

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ KASDI MERBAH OUARGLA



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Qualité Des Produits Et Sécurité Alimentaire

Présenté par :

Guendouz Nadjah

Aouichat Zahra Aouatef

Thème

**Valorisation des sous produites oléicoles (eaux de lavage des huiles)
par des analyses chimiques et biochimiques.
Etude de leurs bioactivités**

Soutenu publiquement le : 29/09/2020

Devant le jury:

Président	BOUAL Zakaria	Pr.	U. Ouargla
Encadreur	OULD EL HADJ Mohamed Didi	Pr.	U. Ouargla
Co-Encadreur	M ^{elle} HADRI Nassima	Doctorante	U. Ouargla
Examineur	BENAOUN Fatima	MCB	U. Ouargla

Année Universitaire 2019/2020

Remerciements

En premier lieu, on remercie Allah le Tout Puissant de nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions également, notre encadreur OULD EL HADJ Mohamed Didi, Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie pour avoir accepté de nous encadrer, pour ses conseils, pour leur disponibilité et ses orientations.

Nos remerciements à M^{elle} NASSIMA HADRI maître assistante au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour avoir accepté De nos Co-encadrer. Et pour leur disponibilité, ses précieux conseils, le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.

Nous aimerions exprimer notre gratitude et nos remerciements à tous les membres de jury :

Mr BOUAL Zakaria ., pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury.

Mr BENAOUN Fatima ., pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner le travail.

Nos remerciements à tous les enseignants de l'université KASDI MERBAH-Ouargla, pour le soutien et la formation qu'ils nous l'ont prodigué tout au long de nos études, qu'ils trouvent ici l'expression de nos profond respect et grande considération.

Dédicace

*« C'EST À FORCE D'ÉTUDES ET DE TRAVAUX QUE
L'HOMME RÉUSSIT À DISTINGUER QU'IL A UNE ÂME
DIFFÉRENTE DE SON CORPS ; ET C'EST À FORCE DE
GÉNIE, LA MEILLEURE PARTIE DE LUI-MÊME, QU'IL
DEVIENT IMMORTEL PAR SES OUVRAGES ».*

PIERRE-JULES STAHL

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL RÉALISÉ GRÂCE À L'AIDE
D'**ALLAH** TOUT PUISSANT

À MES TRÈS CHERS PARENTS, QUI ONT FAIT DE MOI CE QUE
JE SUIS AUJOURD'HUI
À MES SŒURS IKHLAS ,GHOFRAN ET À MON FRÈRE
MOHAMMED NADJIB, QUI ONT ÉTÉ TOUJOURS À MES CÔTÉS TOUT
AU LONG DE MES ANNÉES D'ÉTUDES.

MES BELLES AMIES HANAN ,RAWYA ,ASSIA,ALIA ,
SAFA,INTISSAR ,MANAL ,SARA,

MON BINÔME ZAHRA AOUATEF
À MON CHÈR NACER EDDINE

À TOUS CEUX QUI M'ONT ENSEIGNÉE

Nadjah



Dédicace

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL À :
MES CHERS PARENTS
MES FRÈRES ET MA SŒUR
À MON BINÔME NADJAH ET SA FAMILLE
TOUS MES PROCHES
À TOUS MES COLLÈGUES DE LA PROMOTION DE
«CONTRÔLE DE QUALITÉ 2019/2020 ».
À TOUS MES ENSEIGNANTS
TOUS CEUX QUI M'ONT AIDÉ DANS LA RÉALISATION DE CE
MÉMOIRE



Zahra Aouatef

Liste des abréviations

PH :	Potentielle d'Hydrogène
l/tonne :	Litre Par Tonne
g/l :	Gramme Par Litre
MES :	Matières En Suspension
MS :	Matière Sèche
MM :	Matière Minérale
UV :	Spectroscopie Ultraviolette
IR :	Spectroscopie Infrarouge
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
DPPH:	Radical 2,2 Diphenyl 1-Picryl-Hydrazyl
COD :	Carbone Organique Dissous
DCO :	Demande Chimique en Oxygène
DBO5 :	Demande Biologique en Oxygène
méq :	Milliéquivalent

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
Figure 1.-	Fruit de l'olive	07
Figure 2.-	Composition de l'olive	08
Figure 3.-	Système discontinu d'extraction par presse	10
Figure 4.-	Système continu d'extraction avec centrifugation à 2 phases	11
Figure 5.-	Système continu d'extraction avec centrifugation à 3 phases	12
Figure 6.-	Extraction d'olive	13
Figure 7.-	Repartions géographique de wilaya OUARGLA	39

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
Tableau 1.-	Caractéristiques physico-chimiques des margine	18
Tableau 2.-	Composition minérale des margines	19

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralités sur l'olivier

I.1.-Historique.....	6
I.2.-Botanique	6
I.3.-Origine de l'olivier.....	7
I.4.-Fructification de l'olive	7
I.5.-Technologie d'élaboration	8
I.5.1.-Réception et stockage	8
I.5.2.-Effeuilage.....	8
I.5.3.-Lavage	9
I.5.4.-Broyage	9
I.5.5.-Malaxage.....	9
I.5.6.-Séparation de la phase huileuse	9
I.5.6.1.-Procédé discontinu ou système à presse	9
I.5.6.2.-Procédé continu ou système à centrifugation	10
I.5.6.3.- Comparaison entre les procédés en discontinu et en continu	13

Chapitre II: Les sous produits oléicoles

II.1.-Les sous produits oléicoles.....	16
II.1. -Grignons	16
II.1.1.- Définition.....	16
II.2.- Eaux de lavage ou margine.....	16
II.2.1.- Définition.....	16
II.2.2.- Origine des eaux de lavage.....	17

II.2.3. -Caractéristiques physico-chimiques des margines	17
II.2.4.- Pollution des margines	21
II.2.4.1.- La pollution des eaux.....	21
II.2.4.2.- La pollution des sols.....	22
II.2.4.3.- La pollution de l'air	22
II.2.5.- Valorisation des margines	22
II.2.5.1.- Biodégradation naturelle des margines dans des bassins ouverts	22
II.2.5.2. -Utilisation des margines comme fertilisant	22
II. 2.5.3.- Transformation des substances organiques des margines en biogaz.....	23
II.2.5.4. -Valorisation des margines par récupération de quelques composants	23
II.2.6.- Valorisation des composés phénoliques des margines.....	23
II.2.6.1.- En agro-alimentaire	23
II.2.6.2. -En cosmétologie	23
II.2.6.3. - En phytothérapie.....	24

Etude expérimentale

Matériels et méthodes

I.1.-Matériels

I.1.1.Appareillages

I.1.2.-Echantillonnage	38
I.2.- Méthodes.....	39
I.2.1.- Analyse physico-chimiques des eaux de lavage des huiles	39
I.2.1.1.-Mesure du PH	39
I.2.1.2.-Conductivité électrique	40
I.2.1 .3.- Matière sèche (MS).....	40
I.2.1.4.- Matières minérale (MM).....	41
I.2.1.5.- Matières en suspension (MES)	41
I.2.2.-Analyse chimiques et biochimiques des eaux de lavage	41
I.2.2.1.- Dosage des sucres totaux	41
I.2.2.2.- Dosage des protéines (Méthode de Bradford)	43
I.2.2.3.- Teneur en matière grasse	Erreur ! Signet non défini.
I.2.3.- Extraction des composés phénoliques	45
I.2.4.- Dosage des polyphénols totaux	45
I.2.5.-Incorporation des extraits phénoliques dans les huiles végétales	

I.2.5.1.-Préparation des huiles	
I.2.6.-Évaluation de l'oxydation des huiles enrichies.....	45
I.2.6.1.-Acidité libre	45
I.2.6.2.-Indice de peroxyde.....	46
I.2.6.3.-Activité anti radicalaire DPPH.....	47
Conclusion	49
Références bibliographiques.....	51

INTRODUCTION

Introduction

L'industrie oléicole est une activité économique importante, concentrée principalement dans les pays méditerranéens (**Gharby, 2013**). L'olivier est une plante emblématique de la Méditerranée. En effet, il n'est pas étonnant que la plupart de la superficie mondiale dédiée à cette culture se trouve justement dans le Bassin méditerranéen. L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (huile d'olive vierge et huile de grignons), laisse deux résidus l'un liquide (les eaux de lavage ou les margines) et l'autre solide (les grignons) (**Mili, 2006**).

De plus, l'olivier engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois. Les eaux de lavage, sous-produit obtenu par centrifugation ou sédimentation de l'huile après le pressage de l'olive, sont caractérisées par une concentration élevée en sucres, lipides, protéines et surtout en composés phénoliques. Une fois rejetées sans avoir subi des traitements préalables, ces eaux auront un impact négatif sur l'environnement dû à leur pouvoir d'inhiber le développement des plantes et de certains microorganismes. Leur phytotoxicité est principalement attribuée à la présence des lipides et des polyphénols.

Les eaux de lavage sont des eaux de végétation qui sont générées lors de l'extraction de l'huile d'olives vierge. Ce sont des effluents riches en matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...), et en sels minéraux (potassium, sodium, magnésium ...). Les eaux de lavage posent un sérieux problème de contamination pour tous les pays oléicoles. L'effet nocif de ces dernières dérive en grande partie de leur contenu en composés phénolique. Difficilement biodégradables ils empêchent les cycles biologiques du sol et souillent les eaux naturelles (**Belaid, Kallel, et Elleuch, 2002**).

La valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour éviter une pollution de plus en plus sérieuse. Elle correspond à des procédés de traitement physique, chimique et biologique conçu essentiellement pour réduire le pouvoir polluant des eaux de lavage (**Nefzaoui, 1991**).

Les eaux de lavage des huiles oléicoles sont considérées comme une source très riche en antioxydants naturels: les polyphénols, de plus, les polyphénols ont montré des propriétés antimicrobiennes, hypolipidémiques, hypocholestérolémiantes et anticancérigènes (**Mulinacci, 2001**).

En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur

la santé (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires (**Vârban, 2009**).

Ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Suhaj, 2006**).

Parmi les antioxydants chimiques utilisés dans l'industrie alimentaire, la gamme des antioxydants phénoliques synthétiques tels que : le butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), le tert-butylhydroquinone (TBHQ). Ce dernier est le plus utilisé par incorporation directe dans les huiles (**Van Aardt, 2004**).

Cependant, actuellement, le consommateur tend à éviter les additifs alimentaires synthétiques qui sont suspectés d'effets toxiques, sensibilisants, allergisants et cancérigènes (**Farag, 2003**).

Les antioxydants naturels sont recherchés. De ce fait, l'industrie agroalimentaire développe l'utilisation des antioxydants naturels. A l'heure actuelle, les polyphénols capturent l'intérêt des chercheurs afin de trouver de nouvelles matières premières abondamment disponibles (**Brenes, 2002**).

Une tentative de récupérer des polyphénols des eaux de lavage aurait en plus de la sécurité du consommateur, un double intérêt: d'une part, résoudre un problème environnemental majeur et d'une autre part, valoriser les polyphénols pour des applications ultérieures en agroalimentaire, en cosmétique ou en pharmacologie.

Dans ce contexte, le présent travail a pour objectif de rechercher les caractéristiques chimiques et biochimiques des eaux de lavage et de vérifier la stabilité et le pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique des eaux de lavage sur une huile végétale, largement consommé. Afin de valoriser les polyphénols extraits des eaux de lavage.

Le travail est subdivisée en deux parties dont la synthèse bibliographique aborde des généralités décrivant l'olive et l'olivier dans leur contexte historique, aspect botanique, les différentes modes d'obtention et à la composition de l'huile d'olive, composition des eaux de lavage et leur valorisation, une généralité sur les polyphénols, leurs caractéristiques, les différents polyphénols présents dans les eaux de lavage etc....., nous présentons aussi le concept de la biodégradations et les travaux réaliser sur les eaux de lavage .

La partie expérimentale a pour objectif de présenter le matériel et les méthodes

utilisées pour effectuer les différentes analyses chimiques et biochimiques des eaux de lavage des huiles oléicoles ainsi une approche de valorisation de ces sous produits.

Et enfin une conclusion.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE.-

CHAPITRE I.-

GÉNÉRALITÉ SUR L'OLIVIER

I.1.-Historique

L'histoire de l'olivier se confond avec celle des civilisations qui ont vu le jour autour de bassin méditerranéen. Ainsi, l'olivier et son huile occupent une place prépondérante dans la culture et le patrimoine des grandes civilisations antique (**Henry, 2003**).

L'homme n'apparaît sur la planète (**Benhayoun, 2007**).

L'olivier est le premier des arbres rapporté par la bible. Mais l'olivier était déjà présent bien avant que premières traces que l'on a de cet arbre datent de 37 000 ans avant Jésus Christ, sur des feuilles fossilisées découvertes dans les îles de Santorin, en Grèce (**Henry, 2003**), de pollens et de feuilles fossiles de plus de 20 000 ans avant J.C., en France, de feuilles fossilisées datant de 12 000 ans avant J.C., en bordure de Sahara (**Benhayoun, 2007**).

A partir du VI^{ème} siècle avant J.C., sa culture s'est étendue à tout le bassin méditerranéen en passant par la Lybie, la Tunisie, la Sicile puis en Italie. Les Romains, lors de leurs conquêtes, pour suivent la propagation de l'olivier dans tous les pays côtiers de la méditerranéen (**Henry, 2003**).

Aujourd'hui l'olivier cultivé dans toutes les régions du globe, mais le bassin méditerranéen est resté sa terre de prédilection.

I .2.- Botanique

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "Olea" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe (**Khaled, 2003**).

La classification botanique de l'olivier selon (**Guignard, 2004**), est la suivante :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Astéridées
- Ordre : Lamiales
- Famille : Oléacée
- Genre : **Olea**
- Espèce : **Olea europea**

I. 3. -Origine de l'olivier

L'origine de l'olivier est le sujet de plusieurs débats (**Loukas et Krimbas, 1983**). Bien que des fossiles datant de la période tertiaire (il y a 1 million d'années) aient prouvé l'existence d'un ancêtre de l'olivier en Italie (**Boskou, 1996**), il paraît certain que l'olivier existait depuis 5000 ans dans la région qui correspond à l'ancienne Perse et Mésopotamie, puis sa culture s'est étendue dans le "croissant fertile", aire englobant l'Egypte, la Syrie, la Palestine et la Phénicie (**Di Giovacchino et al, 2002**).

C'est ainsi que l'on a retrouvé des fossiles de feuilles d'olivier dans les gisements du Pliocène de Mongardino (Italie), des restes fossilisés dans les couches du paléolithique supérieur en Afrique du Nord, des morceaux d'oléastres et des noyaux dans les excavations de l'Enéolithique en Espagne (**Bitonti et al, 2000**).

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. En effet, l'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre Algérie et Rome, durant l'époque romaine et constituait l'une des bases essentielles des activités économiques des populations rurales.

Des historiens et géographes, tels que Polybe au Ier siècle avant J.C., Idrissi au Xe siècle et Marmole au XV^{le} siècle, décrivaient avec admiration les olivettes qui assuraient la prospérité de l'Algérie (**Alloum, 1987**).

I.4.- Fructification de l'olive

L'olive est une drupe à peau lisse, à enveloppe charnue renfermant un noyau très dur, osseux, qui contient une graine. Sa forme ovoïde est typique. Sa couleur d'abord verte, vire au bleu violacé et au noire à maturité complète, vers octobre-novembre dans l'hémisphère nord.

C'est un aliment et source d'une huile alimentaire issue de son enveloppe charnue riche en graisses lors de la trituration des fruits (**Paris et Moyse, 1971**).

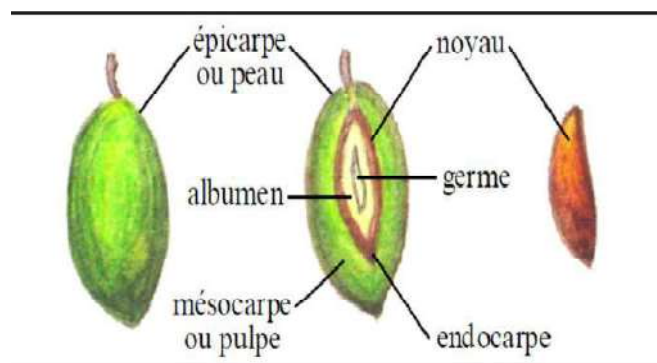


Figure 1.- Fruit de l'olive (Amouretti et Comet, 2000)

Sa composition physique est :

- Un épicarpe 2 à 2.5 %: l'eau de l'olive, elle est recouverte d'une matière cireuse, la cuticule, qui est imperméable à l'eau.
- Un mésocarpe 71,5 à 80,5% : la pulpe du fruit est constituée de cellule dans lesquelles vont être stockées l'huile d'olive.
- Un endocarpe : 17,3 à 23,0% paroi du noyau 2,0 à 5,5% Amandes

Pour les composées chimiques de l'olive ils sont généralement de lipides, glucides, protides, cendres et eau. (Maymone, 1961).

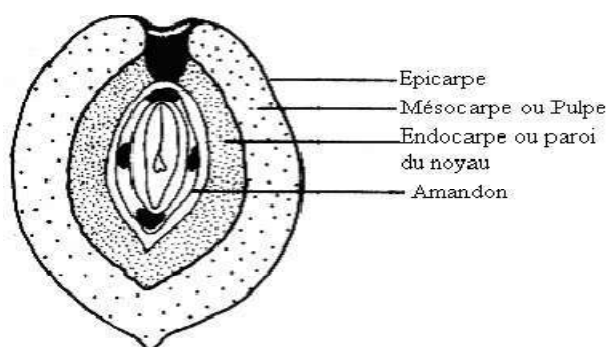


Figure 2.- Composition de l'olive (Nefzaoui, 1984).

I.5. -Technologie d'élaboration

La production d'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évolué mais le processus d'extraction d'huile d'olive reste toujours le même. Il inclut quatre opérations principales : le nettoyage, le broyage, le malaxage et la séparation des phases liquides (Chimi, 1997).

I.5.1.- Réception et stockage

Pour éviter l'altération des olives, il faut réduire la durée de stockage au minimum possible (2 à 5 jours), le stockage dans des sacs.

I.5.2.-Effeuvillage

Généralement s'effectue manuellement ou par un système mécanique. Elle est nécessaire pour éviter la coloration trop verdâtre de l'huile. Cette étape est nécessaire afin d'éliminer les feuilles, brindilles, petits cailloux, terre qui donnent un goût amer à l'huile (Henry, 2003).

1.5.3.- Lavage

Les olives sont lavées à l'eau froide. Le lavage permet d'éviter l'interférence des terres avec la couleur, l'odeur et le goût de l'huile. Cette étape consiste à éliminer les matières étrangères (saletés, moisissures...) (**Aissam, 2003**).

1.5.4.- Broyage

Cette étape consiste à la dilacération des tissus des olives pour libérer les gouttelettes d'huiles contenues dans les cellules d'olives (**Labdaoui, 2017**). Le produit obtenu à l'issue de cette phase, dans la plupart des installations, est « la pâte d'huile » masse semi fluide composée d'une fraction solide (fragment de noyaux, peaux et pulpes) et d'une fraction liquide (émulsion d'eau et d'huile) (**Benyahoun et al, 2007**).

1.5.5.- Malaxage

Son but est de libérer le maximum d'huile en brisant les vacuoles qui sont restées entières durant l'opération précédente et d'amasser les gouttelettes d'huile en des gouttes plus grosses (**Boudissa, 2012**).

Les conditions idéales de malaxage sont de 30 à 45 minutes à une température de 30°C.

I 5.6.- Séparation de la phase huileuse

Une fois la pâte d'olive homogénéisée et la coalescence effectuée, l'étape suivante consiste en la séparation de la phase solide et de la phase liquide. Deux systèmes de séparation des phases sont utilisés: un système de presse et un système de centrifugation horizontale (**Argenson, 1999**).

1.5.6.1.- Procédé discontinu ou système à presse

L'extraction de l'huile est effectuée par des presses hydrauliques où la pâte est placée dans des doubles disques appelés « scourtins » puis pressée. La séparation des deux phases se fait par une simple décantation. Les sous-produits de cette opération sont le grignon brut et le moût (**Bianchi, 1999**).

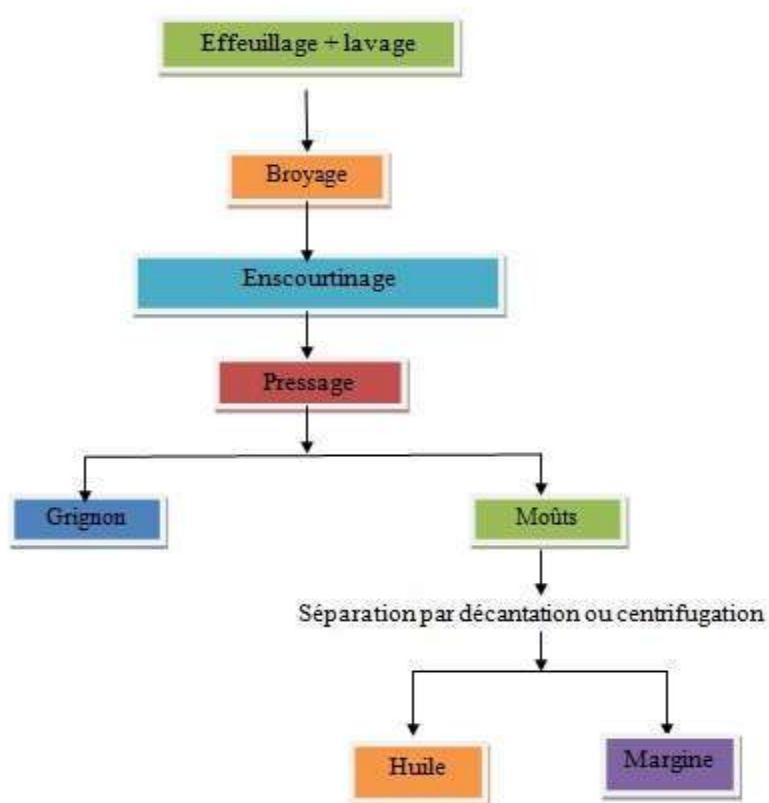


Figure 3.-Système discontinu d'extraction par presse (Ben hassine *et al.*, 2013).

I. 5.6.2.- Procédé continu ou système à centrifugation

Ce procédé est différent du système précédant, l'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation donnant le grignon et le moût. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des effluents d'huileries d'olive (Argenson, 1999).

On distingue deux types de procédé continu :

❖ Procédé continu à deux phases

L'extraction se réalise en une seule étape à l'aide d'un décanteur horizontal à force centrifuge.

Le décanteur sépare l'huile et mélange le grignon et les eaux de végétation en une unique phase de consistance pâteuse appelée grignon humide ou grignon à deux phases (Piacquadia *et al.*, 1998).

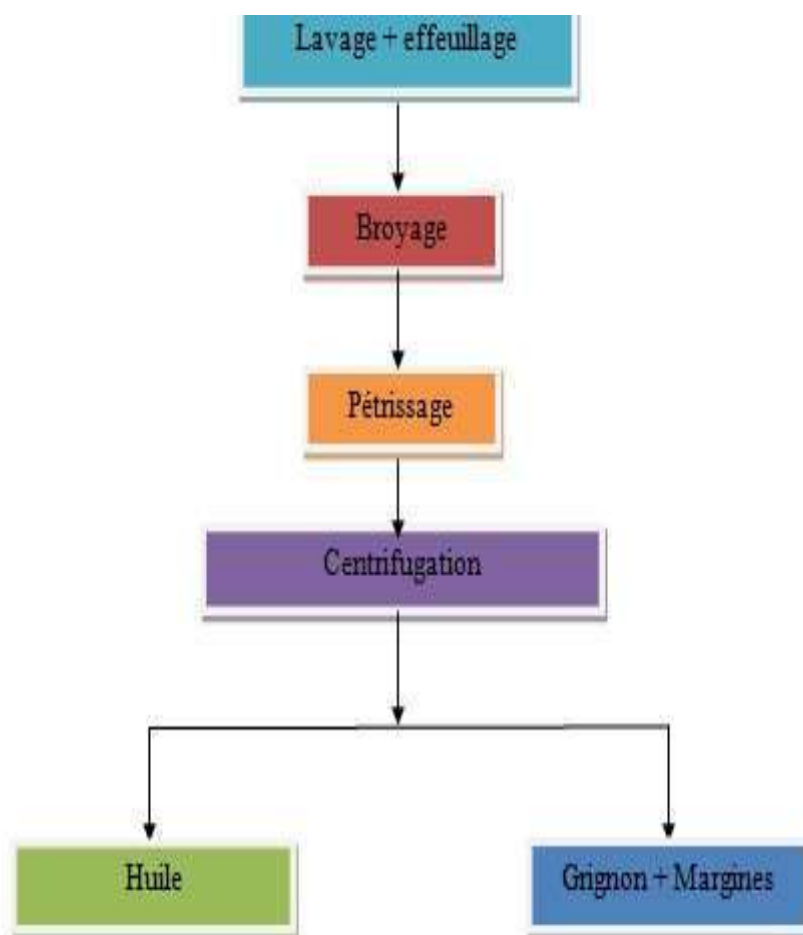


Figure 4.- Système continu d'extraction avec centrifugation à 2 phases (Ben hassine *et al.*, 2013).

❖ Procédé continu à trois phases

L'extraction se réalise à deux temps, elle consiste en une séparation des phases solide/liquide (grignon/huile et margine) qui est réalisée par centrifugation à axe horizontal, puis une séparation des phases liquide/liquide (huile/margine) par centrifugation à axe vertical.

Les produits résultant de ce processus sont l'huile (93% d'huile, 6% d'eau et 1% de solide), margine (89% d'eau, 10% de solide et 1% d'huile) et grignon (53% d'eau, 3% d'huile et 44% de solide).

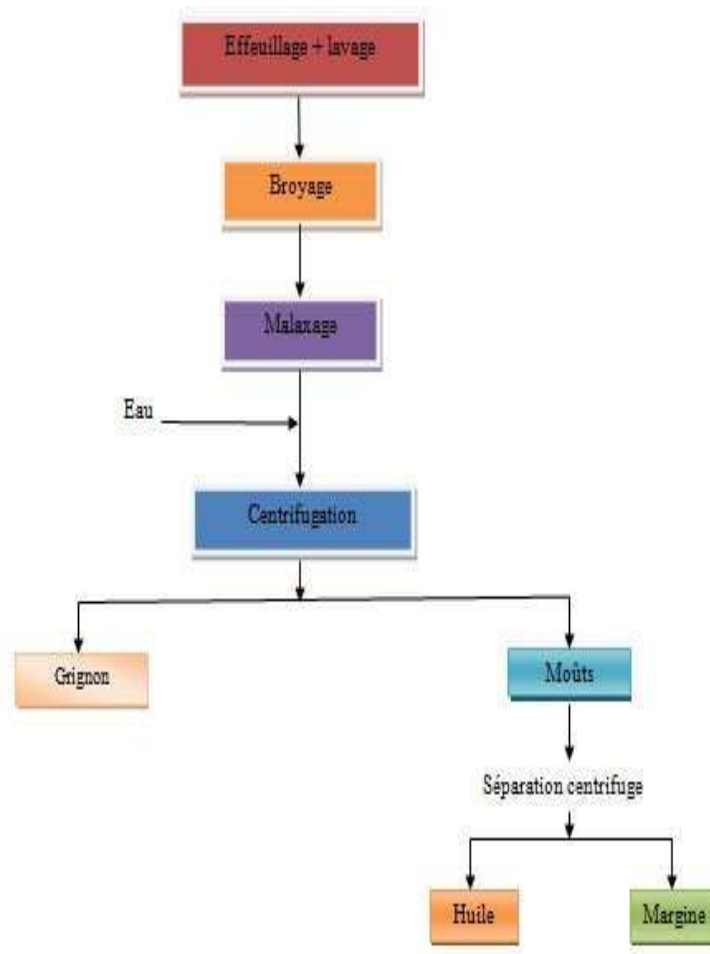


Figure 5.-Système continu d'extraction avec centrifugation à 3 phases (Ben Hassine ,2013).

Ce système a besoin d'avoir une couche d'eau libre pour faciliter l'extraction de l'huile. L'huile ainsi obtenue contiendra moins d'antioxydants (**Papadoupoulos et Boskou, 1991**).

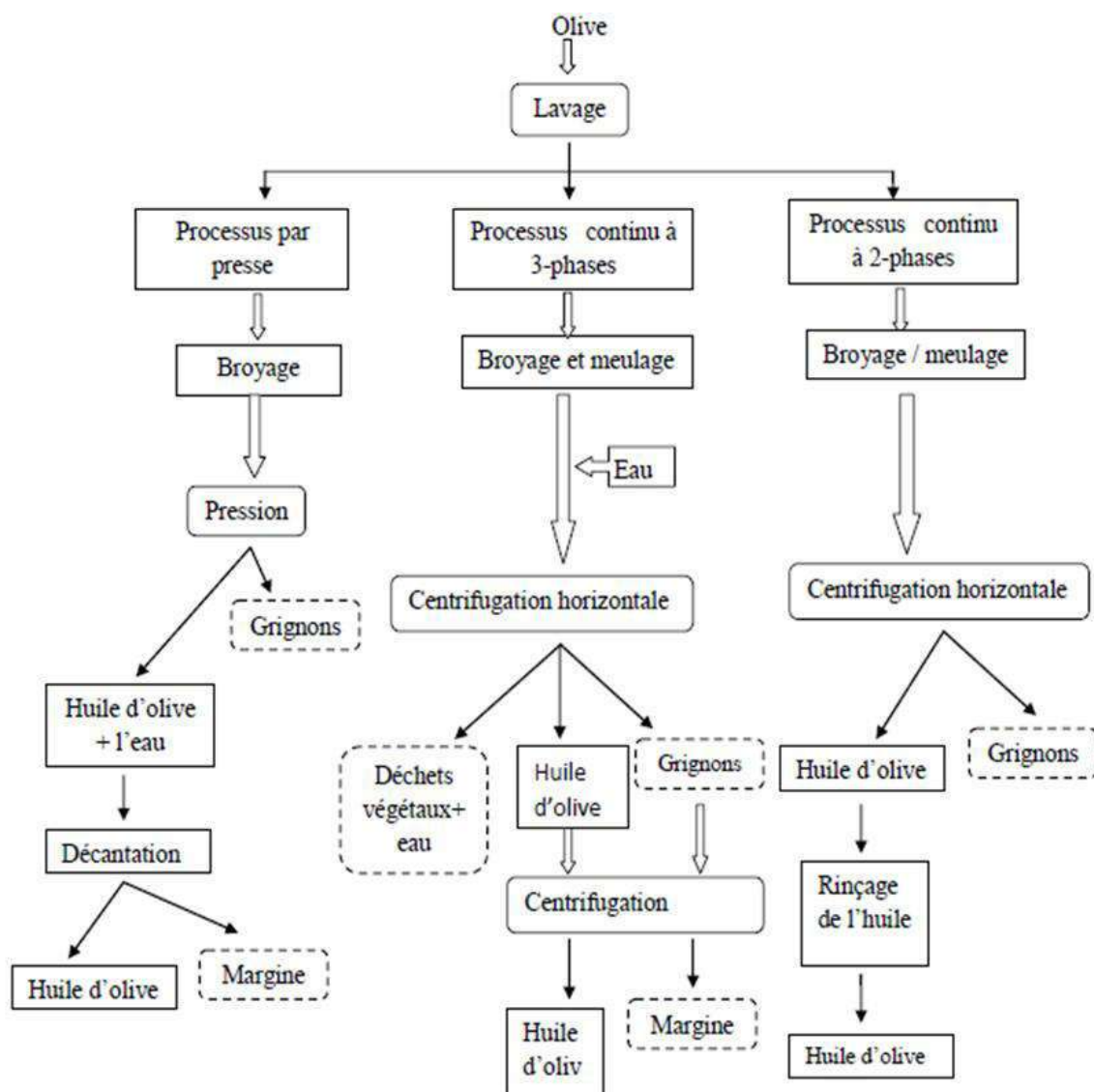


Figure 6.- Extraction d'olive (Morillo *et al*, 2009).

I .5.6.3.- Comparaison entre les procédés en discontinu et en continu

- ❖ Le système à centrifugation travaille plus rapidement que le système de presse.
- ❖ Les couts de main- d'œuvre des procédés en continu sont plus élevés avec le système de presse.
- ❖ Les installations à cycle continu présentent des inconvénients dus principalement à la consommation élevées d'eau chaude, ce qui se traduit par une production accrue des margines. Dans les systèmes traditionnels, l'extraction se fait sans addition significative d'eau, ce qui se répercute sur la charge des margines en matière organique et en suspension.

En effet, des eaux de lavage des unités traditionnelles son plus chargées et plus concentrées que ceux des unités modernes (**Aissam, 2003**).

Actuellement, les grandes usines dites super-presse emploient le procédé en continu pour améliorer le rendement de production d'huile d'olive et minimiser les quantités des eaux de lavage.

CHAPITRE II.-

LES SOUS PRODUITS OLÉICOLES

II .1.-Les sous produits oléicoles

Le développement de l'activité agro-industrielle a engendré une large production de déchets qui sont notamment issus de la transformation des matières premières de l'agriculture. Comme toutes les industries agro-alimentaire, l'opération d'extraction nécessite des grandes quantités d'eau, par conséquent elle engendre des quantités importantes de déchets solides (grignons d'olive) et liquide (des margines) (**zenjari et al, 2006**).

II.1. -Grignons**II. 1.1.- Définition**

C'est un sous-produit du processus d'extraction de l'huile d'olive, issus de la première pression ou centrifugation (**Nefzaoui, 1987**). C'est un résidu solide composé des peaux, des résidus de la pulpe et des fragments des noyaux. Il est composé par une fraction riche en lignine provenant des fragments de noyaux, et l'autre renfermant principalement des glucides, comme la cellulose et l'hémicellulose et, dans une moindre mesure, des protéines et de l'huile résiduelle qui dépend de la technique d'extraction (**Nefzaoui, 1984**).

II.2.- Eaux de lavage ou margine**II.2.1.- Définition**

L'eau de lavage est un liquide d'aspect trouble, de couleur brune rougeâtre à noire, a une odeur qui rappelle celle de l'huile d'olive, mais elles peuvent devenir gênantes lors de phénomène de fermentation.

Les eaux de lavages sont composées de 40 à 50% de l'eau végétal qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutés lors de processus de trituration (**Aissam, 2003**).

Elles constituent un important facteur de pollution du fait qu'ils renferment une fraction organique importante (des protéines, lipides, glucides et polyphénols) et aussi par leur acidité moyennement élevée et leur concentration élevée de matière solide totale

(**Camurati, 1984**).

Elles sont caractérisées par un pH acide (3-5) et une très grande conductivité électrique. Sa couleur noire est due à la présence des polyphénols. Les composés fondamentaux des margines sont l'eau (83 - 96 %), les matières organiques (3,5 – 15 %) et de sels minéraux (0,5 – 2 %) (**Iboukhoullef, 2014**).

La qualité et la quantité des margines dépendent de l'opération d'extraction d'huile d'olive, elles sont aussi influencées par la variété d'olive, la saison de cueillette, le taux de maturation des fruits et les conditions climatiques (**Fiorentino *et al*, 2003**).

II.2.2.- Origine des eaux de lavage

Les margines sont obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive à partir de l'eau contenue dans le fruit, ajoutée au cours du broyage et des étapes de trituration. La qualité et la quantité des margines dépendent de l'opération d'extraction d'huile d'olive. Elles sont aussi influencées par la variété d'olives, la saison de récolte, le taux de maturation des fruits et les conditions climatiques (**Fiorentino, 2003**).

Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation (Di-Giovacchino *et al*, 1988 ; Hamdi *et al*, 1992).

Les différentes techniques d'extraction d'huile d'olive aboutissent à la formation des margines en quantités variables, allant de 400 à 500 l/tonne d'olives pour les unités traditionnelles et une tonne de margines /tonne d'olives pour les unités modernes (**Achak *et al*, 2009**).

II.2.3. -Caractéristiques physico-chimiques des margines

Les margines présentent une composition chimique très complexe et hétérogène. Elles contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes. Cette variation est due essentiellement aux procédés d'extraction d'huile d'olive qui représente l'élément le plus important, au stade de la maturité des olives, à la variété de l'olivier, aux conditions climatiques, à la durée de stockage des olives avant la trituration, au système de culture, à la situation géographique, au temps de stockage des olives avant la trituration, à la nature de conservation des olives et aux techniques et lieu de stockage (**Karapinar et Worgan, 1983; Bambalov *et al.*, 1989 ; Annaki *et al.*, 1996**).

Tableau 1.-Caractéristiques physico-chimiques des margine (Amirantes, 1996).

Paramètre	Valeur
DCO (g/l)	340-374
Chlorures (g/l)	11.16-25.48
Conductivité (ms/cm)	24-29.8
PH	4.75-4.9
Taux des sucres (g/l)	18.54-26.87
DBO5 (mg/l)	1250-6250
Matières sèches (g/l)	138.44-240
Matières minérales (g/l)	22.69-24.35
Matières volatiles (g/l)	114.09-212
Matières en suspension (g/l)	5.1-10
Taux d'humidité (%)	86-87.6
Masse volumique (g/cm ³)	1.03-1.05

La composition de ces effluents est plus ou moins variable. Elle dépend de **(Fiestas; Borja Padilla, 1992)**:

- La qualité des olives
- Leur degré de maturité
- Système d'extraction
- La qualité d'eau rajoutée lors de la phase d'extraction de l'huile

➤ **Fraction minérale**

Les margines contiennent des quantités significatives en sels minéraux **(Ranalli, 1991)**.

- 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures).
- 20% insolubles (carbonates et silicates).

Les éléments les plus représentatifs dans la fraction minérale sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) **(Fiestas; Borja Padilla, 1992)**.

Tableau 2.- Composition minérale des margines (Salvemini, 1985).

Elements	Concentration (mg/l)
Ortho phosphates (PO_4^{3-})	800,6
Chlorures (Cl^-)	270,2
Sulfate (SO_4^{2-})	16,68
Sodium (Na^+)	5370,9
Potassium (K^+)	15295,5
Calcium (Ca^{2+})	1167,6
Magnésium (Mg^{2+})	410,3
Fer (Fe)	103,4
Aluminium (Al)	8,34
Chrome (Cr^-)	0,66
Nickel (Ni)	3,36
Cobalt (Co)	1,33
Manganèse (Mn)	1,66
Cadmium (Cd)	0,83
Oxyde de silicium (SiO_2)	41,7
Zinc (Zn)	10,0

➤ Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques (**Aissam, 2003**):

- Fraction insoluble dans la phase aqueuse : constituée essentiellement de pulpes d'olives, qui représente la matière en suspension et colloïdale,
- Fraction soluble dans la phase aqueuse : les sucres, les lipides, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les composés phénoliques.

✓ Glucides

Les glucides sont des composants de la matière vivante formée de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Sa teneur dans la marge varie entre 2 et 8% du poids de la pulpe d'olive fraîche (**Capasso ; De Martino ; Arienzo, 2002**).

Ils contiennent principalement 3% lignocellulosiques et 0,6 % des pectines

(Fernandez Diaz, 1983).

Les sucres simples les plus fréquents dans les margines sont, en particulier, Arabinose, Galactose, Glucose, Rhamanose, Acide Gluronique, Acide Galacturonique (Capasso ; De Martino ; Arienzo, 2002).

✓ Composés azotés

Ils sont principalement les protéines (grosse molécule complexe d'acides aminés) sa teneur variant entre 1,2 et 2,4% (p/v). Les acides aminés plus abondants dans les margines sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine (Ranalli, 1991).

✓ Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique, mais indispensable à l'organisme. Plusieurs vitamines ont été identifiées. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D (calciférol) et la vitamine PP (vitamine B3 ou acide nicotinique) avec une concentration de 124 mg.kg-1 de margines (Aissam, 2003).

✓ Acides organiques

Les acides organiques sont des composés organiques présentant des propriétés acides, c'est-à-dire capable de libérer un cation (ion chargé positivement).

La proportion des acides organiques présente dans les margines varie entre 0,5 et 1,5% (p/v). Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique (Fiestas Ros J.A, 1981).

✓ Huiles

Les huiles sont des liquides gras, inflammable, insoluble dans l'eau, d'origine végétale, animale ou minérale.

La concentration d'huile résiduelle contenue dans les margines est très variable selon le procédé d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1% (v/v) (Fiestas ; Borja Padilla, 1992).

L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité d'huile (Ranalli, 1991).

✓ Composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Plus de 50 différents composés phénoliques

ont été identifiés dans les margines (**Obied ; Allen ; Bedgood ; Prenzler ; Robards ; Stockmann, 2005**). La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction de l'huile d'olive (**Aissam, 2003**).

En général, cette teneur varie entre 3 à 5 g/l et peut dépasser 9 g/l (**Aissam ; Errachidi ; Merzouki ; Benlemlih, 2002**).

II.2.4.- Pollution des margines

Les margines, effluents d'extraction de l'huile d'olive, posent de sérieux problèmes de pollution par leur concentration élevée en matières organiques et en poly phénols. Des études de toxicité et de biodégradabilité ont montré que les composés phénoliques qui sont de nature humiques et responsables de la coloration noire sont très peu toxiques et très difficilement biodégradables, par contre, les composés tanniques sont très toxiques mais biodégradables.

(**Boudoukhana, 2008**).

II.2.4.1.- La pollution des eaux

Les margines sont rejetées le plus souvent dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun contrôle préalable et nuisent fortement à la qualité de ces eaux de surfaces; la très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longue distances (**Mébirouk, 2002**).

La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution. De plus, la teneur élevée en sucres réducteurs provoque la prolifération des micro- organismes qui y profitent comme substrat, ceci diminue la disponibilité de l'oxygène pour d'autres organismes vivants et entraîne un déséquilibre de l'écosystème aquatique, de même que l'accumulation du phosphore provoque l'eutrophisation des eaux et favorise la multiplication de pathogènes (**Lacomelli, 2000**).

En outre, l'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer la pollution des nappes souterraines situées dans la zone ou à proximité du site d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable ; or dans le bassin méditerranéen, les ressources en eau sont rares et leur préservation, tant que quantitativement que qualitativement est capitale. Ensuite, Les lipides présents dans les margines forment un film imperméable à la surface des rivières et ses bords empêchent la pénétration de la lumière et l'oxygène (**Benyahia et Zein, 2003**).

II.2.4.2.- La pollution des sols

Les acides, les éléments minéraux et les substances organiques aboutissent à une destruction de la capacité d'échange cationique du sol (CEC), par suite, une réduction de la fertilité du sol. La fertilité du sol se réduit suite à l'action altérante des acides, des minéraux et des composés organiques (**Cadillon, SD**).

L'acidité des margines a un impact négatif sur le sol et ses constituants (destruction des espèces et des micro-organismes de sol. Par ailleurs le caractère visqueux des margines entraîne la formation d'un dépôt huileux qui provoque l'imperméabilisation du sol dans un premier lieu et son asphyxie par la suite. Ceci entraîne la stérilisation du sol et le déséquilibre de la symbiose entre la microflore du sol et les plantes (**Iboukhoulef, 2014**).

II.2.4.3.- La pollution de l'air

Les fortes teneurs en sels des margines, leur forte charge et leur acidité sursaturent le milieu récepteur et provoquent des conditions d'anaérobioses propices aux dégagements d'odeurs désagréables liées à la formation d'acide H₂S lors du processus de fermentation.

Les odeurs incommodes forment les riverains du cours d'eau (**Manahan, 1994**).

II.2.5.- Valorisation des margines**II.2.5.1.- Biodégradation naturelle des margines dans des bassins ouverts**

Le procédé d'évacuation consiste à accumuler les margines dans des bassins pour qu'elles s'évaporent et éviter ainsi leur développement dans la nature.

L'inconvénient que peut revêtir cette méthode d'évacuation est qu'en essayant d'éviter une pollution hydrique, nous risquons de provoquer une pollution de l'environnement en raison des problèmes de manque d'esthétique et de mauvaises odeurs que présentent les bassins d'évaporation et formation d'une pellicule lipidique étanche à la surface qui entrave la pénétration de la lumière et limite l'évaporation naturelle (**Ghomari, 2015**).

II.2.5.2. -Utilisation des margines comme fertilisant

Les margines peuvent être utilisées pour obtenir un composte fertilisant pour le sol. La technique consiste à ajouter aux margines toutes sortes de résidus secs, agricoles ou forestiers et le subit une fermentation aérobie-anaérobie. Ensuite un séchage partiel et un conditionnement sous forme de pellette son effectués (**Boudoukhana, 2008**).

II. 2.5.3.- Transformation des substances organiques des margines en biogaz

L'opération de processus de digestion anaérobiques permet par des réactions biochimiques de transformer 85% des substances organiques en biogaz pour donner 65-70% de méthane et de CO₂ (**Loulan, 1987**). Le méthane sera utilisé comme un moyen thermique ou sera reconverti en énergie électrique (**Nefzaoui, 1991**).

II.2.5.4. -Valorisation des margines par récupération de quelques composants

L'expérience dans ce domaine est très récente. Il s'agit, en particulier de la récupération des composants aromatiques et phénoliques et des solutions de glucides. La fraction de margine dépourvue de ces composants peut être utilisée pour la production de biomasse (**Benhayoun, 2007**).

II.2.6.- Valorisation des composés phénoliques des margines

Elles jouent un rôle capital dans la dégradation oxydative des aliments et des produits cosmétiques. Par conséquent, l'extraction des composés phénoliques biologiquement actifs à partir des margines constitue une alternative viable pour valoriser cet effluent problématique (**Grenet, Barry, 1988**).

En effet, la fraction phénolique possède des activités biologiques intéressantes, il est montré aussi que l'absorption journalière des polyphénols peut dépasser 1g/jour. Ce qui veut dire qu'elle est supérieure à celle des autres classes de métabolites secondaires et des antioxydants alimentaires (**Guétitcha, 2001**).

Trois grands créneaux d'applications sont identifiés par rapport aux propriétés des composés phénoliques : en agro-alimentaire, en cosmétologie et en phytothérapie.

II.2.6.1.- En agro-alimentaire

Selon (**Berset et bondini, 2000**) les composés phénoliques agissent sur la qualité sensorielle des aliments, couleur, odeur et goût. Mais aussi sur leur conservation avec un rôle antibactérien et antioxydant (**Haj-Ayed, Gonzalez, Caballero and Alvir, 2000**).

II.2.6.2. -En cosmétologie

En 2005 Macheix J. a montré que l'intérêt des composés phénoliques en cosmétologie est lié aux propriétés : Antioxydants, leur capacité de chélate les métaux, pouvoir anti-inflammatoire, effet antimicrobien et l'intervention sur l'activité de nombreuses enzymes. Ils permettent de lutter contre le vieillissement cutané en tant que molécule anti-radicalaire et en

tant que protecteur des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène.

Le seul frein de l'utilisation des composés phénoliques en cosmétologie est leur forte réactivité à l'oxydation et leurs instabilités dans les formulations cosmétiques conduisant ainsi à la variation possible de l'odeur et de la couleur (**Fonty ; Jouany ; Forano et Gouet, 1986**).

II.2.6.3. - En phytothérapie

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine les composés phénoliques intéressent particulièrement le domaine de la phytothérapie, puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes.

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, cancers, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental.

De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols dans la prévention de ces pathologies, qui met en cause les propriétés réductrices des composés phénoliques (**Fonty ; Jouany; Forano et Gouet, 1986**).

ETUDE EXPÉRIMENTAL

MATÉRIELS ET MÉTHODE

La partie expérimentale de notre étude est basé sur l'objectif suivant :

- Analyse physico-chimiques des eaux de lavage des huiles ;
- Analyse chimiques et biochimiques des eaux de lavage des huiles ;
- Extraction des polyphénols, et dosage des sucres totaux, des acides gras, des protéines ;
- Tester l'évolution de l'oxydation de l'huile enrichis à travers plusieurs paramètres (l'acidité, l'indice de peroxyde, capacité anti oxydante).

I.1. – Matériels

I.1.1. - Appareillages

- PH mètre type HANNA
- Un four à moufle
- Centrifugeuse type SIGMA
- Etuve type BIND
- Conductimètre de type MARTINI instruments
- Evaporateur rotatif
- Spectromètre UV/Visible

I.1.2.-Echantillonnages

Les échantillons des eaux de lavage utilisés au cours de cette étude proviennent de la trituration des olives de variété chemelal dans les huileries moderne située dans la région de Ouargla .Cette huilier fonctionne avec un système de centrifugation à trois phases.

Les échantillons ont été collecte pendant la période (janvier-mares) dans des bouteilles de 1.5 l et transportés au. Ils sont stockés à l'obscurité, dans un environnement non oxygéné et à 4°C.



Figure 7.-Repartions géographique de wilaya OUARGLA(Naima,2018)

I.2.- Méthodes

I.2.1.- Analyse physico-chimiques des eaux de lavage des huiles

I.2.1.1.-Mesure du PH

- Principe

Il consiste à la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence réunis en un système d'électrodes combiné.

Le PH détermine directement en utilisant un PH-mètre à analyse, à une température avoisinant les 25°C.

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre type (HANNA instruments modèle 210).



PH mètre type HANNA

- **Mode opératoire :**

- Après avoir étalonné le pH mètre avec les solutions étalons
- Plonger l'électrode dans l'échantillon.
- Lire la valeur du PH directement sur l'écran de l'appareil.

I.2.1.2.-Conductivité électrique

La conductivité est une expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de véhiculer le courant électrique. Cette capacité dépend de la présence des ions, leur mobilité, leurs concentrations relatives et de la température de mesure. Elle est exprimée en mS.cm^{-1} .

- **Mode opératoire :**

- Etalonné l'appareil avec les solutions étalons.
- Plonger l'électrode dans l'échantillon.
- Lire la valeur de la conductivité directement sur l'écran de l'appareil.

I.2.1.3.- Matière sèche (MS)

- **Principe**

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les eaux de lavage. La matière sèche est déterminée par la pesée d'un échantillon de l'eau de lavage des huiles avant et après évaporation à 105°C pendant 24 heures. Elle est exprimée en g/100 g de poids frais:

$$\text{Humidité (\%)} = (P - P_s) / (P - P_o)$$

$$\text{MS (\%)} = 100 - \text{Humidité (\%)}$$

- ✓ P: poids du creuset + échantillon avant séchage.
- ✓ Ps: poids du creuset + échantillon après séchage.
- ✓ Po: poids du creuset vide.

I.2.1.4.- Matières minérale (MM)

- **Principe**

L'eau de lavage sèches ont été incinérées à 550°C jusqu'à une masse constante dans un four à moufle. La matière minérale correspond à la différence entre le poids sec et les cendres (correspondant à la MM) qui en résultent.

I.2.1.5.- Matières en suspension (MES)

Les matières en suspension sont déterminées par centrifugation d'un volume de 20 ml d'échantillon à $8\,000 \times g$ pendant 20 minutes. Le culot est mis dans une coupelle en porcelaine préalablement pesée puis séché à l'étuve à 105°C pendant 24 heures.

La différence entre le poids de l'échantillon séché et celui de la coupelle détermine le taux de MES. Il est exprimé en g.l^{-1} .

I.2.2.-Analyse chimiques et biochimiques des eaux de lavage

I.2.2.1.- Dosage des sucres totaux

- **Principe**

La méthode utilisée est celle décrite par Dubois *et al.* (1956). Les sucres simples, oligosaccharides, polysaccharides et leurs dérivés réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La réaction est sensible, et la coloration reste stable pendant plusieurs heures. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 490 nm. La concentration des sucres totaux est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage d'une solution de glucose à des concentrations allant de 10 à 100 mg.l^{-1} .

- **Mode opératoire**

Dans chaque tube à essai 2 ml de la dilution de l'échantillon plus 1ml de la solution phénol à 5 % et 5 ml de d'acide sulfurique à 96 % avec une bonne agitation. Après 10 min d'incubation à température ambiante, et une autre incubation dans un bain marie à 30 °C jusqu'à apparition d'une couleur jaune-orangée, L'absorbance a été mesurée à 492 nm au spectrophotomètre UV-Visible contre un blanc. Les échantillons et la gamme étalon sont

préparés de la même manière et dans les mêmes conditions.

La teneur en sucres totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec une solution de glucose.

I.2.2.2.-Dosage des protéines (Méthode de Bradford) :

Elle est basée sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et les résidus hydrophobes présents dans les protéines.

- **Principe**

En milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie G250 interagit (par des liaisons non covalente = adsorption) avec les radicaux aromatiques des acides aminés constitutifs des protéines. Sa longueur d'onde maximale d'absorption augmente alors de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

- **Mode opératoire**

Pratiquement, le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote de l'échantillon d'eau (100 µL). Cette fraction est additionnée à la solution de Bradford (4mL) représentée par sa composition ci-dessous. Le mélange est agité, puis mis au repos pendant 5 minutes pour stabiliser le complexe coloré formé. Ce complexe est la conséquence de la réaction du Bleu Brillant de Coomassie (BBC) G250 avec les protéines. La mesure effective des protéines est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 7315, UK) dans le visible à une longueur d'onde de 595nm.

A cette longueur d'onde le blanc (H₂O distillée) et les échantillons de protéines sont lus alternativement pour s'assurer de l'absence d'interférences liées au solvant eau.

Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (SAB) (Sigma-Aldrich) pour un domaine de concentration compris entre 0 à 1 g/L. A partir de cette courbe d'étalonnage, on détermine systématiquement par extrapolation toutes les solutions inconnues en protéines exprimées en mg ou g/L. Les échantillons d'eaux usées brutes concentrés en protéines sont dilués pour rester dans la gamme étalon

- **Composition du réactif de Bradford:**

- Bleu brillant de Coomassie (BBC) G250 (Merck1544)100 mg.
- Ethanol (Sigma-Aldrich) à 95%50 mL.
- Après agitation pendant 2 heures à l'abri de la lumière on ajoute :

- Acide ortho phosphorique (Sigma-Aldrich) à 85%100 mL.
- Eau distillée q.s.p1000 mL

II.2.2.3.-Teneur en matière grasse

A 100 ml de l'eau de lavage, 75 ml de chloroforme et 100 ml du méthanol sont ajoutés. Après agitation suivie d'une décantation, le mélange est divisé en deux phases. La phase supérieure constituée de l'eau de lavage et de méthanol est éliminée, alors que la phase inférieure contenant le chloroforme et les lipides soluble est évaporée dans un rotavapeur. Le chloroforme s'évapore et les lipides sont récupérés. Le volume de lipides obtenu est évalué en pourcentage par rapport au volume de l'eau de lavage utilisé (v/v).

II.2.3.- Extraction des composés phénoliques

- **Principe**

Il s'agit d'une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle. L'extraction repose sur le principe de solubilité dans les solvants organiques.

- **Dilapidation des margines (l'eau de lavage)**

Elle se fait par une extraction totale à l'hexane. X ml de l'eau de lavage sont ajoutées à X ml d'hexane (V/V). Le mélange subit une agitation suivie d'une décantation pendant 10 min. les eaux de lavage délipidées sont recueillies après séparation complète en deux phases: l'hexane (surnageant) et les eaux de lavage délipidées (phase aqueuse) prêtes à une extraction liquide- liquide.

- **Extraction des composés phénoliques à l'acétate d'éthyle**

- **Principe**

L'acétate d'éthyle est confirmé d'être un solvant convenable pour la récupération des composés phénoliques contenus dans la marge. Ce dernier est additionné aux marges délipidées (V/V), le mélange est secoué vigoureusement dans une ampoule à décanter (15min), L'ensemble est complètement séparé en deux phases: l'acétate d'éthyle riche en polyphénols en surnageant et les marges en culot. La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C.

Le rendement d'extraction est calculé selon la relation suivant :

$$R (\%) = (m \text{ Finale} / m \text{ Initial}) * 100$$

✓ R : Rendement de la bioconversion et la biodégradation obtenu en pourcentage.

- ✓ m Finale: Masse de finale en gramme.
- ✓ m Initial: Masse initiale du menthol utilisé en gramme.

I.2.4.- Dosage des polyphénols totaux par la méthode (Folin-Ciocalteu).

• Principe

En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique du réactif Folin Ciocalteu, qui se traduit par l'apparition d'une coloration bleue foncée, L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'échantillon.

• Mode opératoire

Le principe de cette méthode est le suivant :

- On dilue 0.5 mL des extraits phénoliques concentrés dans 20 mL d'eau distillée.
- On introduire 0.3 mL des extraits phénoliques dilués, 20 mL d'eau distillée et 0.625 ml de réactif Folin-Ciocalteu dans des fioles de 25 mL.
- Après 3 min, on ajoute 2.5 mL de la solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 35%.
- On agite le contenu et diluer le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- On préparer un blanc, dans les mêmes conditions, en éliminant l'extrait.
- On maintient les fioles préparées à l'obscurité pendant 1 heure.
- Lire les densités optiques à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (annexe 3).
- Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par litre de

I.2.5.-Incorporation des extraits phénoliques dans les huiles végétales.

I.2.5.1.-Préparation des huiles

Trois types d'huiles préparées à partir d'un même lot de l'huile végétale, chaque type a été en double exemplaires:

- 1) l'huile végétale témoin
- 2) l'huile végétale enrichie par le TBHQ
- 3) l'huile végétale l enrichie par 100 mg/kg de polyphénols

Les concentrations des extraits phénoliques et le TBHQ testés sont 100mg/kg d'huile (simple concentration) et 200mg/kg d'huile (double concentration). La double concentration de 200mg/kg d'huile est la concentration en polyphénols autorisée.

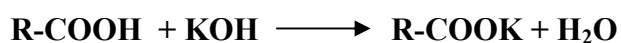
I.2.6.- Évaluation de l'oxydation des huiles enrichies

I.2.6.1.-Acidité libre

- **Principe**

L'acidité d'un corps gras mesure le pourcentage d'acides gras libres contenu dans celui-ci. Elle est déterminée selon la méthode décrite dans le règlement CEE/2568/91.

Le principe repose sur la neutralisation des acides gras libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium sans hydrolyser les liaisons esters des glycérides, selon la réaction suivante :



Acide gras Hydroxyde de potassium Savon Eau

- **Mode opératoire**

Une prise d'essai d'huile de 5g est dissoute dans 20 ml d'un mélange d'oxyde diéthylique-éthanol à 95% (V/V). Le mélange est titré en agitant à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0,1N) en présence de phénolphtaléine jusqu'à coloration rose persistant une dizaine de secondes. Un essai témoin est réalisé dans les mêmes conditions.

L'acidité est exprimée en pourcentage d'acide oléique qui se détermine ainsi :

$$A\% (\text{acide oléique}) = (V - V_0) * (N * M/10 * m)$$

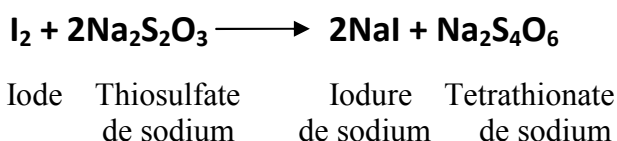
V et V₀: volume en millilitre de KOH nécessaire à la neutralisation de l'échantillon et le blanc, respectivement.

- ✓ N: normalité de la solution de KOH (0,1N).
- ✓ M: masse molaire de l'acide oléique qui est égale à 282 g/ml.
- ✓ m: masse en gramme de la prise d'essai.

I.2.6.2.-Indice de peroxyde

• Principe

Il correspond à la quantité d'oxygène actif du peroxyde contenu dans une certaine masse de produit capable d'être libéré dans les conditions de l'expérience. Il est exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par Kg de matière grasse pouvant oxyder l'iodure de potassium en présence d'acide acétique et de chloroforme. L'iode libéré est titré en retour par une solution de thiosulfate de sodium, suivant la réaction



• Mode opératoire

La méthode utilisée est celle d'ISO 3960, 2007.

- 5g d'huile pesées dans une fiole et mélangés avec 12ml de chlorophorme; le tout est agité.
- 18ml d'acide acétique glacial ainsi que 1ml d'Iodure de potassium (KI) (solution aqueuse saturée) sont ajoutés.
- Le mélange est agité pendant 1mn et laissé reposer pendant 5mn à l'abri de la lumière et à une température de 15 à 25°C.
- 75ml d'eau distillée sont additionnés suivi d'un titrage de l'iode libéré avec une solution de thiosulfate de sodium [C (Na₂S₂O₃)] à 0,01N en agitant vigoureusement et en employant la solution d'amidon (1g/100ml) comme indicateur jusqu'à disparition de la couleur.

- Un essai à blanc est effectué simultanément.

L'indice de peroxyde (IP) se détermine ainsi :

$$I_p = N (V - V_0) * 1000 / m \text{ (meq d'O}_2\text{/Kg)}$$

- ✓ V_0 : volume en millilitre de thiosulfate de sodium nécessaire pour titrer le blanc.
- ✓ V : volume en millilitre de thiosulfate de sodium nécessaire pour titrer l'essai.
- ✓ N : normalité de la solution de thiosulfate de sodium (0,01 N).
- ✓ m : masse en gramme de la prise d'essai.

I.2.6.3.-Activité anti radicalaire DPPH

L'activité antioxydant des huiles testée avant et après enrichissement est mesurée par le test DPPH. Les antioxydants présents dans l'huile neutralisent le DPPH° et la diminution de la concentration de ce radical est suivie par la diminution de l'absorbance 517 nm (Salta., 2010).

La capacité antioxydant est estimée suivant la méthode décrite par (Salta , 2010) qui consiste à ajouter a 1ml de la solution d'huile (huile dans chloroforme : 10%p/v) 4ml de la solution de DPPH (DPPH dans le chloroforme, 6×10^{-5} M). Après incubation de 30 min à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de DPPH}^\circ = AC - A_{t=30} / AC \times 100.$$

Avec:

- ✓ AC : Absorbance du contrôle (solution de DPPH° dans le chloroforme, 6×10^{-5} M)
- ✓ $A_{t=30}$: Absorbance de la solution d'huile après incubation

CONCLUSION

Conclusion

L'industrie d'extraction d'huile d'olive pose de sérieux problèmes environnementaux. Les eaux de lavage en subissent aucun traitement et sont souvent déversés dans les égouts d'assainissement, stockés dans des bassins d'évaporation ou épandus directement sur le sol. Il en résulte un impact négatif sur l'environnement qui se traduit par le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement d'odeurs nauséabondes. Ces problèmes environnementaux sont attribués à la richesse des effluents en matière organique et en particulier en polyphénols qui sont responsables d'effets phytotoxiques et antimicrobiens.

L'objectif assigné à ce travail est l'étude de l'effet du contenu phénolique extrait des eaux de lavage issues de deux modes de trituration.

Dans notre étude que les polyphénols extraits des eaux de lavage sont des antioxydants efficaces qui présentent deux avantages importants, d'une part, ces polyphénols d'origine naturelle qui sont caractérisés par une haute capacité antioxydant comparable au TBHQ qui lui, est synthétique; et peuvent le remplacer en agroalimentaire selon une utilisation rationnelle qui n'implique pas de risques sur la santé humaine et de plus est de moindre frais. D'autre part, l'impact environnemental des margines est réduit ce qui mènerait les pays producteurs d'huile d'olive à profiter de cette matière première à l'échelle industrielle en tant que source économiquement non chère, mais riche en polyphénols.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.-

Références bibliographiques

- Aissam H, 2003.** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national, faculté des sciences DHAR EL MEHRAZ FES, université Sidi Mohamed BEN ABDELLAH, 156p.
- Aissam H, 2002 Errachidi F., Merzouki M., Benlemlih M.,** Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase, Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé, 7 ,23-30.
- Amourettim C. et Comet G. 2000.** Le livre de l'olivier. Edisud, 191.
- Argenson C. 1999.** Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL), *L'olivier*, 204.
- Belaïd C, Kallel M, et Elleuch B.,** Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides de l'huilerie d'olive (margines). Dechet scientifique & technique, 27, 30-34, (2002)
- Ben hassine K., (2013).** Impact de la variété et du système d'extraction de l'huile d'olive sur les préférences consommateurs : 1-6.
- Benhayoun G, LAZZERI Y.** L'olivier en méditerranée du symbole à l'économie. Paris : L'HARNATTAN, 2007, 135p.
- Bianchi. 1999.** Extraction Systems and olive oil. *OCL*, 6: 49 - 55.
- Boudissa F, 2012.** Influence des radiations micro-ondes sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive imprégnée de margines. Mémoire de Master, faculté des sciences, université MOULOUD MAMMERI, Tizi-Ouzou, 90p.
- Boudoukhana H, 2008.** Impacts des margines sur les eaux de Oued BOUCHTATA (wilaya de Skikda). Mémoire de Magister, département des sciences
- Brenes M., Garcia A., Dobarganes C., Velasco J. et Romero C. J. Agr. Food Chem., 50 (2002) 5962-5967.**
- Cadillon , Lacassin .SD .**La valorisation agronomique des margines. Société du canal de Provence.
- Capasso R., De Martino A., Arienzo M.,** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *JAgric Food Chem*, 50 (10), 28-46-55, (2002).

- Chimi H, 1997.** Sous-produits de la transformation et de traitement des margines. Cours international sur l'amélioration de la qualité de l'huile. 30-11p.
- Di Giovacchino L., Sestili S. et Di Vincenzo, D. 2002.** Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104:587-601.
- Farag R., El-Baroty G. and Basuny, A. Internat. Journal of Food Science and Technology**, 38 (2003) 81-87.
- Fernandez Diaz M.J.,** Olives. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 5, 379-397, (1983).
- Fiestas Ros J.A., Borja Padilla R.,** Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain, *Grasas y Aceites*, vol43 (2), 101-106, (1992).
- Fiestas Ros J.A.,** Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). 93-110. Tunisie, (1981).
- Fonty G., Jouany J.P., Forano E. et Gouet Ph. (1986).** Interaction entre espèces microbiennes dans le rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 26 : 147-159.
- Gharby S., Harhar H., Kartah B., Chafchaoui I, Sibawayh Z., Charrouf Z. J. Mater. Environ. Sci.** 4 (2013) 935.
- Ghomari O, 2015.** Traitement des margines de la région du Fès. Mémoire de Master, faculté des sciences et techniques, université SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH, Fès, 39p.
- Grenet E., Barry P. (1988).** Colonization of thick-walled plant tissues by anaerobic fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.* 19 :25-31.
- Guetitcha H. (2001).** Étude de la fermentescibilité in vitro de sous-produits agro-industriels par la microflore rumianle de caprins. Thèse de magistère. ISN. Université de Constantine, 88p.
- Guignard J.L., Dupont F., Botanique les familles des plantes**, Editions Masson, Paris, France. P 336, (2004).
- Haj-Ayed M., Gonzalez J., Caballero R. and Alvir M.R. (2000).** Nutritive value of on-farm common vetch-oat hays. II. Ruminant degradability of dry matter and crude protein. *Animal Zootechnics*. 49 : 391-398.
- Henrys, 2003 ;** L'huile d'olive, son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en

cosmétique. Diplôme d'état de docteur en pharmacie, faculté de pharmacie, université HENRI POINCAR-NANCY 1, 82 p.

Iboukhoulé H, 2014. Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancés basés sur le système Fenton-like (H₂O₂/Cu). Thèse de doctorat, Faculté des sciences, université Mouloud MAMMERI, Tizi-Ouzou, 124p.

Khaled R, 2013 .Caractérisation physico-chimique et organoleptique des huiles d'olive vierges provenant de différentes, variétés algériennes, Master 2 en sciences agronomiques, p2, Université Saad Dahleb de Blida.

Koechlin-Ramonatxo C. Nutr. Clin. et Métab. « Oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way of nutrition in respiratory diseases», p 165-177. N°20.2006.

Loulan py, Thelier Y, 1987.Procédé et dispositif de traitement par fermentation méthanique des eaux résiduaires lipidiques, Brevet français, 2620439.

Macheix J. Les composés phénoliques des végétaux. Collection biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, 192, (2005).

Maymone B., A. Battaglini, M. Tiberio, Ricerche sul valore nutritivo della sansa diolive. Alimentazione Animale. 5, 219-250, (1961).

Mebirouk M, 2002. Rejets des huileries, développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols.

Mili S. « Olive oil marketing on non-traditional markets: prospects and strategies », New Medit, 5-27, (2006).

Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva- Sanchez M., Ramos-Cormenzana A. et Russell N. J., Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. Applied Microbiology, 82, 25-39, (2009).

Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri F. J. Agr. Food Chem., 49 (2001) 3509.

Nefzaoui A, 1991 « Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits option méditerranéennes série séminaire N° 16, P101-108, Ecole supérieure d'horticulture Sousse, Tunisie.

Obied H., Allen M., Bedgood D., Prenzler P., Robards K., Stockmann R., Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste, agricul. Food Chem., 53, 823- 837.

Doctorat national, Université sidi mohamed ben abdellah. Fes, 156, (2005)

Papadopoulos G. et Boskou D 1991. Antioxydant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 68:669-671.

Paris RR. et Moyse H. 1971. Précis de matière médicale. Pharmacognosi spéciale des dicotylédones gamopétales. *Tome III Edition Masson*, 510p.

Piacquadia P., De Stefano G. et Sciancalepore V. 1998. Quality of virgin olive oil extracted with the new centrifugation system using a two-phase decanter. *Lipids*, 100: 472-74.

Ranalli A., The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37, 30-39, (1991).

Salvemini F. (1985). Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive. *Riv. Delle Sostanze Grasse*. 112 : 559-564

Suhaj, M., J. « Spice antioxidants isolation and their antiradical activity », p 531–537. N°19 (2006).

Van Aardt M., Duncan S., Long T., O'Keefe S., Marcy J. and Sims S. J. Agr. Food Chem., 52 (2004) 587-591.

Vârban D.I., Duda M., Vârban R., et Muntean S. Research Concerning: « the Organic Technology for UASVM Agriculture », p 225- 229. N°66.2009.

Résumé

Dans cette étude, différents types ont été identifiés les sous produits oléicoles de huile olive issu de système extraction à trois phases. et leur caractères physico-chimiques. Basé sur des analyses chimiques et biochimiques. Afin d'évaluer les composés phénoliques en tant qu'antioxydants naturels sains aux lieux des antioxydants synthétiques par l'incorporation ces continus phénoliques extraits de sous produits oléicoles dans les huiles alimentaires.

Mots clé : Huile olive , Polyphénols , Antioxydants .

Abstract

In this study , the various compounds of olive oil properties were identified , resulting from the Three stage centrifugations system and their physiochemical . based on analyzes chemical and biochemicals, in order to evaluate the phenolic compounds as healthy natural antioxidants instead of synthetic antioxidants by incorporating these phenolic extracted . from olive products into edible oils.

Keywords. : Olive oil , Phenolic , antioxidants .

ملخص

في هذه الدراسة تم التعرف على مختلف مركبات زيت الزيتون الناتجة عن نظام الطرد المركزي لثلاث مراحل وخصائصها الفيزيوكيميائية، استنادا على تحاليل كيميائية وبيوكيميائية . قصد تثمين المركبات الفينولية كمضادات للأكسدة طبيعية و صحية بدل المضادات الأكسدة الصناعية بدمج هذه المحتويات الفينولية المستخرجة من زيت الزيتون في الزيوت الغذائية.

الكلمات المفتاحية زيت الزيتون، البوليفينول ، مضادات الأكسدة .