hue for Spanish-style green olives and a more bluish color for natural turning color olives. These results are consistent with those

**Table 3**

Moisture, texture, and color parameters in Algerian commercial table olives.

Type	Sample	Moisture (%)	Texture (N/fruit)	Color parameters		
				$L$	$a^*$	$b^*$
Green Spanish-style olives	1	72.1 (0.1) <sup>b</sup>	25.7 (2.7) <sup>d</sup>	39.9 (1.4) <sup>bc</sup>	2.3 (0.2) <sup>b</sup>	24.6 (0.1) <sup>b</sup>
	2	66.1 (1.1) <sup>c</sup>	35.8 (2.5) <sup>bc</sup>	42.9 (2.1) <sup>a</sup>	1.0 (0.3) <sup>cd</sup>	26.2 (1.0) <sup>a</sup>
	3	72.5 (1.0) <sup>b</sup>	32.7 (3.5) <sup>bc</sup>	39.7 (1.5) <sup>cd</sup>	2.4 (0.3) <sup>b</sup>	24.0 (1.0) <sup>b</sup>
	4	74.1 (0.9) <sup>b</sup>	44.5 (1.0) <sup>a</sup>	39.7 (0.6) <sup>bc</sup>	2.9 (0.1) <sup>b</sup>	26.7 (0.4) <sup>a</sup>
	5	78.5 (1.2) <sup>a</sup>	24.3 (2.2) <sup>d</sup>	41.9 (0.6) <sup>ab</sup>	1.5 (0.2) <sup>bcd</sup>	23.8 (0.7) <sup>b</sup>
	6	75.1 (1.1) <sup>b</sup>	25.0 (0.5) <sup>d</sup>	40.4 (0.8) <sup>bc</sup>	1.6 (0.1) <sup>bcd</sup>	23.1 (1.2) <sup>bc</sup>
	7	78.7 (1.2) <sup>a</sup>	31.6 (0.1) <sup>c</sup>	37.3 (0.9) <sup>de</sup>	2.1 (0.2) <sup>bc</sup>	22.2 (0.2) <sup>c</sup>
Natural turning color olives	8	62.8 (0.0) <sup>d</sup>	15.8 (1.1) <sup>e</sup>	26.8 (0.9) <sup>f</sup>	2.8 (1.8) <sup>b</sup>	10.2 (0.5) <sup>e</sup>
	9	64.0 (0.4) <sup>c</sup>	17.7 (0.3) <sup>e</sup>	35.2 (0.2) <sup>e</sup>	6.6 (0.2) <sup>a</sup>	10.2 (0.8) <sup>e</sup>
	10	72.4 (0.4) <sup>b</sup>	22.7 (0.8) <sup>d</sup>	38.4 (1.3) <sup>cd</sup>	6.4 (0.8) <sup>a</sup>	16.8 (0.7) <sup>d</sup>
Black oxidized olives	11	73.8 (0.3) <sup>b</sup>	17.1 (2.6) <sup>e</sup>	18.6 (0.3) <sup>g</sup>	0.4 (0.0) <sup>d</sup>	0.0 (0.2) <sup>f</sup>
	12	73.6 (0.3) <sup>b</sup>	15.8 (0.3) <sup>e</sup>	18.6 (0.5) <sup>g</sup>	0.4 (0.1) <sup>d</sup>	-0.0 (0.2) <sup>f</sup>
	13	75.1 (0.3) <sup>b</sup>	15.5 (0.1) <sup>e</sup>	18.1 (0.2) <sup>g</sup>	0.4 (0.0) <sup>d</sup>	-0.1 (0.1) <sup>f</sup>

Values are the mean of the duplicate analyses with the standard deviation in brackets. Column values with the same superscript letter are not significantly different by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ).

**Table 4**  
Microbial population in brine of Algerian commercial table olives.

Type	Sample	Log CFU/ml			
		Mesophilic aerobes	Yeast	LAB	Enterobacteriaceae
Green Spanish-style olives	1	5.57 (0.15) <sup>c</sup>	5.56 (0.25) <sup>abc</sup>	BDL	BDL
	2	5.49 (0.04) <sup>c</sup>	5.46 (0.07) <sup>abc</sup>	BDL	BDL
	3	6.45 (0.06) <sup>b</sup>	6.47 (0.14) <sup>a</sup>	5.76 (0.01) <sup>ab</sup>	BDL
	4	5.57 (0.34) <sup>c</sup>	5.52 (0.11) <sup>abc</sup>	BDL	BDL
	5	5.06 (0.04) <sup>d</sup>	4.68 (0.05) <sup>bc</sup>	BDL	BDL
	6	4.58 (0.11) <sup>e</sup>	5.17 (0.65) <sup>abc</sup>	BDL	BDL
	7	6.15 (0.12) <sup>b</sup>	6.12 (0.09) <sup>abc</sup>	6.14 (0.04) <sup>a</sup>	BDL
Natural turning color olives	8	6.25 (0.10) <sup>b</sup>	6.05 (0.04) <sup>abc</sup>	5.27 (0.18) <sup>b</sup>	BDL
	9	6.44 (0.17) <sup>b</sup>	5.60 (0.09) <sup>abc</sup>	6.48 (0.15) <sup>a</sup>	BDL
	10	6.43 (0.16) <sup>b</sup>	6.38 (0.01) <sup>a</sup>	2.26 (0.26) <sup>c</sup>	BDL
Black oxidized olives	11	7.96 (0.23) <sup>a</sup>	5.82 (0.14) <sup>abc</sup>	1.54 (0.34) <sup>c</sup>	5.95 (0.47) <sup>a</sup>
	12	7.73 (0.03) <sup>a</sup>	4.66 (0.08) <sup>c</sup>	2.24 (0.34) <sup>c</sup>	5.72 (0.06) <sup>a</sup>
	13	7.80 (0.09) <sup>a</sup>	5.18 (0.68) <sup>ab</sup>	2.30 (1.41) <sup>c</sup>	5.93 (0.06) <sup>a</sup>

Values are the mean of the duplicate analyses with the standard deviation in brackets. BDL: below the detection limit. Column values with the same superscript letter are not significantly different by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ).

obtained previously by other researchers (Rallo et al., 2018).

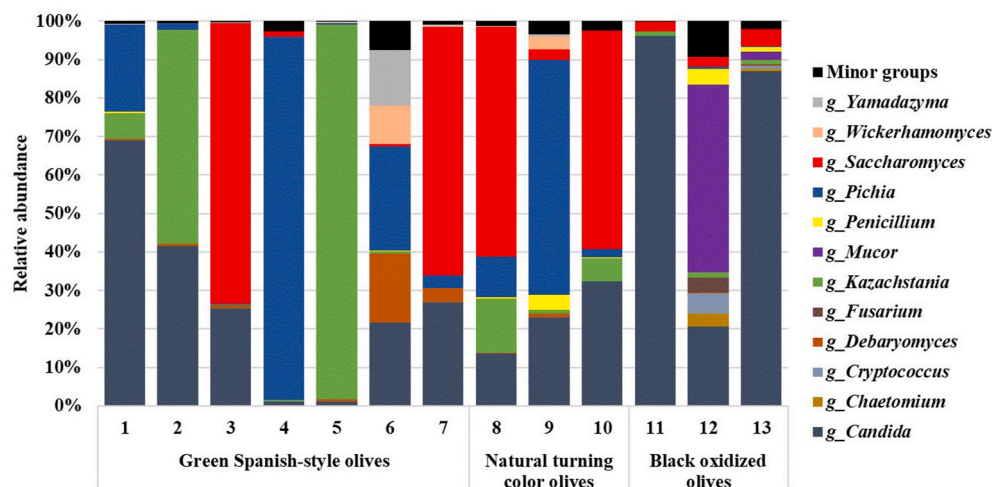
Table 4 presents the enumeration of microbial populations in the Algerian commercial table olive samples studied. The population of mesophilic aerobes is quite high for all samples, exceeding 7 log CFU/mL in oxidized black olive samples (11, 12, and 13). It is normal to find such high population levels in olives packaged without thermal treatments (Medina et al., 2018; Sab et al., 2021). The yeast population ranges from 4.66 to 6.47 CFU/mL, being abundant in all samples regardless of the type of preparation (Table 4). Metagenomic analysis of the yeast population (Fig. 1) detected the presence of various genera characteristic of table olives. The genera *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, and *Kazachstania* were predominant in most samples, although other groups were also detected in lower abundance, such as *Wickerhamomyces*, *Debaryomyces*, etc. All these groups have been previously identified and are characteristic of table olive processing (Benítez-Cabello et al., 2022; Lucena-Adrós & Ruiz-Barba, 2019; Medina et al., 2018). Yeasts are microorganisms typical of olive fermentation and contribute to the flavor and aroma profiles of these fermented products (Benítez-Cabello et al., 2019).

Lactic acid bacteria were detected in higher concentrations in turning color olives and at lower levels in oxidized black olives (Table 4). Surprisingly, LAB were only detected in two samples of Spanish-style green olives. These microorganisms are usually predominant in this type of processing and tend to remain in the product even after fermentation (Sab et al., 2021). Despite their absence,

metagenomic analysis (Fig. 2) identified the genus *Lactiplantibacillus* as the predominant group in Spanish-style green olives and naturally color-changing olives, indicating that they have been present during the fermentation process. Other LAB belonging to the genera *Enterococcus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus*, typical of olive fermentations, were also previously described by other authors (Benítez-Cabello et al., 2019; Lucena-Adrós & Ruiz-Barba, 2019; Sab et al., 2021).

No populations of Enterobacteriaceae were detected in green and natural olives (Table 4) since these microorganisms do not grow at acidic pH conditions. Despite the low counts, Enterobacteriaceae were identified in the remaining samples (Fig. 2), possibly due to their presence during the initial stages of the fermentative process when pH values tend to be more alkaline. However, they were indeed detected in oxidized black olives, with average values of 5.8 CFU/mL (Table 4). Enterobacteriaceae constitute a group of bacteria that includes potential pathogens and serve as indicators of poor hygiene in the production or packaging process, which is concerning from a food safety perspective (Medina-Pradas et al., 2017).

The metagenomic analysis also identified the presence of other groups of microorganisms related to spoilage and secondary fermentations in the table olives. The genus *Celerinatantimonas* was detected in high abundance in natural turning color olive samples. The presence of this genus, along with Enterobacteriaceae, during the early stages of processing leads to the formation of gas within the fruit, causing "alambrado" (Medina et al., 2017; Ruiz-Barba et al., 2022). Many fruits



**Fig. 1.** Relative abundance of fungal genus in olive brine samples.

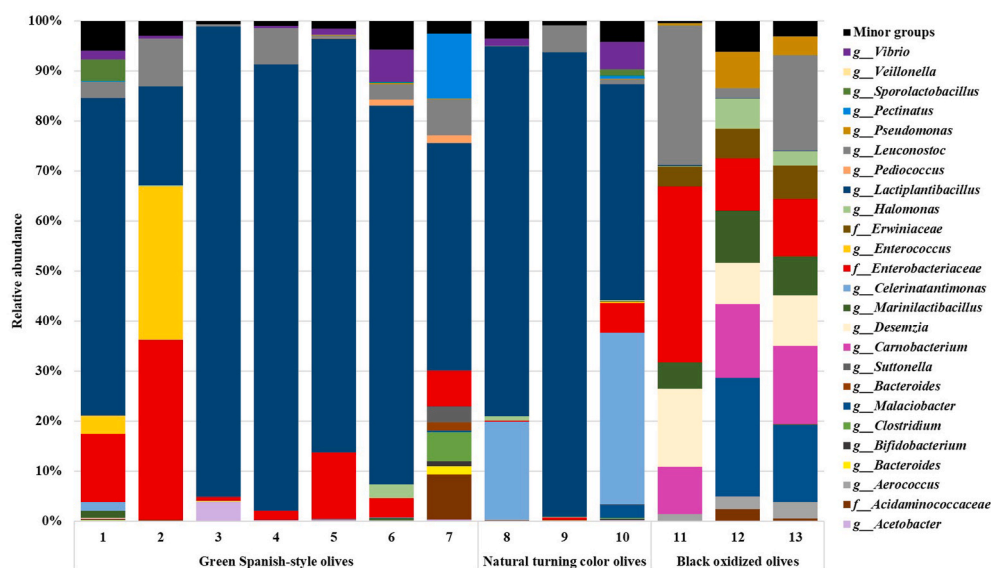


Fig. 2. Relative abundance of bacterial family and genus in olive brine samples.

damaged by “alambrado” were observed during the handling of the samples, although it was not quantified (data not shown).

The genus *Acetobacter* was present in almost all samples, with a higher abundance observed in sample 3 (Fig. 2). These microorganisms, along with certain oxidative yeasts (Fig. 1), play a significant role in the initiation of spoilage by converting lactic acid into acetic acid (Medina et al., 2016; Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015; Medina-Pradas et al., 2017; Sab et al., 2021). Additionally, the presence of *Pectinatus*, especially in sample 7, suggests an initial stage of secondary fermentation (Breidt et al., 2013; Medina et al., 2016; Medina-Pradas et al., 2017; Sab et al., 2021). These microorganisms can metabolize lactic acid, produced by fermentation, into propionic acid, as detected in brines 7, 9, 10, and 12 (Table 2). The consumption of lactic acid in table olives compromises their preservative properties and raises pH values, allowing the growth of other undesirable microorganisms detected in most brines, particularly the genus *Clostridium*. This genus can metabolize lactic acid to produce butyric acid, symptoms of putrid and butyric fermentations (De Castro et al., 2018; Medina-Pradas et al., 2017; Sab et al., 2021). Brine 7 showed a relative abundance of 6% for this genus, and butyric acid was detected in its brine (Table 2). These secondary fermentations transform lactic acid into other organic acids that raise the pH of the product, making it more vulnerable to the growth of pathogenic microorganisms. pH values higher than 4.6 allow the

germination of *Clostridium botulinum* spores, which are responsible for producing botulinum toxin, posing a health risk to consumers (Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015; Valero et al., 2020).

The microbiological analysis revealed notable variations in the microbial populations among the different types of table olives, including Spanish-style, turning color, and black oxidized. However, it's crucial to emphasize that our study is based on the analysis of a limited sample size (13 samples). Consequently, these findings provide a snapshot rather than a comprehensive characterization of all Algerian table olives. The absence of detailed information on the processing methods for each sample underscores the need for standardization in table olive production, as reflected in the observed variations in pH and salt content.

Overall, these results underscore the importance of strict microbiological control throughout all stages of production and packaging of Algerian table olives to ensure the safety and quality of the final product. The high microbial populations highlight the absence of thermal treatment, which, while not necessary for Spanish-style olives and natural olives, is mandatory for oxidized black olives according to the Codex standard. Implementing an appropriate thermal treatment for each type of processing or considering the addition of preservatives, such as sorbates or benzoates (which were not detected in the brines), would help reduce the microbial load in the final product. This, in turn, would prevent issues like turbidity, spills, and gas formation, enhancing

Table 5  
Four-log reduction times (4Dr) for the different bacterial cocktails inoculated in table olive brines.

Type	Sample	4Dr (h)			
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>
Green Spanish-style olives	1	33.2 (0.4) <sup>d</sup>	31.8 (4.3) <sup>d</sup>	80.4 (1.3) <sup>d</sup>	33.2 (0.7) <sup>d</sup>
	2	31.7 (0.2) <sup>de</sup>	27.7 (0.1) <sup>e</sup>	68.8 (0.9) <sup>d</sup>	28.1 (0.6) <sup>e</sup>
	3	28.7 (0.0) <sup>ef</sup>	29.8 (0.7) <sup>de</sup>	27.3 (1.4) <sup>e</sup>	27.0 (0.0) <sup>e</sup>
	4	70.1 (0.6) <sup>c</sup>	63.1 (0.5) <sup>c</sup>	105.4 (3.9) <sup>c</sup>	43.7 (3.9) <sup>c</sup>
	5	28.6 (0.0) <sup>ef</sup>	28.3 (0.1) <sup>e</sup>	27.3 (0.3) <sup>e</sup>	27.0 (0.0) <sup>e</sup>
	6	27.9 (0.3) <sup>f</sup>	28.2 (0.0) <sup>e</sup>	22.4 (5.5) <sup>e</sup>	27.0 (0.0) <sup>e</sup>
	7	99.2 (4.5) <sup>b</sup>	171.9 (1.6) <sup>b</sup>	123.5 (6.3) <sup>b</sup>	131.5 (0.5) <sup>b</sup>
Natural turning color olives	8	12.9 (0.1) <sup>g</sup>	10.2 (0.0) <sup>g</sup>	10.0 (2.6) <sup>e</sup>	2.0 (0.0) <sup>g</sup>
	9	14.9 (0.2) <sup>g</sup>	15.2 (0.0) <sup>g</sup>	15.1 (0.0) <sup>e</sup>	15.1 (0.0) <sup>f</sup>
	10	11.7 (2.0) <sup>g</sup>	10.2 (0.0) <sup>g</sup>	16.7 (4.2) <sup>e</sup>	2.0 (0.0) <sup>g</sup>
Black oxidized olives	11				
	12				
	13			>45 days	

Values are the mean of the duplicate analyses with the standard deviation in brackets. Column values with the same superscript letter are not significantly different by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ).

Table 6

Concentration of triterpenic acids and phenolic compounds in commercial table olives from the Algerian market.

Type	Sample	Polyphenols (ppm)							Triterpenic acids (ppm)	
		Hydroxytyrosol	Hy-4-Glu	Tyrosol	Verbascoside	HyEDA	Oleuropein	EDA	Maslinic acid	Oleanolic acid
Green Spanish-style olives	1	371 (2) <sup>e</sup>	54(6) <sup>de</sup>	36 (1) <sup>gh</sup>	ND	ND	ND	ND	637 (39) <sup>e</sup>	190 (32) <sup>de</sup>
	2	310 (26) <sup>efg</sup>	55(18) <sup>de</sup>	32 (2) <sup>i</sup>	14 (10) <sup>c</sup>	ND	ND	ND	1670 (525) <sup>d</sup>	532 (29) <sup>d</sup>
	3	704 (92) <sup>d</sup>	103(14) <sup>cd</sup>	72 (2) <sup>d</sup>	ND	12 (0) <sup>d</sup>	ND	4 (0) <sup>c</sup>	2412 (20) <sup>bc</sup>	1389 (134) <sup>abc</sup>
	4	247 (6) <sup>g</sup>	42(5) <sup>de</sup>	25 (4) <sup>j</sup>	ND	ND	ND	ND	2101 (15) <sup>cd</sup>	1052 (222) <sup>c</sup>
	5	250 (25) <sup>g</sup>	104(39) <sup>cd</sup>	24 (2) <sup>j</sup>	17 (7) <sup>c</sup>	ND	ND	ND	462 (2) <sup>e</sup>	110 (6) <sup>e</sup>
	6	338 (10) <sup>efg</sup>	148(29) <sup>c</sup>	32 (1) <sup>hi</sup>	35 (25) <sup>c</sup>	ND	ND	12 (1) <sup>c</sup>	593 (35) <sup>e</sup>	143 (30) <sup>e</sup>
	7	276 (13) <sup>fg</sup>	71(8) <sup>de</sup>	39 (1) <sup>g</sup>	ND	ND	ND	ND	2434 (582) <sup>bc</sup>	1613 (418) <sup>a</sup>
Natural turning color olives	8	1321 (36) <sup>b</sup>	365(31) <sup>a</sup>	81 (2) <sup>b</sup>	731 (119) <sup>b</sup>	32 (4) <sup>a</sup>	652 (105) <sup>a</sup>	40 (2) <sup>a</sup>	3758 (662) <sup>a</sup>	1615 (232) <sup>a</sup>
	9	1495 (26) <sup>a</sup>	416(42) <sup>a</sup>	77 (2) <sup>c</sup>	958 (127) <sup>a</sup>	24 (5) <sup>b</sup>	289 (40) <sup>b</sup>	39 (10) <sup>b</sup>	2853 (269) <sup>b</sup>	1466 (130) <sup>ab</sup>
	10	774 (8) <sup>c</sup>	263(61) <sup>b</sup>	85 (1) <sup>a</sup>	ND	19 (1) <sup>c</sup>	224 (68) <sup>b</sup>	40 (0) <sup>b</sup>	2631 (107) <sup>bc</sup>	1190 (96) <sup>bc</sup>
Black oxidized olives	11	173 (36) <sup>h</sup>	27(9) <sup>e</sup>	63 (0) <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	90 (0) <sup>e</sup>	62 (5) <sup>e</sup>
	12	170 (3) <sup>h</sup>	24(1) <sup>e</sup>	61 (1) <sup>ef</sup>	ND	ND	ND	ND	103 (14) <sup>e</sup>	85 (12) <sup>e</sup>
	13	157 (8) <sup>h</sup>	22(4) <sup>e</sup>	59 (0) <sup>f</sup>	ND	ND	ND	ND	54 (11) <sup>e</sup>	58 (24) <sup>e</sup>

Values are the mean of the duplicate analyses with the standard deviation in brackets. ND: not detected. Column values with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ). Hy-4-Glu: hydroxytyrosol 4-glucoside. EDA: the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid. HyEDA: EDA linked to hydroxytyrosol.

consumer acceptance of the product while ensuring its safety and microbiological stability (Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015; Medina-Pradas et al., 2017; Sánchez-Gómez et al., 2006).

Despite the extensive safety record associated with table olives, the presence of spoilage microorganisms responsible for secondary fermentations could facilitate the development of other foodborne pathogens (Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015). Therefore, this study included a challenge test to investigate the behavior of certain pathogenic microorganisms and their survival in Algerian commercial olive products. The reduction of 4 logarithmic units ( $4Dr$  value) for the different tested pathogenic strain cocktails is shown in Table 5. Natural olives exhibited the lowest  $4Dr$  values for the tested pathogens, followed by Spanish-style green olives, with average values of 12.6 h and 52.6 h, respectively. Sample 7, which showed signs of spoilage, had the longest survival time, reaching 171.9 h for *S. aureus* and over 100 h for the other tested microorganisms.

Oxidized black olives showed  $4Dr$  values exceeding 45 days, as they had less restrictive physicochemical conditions (Table 2). Additionally, Table S1 shows the survival curves for *Listeria monocytogenes* for each brine from the different types of table olive preparation. The inactivation kinetics followed a log-linear kinetic pattern, obtaining adequate  $R^2$  coefficients. These values align with those found by previous authors for various table olive processing methods (Grounta et al., 2013; Medina et al., 2013; Panagou et al., 2013). The survival of these pathogens in brines mainly depends on pH, salt, and acidity levels (Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015). In fact, in this study, lower survival was observed in those brines that have a lower pH and higher salt and acidity concentrations (Table 2). However, it's worth noting the antimicrobial effect that certain phenolic compounds in olives can have (Medina et al., 2013). This includes compounds like EDA (the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid) and HyEDA (EDA linked to hydroxytyrosol), primarily detected in naturally turning color olives (Table 6), which coincidentally exhibited the lowest survival rates (Table 5). The combined effect of the physicochemical characteristics of the fermented product and the concentration of these phenolic antimicrobials will determine the survival of pathogenic microorganisms (Medina et al., 2013; Medina-Pradas & Arroyo-López, 2015).

Table olives' phenolic concentration and triterpenic acid content are also closely associated with health benefits. Numerous studies have linked health effects to oleuropein, hydroxytyrosol, and maslinic acid, among others (Rufino-Palomares et al., 2022). Phenols and triterpenic acids are found in higher concentrations in naturally processed olives, followed by Spanish-style olives, and finally oxidized black olives (Table 6). The loss of these bioactive compounds is intimately related to the number of washing stages during processing, explaining the lower concentration in oxidized black olives (Ait Chabane et al., 2021;

Johnson et al., 2018; Mettouchi et al., 2016; Romero et al., 2004).

#### 4. Conclusion

In this comprehensive study of commercial table olives from the Algerian market, a detailed physicochemical characterization was conducted, revealing significant discrepancies with international regulations, indicating non-compliance with the standards. The study provides a snapshot of the quality of table olives available in the outlets surveyed. Spanish-style green olives and olives in brine, for the most part, did not meet the established standards in terms of pH and salt concentration. Furthermore, samples of oxidized black olives, which should undergo sterilization due to their high pH, were found in non-sterilized packaging. It is crucial to adhere to the established standards in international table olive processing norms and respect the defined limits, especially concerning oxidized black olives. Sterilization of this product, given its pH values close to neutrality, is essential to maintain microbiological stability.

The microbiological analysis revealed high populations of Enterobacteriaceae and other spoilage microorganisms in the brines, indicating potential deficiencies in hygiene practices during production. The use of preservatives and heat treatments together with good manufacturing and hygiene practices are useful tools as control measures to reduce alterations in table olives. Strict microbiological control and process optimization within Algerian industries could significantly enhance the final product's quality and consumer acceptance, ensuring its safety and microbiological stability simultaneously.

The study assessing the survival of pathogenic microorganisms in the samples indicated that the physicochemical conditions of the product, such as pH and salt concentration, played a crucial role in preventing the survival of these pathogens. Additionally, an antimicrobial effect of certain phenolic compounds present in olives was observed, underscoring the significance of these compounds in food safety.

In conclusion, our study provides valuable insights into the microbiological characteristics of various commercial table olive samples in Algeria. However, we must underscore the limitations associated with the sample size and the absence of detailed processing information. Of particular concern are the safety implications associated with black oxidized olives, as indicated by an extended time to achieve a 4D reduction of pathogens and the elevated population of Enterobacteriaceae. Urgent regulatory intervention is recommended to address these safety issues, including the potential prohibition of marketing this particular trade preparation in bulk until safety concerns are adequately addressed.

## CRedit authorship contribution statement

**Chafiaa Sab:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Eva María Ramírez:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Concepción Romero:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Mercedes Brenes-Álvarez:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Akli Ouelhadj:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Visualization, Writing – review & editing. **Eduardo Medina:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

No data was used for the research described in the article.

## Acknowledgments

This work was supported by the project RTI2018-093994-J-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033. FEDER, financed by the European Union “NextGenerationEU”/PRTR, the project PIE.202270I017 funded by ORGC-CSIC, and the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (PNE program 2019–2020). E. M. Ramírez offers thanks to the Junta de Andalucía for his postdoctoral contract (PAIDI2020—00054). We are grateful to Alejandra Expósito for her technical support.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110324>.

## References

- Ait Chabane, F., Tamendjari, A., Rovellini, P., Romero, C., & Medina, E. (2021). Chemical parameters and antioxidant activity of turning color natural-style table olives of Sigoise cultivar. *Grasas Y Aceites*, 72(3), Article e419. <https://doi.org/10.3989/gya.0559201>. Article.
- Benítez-Cabello, A., Ramiro-García, J., Romero-Gil, V., Medina, E., & Arroyo-López, F. N. (2022). Fungal biodiversity in commercial table olive packages. *Food Microbiology*, 107, Article 104082. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104082>. Article.
- Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Morales, M. L., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2019). Lactic acid bacteria and yeast inocula modulate the volatile profile of Spanish-style green table olive fermentation spoilage bacteria in table olive brines, 2013 *Food Control*, 34(2), 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.026>.
- Breidt, F., Medina, E., Wafa, D., Pérez-Díaz, I. M., Franco, W., Huang, H. Y., Johanningsmeier, S. D., & Kim, J. H. (2013). Characterization of cucumber fermentation spoilage bacteria by enrichment culture and 16S rDNA cloning. *Journal of Food Science*, 78, M470–M476. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12057>.
- Brenes, M., & de Castro, A. (1998). Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Journal of Food and Agriculture*, 77, 353–358. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199807\)77:3<353::AID-JSFA50>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3<353::AID-JSFA50>3.0.CO;2-G).
- Brenes, M., Romero, C., & García, P. (2017). Optimization of ripe olive processing with a single lye treatment. *Journal of Food Science*, 82, 2078–2084. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13827>.
- Brenes, M., Romero, C., García, P., & Garrido, A. (2004). Absorption of sorbic and benzoic acids in the flesh of table olives. *European Food Research and Technology*, 219, 75–79. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0893-6>.
- Codex Alimentarius. (2013). *Standard for table olives. CODEX STAN. 66-1981. Revision. 1987*. Retrieved from . (Accessed 10 October 2023).
- De Castro, A., García, P., Romero, C., Brenes, M., & Garrido, A. (2007). Industrial implementation of black ripe olive storage under acid conditions. *Journal of Food Engineering*, 80, 1206–1212. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.09.010>.
- De Castro, A., Sánchez, A. H., López-López, A., Cortés-Delgado, A., Medina, E., & Montaña, A. (2018). Microbiota and metabolite profiling of spoiled Spanish-style green table olives. *Metabolites*, 8, Article 73. <https://doi.org/10.3390/metabo8040073>. Article.
- Grounta, A., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2013). Survival of food-borne pathogens on natural black table olives after post-processing contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.017>.
- International Olive Council, IOC. (2023). World table olive figures. Retrieved from <http://www.internationaloliveoil.org/wh-at-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>. (Accessed 10 October 2023).
- International Olive Oil Council, I. O. C. (2004). *Trade standard applying to table olives, COI/OT/NC (Vol. 1)*. Resolution No. RES-2/91-IV/04.
- Johnson, R., Melliou, E., Zweigenbaum, J., & Mitchell, A. E. (2018). Quantitation of oleuropein and related phenolics in cured Spanish-style green, California-style black ripe and Greek-style natural fermentation olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2121–2128. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06025>.
- Kailis, S., & Harris, D. (2007). *Producing table olives*. Collingwood VIC 3066, Australia: Landlinks Press.
- Lanza, B., Di Serio, M. G., Iannucci, E., Russi, F., & Marfisi, P. (2010). Nutritional, textural and sensorial characterisation of Italian table olives (*Olea europaea* L. cv. 'Intosso d'Abruzzo'). *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 67–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02104.x>.
- Lucena-Padrós, H., & Ruiz-Barba, J. L. (2019). Microbial biogeography of Spanish-style green olive fermentations in the province of Seville, Spain. *Food Microbiology*, 82, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.004>.
- Medina, E., Brenes, M., García-García, P., Romero, C., & de Castro, A. (2018). Microbial ecology along the processing of Spanish olives darkened by oxidation. *Food Control*, 86, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.035>.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., & De Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9817–9823. <https://doi.org/10.1021/jf0719757>.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., Ramírez, E., & De Castro, A. (2013). Survival of foodborne pathogenic bacteria in table olive brines, 2013 *Food Control*, 34(2), 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.026>.
- Medina, E., Pérez-Díaz, I. M., Breidt, F., Franco, W., Butz, N., & Azcarate-Peril, A. (2016). Bacterial ecology of fermented cucumber rising pH spoilage as determined by nonculture-based methods. *Journal of Food Science*, 81, M121–M129. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13158>.
- Medina-Pradas, E., & Arroyo-López, F. N. (2015). Presence of toxic microbial metabolites in table olives. *Frontiers in Microbiology*, 6, Article 873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00873>. Article.
- Medina-Pradas, E., Pérez-Díaz, I. M., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2017). Review of vegetable fermentations with particular emphasis on processing modifications, microbial ecology, and spoilage. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *The microbiological quality of food* (pp. 211–230). New York: Elsevier.
- Mettouchi, S., Sacchi, R., Ould-Moussa, Z. E. D., Paduano, A., Savarese, M., & Tamendjari, A. (2016). Effect of Spanish style processing on the phenolic compounds and antioxidant activity of Algerian green table olives. *Grasas Y Aceites*, 67, Article 114. <https://doi.org/10.3989/gya.0378151>. Article.
- Montaña, A., Sánchez, A. H., López-López, A., De Castro, A., & Rejano, L. (2010). Chemical composition of fermented green olives: Acidity, salt, moisture, fat, protein, ash, fiber, sugar, and polyphenol. In V. R. Preedy, & R. R. Watson (Eds.), *Olive and olive oil in health and disease prevention* (pp. 291–297). Oxford, UK: Elsevier.
- Panagou, E. Z., Nychas, G. J. E., & Sofos, J. N. (2013). Types of traditional Greek foods and their safety. *Food Control*, 29, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.050>.
- Rallo, P., Morales-Sillero, A., Brenes, M., Jiménez, M. R., Sánchez, A. H., Suarez, M. P., Casanova, L., & Romero, C. (2018). Elaboration of table olives: Assessment of new olive genotypes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, Article 1800008. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800008>. Article.
- Ramírez, E., Medina, E., Brenes, M., & Romero, C. (2014). Endogenous enzymes involved in the transformation of oleuropein in Spanish table olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9259–9275. <https://doi.org/10.1021/jf5027982>.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., & Garrido, A. (2004). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 479–484. <https://doi.org/10.1021/jf0305251>.
- Romero, C., García, A., Medina, E., Ruiz-Méndez, M. V., De Castro, A., & Brenes, M. (2010). Triterpenic acids in table olives. *Food Chemistry*, 118, 670–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.037>.
- Rufino-Palomares, E. E., Pérez-Jiménez, A., García-Salguero, L., Mokhtari, K., Reyes-Zurita, F. J., Peragón-Sánchez, J., & Lupiáñez, J. A. (2022). Nutraceutical role of polyphenols and triterpenes present in the extracts of fruits and leaves of *Olea europaea* as antioxidants, anti-infectives and anticancer agents on healthy growth. *Molecules*, 27, Article 2341. <https://doi.org/10.3390/molecules27072341>. Article.
- Ruiz-Barba, J. L., de Castro, A., Romero, C., Sánchez, A. H., García, P., & Brenes, M. (2022). Study of the factors affecting growth of *Celerinatantimonas* sp. and gas pocket formation in Spanish-style green olives. *Food Control*, 141, Article 109208. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109208>. Article.
- Sab, C., Romero, C., Brenes, M., Montaña, A., Ouelhadj, A., & Medina, E. (2021). Industrial processing of Algerian table olive cultivars elaborated as Spanish style. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 729436. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.729436>. Article.

- Sánchez-Gómez, A. H., García-García, P., & Rejano-Navarro, L. (2006). Elaboration of table olives. *Grasas Y Aceites*, 57, 86–94. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.24>
- Ünal, K., & Nergiz, C. (2003). The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas Y Aceites*, 54, 71–76. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i1.280>
- Valero, A., Olague, E., Medina-Pradas, E., Garrido-Fernández, A., Romero-Gil, V., Cantalejo, M. J., ... Arroyo-López, F. N. (2020). Influence of acid adaptation on the probability of germination of *Clostridium sporogenes* spores against pH, NaCl and time. *Foods*, 9, 127. <https://doi.org/10.3390/foods9020127>