

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Abbes Laghrour- Khenchela

Faculté : Science et Technologie

Département : Science de la matière



No. Réf :....

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master (LMD)

Option : Chimie Analytique et Environnement

Valorisation des sous-produits oléicole

Présenté et soutenu par :

Harrath Amira

Djebbar Imen

Dirigé par :

Badis Zakaria

Membres de jury :

Présidente

Malki Asma

Université Abbes Laghror - Khenchela

Rapporteur

Badis Zakaria

Université Abbes Laghror - Khenchela

Examinatrice

Cekhab Messaouda

Université Abbes Laghror - Khenchela

Année Universitaire : 2020/2021



Remerciements

A l'issue de cette modeste étude, nous tenons à remercier tout d'abord nos bon Dieu tout puissant, de nous avoir procuré patience et volonté pour aboutir à nos fin et pour son aide miséricordieuse durant toute nos années d'étude.

*Également, il est particulièrement agréable de remercier vivement nos encadreur monsieur **BADIS Zakaria** pour avoir accepté de nous encadrer et de diriger ce travail d'une manière exemplaire et pour le temps qu'il nous consacrer.*

Nous tenons à exprimer toute notre grande gratitude aux membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Tous les gens qui nous ont aidé pour réaliser ce travail et tous ceux qui ont procuré main forte pendant les moments difficiles.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

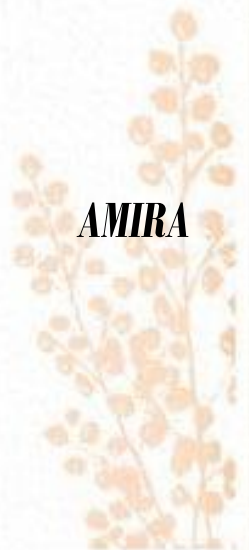
Mes très chers parents qui ont m'aidé et m'encouragé pendant toute ma vie d'étude et d'être ma source de bonheur et de réussite.

Mes chers frères : Abderrezak, Hamza et Heithem ;

Ma douce sœur Sarrah ;

Et à tous mes amis et mes collègues de ma promotion

AMIRA





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui je ne peux jamais remercier ;

Mes chers frères : HAKIM, KAMEL,IMAD et AMARA

Mes douces sœurs LINDA ET SANA ;

Mes amis et tous mes collègues.

IMENE



Liste des abréviations

FAO : food and agriculture organisation

BHA : Buthylhydroxyanisol (HydroxyanisolButylé)

BHT :Buthylhydroxytoluène (HydroxyanisolToluene)

BBBS : Biochimie, Biophysique, Biomathématique et Scientométrie

COI : Conseil Oléicole International

MS : Matière Sèche

PAL : L-Phénylalanine Amonia Lyase

E : Extrait

O : Oleuropéine

PT : Polyphénols Totaux

CAE : Cafeiqueacidequivalent (Equivalent d'Acide Caféique)

EAG : Equivalent d'Acide Gallique

φ : Diamètre

FC :Folin-Ciocalteu

RMS : Response Method Surface (Méthode de Surface de Réponse)

CCD : Centered Composite Design (Composite Centré Réduite)

ANOVA : Analyse Of Variance (Analyse de la variance)

DPPH : 1,1Diphényl-2-Pircyl Hydrazyl

H : Heure

Liste des figures

I.1 Répartition géographique d'olivier dans le monde	7
I.2 Composition physique de l'olivier	9
I.3 Extraction par presse	11
I.4 Chaîne continue à trois phases pour l'extraction de l'huile d'olive	12
I.5 Chaîne continue à deux phases pour l'extraction de l'huile d'olive	12
II.1 Structure chimique des acides hydrox benzoïques	17
II.2 Structure des différents acides phénoliques des grignons d'olive	17
II.3 Structure de base d'un flavonoïde	18
II.4 Structure de différents flavonoïdes des grignons d'olive	18
II.5 Structure chimique du tyrosol (a) et de l'hydroxytyrosol (b)	19
II.6 Exemple de structure d'un tanin condensé (a) et d'un tanin hydrolysable (b)	19
II.7 Structure chimique du pinosol (a) et de l'acetoxypinorésinol (b)	20
II.8 Structure de base d'un acide élénolique	20
IV.1 Schéma général du plan de travail	31
IV.2 Etuve de séchage	34
IV.3 Protocole d'extraction des polyphénols à partir des huiles	35
IV.4 Schéma présentatif du protocole de séchage	36
IV.5 Schéma récapitulatif de l'étude préliminaire	37
IV.6 Représentation du plan d'expérience sous forme d'un cube virtuel	39
IV.7 Etape du test de DPPH	41
V.1 Photographie montrant la tolérance des rhizobiums vis-à-vis des différentes concentrations des margines	45
V.2 Photographie montrant l'absence de l'effet inhibiteur sur les rhizobiums en présence de différentes concentrations des grignons	46
V.3 Evaluation de la croissance des souches de rhizobium en fonction de temps d'incubation	48
V.3-2 Evaluation de la croissance des souches de rhizobium en fonction de temps d'incubation (suite)	49
V.4 Effet du ratio sur le taux de PT	53
V.5 Effet du temps d'agitation sur le taux de PT	53
V.6 Effet du diamètre de la poudre sur le taux de PT	54
V.7 Diagramme normalisé de Pareto pour la concentration en polyphénols totaux	56

V.8Interpretation graphique des résultats par Stargraphics : l'effet général des facteurs	57
V.9Surface de réponse de l'effet des différents facteurs.....	58
V.10Pouvoir anti-radicalaire des extraits méthanoliques des huiles analysées	59
V.11Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	60
V.12Evolution du DPPH en fonction de la concentration en polyphénols des huiles	60
V.13: Evolution du DPPH° en fonction de la concentration en polyphénols des huiles : brute (a) et enrichie (b)	60

Liste des Tableaux

I. L'olivier dans le monde 2006/2007	9
II. L'olivier en Algérie 2006/2007	9
III. Composition chimique et indicative du grignon d'olive	16
IV. Différents types d'enrichissement de l'huile d'olive	24
V. Effet inhibiteur des margines et du grignons d'olive vis-à-vis des souches de rhizobium	44
VI. Tableau récapitulatif des expériences et des résultats du plan d'expérience	54
VII. Analyse de la variance pour les PT.....	55
VIII. Présentation des paramètres optimisés	59
IX. Résultats de l'analyse sensorielle	62

Table des matières

Table des matières

Remerciements

Dédicace

<i>Introduction générale</i>	2
------------------------------------	---

Etude bibliographique

Chapitre I : Généralités

I.1. L'olivier et le secteur oléicole :	7
I.1.1 L'olivier et le verger oléicole :	7
I.1.2. Production oléicole :	8
I.2. Huile d'olive :	10
I.2.1. Définition :	10
I.2.2. Types de l'huile d'olive :	10
I.2.3. Technologie d'extraction :	10
I.2.4. Composition chimique de l'huile d'olive :	12

Chapitre 2 : Grignons d'olive

II.1. Définition :	15
II.2. Composition chimique :	15
II.3. Composition phénolique :	16
II.3.1. Définition :	16
II.3.2. Classification :	16
II.3.3. Pouvoir antioxydant :	21
II.4. Place industrielle et valorisation des grignons d'olive :	21

Chapitre 3 : Enrichissement de l'huile d'olive

III. Enrichissement de l'huile d'olive	24
III.1. Introduction	24
III.2. Extraction solide-liquide	25
III.3. Extraction liquide-liquide	25
III.4. Combinaison des deux méthodes	25

ETUDE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

<i>1.Présentation du sujet</i> :	31
<i>2.Matériel</i>	33
a.Matériel végétal	33

b. Matériel biologique	33
3. Echantillonnage	33
3.1 Echantillonnage	33
3.2 Préparation des échantillons	33
3.2.1 Préparation de la solution de margines	33
3.2.2 Préparation de la solution de grignons	34
3.3 Recherche d'effet inhibiteur	34
3.3.1 Préparation des précultures et standardisations	34
3.3.2 Préparation des solutions de dilution des margines et de grignons d'olives	34
3.3.3 Ensemencement et dépôt des disques	34
3.4 Test de biodégradabilité des margines et de grignons	35
4. Prétraitement	35
4.1 Séchage	35
4.2 Broyage et tamisage	36
5. Extraction des composés phénoliques de l'huile	36
6. Dosage des composés polyphénoliques	36
7. Etude préliminaire	37
8. Plan d'expérience : théorie et application	39
8.1 Définition	39
8.2 Terminologie	39
8.3 Plan de surface de réponse	39
8.4 Plan d'expérience composite centré	40
8.5 Démarche	41
9. Mesure du pouvoir antioxydant	41
10. Evaluation sensorielle	42

Résultats et Discussions

1. Echantillons biologiques	45
2. Humidité	52
3. Extraction	52
4. Dosage	52
5. Etude préliminaire	53
5.1 Température	53
5.2 Ratio	53
5.3 Temps d'agitation	54

5.4 Diamètre de la poudre	54
6.Conditions optimales.....	55
7.Traitement des données par Statgraphics	56
7.1 Analyse de la variance et validation duplan.....	56
7.2 Analyse de surface	57
8.Mesure du pouvoir antioxydant.....	60
9.Effet de la concentration	61
10.Evaluation sensorielle	62
Conclusion générale	64
Références Bibliographiques	68
Annexes.....	77

Introduction générale

Introduction générale

L'olivier, arbre sacré des civilisations antiques, a, de tout temps, joué un rôle très important dans la vie des populations méditerranéennes. La découverte, ces dernières décennies, des bienfaits de son huile, qui fait à présent partie intégrante de ce que l'on appelle couramment « régime méditerranéen », a donné lieu à un retour en grâce fulgurant et mérité de la culture de l'olivier (**Villa, 2003**).

Dans le bassin méditerranéen, l'olivier (*Olea Europea L*) constitue une essence fruitière principale, tant par le nombre de variétés cultivées que par l'importance sociale et économique de sa culture et de son rôle environnemental. Il est noté l'existence de plus 805 millions d'oliviers dans le monde entier dont 98% sont concentrés sur le pourtour méditerranéen. En fait, le patrimoine génétique oléicole mondial est très riche en variétés. Il est constitué par plus de 2,600 variétés différentes (**Boukhari, 2014**).

Dans le monde, l'espèce *Olea Europea L* est actuellement composée de quelques 2000 variétés ; dont près de 500 sont implantées en Italie (**Boukhari, 2014**).

L'olivier est l'arbre fruitier le plus cultivé en Algérie, cette culture occupe une place très importante avec plus d'un tiers du verger arboricole algérien. Une diversité très importante caractérise cette espèce (**Boukhari, 2017**). Il existerait plus de 150 variétés d'oliviers plus ou moins cultivées, les plus dominantes sont les variétés : Chemlal et Sigoise (**Benderradji, 2016**).

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile comme produit principale, de grandes quantités de sous-produits. Ainsi, 100 Kg d'olives produisent en moyenne 35Kg de grignons et 100 litres de margines. De plus, la taille de l'olivier laisse en moyenne 25Kg de feuilles et brindilles annuellement (**Nefzaoui, 1988**).

La valorisation de ces résidus est devenue une double nécessité ; écologique et économique. En effet elle permettrait de réduire une pollution de plus en plus conséquente, et de contribuer à l'amélioration de la rentabilité du secteur, surtout des pays du sud de la méditerranée, à l'instar de l'Algérie.

Dans ce contexte, ce travail vise, d'une part, à éliminer l'un des principaux polluants de l'oléiculture qu'est le grignon d'olive en le transformant en valeur ajoutée, pour cela notre mémoire est devisé en trois chapitres ; le premier chapitre présente l'oléiculture, la deuxième porte sur les grignons d'olive et le troisième chapitre sur l'enrichissement de l'huile d'olive. Suivant par la partie pratique qui regroupe le matériel utilisé, les méthodes suivies et la présentation et l'interprétation des résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Etude bibliographique

Chapitre I :
Généralités

I. Généralités :

I.1. L'olivier et le secteur oléicole :

L'olivier a été cité dans les livres à plusieurs reprises. Dans le Coran, cité au début de la sourate de « AL-TINE ». Aussi cité au niveau de la bible et l'Évangile (**Blaquez, 1997**). L'olivier du latin « olea » fait partie de la famille des oléacées, un arbre qui possède une réelle valeur ornementale et qui fournit un bois très dur et stable. Son fruit, l'olive, donne une huile recherchée, après la découverte de ces bienfaits nutritionnels.

I.1.1 L'olivier et le verger oléicole :

La superficie oléicole mondiale est estimée à 8.600.000 hectares, dont 95% se situe dans le bassin méditerranéen. La production moyenne en olives est environ 10 millions de tonnes par an dont 92% sont utilisées pour l'extraction de l'huile, le reste étant consommé en tant qu'olive de table (**Zouiten Et El-Hadrani, 2001**).

Situation dans le monde :

L'olivier est aujourd'hui cultivé dans toutes les régions du globe se situant entre les latitudes 30° et 45° des deux hémisphères, des Amériques (Californie, Mexique, Brésil, Argentine, Chili), en Australie et jusqu'en Chine, en passant par le Japon et l'Afrique du Sud, on compte actuellement plus de 900 millions d'oliviers cultivés à travers le monde, mais le bassin méditerranéen est resté sa terre de prédilection, avec près de 95% des oliveraies mondiales (**Benhayounet Lazzeri, 2007**).



Figure I.1 : Répartition géographique d'olivier dans le monde (**Source : COI- 2003**).

En Algérie :

Les données archéologiques confirment que la région orientale était la zone oléicole la plus importante du pays, cependant, la dégradation de ces cultures amorcées sous les Vandales et les Byzantins, s'est poursuivie lorsque la vie nomade s'est installée dans les plaines dès le X^e siècle, ce qui explique le repli de l'olivier vers les zones de montagne de Kabylie principalement et de l'Aurès, configuration qui marque encore l'oliveraie contemporaine (**Mendil M et Sebai A, 2006**).

La surface oléicole est répartie dans trois régions : le centre, avec 54,3% de la superficie totale ; l'Est, avec 28,3% ; et l'Ouest, avec 17%.

En Algérie, coexistent une oléiculture traditionnelle et une oléiculture moderne :

La première est représentée par la plupart des oliveraies (80%) qui sont situées dans des zones de montagne s'agrippant d'Ouest en Est, sur des terrains accidentés et marginaux, peu fertiles et caractérisés par une pluviométrie moyenne comprise entre 400 et 900 mm/an. Le secteur moderne représente le reste des oliveraies (20%) qui sont situées dans les plaines occidentales du pays, où la pluviométrie moyenne annuelle est de 300-400 mm. (**Mendil M et Sebai A, 2006**).

I.1.2. Production oléicole :***Dans le monde :***

Sans entrer dans les considérations se rapportant à la disparité des informations statistiques disponibles sur la scène mondiale, l'huile d'olive est pour l'essentiel produite en termes quantitatifs par l'Espagne à environ 50% de la production mondiale qui doit se situer actuellement entre 2.7 et 3 millions de tonnes, selon les estimations et les années. L'Italie viendrait ensuite avec environ 20% suivie par la Grèce 10%, la Tunisie 8%, la Syrie 6% et le reste des pays contribuant avec 6% à la production mondiale. Dans ce dernier pourcentage, il y a un nombre important d'autres Etats méditerranéens qui y contribuent comme le Maroc, le Portugal, l'Algérie, Chypre, la France, la Libye, etc. c'est dire que la production mondiale provient à plus de 99% non seulement de pays qualifiés de méditerranéens mais aussi et pour l'essentiel de zones appartenant au pourtour assez limitrophe du bassin en question (**Thabet al, 2006**). Les statistiques de la production mondiale pour la saison oléicole 2006/2007 sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau I : l'olivier dans le monde 2006/2007 (COI 2007)

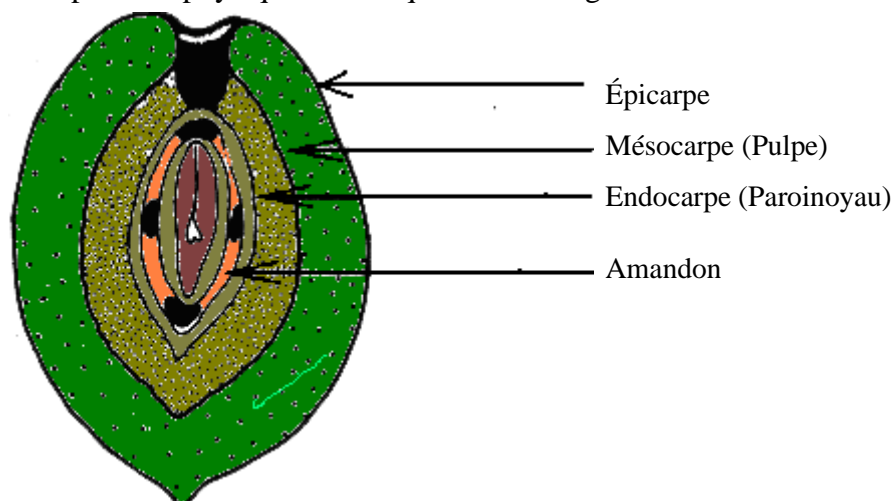
Surface totale plantée	9,5 millions hectares
Arbres en production	900 millions
Olives récoltées	14 million tonnes
Huile d'olive produite	2,8 million tonnes
Olives de table produites	1,8 million tonnes

Production nationale :**Tableau II** : l'olivier en Algérie 2006/2007 (Ministère De L'agriculture (Algérie))

SURFACE TOTALE PLANTÉE	9,5 MILLIONS HECTARES
ARBRES EN PRODUCTION	900 MILLIONS
OLIVES RECOLTES	14 MILLION TONNES
HUILE D'OLIVE PRODUITE	2,8 MILLION TONNES
OLIVES DE TABLE PRODUITES	1,8 MILLION TONNES

Composition de l'olive :

L'olive est une drupe, sa composition physique est indiquée dans la figure suivante :

**Figure I.2** : composition physique de l'olive (Nefzaoui, 1984)

1.2. Huile d'olive :

1.2.1. Définition :

L'huile d'olive est une composante unique du régime méditerranéen (**Da-Peng Yang, 2007**). Elle est l'huile provenant uniquement du fruit de l'olivier (*Olea europaea* L.) à l'exclusion des huiles obtenues par solvant ou par des procédés de réestérification et de tout mélange avec des huiles d'autre nature. Elle est commercialisée selon plusieurs noms, constituée pour l'essentiel de triglycérides (99%) et d'un grand nombre d'autres composants, présents en faible quantité (1%) (**COI, 2011**).

1.2.2. Types de l'huile d'olive :

L'huile d'olive est un corps gras parfaitement réglementé, en outre, le Conseil International d'Huile d'Olive définit trois grands types d'huile d'olive, huiles d'olive vierges, huiles d'olive raffinées et l'huile d'olive. Une autre huile peut être mise en évidence, il s'agit de l'huile de grignons d'olive (**COI, 2011**). Les différentes dénominations et définitions des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive sont représentées en **Annexe 1**.

1.2.3. Technologie d'extraction :

- ***Extraction discontinue (par pressage) :***

L'extraction par pression se réalise traditionnellement sur des presses (figure) discontinues utilisant pour accessoires des scourtins à disques filtrants, traditionnellement en fibre de coco, et désormais en polyéthylène ou polypropylène, aux armatures rigides d'acier, parfois de plastique (**Argenson et Al., 1999 ; Foin et Al., 2002**).

La pâte issue du broyage est empilée sur les scourtins ; à raison de 5 à 10 Kg par scourtin. L'application de la pression sur la charge des scourtins doit être réalisée de manière progressive. La durée totale de l'opération de pressage, réalisée en une seule fois, varie entre 45 et 60 mn (**Hammadi, 2006**).

La plupart des moulins utilisent désormais des presses hydrauliques (**Foin et al., 2002**).

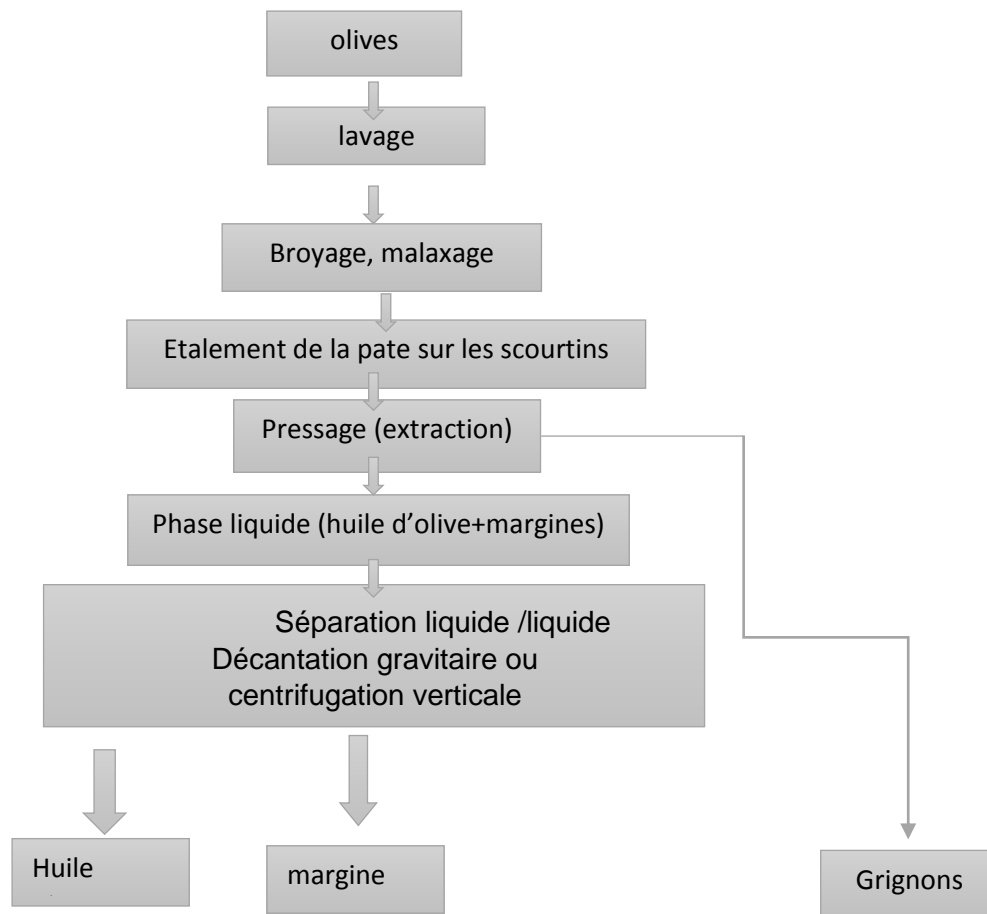


Figure I.3 : extraction par presse (méthode traditionnelle)(Bouskou, 2006)

- **Extraction continue :**

L'extraction de l'huile des olives par centrifugation directe des pâtes intervient par l'effet de la force centrifuge (3000 à 4000 tours/mn). Cette dernière accentue la différence entre les poids spécifiques des liquides non miscibles et du matériel solide et permet ainsi, la séparation continue et simultanée des différentes phases (Cuellar, 1990).

Deux technologies sont proposées par les constructeurs : la centrifugation à trois phases, la plus courante en Algérie, et la centrifugation à deux phases (écologique).

a/extraction continue à trois phases :

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives (figure I.4) contrairement au procédé discontinu. La pâte issue du malaxage est diluée avec de l'eau avant d'entrer dans le décanteur centrifuge afin que les différentes phases se séparent selon leur densité (El hajjouji, 2007).

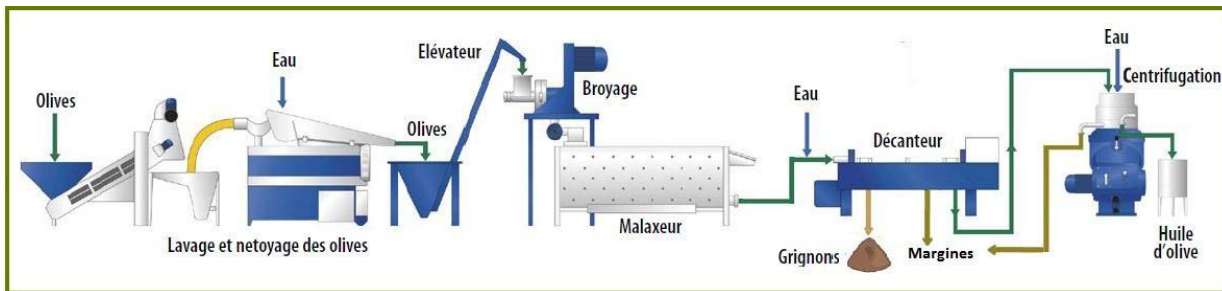


Figure I.4 : chaîne continue à trois phases pour l'extraction de l'huile d'olive

(Hammadi,2006)

b/ extraction à deux phases :

Le procédé technologique d'extraction de l'huile d'olives fonctionne avec un système de centrifugation à deux phases (huile et grignons humides) qui ne nécessite pas l'adjonction d'eau pour la séparation des phases huileuses et solides (**figure I.5**). Ce procédé est dit écologique (**HAMMADI, 2006**).

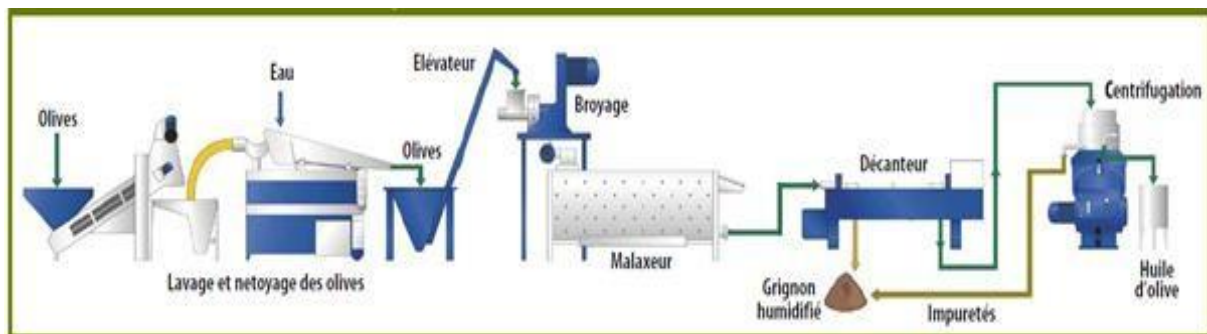


Figure I.5 : chaîne continue à deux phases pour l'extraction de l'huile d'olive (**Hammadi, 2006**).

I.2.4. Composition chimique de l'huile d'olive :

Comme toutes les huiles végétales, l'huile d'olive est constituée d'une fraction saponifiable, et d'une fraction insaponifiable (composants mineurs), différant d'un type d'huile à un autre (**COI, 2011**).

I.2.4.1. Fraction saponifiable

Elle représente la plus grande partie (99%) de la composition générale de l'huile d'olive. Elle est formée essentiellement de triglycérides et d'acides gras. Ces derniers sont responsables du goût aigre et l'odeur prononcée de l'huile, ils sont présents soit à l'état saturé (12,6 à 19,7%), ou monoinsaturé (64,4 à 81%) ou encore polyinsaturé (6-15,9%) (**Maggio R.M, 2009**).

I.2.4.2. Fraction insaponifiable

Cette fraction est dénommée également composants mineurs (0.4 – 1%) (**COI, 2011**), Ces composants en faible quantité sont majoritairement responsables de la qualité gustative de

l'huile, notamment au niveau de l'amertume, de l'arrière-goût poivré et/ou pimenté, et de sa stabilité (Dupont F. et Guignard J-L., 2007), on distingue :

- a. **Tocophérols** : Avec une teneur allant de 84 à 463 mg/kg d'huile, selon les variétés et les conditions climatiques (Beltran G, 2010).
- b. **Stérols** : Présents à raison de 1039 à 1567 mg/kg dans l'huile d'olive extra vierge (Menai-Djebaili, 2012).
- c. **Pigments** : Les principaux pigments rencontrés dans l'huile d'olive sont : la chlorophylle (0.15 à 61.96 mg/kg) et les caroténoïdes (0.53 à 31.51 mg/kg) (Moyano M.J, 2008).
- d. **Hydrocarbures** : Le principal hydrocarbure de l'huile d'olive est le squalène, contenu dans l'huile d'olive extra vierge à raison d'environ 400-450mg/100g, tandis que l'huile d'olive raffinée, en contient 25% de moins (Owen R.W, 2000).
- e. **Composés phénoliques** : On trouve les phénols simples, présents à la concentration de 4,2mg/100g dans l'huile d'olive vierge extra et de 0,47mg/100g dans l'huile raffinée et des phénols complexes (Owen R.W, 2000).

Chapitre 2 :
Grignons d'olive

II. Grignons d'olive

II.1. Définition :

Les grignons sont les résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives (Zein, 2003).

Ils sont de plusieurs types selon le traitement subit :

- **Grignons brut**

C'est le résidu de l'extraction de l'huile de l'olive entière. Ses teneurs relativement élevées en eau et en huile favorisent son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre (Nefzaoui, 1987).

- **Grignons épuisé**

C'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par solvant, l'exhane généralement (Nefzaoui, 1987).

- **Grignon partiellement dénoyauté**

- Il résulte de la séparation partielle des débris de noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation ;
- Il est dit gras si son huile n'est pas extraite par solvant.
- Il est dit dégraissé ou épuisé si son huile est extraite par solvant (Nefzaoui, 1987).
- En général, 100 kg d'olives donnent en moyenne (après trituration par système classique) 33-45 kg de grignon brut (avec une humidité de 25-27 %) qui, après épuisement (extraction de l'huile résiduelle) par solvant donnent 25-26 kg de grignon épuisé (avec une humidité de 15 %) constitués de 13 à 14 kg de coque et de 12 à 13 kg de pulpe (avec une humidité de 5 à 8 %) (Trigui, 2008).

II.2. Composition chimique :

Contrairement aux autres touteaux oléagineux les grignons bruts sont pauvres en matière azotées et riches en cellulose brute. Ils restent relativement riches en matières grasses. La composition chimique du grignon d'olive est en fonction de son type, du type de traitement qu'il a subi (épuisement, dénoyautage), de la variété (Nefzaoui A, 1984) et le stade de maturité des olives triturées. Toutefois le procédé d'extraction de l'huile est aussi déterminant, en effet, la teneur en composés phénoliques par exemple est de 1,14% si le procédé d'extraction est par pressage, 0,326% pour le système discontinu à trois phases et 2,43% s'il est à deux phases (Trigui A, 2008). **Tableau III :**

% de la Matière Sèche

Type de grignon	Matière Sèche	Matières minérales	Matières Azotées Totales	Cellulose brute	Matières Grasses
Grignon brut	75–80	3–5	5–10	35–50	8–15
Grignon gras partiellement dénoyauté	80–95	6–7	9–12	20–30	15–30
Grignon épuisé	85–90	7–10	8–10	35–40	4–6
Grignon épuisé partiellement dénoyauté	85–90	6–8	9–14	15–35	4–6
Pulpe grasse	35–40	5–8	9–13	16–25	26–33

Tableau III : composition chimique et indicative du grignon d'olive (FAO).**II.3. Composition phénolique :**

Les substances appartenant au groupe des composés phénoliques, très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure, ont suscité ces dernières années plus de travaux de recherche, vu leur dynamique biochimique incontestable (Zaidi F, 2009), faisant parler leurs intérêts sur la santé humaine, et dans les domaines : agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Les polyphénols occupent donc une place certaine dans toutes les disciplines scientifiques, c'est pourquoi ils ont pris de l'ampleur, et sont devenus plus courants dans les sujets de recherche.

II.3.1. Définition :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui sont largement distribués dans le règne végétal. Ces métabolites à poids moléculaire élevé, sont caractérisés par une structure de base, ayant comme point commun la présence d'au moins un cycle aromatique porteur d'une ou de plusieurs fonctions hydroxyles. (Molina E, 1991 ; Gharbi F.R, Benarif T, 2011 ; Sansoucy R, 1984).

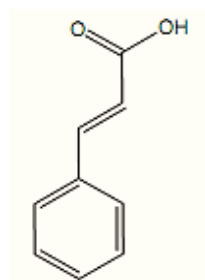
II.3.2. Classification :

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques, plus de 10000 sont actuellement connus (Djadoun S, 2010). Ils peuvent aller de molécules simples, le cas des acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Daltons, comme les tanins. La grande diversité de ces substances actives rend donc

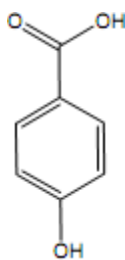
leur classification très compliquée. Cependant, les polyphénols sont communément subdivisés en : acides phénoliques, flavonoides, alcools phénoliques, lignanes et les tanins (**D'Archivio M, 2007**).

II.3.2.1. Acides phénoliques :

Cette classe implique tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Robbins R.J, 2003**). On en trouve deux grands groupes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques qui se distinguent à



travers leur formule chimique de base, C_6H_5 et C_6H_3 respectivement.



(a)

(b)

Figure II.1 : Structure chimique des acides hydroxybenzoïque(a) et hydroxycinnamique(b)

Les principaux acides phénoliques des grignons d'olive sont : l'acide vanillique (0,67mg/g d'extrait (E)), l'acide caféique (0,03mg/g d'E) et l'acide rosmarinique (0,73mg/g d'E)(**Rubio L, 2012**).

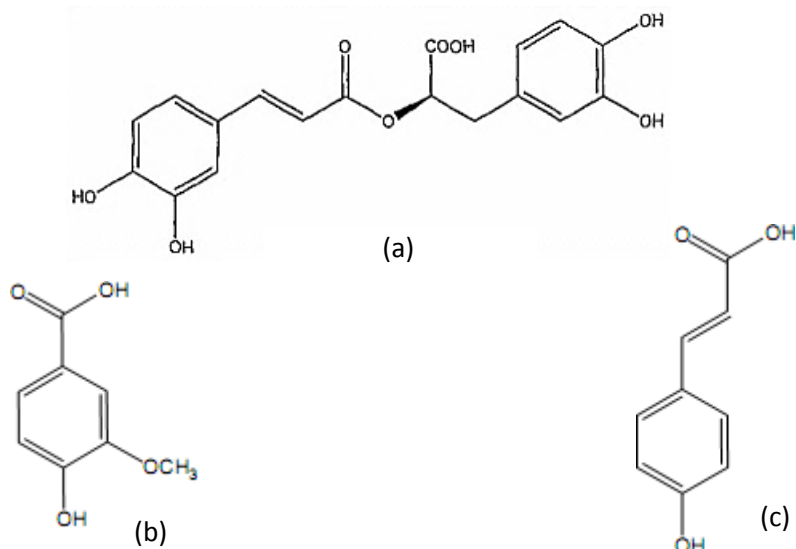
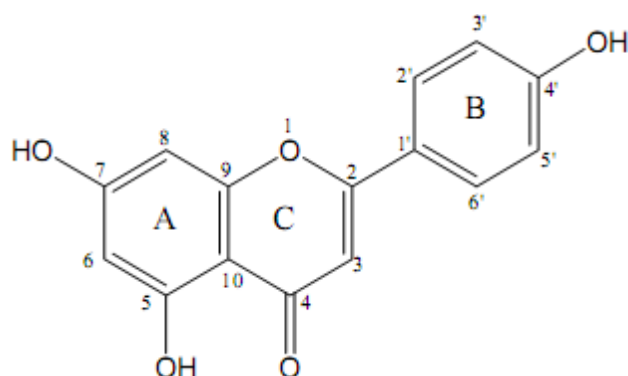


Figure II.2 : Structures de différents acides phénoliques des grignons d'olive : Acide rosmarinique (a), Acide vanillique (b) et Acide caféïque (c) (Vermerris W et Nicholson R, 2006)

II.3.2.2. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes, du latin «*flavus*» (jaune), constituent une classe très importante de la famille des polyphénols et sont des molécules très répandues dans le règne végétal (Paris M et Hurabeille M, 1981), rencontrés dans les feuilles, le pollen et les fruits. Ils se répartissent en plusieurs catégories, dont les plus importantes sont les flavanols, les flavonols, les flavones, les flavanones, et les anthocyanidines (Pietta P et Simonttil P, 1999). Cependant, Ils possèdent tous un même squelette de base, à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆(A et B), reliés par une chaîne en C₃(Vermerris W,



2006).

Figure II.3 : Structure de base d'un flavonoïde

Les différents flavonoïdes des grignons d'olive sont : l'apigénine (0,04mg/g d'Extrait (E)), la lutéoline (0,49mg/g d'E), le naringénine (0,02mg/g d'E) et le taxifoline (0,02mg/g) (**Rubio L, 2012**).

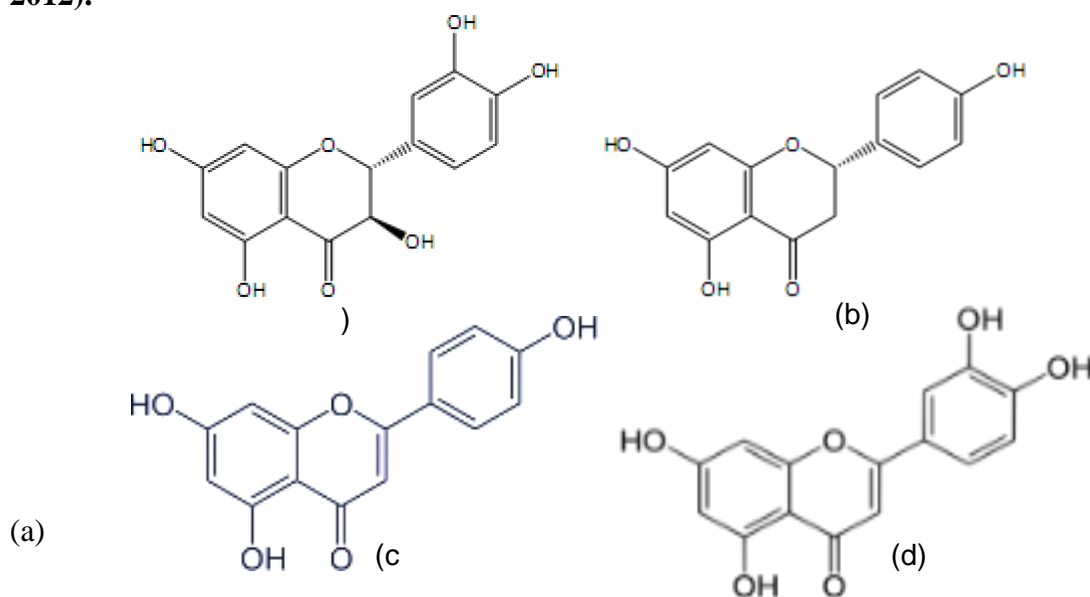


Figure II.4 : Structure de différents flavonoïdes des grignons d'olive : Taxifoline (a), Naringénine (b), Apigénine (c) et Lutéoline (d) (**Vermeris W, 2006**).

II.3.2.3. Alcools phénoliques :

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) (**Fig. II.5**), sont les principaux alcools phénoliques des grignons d'olive, contenus à raison de 0,27 et 2,77 mg/g d'E respectivement (**Rubio L, 2012**).

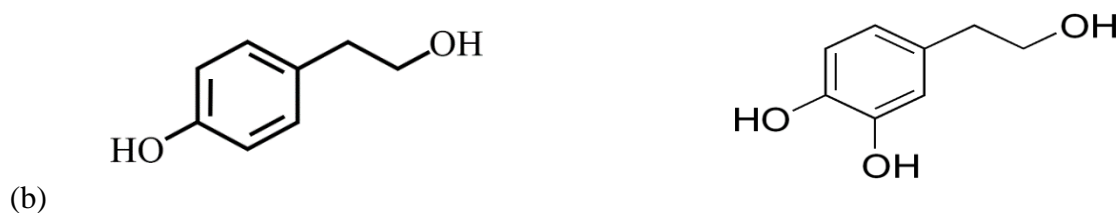


Figure II.5 : Structures chimiques du tyrosol (a) et de l'hydroxytyrosol (b)

II.3.2.4. Tanins :

Les tanins, utilisés depuis l'antiquité par l'Homme pour le traitement des peaux d'animaux, sont des formes phénoliques condensés, de structures variées, qui sont capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter (**Macheix J.J, 1990**), d'où leur aspect astringent (**RibbreauGayon, 1968**).

Les tanins sont classés en deux groupes, différant à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition, en tanins hydrolysables et en tannins condensés

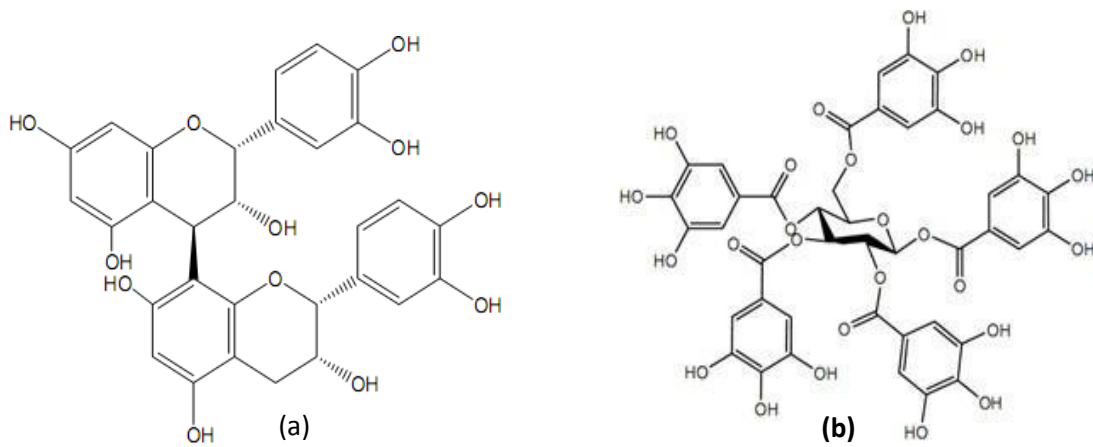


Figure II.6 : Exemple de structure d'un tanin condensé (a) et d'un tanin hydrolysable (b) (Vermerris W, 2006).

II.3.2.5. Lignanes :

Les lignanes sont produits par la dimérisation oxydante de deux unités de phenylpropane, elles sont la plupart du temps présentes dans la nature sous la forme libre, alors que leurs dérivés de glycoside sont seulement une forme (D'Archivio M, 2007).

Il a été montré que le grignon d'olive contient le pinosol à raison 0,09mg/g d'E et l'acetoxy-pinorésinol à raison de 1,17mg/g d'E (Rubbio L, 2012).

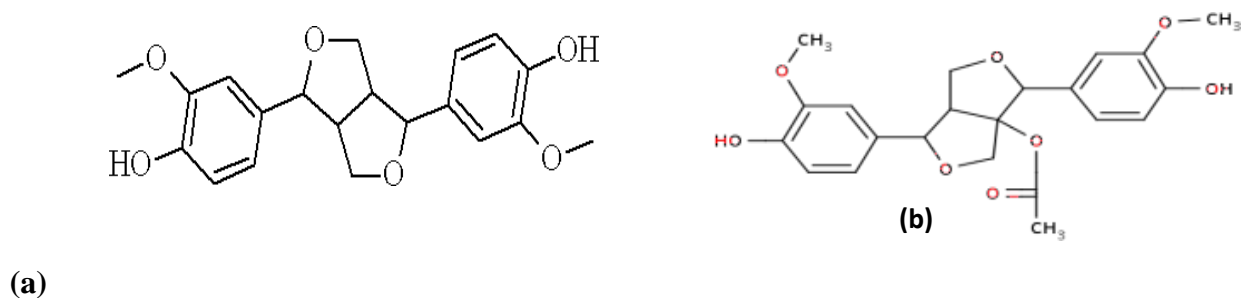


Figure II.7 : Structure chimique du Pinosol (a) et de l'acetoxy-pinorésinol (b)

II.3.2.6. Secoiridoides :

Les membres de la famille des Oléacées sont caractérisés par la présence de secoiridoides. Ces composés possèdent dans leurs structures de l'acide élénolique ou l'un de ses dérivés. Ces derniers comprennent des oléosidés, qui ne sont pas nécessairement des composés phénoliques, mais peuvent inclure une fraction phénolique à la suite d'estérification (**Silva S, 2010**). Le grignon d'olive contient plusieurs dérivés de sécoiridoïdes qui sont : Acide Elénolique : 13,2 mg/g d'extrait, Acetate d'Ethyl 3,4 Dihydroxyphényl (0,64 mg/g d'E), Acetate d'EthylDihydroxyphénylElénoliqueDialdehyde (47,4 mg/g d'E), Acetate d'EthylHydroxyphénylElénoliqueDialdehyde (4,56mg/g d'E), Acetate d'EthylHydroxyphénylElénoliquemonoaldehyde (4,32mg/g d'E) et Acetate d'Ethyl 3,4 DihydroxyphénylElénoliquemonoaldehyde (5,36mg/g d'E) (**Rubio L, 2012**).

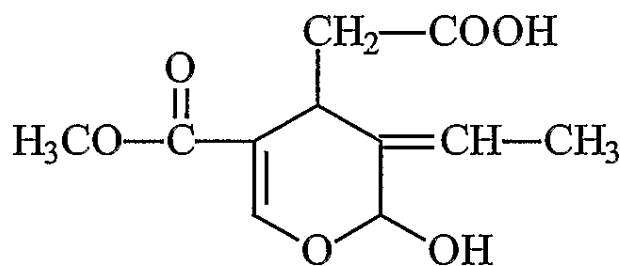


Figure II.8 : Structure de base d'un acide élénolique

II.3.3. Pouvoir antioxydant :

Afin de faire face à l'excès de radicaux libres qui produit le stress oxydatif, l'Homme a développé des mécanismes endogènes et exogènes afin de maintenir l'homéostasie redox. Parmi ceux-ci, les polyphénols ont été en grande partie étudiés pour leurs fortes capacités antioxydantes et autres propriétés par lesquelles les activités cellulaires sont réglées (**Xiuzhen H, 2007**). En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices en se réduisant avec eux, annihilant ainsi leur action, d'où leur prévention contre les maladies dégénératives et cardiovasculaires (**Covas M.I, 2006**).

II.4. Place industrielle et valorisation des grignons d'olive :

L'huile d'olive est classée parmi les huiles végétales les plus résistantes à l'autoxydation. Cette stabilité oxydative est fortement liée à la teneur en composés phénoliques totaux. La résistance à l'oxydation des huiles vierges diminue assez rapidement quand les polyphénols sont éliminés (**Montedero, 1980**). Des chercheurs ont proposé d'extraire

les composés phénoliques des déchets d'huileries d'olive pour les valoriser en tant qu'antioxydants naturels. Parmi les composés les plus utilisés on peut citer l'acide caféique, le tyrosol et l'acide hydroxybenzoïque. Ces derniers sont des précurseurs très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique (**Knupp G, 1996**).

Autrefois, les grignons avaient un débouché important dans l'industrie agroalimentaire par l'extraction de l'huile résiduelle à l'aide de solvants. Celle-ci est notamment constituée de la fraction lipidique contenue dans les graines des olives, mais aussi des graisses finement émulsionnées ou liées par les énergies d'interface (tension superficielle), inaccessibles par la pression ou la centrifugation. Cependant, les coûts des transports, la production de grignons à haute teneur en eau issus de l'extraction par centrifugation, l'intérêt limité du marché pour l'huile de grignons, sont autant d'éléments qui ont réduit la rentabilité de ce sous-produit et conduit, dans de nombreuses huileries, à rechercher d'autres débouchés. De ce fait, et dans le but de surmonter les impacts environnementaux, d'autres utilisations (valorisations) sont envisagées, à savoir, un épandage comme amendement sur les terres agricoles (valorisation agricole (**Michailides 2011 ; Malik, 2009**), emploi comme combustible pour le chauffage (valorisation énergétique)(45,46)et enfin, emploi dans l'alimentation du bétail, en particulier les ovins (**Molina 1991 ; Gharbi FR, 2011**). Les principales voies de valorisation des grignons d'olive sont résumées dans la figure en **annexe 2**.

Chapitre 3 :
Enrichissement de
l'huile d'olive

III. Enrichissement de l'huile d'olive

III.1. Introduction

Les composés phénoliques contenus dans les huiles d'olive ont un rôle prépondérant dans l'amélioration de la conservation de ces huiles, car ils limitent le développement de l'oxydation des lipides qu'elles contiennent, aussi bien lors de la conservation que lors d'un chauffage (**Servili et al, 2004**), de plus, ces polyphénols ont une valeur nutritionnelle de pointe, faisant parler leurs effets bénéfiques pour la santé.

Cependant, la quasi-totalité (98%) de ces composés présents dans l'olive sont perdus lors du procédé d'extraction des huiles, et c'est ainsi que 45% de ces pertes restent liés dans les tourteaux et les 55% qui restent sont perdus en phase aqueuse du procédé d'extraction (**Mulinacci, 2001**).

Les pertes en ces bio-phénols sont alors très importantes, et sont dues d'une part à leur faible affinité pour la fraction lipidique (**Rodis, 2002**) et d'autre part au procédé de blanchiment appliqué aux olives avant le broyage et le pressurage. En outre, des enzymes endogènes, telle que la β -glucosidase, inactivées par le blanchiment, catalysent l'hydrolyse des composés phénoliques (oleuropéine) en leurs aglycones correspondants, moins solubles dans l'eau, durant la phase du broyage, et par conséquent, l'inactivation de ces enzymes fait augmenter la quantité des polyphénols glycosylés et estérifiés susceptibles d'être perdus dans les eaux ajoutées pendant le procédé d'extraction (**Servili, 2004**). Ainsi, la polyphénoloxydase est également susceptible d'oxyder les polyphénols en quinones, qui peuvent alors se lier de façon covalente aux parois cellulaires et rester dans les tourteaux d'extraction (**Servili, 2004**).

Dans l'optique de compenser ces pertes et dans la perspective d'améliorer la qualité de l'huile, un enrichissement de celle-ci s'avère donc une alternative très intéressante. De ce fait, de nombreuses études ont été réalisées sur l'enrichissement des huiles alimentaires à base de matrices végétales. En effet, les huiles : tournesol, olive, soja, palme, colza et arachide, ont été supplémentées par l'origan, la sauge, le romarin, épinards... etc (**Salta et al, 2007**).

Il existe trois méthodes d'enrichissement par les substances actives de l'olivier (**Xiuzhen et al, 2007**)

- Extraction solide-liquide.
- Extraction liquide-liquide.
- Combinaison des deux types d'extraction.

III.2. Extraction solide-liquide

Se base sur le dissous d'une quantité de poudre de la matière végétale (solide), dans l'huile. Le passage des principes actifs dans la phase huileuse est donc en fonction de la solubilité de chaque composé (Xiuzhen et al, 2007).

III.3. Extraction liquide-liquide

Consiste à la mise en contact d'une huile avec une solution alcoolique de phénol, ces molécules sont transférées à la phase huileuse en fonction de leur facteur de distribution et la phase alcoolique est éliminée par centrifugation (Xiuzhen et al, 2007).

III.4. Combinaison des deux méthodes

Dans cette méthode, ce n'est qu'après extraction des polyphénols à partir de la matrice qu'ils sont additionnés à l'huile et tout est mélangé. La séparation des deux phases obtenus est réalisée sous vide par élimination d'alcool (Xiuzhen et al,2007).

Des nouvelles méthodes ont été apparues, qu'elles visent à améliorer le rendement d'extraction et réduire le temps, on trouve : l'extraction assistée par ultrasons, qui est une technique pouvant offrir une productibilité élevée dans des périodes plus courtes, grâce aux ultrasons appliqués, qui accélèrent le processus d'extraction. Ainsi que l'extraction par microondes, ce qui est basée sur la capacité d'une matrice à absorber l'énergie des microondes, ce qui incite le passage de l'analyte vers le milieu d'extraction (Achat et al, 2012).

L'enrichissement effectué pour l'huile d'olive et ces travaux sont résumés dans le tableau suivant : **Tableau IV** : différents types d'enrichissement de l'huile d'olive.

Matrice	Analyte	Conditions d'enrichissement	Référence
Feuille d'olivier	Polyphénols totaux (Oleuropeine)	- Enrichissement direct par method conventionnelle => 342,5 ± 1,7mg d'oleuropeine/kg d'huile de polyphénols totaux (soit une augmentation de 60,5mg par rapport à l'huile témoin) et 50,7 ± 1,7mg d'O/kg d'huile d'oleuropeine. Avec un %DPPH de 65,0 ± 0,8%. - Enrichissement avec ultrasons (60w, 16°C, 45min) => 414,3 ± 3,2mg O/kg d'huile de PT	(Achat s, 2012).

		(soit une augmentation de 132mg par rapport à l'huile témoin) et $111,0 \pm 2,2$ mg O/kg d'huile d'oleuropéine. Avec un %DPPH de $86,2 \pm 0,2$ %.	
Romarin, thym et origan	Antioxydants	- Enrichissement direct par contact à 5% avec suivi de la quantité d'antioxydants en fonction du temps à: 1) Température ambiante pendant 190 j =>L'enrichissement n'a pas eu lieu 2) 25°C avec agitation à 400tr/min pendant 11jours => le meilleur résultat est obtenu après 51 h (5,30mg/L) pour l'origan, 274 h (0,53mg/L) pour le romarin et 274h (0,35mg/L) pour le thym. 3) 35-40°C avec agitation à 400tr/min pendant 11jours => le meilleur résultat est obtenu après 168 h (4,95mg/L) pour l'origan, 274 h (10,53mg/L) pour le romarin et 274h (0,86mg/L) pour le thym.	(Nevado, 2012)
Feuille d'olivier	Polyphénols totaux	- Enrichissement après extraction par des extraits de 120mg de polyphénols totaux (PT)/kg d'huile et 240 mg de PT/kg d'huile => passage de 8,2mg Equivalents d'Acide Caféique (CAE)/100g d'huile à $14,7 \pm 0,7$ mg CAE/100g d'huile et à $20,2 \pm 0,9$ mg CAE/100g d'huile respectivement.	(Chiou, 2009).
Feuille d'olivier	Polyphénols totaux	- Enrichissement après extraction (100µl d'extrait sec d'olive dans le glycérol sont ajoutés à 10g d'huile avec agitation/2min) => une teneur de plus de 200mg/kg d'huile a été enregistrée, soit un passage de 94 à 299mg CAE/kg d'huile, avec un DPPH de 140μ g Equivalents Trolox (ET)/g d'huile avant enrichissement et 260μ g ET/g d'huile après	(Salta, 2007).

		enrichissement.	
	Oleuropein, Verbascoside Apigénine-7-	- Enrichissement avec la méthode des ultrasons (dans une méthode d'extraction, 1g de poudre dans 10ml d'huile à 25°C, 20 kHz, 225W) => Transfert de l'oleuropéine ($14,5 \pm 3,32 \mu\text{g/ml}$), Apigénine-7-glucoside ($1,91 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$) et	
Feuilles d'olivier	glucoside, et Lutéoline-7-glucoside Lutéoléine, Apigénine	Lutéoline-7-glucoside ($1,60 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$). -Enrichissement direct par méthode conventionnelle (étho conditions de la méthode par ultrasons) => pas de transfert. -Enrichissement direct par méthode conventionnelle (1g de poudre de feuilles séchées dans 10ml d'huile sous agitation à 25°C/24heures) => Transfert de l'oleuropéine ($3,44 \pm 0,90 \mu\text{g/ml}$).	(Japon Lujan, 2008).
Feuilles de basilic	Huiles essentielles (Linalool et Eugénol)	- Aromatisation conventionnelle (150g de feuilles/1L d'huile sous agitation pendant 12 heures à température ambiante) => $1,66 \text{mg/L}$ d'huile de Linanool et $0,31 \text{mg/L}$ d'huile d'Eugénol. - Aromatisation avec la méthode des ultrasons (1W, 25KHz) : 1) 150g de poudre dans 1L d'huile d'olive/ 15 minutes => $3,68 \text{mg/L}$, $1,34 \text{mg/L}$ d'huile de linanool et d'Eugénol respectivement. 2) 50g de poudre dans 1L d'huile d'olive/15minutes => $1,94 \text{mg/L}$ d'huile de Linanool et $0,79 \text{mg/L}$ d'huile d'eugénol.	(Villet, 2010).
Feuilles d'olivier variété CHEMLAL	Composés phénoliques (Stérols)	- Extraction des polyphénols puis enrichissement : après six mois de stockage => passage de $947 \pm 0,02 \text{mg/kg}$ d'huile à $1535 \pm 0,06 \text{mg/kg}$ d'huile (les polyphénols	(Bouaziz, 2008).

		<p>totaux : 158</p> <p>- ± 0,1mg/kg d'huile et le test de Rancimat a révélé une résistance de l'huile à la friture pendant 34,4 heures avant enrichissement et 64,8 heures après enrichissement)</p>
--	--	--

ETUDE
EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

1. Présentation du sujet :

L'huile d'olive est un composant unique du régime méditerranéen et est susceptible d'être partiellement responsable des effets de santé de ce régime. **(Da-Peng Yang, 2007)**.

Bien que le fruit de l'olivier soit très riche en composés phénoliques et que le potentiel médicinal d'huile d'olive ait été en grande partie attribué aux effets multiples des antioxydants de ces bio-phénols dérivés de l'olive **(Da-Peng Yang, 2007)**, on n'en retrouve qu'une minime quantité dans l'huile d'olive, c'est pourquoi une supplémentation de celle-ci s'avère une alternative intéressante. La modeste quantité retrouvée dans l'huile d'olive est corrélée aux pertes subies par celle-ci au cours de son procédé d'extraction. Ces pertes qui parviennent certainement aux déchets, qu'ils soient solides (grignons) ou liquides (margines), peuvent être compensées.

Compte tenu du fait que les grignons d'olive sont générés en des quantités énormes par les industries oléicoles et qu'ils sont très riches en composés phénoliques, ils peuvent éventuellement constituer une matrice intéressante pour enrichir celle-ci, en utilisant une méthode simple qui est l'enrichissement direct par macération, permettant d'assurer le transfert de ces composés vers l'huile, la protégeant ainsi de l'oxydation et donc une éventuelle prolongation de sa durée de vie, mais aussi, une amélioration de sa qualité à la fois nutritionnelle et organoleptique. De ce fait augmenter ses atouts pour la santé humaine et surmonter les impacts environnementaux engendrés par ces déchets.

Mais quelles conditions faut-il prévoir pour assurer le transfert de ces polyphénols ? Par conséquent, la réponse à cette question fera donc l'objet du développement du sujet de cette étude expérimentale.

Ce travail se penche sur l'enrichissement direct de l'huile d'olive par les principes actifs des grignons d'olive, avec intégration de la méthode des plans d'expériences. En premier lieu, une extraction des composés phénoliques à partir de l'huile d'olive avant enrichissement est préalablement faite, pour pouvoir comparer les résultats après enrichissement. Puis une optimisation des paramètres d'enrichissement est effectuée pour choisir les niveaux du plan d'expériences à adopter, suivie du lancement de ce dernier. Ainsi, les enrichissements dictés par ce plan sont accomplis. L'extraction, le dosage, ainsi que la quantification des polyphénols sont réalisés et le pouvoir antioxydant est mesuré. Et pour terminer une évaluation sensorielle des huiles, brute et enrichie, est réalisée **(Fig. IV.1)**.

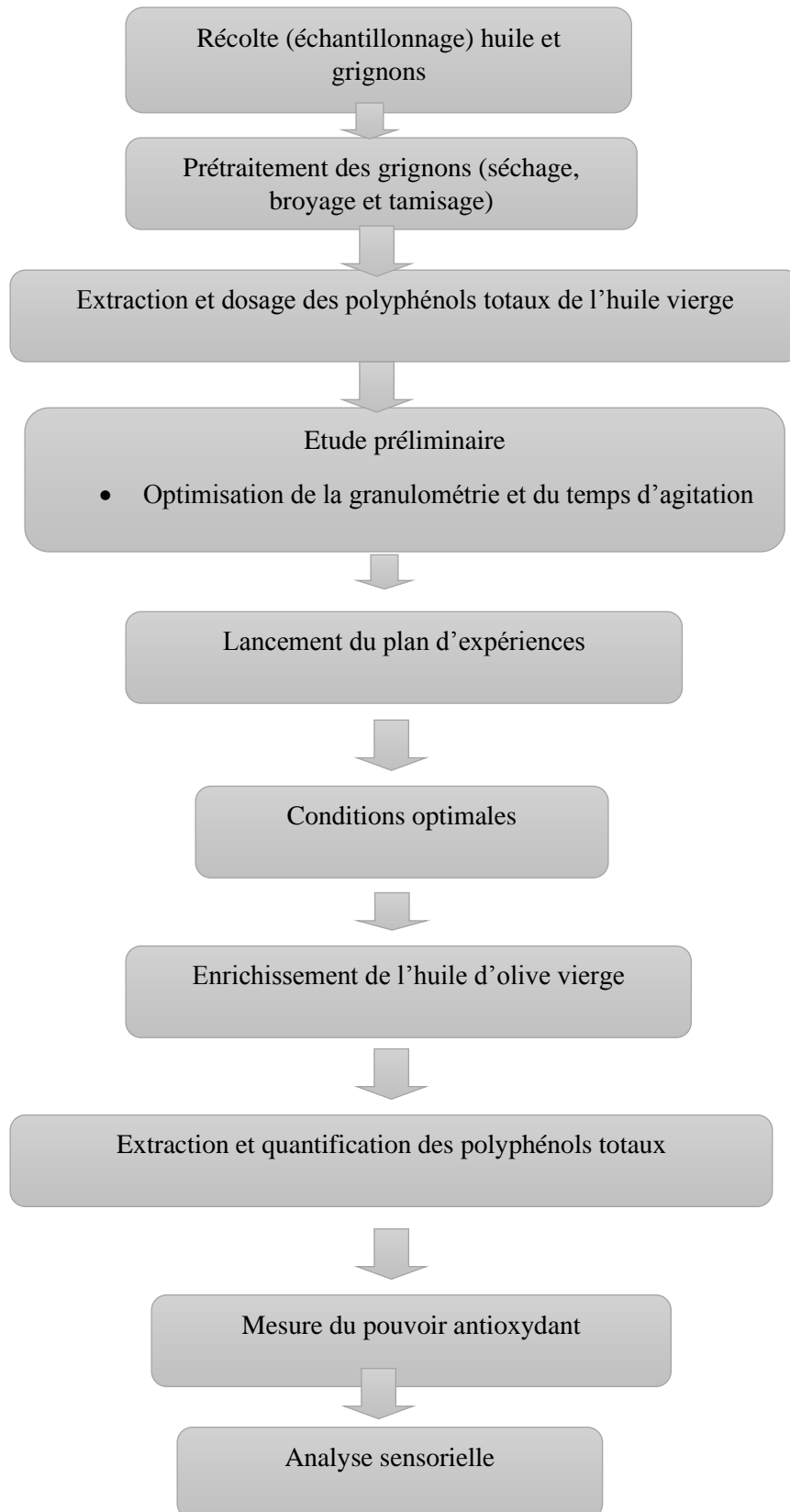


Figure IV.1 : schéma générale du plan de travail

2. Matériel

a. Matériel végétal

Les travaux en cours portent sur l'utilisation de composés phénoliques dans les grignons d'olive pour concentrer l'huile d'olive. A cet effet, les échantillons suivants ont été prélevés pour les deux matières premières concernées :

- **Huile d'olive**

L'huile d'olive, a été récoltée chez une huilerie moderne sise à Takerietz, wilaya de Bejaia. Elle a été obtenue par des moyens exclusivement mécaniques à partir du fruit de l'olivier (*Olea europea*), variété CHEMLAL, c'est donc une huile d'olive vierge.

- **Grignon d'olive**

Quant aux grignons, ils proviennent de la même huilerie, et sont issus suite à l'extraction de l'huile récoltée pour l'étude, puis soumis à une série de prétraitements.

b. Matériel biologique

Les souches de rhizobiums utilisées dans cette étude appartiennent à la collection du laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia. Elles ont été isolées à partir des nodules de la féverole (*Vicia faba minor* et *Vicia fabaequina*). Ces souches ont été repiquées dans des tubes inclinés contenant la gélose YMA (**annexe**), puis incubées à 28°C/48h en vue de leur revivification.

Les souches utilisées sont : ES8, RLV, EB1, MEK6, AM11R, UE28, EA2, UM2 et AKE1.

3. Echantillonnage

3.1 Echantillonnage

Les margines et les grignons utilisés proviennent d'une unité industrielle moderne de broyage d'olives par centrifugation à trois phases, située dans la région d'Akbou (Bejaia), pendant la campagne oléicole (2016-2017). Les échantillons de margines ont été prélevés le 30/01/2017 à partir du bassin de stockage des margines et transportés dans un bidon de 5L, puis ont été conservés à l'abri de la lumière. Les grignons ont été répartis en fractions de 1Kg dans deux sacs en plastiques puis conservés pour usage ultérieur.

3.2 Préparation des échantillons

3.2.1 Préparation de la solution de margines

La préparation des margines sèches commence par la filtration pour élimination des matières solides flottante ; les margines ont été concentrées par évaporation dans un four à 103°Cjusqu'à obtention de la matière sèche (**Esmail et al, 2015**).

A partir de la matière sèche de margines, une solution mère a été préparée en faisant dissoudre

5g de la matière sèche dans 50ML d'eau distillée. La solution obtenue est stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

3.2.2 Préparation de la solution de grignons

Les échantillons de grignons d'olives utilisés ont subi un séchage à l'étuve à 60°C. ce séchage consiste à éliminer la teneur en humidité dans le grignon afin d'avoir un meilleur transfert de matière lors du processus d'extraction et éviter le développement des moisissures. Le broyage est effectué à l'aide d'un broyeur de type IKA M20. Le broyat a été ensuite tamisé et seules les particules dont le diamètre est inférieur à 0.8 mm ont été retenues. 5g du broyat de pulpe des grignons d'olives ont été dissout dans 50 ml d'eau distillée puis laissés macérer, sous agitation pendant 2 heures. La solution obtenue a été filtrée sur papier filtre Wattman N°1, puis stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

3.3 Recherche d'effet inhibiteur

La mise en évidence d'effet inhibiteur chez les margines et le grignon d'olive vis-à-vis des souches de rhizobium a été réalisée sur milieu YMA (Annexe).

3.3.1 Préparation des précultures et standardisations

A partir des souches conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose YMA, des précultures sont préparées dans le milieu YMB. Après incubation à 28°C pendant 48H, une solution standard ($DO_{600}=0.1$) a été préparée par dilution de cette préculture dans de l'eau physiologique stérile.

3.3.2 Préparation des solutions de dilution des margines et de grignons d'olives

A partir des solutions mères de margines et de grignon préparées auparavant, une série de dilutions à progression géométrique d'ordre 2(1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64) a été préparée dans des tubes eppendorf.

3.3.3 Ensemencement et dépôt des disques

Après ensemencement par écouvillonnage des différentes boîtes contenant le milieu YMA et séchage, des disques en papier Watman stériles sont déposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. 10 µl de chaque dilution correspondant aux solutions mères de margines et de grignon sont déposés sur chaque disque. Pour une meilleure diffusion des différentes solutions, les boîtes sont conservées à 4°C pendant une heure, elles sont transférées par la suite dans une étuve à 28°C pour incubation pendant 48H.

La présence d'effet inhibiteur se manifeste par l'apparition de zones claires autour des disques.

3.4 Test de biodégradabilité des margines et de grignons

Dans le but de mettre en évidence la capacité des rhizobiums à dégrader les margines et le grignon et les utiliser comme substrat carboné, un test d'assimilation a été réalisé sur milieu YMB modifié. Ainsi, le mannitol que contient le milieu YMB est remplacé par 1g de margine ou de grignon et l'extrait de levure est remplacé par le KNO₃. Les milieux préparés sont répartis dans des tubes à essai à raison de 5 ml puis autoclavés à 120°C pendant 20mn.

Les milieux ainsi préparés sont ensemencés avec 10µl d'une préculture dont la DO600 est ajustée à 0.1. Pour évaluer la capacité de ces souches à dégrader les margines et le grignon, une cinétique de croissance a été réalisée par mesure de la densité optique à des intervalles de temps réguliers (24, 48, 72, 96 et 120H).

4. Prétraitement

4.1 Séchage

Le séchage du grignon a été réalisé dans une étuve (ECOCELL) à 40°C (**Fig. IV.2**) jusqu'à poids sec constant. Afin de déterminer sa teneur en eau, un test d'humidité a été entrepris et le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante (**Doymaz I, 2004**) :

$$H\% = \frac{PF-PS}{PF} \times 100$$

Où :

H% : Taux d'humidité en pourcentage ;

Pf : poids de l'échantillon frais ;

Ps : poids de l'échantillon après séchage.



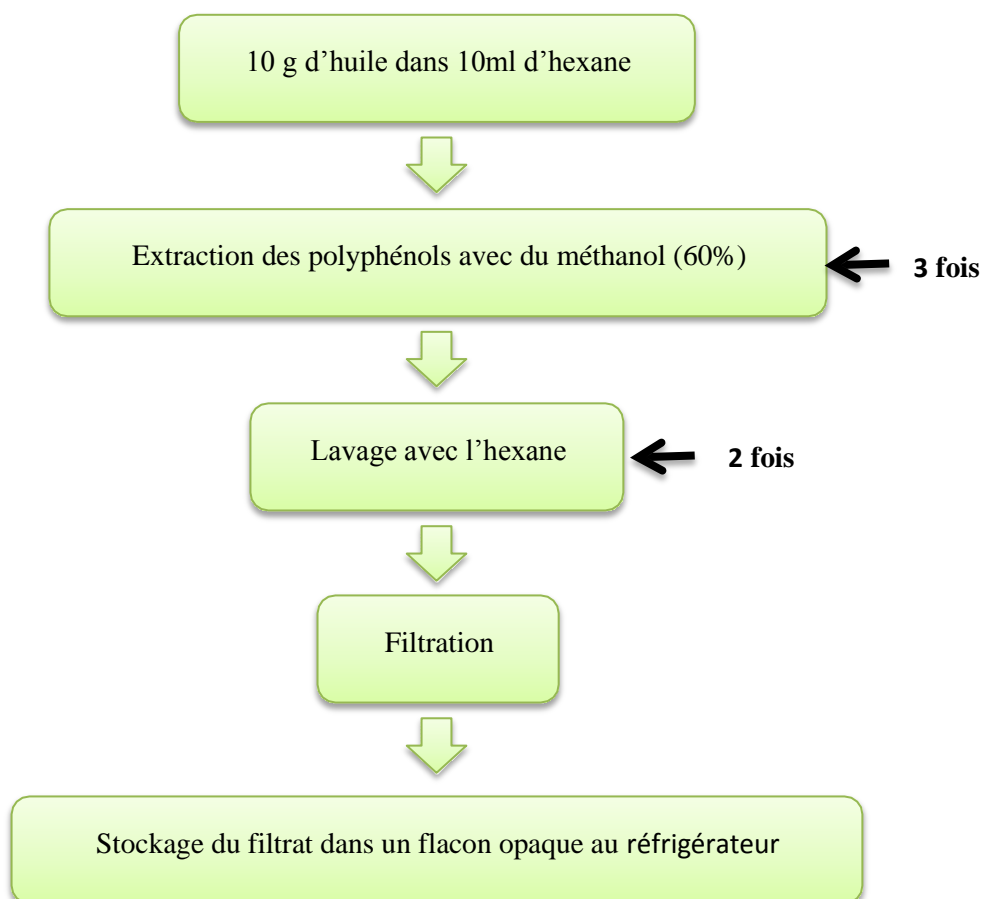
Figure IV.2 : étuve de séchage

4.2 Broyage et tamisage

Le grignon d'olive séché a été broyé à l'aide d'un broyeur (IKA A11 BASIC) et la poudre issue de ce broyage a été soumise à un tamisage. Ce dernier a été effectué à l'aide d'un tamiseur (RESTCH AS 200), muni d'un ensemble de tamis avec différentes granulométries. Il a permis en effet d'obtenir quatre poudres à diamètre différent, en l'occurrence $\geq 1\text{mm}$, $500\mu\text{m}$, $250\mu\text{m}$ et $<250\mu\text{m}$. Ces dernières ont été conservées à température ambiante et à l'abri de la lumière et d'humidité dans des flacons en verre pour des utilisations ultérieures.

5. Extraction des composés phénoliques de l'huile

L'extraction des composés phénoliques est réalisée avant et après enrichissement. Le protocole adopté est celui décrit par **Tsimidouet al.** (*Fig.IV.3*)

**Figure IV.3** : Protocole d'extraction des polyphénols à partir des huiles (**Tasimidou et al.**).

6. Dosage des composés polyphénoliques

La teneur en polyphénols totaux (PT) des extraits des huiles, enrichie et non enrichie, a été déterminée en utilisant le réactif de FolinCiocalteu (FC) en se référant à la méthode décrite

par Negiet *al* (Fig.IV.4).

Une courbe standard a été réalisée avec l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons (Annexe 3). Les polyphénols sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par Kg d'huile (mg EAG/Kg d'huile), trois répétitions sont réalisées pour chaque échantillon.

Principe

Le réactif de FC est un acide de couleur jaune, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$), et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation avec les composés phénoliques en milieu alcalin en un mélange bleu d'oxydes de tungstène et de molybdène dont l'intensité optique est mesurée par spectrophotométrie UV-visible (RibbreauGayon, 1968).

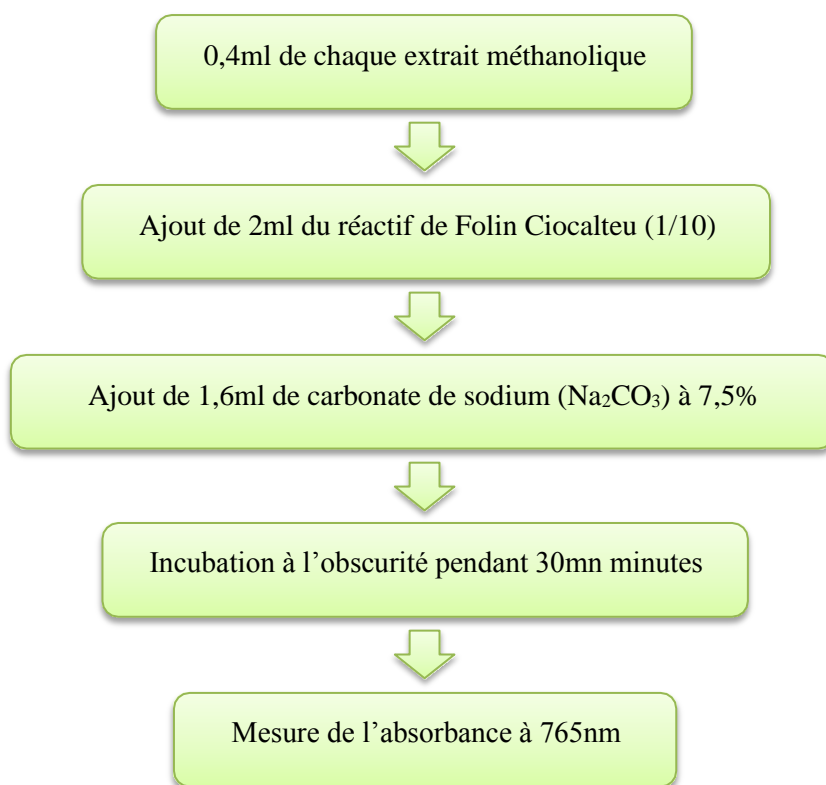


Figure IV.4 : schéma présentatif du protocole de dosage (Negi , 2003)

7. Etude préliminaire

Afin de mieux mener l'enrichissement de l'huile d'olive, ainsi que de déterminer les bornes du plan d'expériences à adopter, un ensemble de paramètres (température d'enrichissement, diamètre de la poudre, temps d'agitation et le ratiosolide-liquide) sont à étudier, c'est pourquoi, une étude préliminaire est sollicitée, résumée dans la figure ci-après.

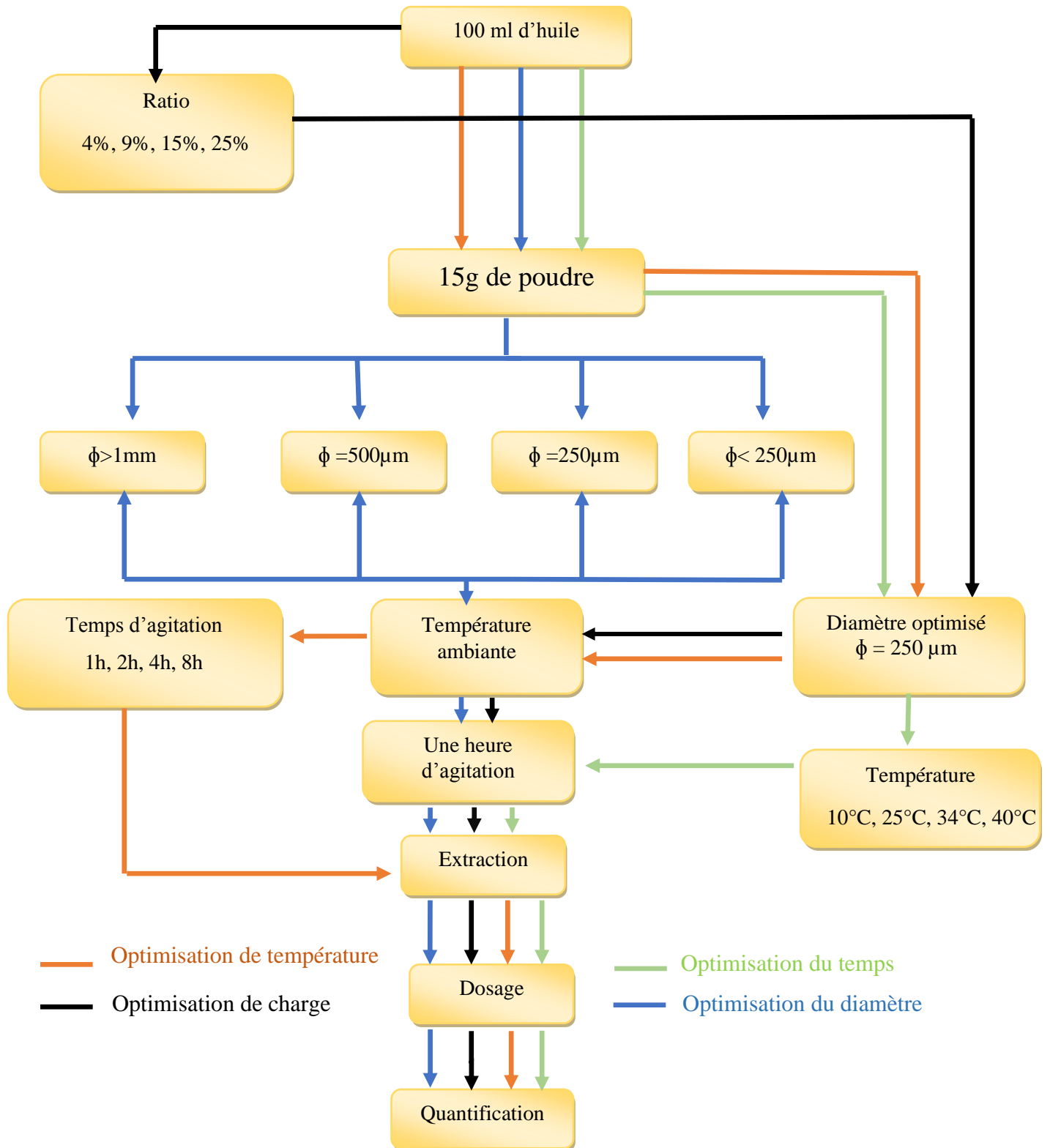


Figure VI.5 : schéma récapitulatif de l'étude préliminaire

8. Plan d'expérience : théorie et application

La notion de plan d'expériences s'est développée à partir des années 20 du siècle précédent, au début en biologie, il fallait en fait réduire le coût des expérimentations et les expérimentations animales (**Plan d'expérience**). Les plans d'expériences servent en effet à optimiser l'organisation des essais qui permet d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Elle permet également d'obtenir la meilleure précision possible sur la modélisation des résultats. La méthode des plans d'expériences est basée sur des règles mathématiques strictes et elle exige une démarche rigoureuse de la part de l'expérimentateur (**Goupi, 1999**). Ils sont applicables à de nombreuses disciplines à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables, x_i . Il faut donc penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type : $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_i)$ (**Goupi, 2006**).

8.1 Définition

Un plan d'expériences est une suite d'essais organisée à l'avance de manière à déterminer en un minimum d'essais et avec un maximum de précision l'influence de multiples paramètres sur une ou plusieurs réponses (**Chauveau JC**).

8.2 Terminologie

La théorie des plans d'expériences ou science de l'organisation des essais et de la modélisation des résultats expérimentaux, nécessite une terminologie adaptée, précise et une mise en œuvre rigoureuse.

Réponse : grandeur physique étudiée ;

Facteur : c'est la variable qui peut modifier la réponse ;

Niveau d'un facteur : valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience ;

Domaine d'étude : domaine expérimental délimité par les niveaux des facteurs utilisés ;

Matrice d'expérience : c'est le niveau pris par les variables codées dans les différentes expériences.

8.3 Plan de surface de réponse

La méthode de surface de réponse (RMS) est une technique d'analyse statistique puissante, bien adaptée à la modélisation des processus complexes où la réponse est influencée par plusieurs variables (facteurs) dont l'objectif est d'optimiser cette réponse. Box et Wilson, sont les premiers à avoir introduit la théorie de la RMS en 1951. Aujourd'hui, elle est la méthode la plus courante pour l'optimisation d'un processus.

La RMS peut être utilisée pour modéliser et prédire l'effet de différents paramètres expérimentaux sur une réponse bien définie, ainsi que l'identification des interactions entre les paramètres expérimentaux que d'autres techniques peuvent négliger. Elle est en effet largement employée dans le domaine de l'ingénierie et de la fabrication où de nombreux paramètres sont impliqués dans un processus. (elsayed K, 2010)

Le modèle mathématique utilisé dans cette méthode est un modèle de second degré :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

dont :

Y : est la réponse (la grandeur d'intérêt) ;

x_i, x_j : sont les variables ;

$\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ et β_{ij} : sont les coefficients de polynome ;

ε : est l'erreur aléatoire.

8.4 Plan d'expérience composite centré

La performance de la présente étude a été obtenue suivant la méthode RMS en utilisant le logiciel STATGRAPHICS PLUS (Rockville, Etats-Unis, 2000). Ce dernier permet de développer un plan d'expériences de type composite centré (CCD). Dans ce type de plan, trois paramètres peuvent être testés et sont schématiquement représentés sur un graphique en trois dimensions (Fig.IV.6). Chaque paramètre étant borné, l'ensemble du domaine d'analyse peut être représenté dans un cube virtuel, les angles de ce cube correspondent aux bornes des paramètres. Dans ce type de plan, 20 manipulations doivent être menées afin de tester les trois paramètres ainsi que la fiabilité du système :

- ✚ 6 au centre du cube ;
- ✚ 8 aux extrémités du cube ;
- ✚ 6 au centre des faces du cube.

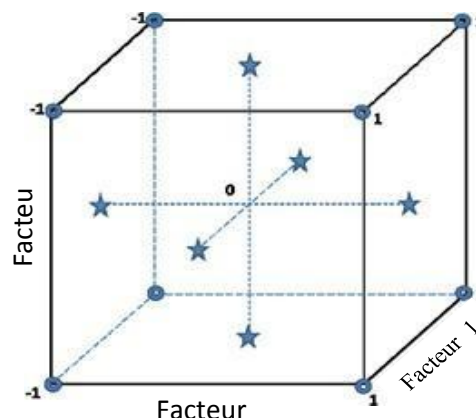


Figure IV.6 : Représentation du plan d'expérience sous forme d'un cube virtuel (Veillet S,

2010)

8.5 Démarche

Pour l'application du plan d'expériences, les étapes à suivre sont :

1. Formaliser le problème ;
2. Sélectionner les paramètres, fixer leurs modalités (niveau de variations des paramètres) et sélectionner leurs interactions(étude préliminaire) ;
3. Construire le plan sur la base des niveaux de variations des paramètres ;
4. Réaliser les essais dictés par le plan et acquisition de résultats ;
5. Analyser les résultats ;
6. Conclure après choix du réglage des paramètres qui peuvent être maîtrisés et essais de confirmation (optimum).

9. Mesure du pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante des huiles, brute et enrichie, a été évaluée suivant la méthode de test de radical 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), le protocole adopté est celui décrit par **Goupy P, 2003** et **Achat S et al 2012**.

Principe :

Le DPPH est un radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible, qui provoque une couleur violette profonde(**Molineaux 2004 ; Hakimian 2009**). Il réagit avec des groupements thiols, les amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques,...etc. cette propriété est largement recommandée et utilisée dans la pratique analytique (**Yodanov 1987**) ; quand la solution du DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, alors ceci provoque la forme réduite (1,1-diphényl-2-2,4,6-trinitrophenyl hydrazine) DPPH₂, avec la perte de la couleur violette et apparition d'une couleur jaune pâle résiduelle, due à la présence du groupement picryl. Le radical DPPH a un maximum d'absorbance aux environs de 517 à 520 nm, qui diminue quand le radical est réduit. La méthode DPPH est décrite comme étant simple, rapide et commode indépendante de la polarité d'échantillon(**Marxen 2007**),

Le protocole est résumé dans la figure suivante :

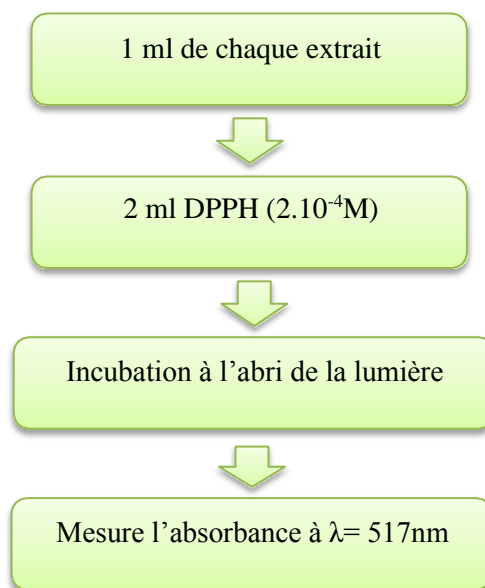


Figure IV.7 : étape du test de DPPH(Goupi p 2003, Bouaziz M, 2008)

Les résultats sont exprimés en pourcentage de neutralisation du radical DPPH[°] et les absorbances obtenues ont été converties aux taux de radical-balayage de DPPH[°] selon l'équation :

$$\% \text{ D'inhibiteur de DPPH} = \frac{AC - AE}{AC} \times 100$$

où

AC : absorbance du control ;

AE : absorbance de l'échantillon.

L'effet de la concentration des différents extraits méthanoliques sur la réduction du radical DPPH a été aussi testé.

10. Evaluation sensorielle

L'évaluation sensorielle est la technique de choix pour étudier les propriétés organoleptiques des denrées alimentaires ou propriétés qui impressionnent les organes sensoriels. C'est elle en particulier qui valide les méthodes instrumentales qui donne aux propriétés organoleptiques une image nécessairement indirecte. Elle repose sur la dégustation des produits et sur l'analyse des réponses sensorielles données par un groupe de sujets (jury).

L'évaluation des propriétés sensorielles des huiles d'olive vierge et enrichie a été réalisée selon la méthode de (Lalas et al). Le panel a été formé de douze dégustateurs, choisis à partir

du personnel du laboratoire BBBS, qui sont amenés à se prononcer sur les traits sensoriels des huiles en question selon le profil sensoriel établi (carte sensorielle) (**Annexe 4**). Pour se faire, deux échantillons codés 1 et 2 qui correspondent respectivement à l'huile d'olive vierge (huile de référence) et l'huile d'olive enrichie leur sont présentés et les sujets sont invités à attribuer une note sur une échelle nominale de cinq pour un ensemble de caractéristiques, à savoir, l'acceptabilité globale de chaque échantillon (tenant compte de tout mauvais et indésirable goût), l'amertume, la préférence totale, le degré de perception du sous-produit rajouté et le rancissement.

*Résultats et
Discussions*

1. Echantillons biologiques

L'huile d'olive récoltée, a été issue de la variété CHEMLAL. Le choix de cette variété n'est pas aléatoire, bien qu'elle est très répandue en Kabylie, elle est aussi moins riche en composés phénoliques (Tsimidou, 1998), ce qui renforce davantage l'idée d'enrichissement de l'huile extraite à partir de son fruit.

- **Mise en évidence d'effetinhibiteur**

L'activité antimicrobienne des margines et du grignon *vis-à-vis* des rhizobiums est évaluée quantitativement par la méthode de diffusion sur gélose en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (Tab V) et par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Tableau V: L'effet inhibiteur des margines et du grignons d'olive *vis-à-vis* des souches des rhizobiums

Concentration (mg/disque)	1/2=0.5		1/4= 0.25		1/8=0.12		1/16=0.062		1/32=0.031		1/64=0.015	
					5		5		3		6	
Souches	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G
S1= UM2	15*	6	13	6	11	6	6	6	6	6	6	6
S2=AM11R	12	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S3=EA2	14	6	15	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S4=MEK6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S5=AKE1	12	6	14	6	14	6	13	6	14	6	6	6
S6= UE28	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S7= ES8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S8= EB1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S9= RLV	14	6	14	6	15	6	6	6	6	6	6	6

(*) Diamètres d'inhibition en (mm) ; M= Margine, G= Grignon

Les souches S1, S2, S3, S5 et S9 ont montré une sensibilité modérée *vis-à-vis* des margines avec des diamètres des zones d'inhibition allant jusqu'à 15mm tandis que, les souches S4, S6, S7 et S8 se montrent tolérantes à toutes les concentrations testées (figure V.1). Il y a lieu de signaler que le grignon n'a aucun effet inhibiteur sur les rhizobiums aux concentrations testées dans cette étude.

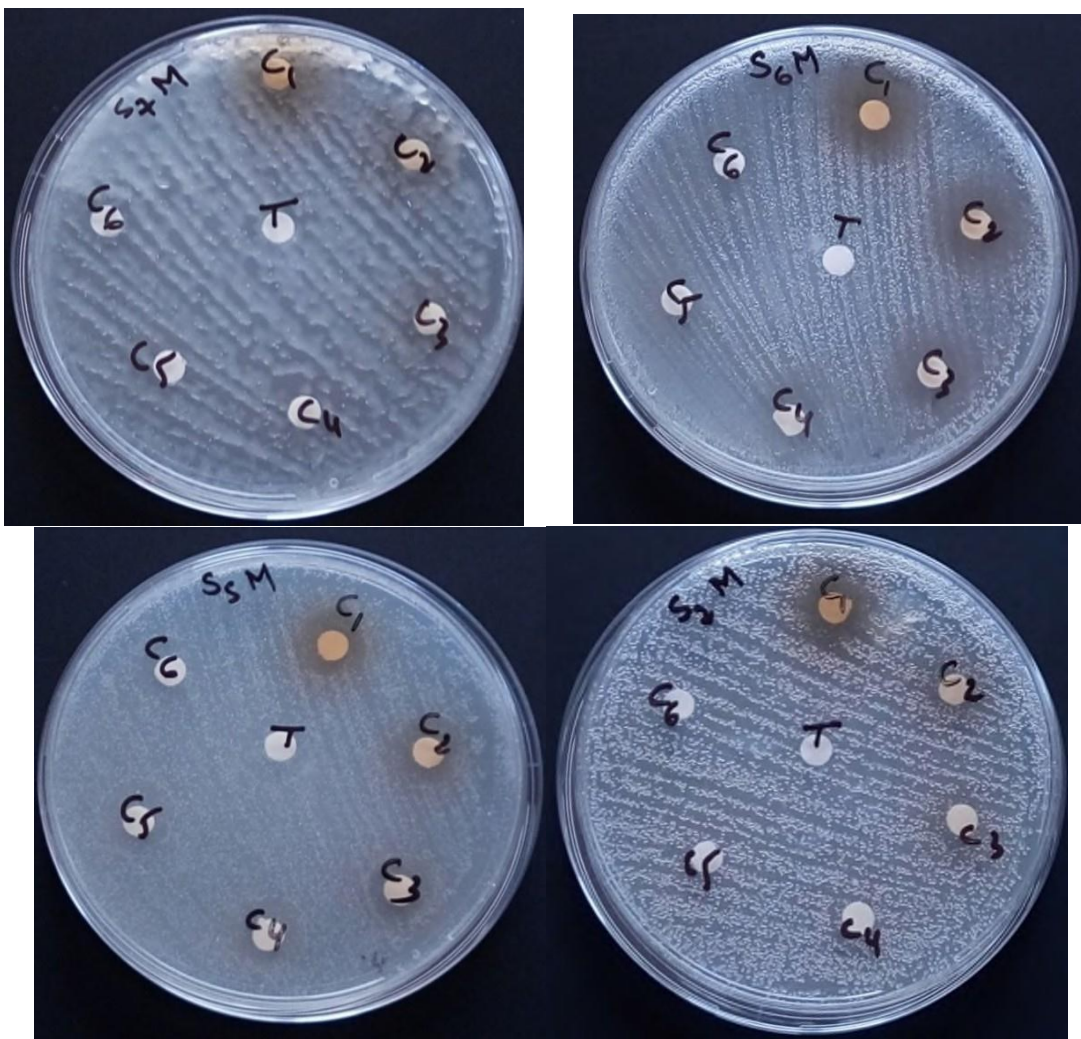


Figure V.1: Photographie montrant la tolérance des rhizobiums vis-à-vis des différentes concentrations des margines

La détermination des concentrations minimales inhibitrices a permis de distinguer les

souches S1, S3, S5 et S9 qui présentent les CMI les plus élevées dépassant 0.5 mg.

La souche S5 semble être la plus affectée par les margines, elle présente une CMI qui est supérieure à 0.0156 mg. Les souches S1 et S9 présentent une CMI de 0.0125mg avec des diamètres des zones d'inhibitions 11 et 15mm respectivement.

L'étude de l'effet antimicrobien du grignon montre que toutes les souches testées lui sont résistantes et qu'aucun effet inhibiteur n'est observé avec les différentes concentrations testées (**figure V.2**).

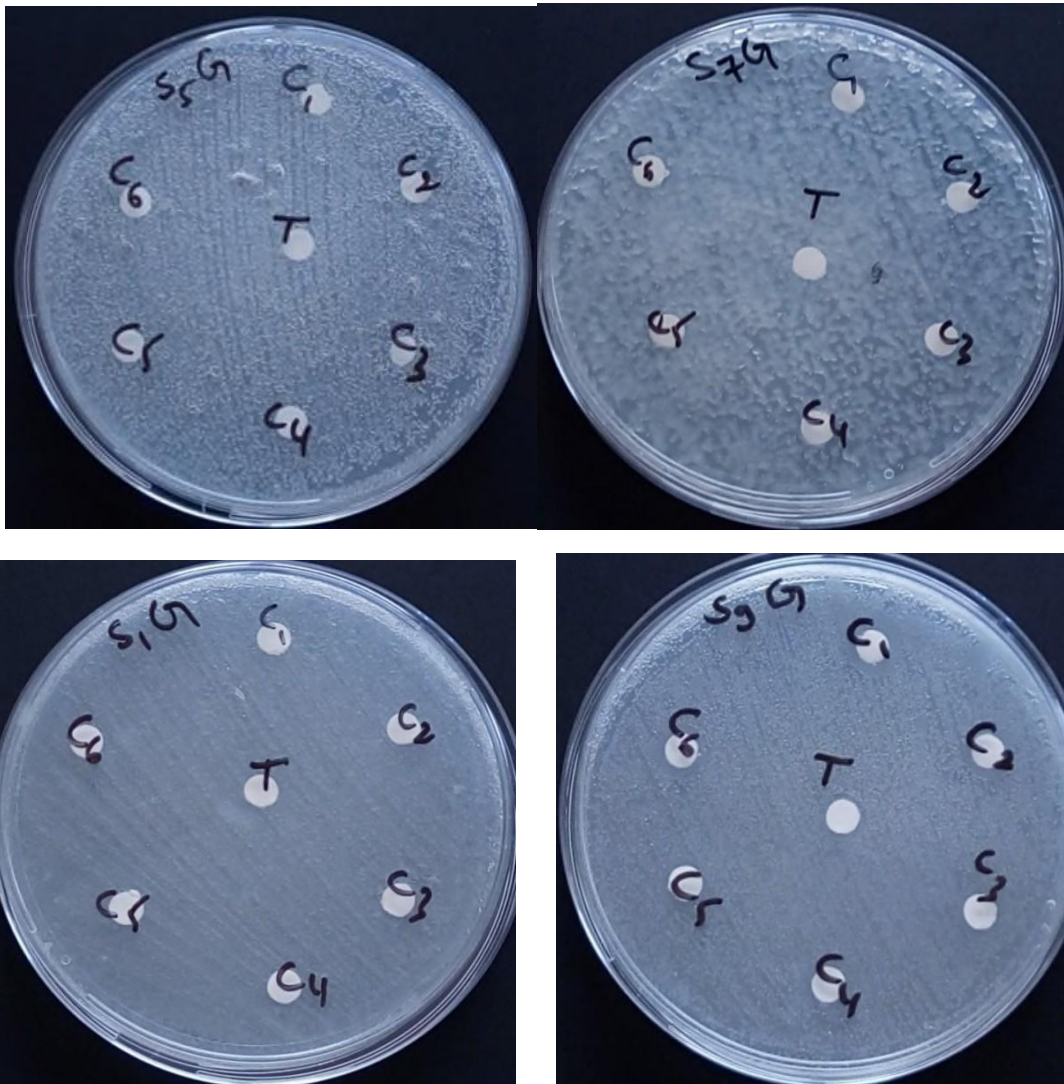


Figure V.2 : Photographie montrant l'absence de l'effet inhibiteur sur les rhizobiums en présence de différentes concentrations du grignon

L'importance de l'effet observé avec les margines comparé à celui obtenu avec le grignon serait due à la prédominance, dans les margines, de substances toxiques notamment, les composés phénoliques qui leur confèrent un pouvoir antimicrobien (**Ranalli, 1991 ; Capasso et al., 1995**).

(Larif et al. 2015) ont montré que les microorganismes ne présentent pas la même sensibilité pour les polyphénols. Ainsi, *Proteus sp.*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* ont montré une plus grande sensibilité à une concentration inhibitrice de 0.04 mg/ml tandis que, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. fecalis* présentent une CMI équivalente à 0.02mg/ml.

(Selon Morillo et al. 2009), cette activité serait due à la présence de certaines classes de composés antimicrobiens ou biostatiques tels que les phénols et les lipides, les faibles valeurs de pH et la faible activité de l'eau dans le cas des grignons. Les composés phénoliques de l'huile d'olive sont les principaux déterminants des actions antimicrobiennes et phytotoxiques des margines et grignon d'olive (Bianco et al., 1999). Ceux-ci, pourront participer, seuls ou en synergie avec d'autres composés, dans l'activité antibactérienne de ce résidu (González et al., 1990).

Selon (Saadi et al. 2007), les margines stimulent potentiellement l'activité microbienne et ne nuisent pas à la microflore du sol. En général l'impact des margines sur la microflore du sol peut être considéré de deux points de vue généraux : (1) enrichissement du sol avec une source du carbone facilement disponible ; (2) Inhibition de certains microorganismes par ajout de margines contenant des composants inhibiteurs.

L'effet inhibiteur des margines est particulièrement prononcé contre la sporulation des bactéries du sol. Certains composés phénoliques comme le méthylcatéchol et le O-quinone inhibent la croissance des bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Capasso et al., 1995). Selon (Ranalli et al. 1991), les constituants des margines agissent sur les bactéries en dénaturant leurs protéines cellulaires, en abîmant leurs membranes et en affaiblissant leur tension superficielle, ce qui augmente l'activité antibactérienne.

(Vaquez Rancero et al. 1974) ont identifié aussi un certain nombre de flavonoïdes, de phénols et de glucosides phénoliques dans les sous-produits oléicoles. Il s'agit en particulier, de l'oleuropéine qui a la propriété d'inhiber le développement de certaines bactéries dont les lactobacilles et des champignons.

Les données obtenues par (Fadil et al. 2003), suggèrent que les margines en haute concentration avait une activité inhibitrice contre les microorganismes en raison de la présence de composés toxiques dans ces effluents tels que des tanins et des composés phénoliques simples.

Test de biodégradabilité des margines et du grignon

Le suivi de la croissance des différentes souches de rhizobiums sur le milieu YMB modifié montre une variabilité dans la biodégradation des margines mais pas celle du grignon (figure V.3).

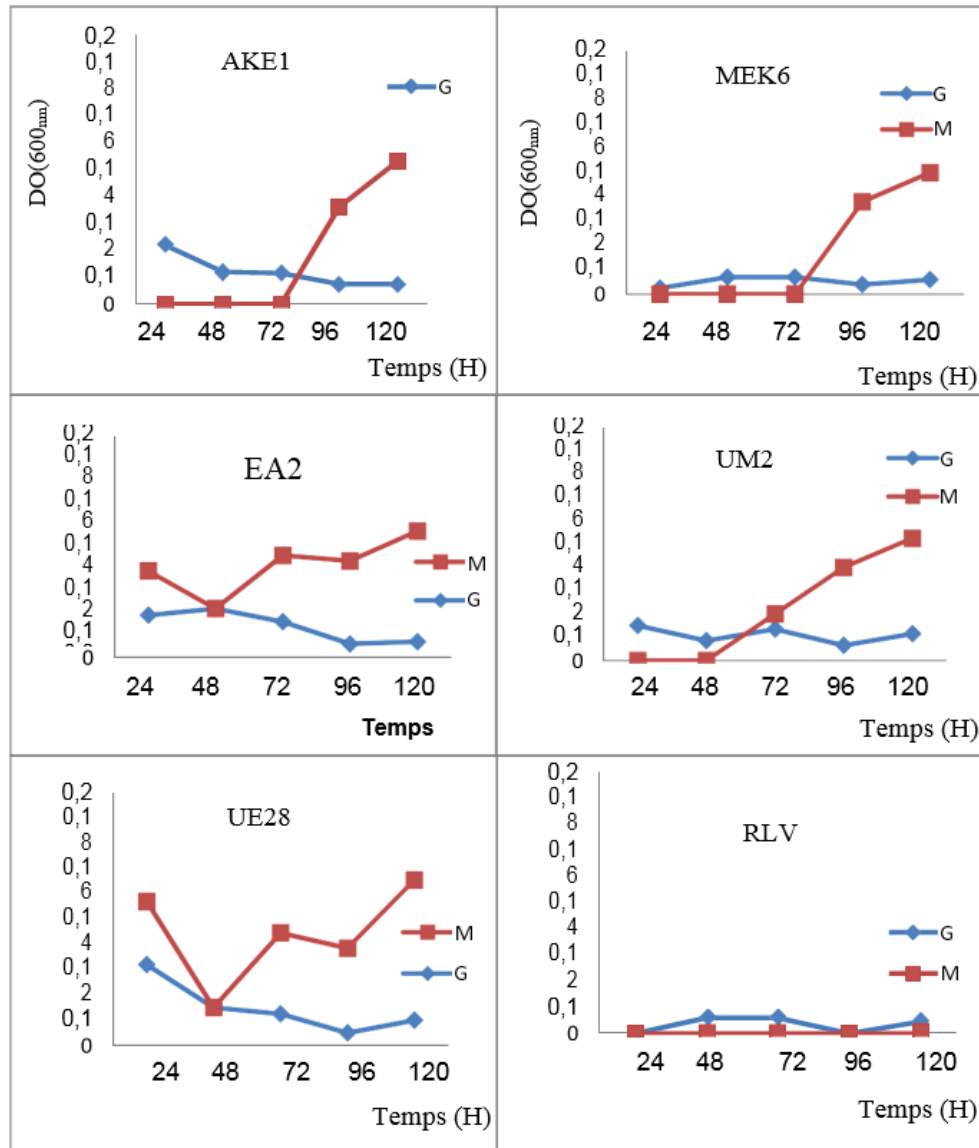


Figure V.3: Evaluation de la croissance des souches de rhizobium en fonction du temps d'incubation (M= Margine, G= Grignon)

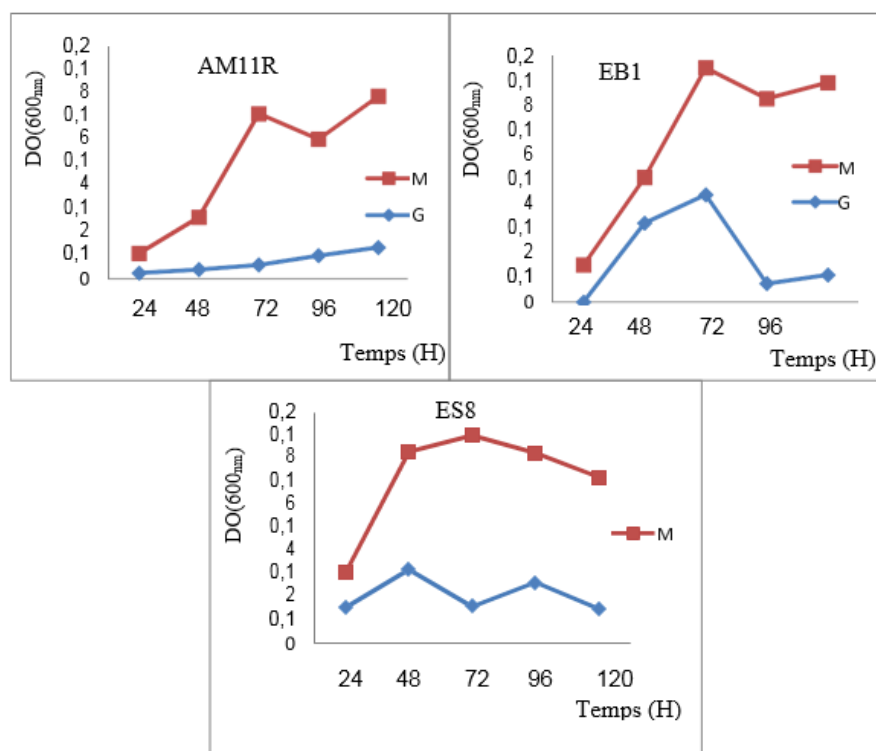


Figure V.3: Evaluation de la croissance des souches de rhizobium en fonction du temps d'incubation (M= Margine, G= Grignon) (suite).

Dans le cas des margines, on constate que les souches UM2 puis AKE1 et MEK6 présentent une phase d'adaptation de 48H et 72H respectivement. Au-delà de cette période d'adaptation, une forte augmentation de croissance est observée chez les trois souches. Ces souches ont montré les mêmes potentialités dans l'assimilation de carbone organique des margines. D'après les résultats expérimentaux de (**sahraoui et al. 2012**) sur l'analyse de l'effet du phénol sur les microorganismes, il ressort que les phénols provenant des margines ont été dégradés ou réorganisés au cours du deuxième mois après l'épandage.

A l'exception de la souche RLV dont la croissance est nulle en présence des margines, l'ensemble des souches testées présente une croissance importante. Contrairement à ce qui a été observé en présence des margines, dans le cas du grignon la croissance est très faible. Cette différence dans la croissance des différentes souches en présence des margines ou du grignon serait due à la présence de plus de composés solubles et assimilables dans les margines mais pas dans le grignon.

Dans le cas des souches UE28 et EA2, une diminution progressive de la croissance a été observée sur les deux milieux à base de grignon et de margine pendant les premières 48H puis, une reprise de croissance est observée jusqu'à 120H d'incubation. (**Aissam, 2003**) a suggéré que l'activité et la croissance des microorganismes sont probablement altérées par la

présence des composés phénoliques à forte concentration (9,7 g.L⁻¹).

(**Yaakoubi et al. 2010**) ont constaté que la faible dégradation chimique des composés phénoliques pourrait être due à une inhibition de l'activité des microorganismes du sol par le pH acide des margines.

D'après (**Ramos-Cormenzana et al. 1995**), les propriétés physico-chimiques des margines (un pH faible et taux de C / N élevé) confèrent leur résistance à la dégradation, qui est principalement due à sa teneur élevée en composés phénoliques. Les molécules phénoliques des margines sont complexes et difficilement biodégradables. De plus, les microorganismes mettent du temps pour s'adapter à ce milieu.

(**Dakhli, 2017**) a rapporté que l'application de margines sur le sol apporte des composés difficilement minéralisables (en particulier la lignine), proportionnellement aux doses adoptées, ce qui a accéléré le déclin de l'activité microbienne.

Les souches EB1 et ES8 apparaissent meilleures que toutes les autres souches. En effet, elles présentent une meilleure croissance sur les margines, comparée aux autres souches. Ceci est attribué aux limites des performances des microorganismes dans un milieu riche en margines (pH, salinité et polyphénols) (**Dakhli, 2017**).

(**Ramos-Cormenzana et al. 1996**), ont évalué la réduction des composés phénoliques des margines par *Bacillus pumilis*, et ont obtenu une biodégradation à 50% de ces composés.

Les composés phénoliques passent sous forme de phénates et perdent une grande partie de leur pouvoir antimicrobien. Les microorganismes peuvent alors les utiliser comme nutriments carbonés et énergétiques (**Borja et al., 1995**).

Les margines présentent un rejet fortement pollué dont la composition est variable. Cette variabilité dépend de plusieurs facteurs tels que :

- La variété d'olives (l'espèce et le degré de leur maturation)
- Des systèmes de culture et de la pratique de la conservation des olives
- Des conditions climatiques
- Les procédés utilisés pour l'extraction d'huile d'olive
- Le type de sol
- Conditions climatiques

D'après les résultats de (**Yaakoubi et al. 2009**), ce sont les microorganismes du sol qui sont responsables de la dégradation des composés phénoliques de ces effluents.

Selon Borja et al. (1995), les microorganismes peuvent utiliser ces effluents comme nutriments carbonés.

2. Humidité

Le taux d'humidité du grignon d'olive est de 42,41%, ce qui signifie approximativement que presque la moitié du poids du matériel végétal frais est constitué d'eau.

L'humidité favorise bien les activités enzymatiques (polyphénols-oxydases et les glucosidases), qui entraînent rapidement des changements irréversibles sur les antioxydants après la récolte du matériel végétal, telle que l'oxydation, et par conséquent une polymérisation ou une décomposition (Veillet, 2010). De plus, l'humidité favorise aussi le développement de microorganismes et de moisissures qui entraînent des dégradations massives et rapides du matériel végétal au cours de la conservation (Johns, 1999). Dans cette perspective, et dans le but de limiter ces réactions et préserver l'état des polyphénols de l'oxydation et d'éventuelles dégradations, un séchage à 40°C et à l'abri de la lumière a été entrepris. Cette température permet d'avoir un séchage des grignons, sans pour autant avoir de modifications néfastes avant la conservation.

3. Extraction

Afin d'extraire les polyphénols contenus dans les huiles brute et enrichie, une extraction liquide-liquide a été réalisée avec deux solvants, hexane et méthanol.

Le méthanol a montré des rendements meilleurs comme solvant d'extraction pour les polyphénols par rapport aux solvants cités dans la littérature (acétone, éthanol,...etc.). Ce solvant est moins polaire que l'eau et très efficace pour la libération des polyphénols (Johns, 1999 ; Sacan et al, 2010). C'est pour cette raison que son utilisation dans cette étude est favorisée par rapport aux autres solvants organiques. En outre, lorsqu'il est ajouté pour l'extraction, deux phases sont formées (Annexe 5), une phase supérieure, dite hexanique, renfermant tout ce qui est lipidique et une phase inférieure, dite méthanolique, renfermant les polyphénols.

4. Dosage

La méthode de quantification des polyphénols totaux par le réactif FC est une analyse rapide, économique et qui est très employée pour estimer le contenu phénolique des huiles vierge et enrichie.

Lors du rajout du réactif FC aux extraits méthanoliques des huiles, une couleur jaunâtre se forme (Annexe 6) et l'addition de carbonate de sodium, qui alcalinise le milieu, donne une couleur bleue (Annexe 6), ce qui pourrait justifier la présence de polyphénols. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques

contenus dans les extraits.

Le dosage colorimétrique de l'extrait méthanolique de l'huile d'olive vierge a révélé une teneur faible en polyphénols ($56 \pm 4,29$ mg d'EAG/kg d'huile) (Rodis et al, 2002 ; Achat et al, 2012), ceci peut être expliqué par la variété, CHEMLAL, des olives triturées pour l'obtention de cette huile qui est une variété à faible teneur en polyphénols totaux (Tsimidou, 1998). De plus la durée de stockage des olives avant trituration est aussi déterminante, puisque celle-ci influence négativement sur la teneur en ces composés (Clodoveo et al, 2009). Ainsi, la concentration en PT est conditionnée par l'activité enzymatique de la L-phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), qui joue un rôle important dans la désamination de la phénylalanine et sa conversion en acide trans-cinnamique impliqué dans la synthèse des composés phénoliques, une forte activité de cette enzyme est donc associée à l'accumulation des composés phénoliques dans le fruit et par conséquent dans l'huile. Cependant, l'activité de la PAL est fonction du degré de maturité des fruits et des conditions climatiques et de l'irrigation. Elle diminue au cours de la maturation et augmente dans des conditions arides (Tovar et al, 2002).

5. Etude préliminaire

Avant d'avoir recours à un plan d'expériences, différents paramètres sont à prendre en compte dans notre analyse :

5.1 Température

Travaillant avec l'huile d'olive, la température ne peut pas être descendue au-dessous de 10°C , sinon une partie de cette huile peut figer, ce qui altérerait l'homogénéité du mélange (Vielle, 2010). Ainsi, les polyphénols étant des molécules sensibles à la température et étant connus pour commencer à se dégrader à partir de 50°C (Kyi et al, 2005 ; Larrauri et al, 1997). La borne supérieure est limitée à 40°C afin d'éviter cette dégradation et donc de ne pas influencer le résultat du plan.

5.2 Ratio

Il est choisi en fixant les autres paramètres et ne laisser varier que celui-ci, les résultats pour quatre charges différentes sont montrés par la figure suivante :

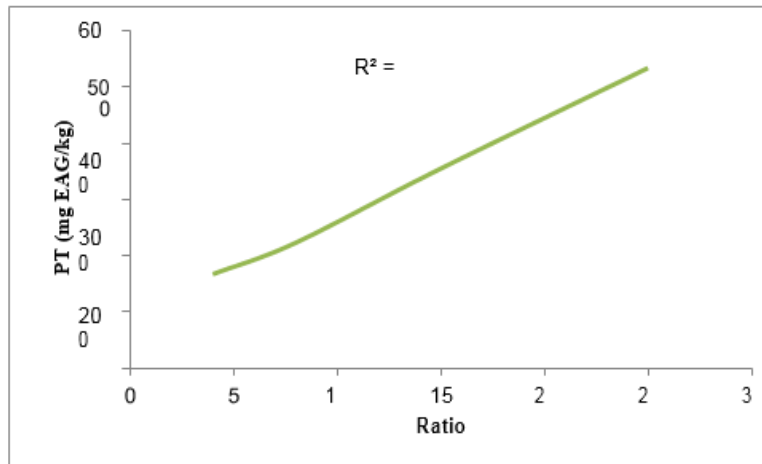


Figure V.4: Effet du ratio sur le taux de PT

Comme le montre clairement la figure ci-dessus, il existe une relation proportionnelle parfaite entre ce rapport et la concentration PT. Cependant, la limite est fixée entre 4% et 25% pour éviter tout problème pouvant interférer avec l'homogénéité de l'huile ou les pertes dues à la saturation de la poudre.

5.3 Temps d'agitation

Afin de sélectionner le bon temps d'agitation, une série d'essais a été réalisée sous différents temps d'agitation, à savoir 1 heure, 2 heures, 4 heures et 8 heures d'agitation. Ceci a conduit à la conclusion suivante : plus on augmente le temps d'agitation, plus le transfert est meilleur mais à partir de 6 à 7 heures, on a tendance à avoir une constance, c'est pourquoi, les bornes du temps d'agitation sont prises entre 1 heure et 7 heures (**fig V.5**).

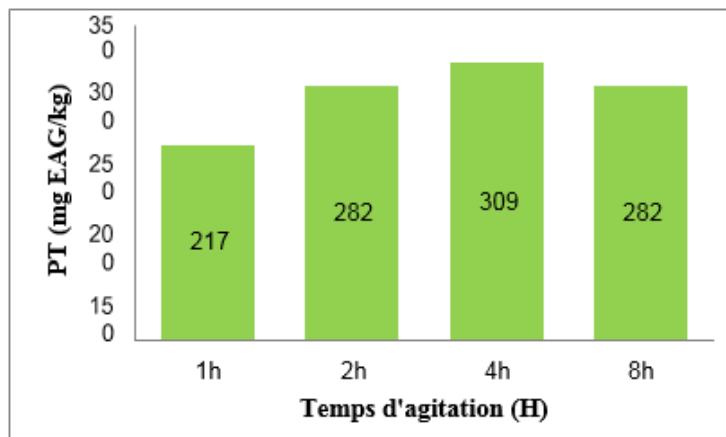


Figure V.5: Effet du temps d'agitation sur le taux de PT

5.4 Diamètre de la poudre

Le choix du diamètre de la poudre à utiliser est choisi en fixant tous les autres paramètres (facteurs) et ne varier que celui-ci. L'extraction et le dosage sont faits et le meilleur résultat est pris en considération, soit le diamètre 250µm (**Fig. V.6**). En effet,

(Meziti, 2009) ont démontré que le meilleur rendement en polyphénols est obtenu lors de l'utilisation de particules plus fines, ce qui est probablement dû à l'augmentation de la surface de contact avec le solvant.

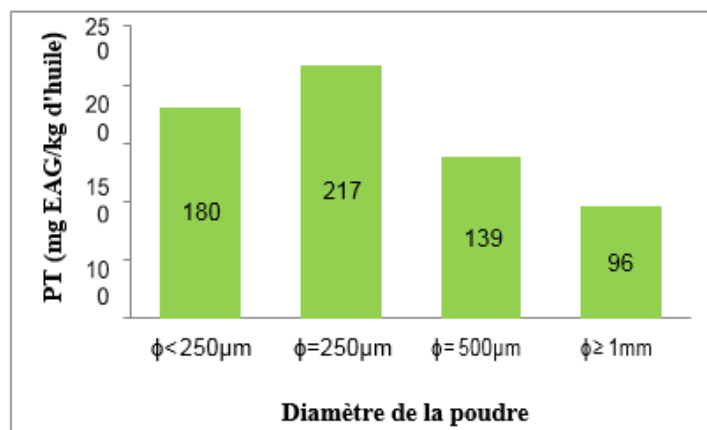


Figure V.6 : Effet du diamètre de la poudre sur le taux de PT

Lors de l'étude préliminaire nous avons avant tout cherché à préserver les polyphénols de la dégradation, à la fois en n'utilisant pas de trop fortes températures ni de temps d'agitation trop longs. Ces conditions devraient exclure tout biais de dégradation qui pourrait faire penser que les polyphénols n'ont tout simplement pas été transférés (pas d'enrichissement).

6. Conditions optimales

Les plans d'expériences sont très utilisés dans les études industrielles en recherche et développement. Ils permettent une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans la conception d'un nouveau produit et d'appréhender une variable réponse rapidement (Wang et al, 2009).

Suite aux résultats de l'étude préliminaire, et après avoir introduit les bornes des différents facteurs au logiciel, le plan proposé par ce dernier avec les résultats des polyphénols totaux des huiles enrichies sont résumés dans le tableau ci-après

Tableau VI : Tableau récapitulatif des expériences et les résultats du plan d'expériences

	TEMPERATURE	TEMPS	RATIO	PPT
ESSAIS	°C	Heure	%	MG D'EAG/KG D'HUILE
1	25	4	15	318 ± 03
2	25	4	4	167 ± 18
3	10	4	15	334 ± 05
4	16	2	21	457 ± 08

5	16	7	21	518 ± 09
6	34	7	21	501 ± 08
7	25	0,47	15	248 ± 08
8	34	2	21	473 ± 13
9	25	4	15	355 ± 02
10	34	2	9	235 ± 08
11	25	4	15	390 ± 06
12	25	4	25	542 ± 07
13	16	2	9	246 ± 01
14	25	4	15	324 ± 16
15	25	8	15	373 ± 07
16	25	4	15	339 ± 11
17	25	4	15	317 ± 05
18	16	7	9	300 ± 10
19	40	4	15	377 ± 13
20	34	7	9	286 ± 07

L'ordre de ces manipulations est attribué de façon aléatoire par le logiciel Statgraphics et la variable analysée dans ce cas est la concentration finale en PT.

7. Traitement des données par Statgraphics

7.1 Analyse de la variance et validation duplan

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur les résultats obtenus (**Tableau VI**). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le modèle étudié et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée, en l'occurrence la concentration en PT (**Tableau VII**).

Tableau VII: Analyse de la variance pour les polyphénols totaux

SOURCE	SOMME DES CARRES	DF	CARRES MOYENS	RATIO F	VALEUR-P
A:TEMPERATURE	136,988	1	136,988	0,17	0,6969
B:TEMPS	12761,6	1	12761,6	15,87	0,0105
C:RATIO	164000,	1	164000,	203,95	0,0000
AA	2014,18	1	2014,18	2,50	0,1743
AB	279,155	1	279,155	0,35	0,5813

AC	70,0336	1	70,0336	0,09	0,7798
BB	364,065	1	364,065	0,45	0,5309
BC	34,4888	1	34,4888	0,04	0,8441
CC	2792,5	1	2792,5	3,47	0,1214
LACK-OF-FIT	4516,76	5	903,352	1,12	0,4508
PURE ERROR	4020,66	5	804,132		
TOTAL (CORR.)	194608,	19			

$R^2 = 96\%$, R^2 (ajusté à D.f) = **92**.

Comme illustré dans le tableau ci-dessus, deux facteurs (Temps et Ratio) ont leur valeur- p inférieure à 0,05, ce qui veut dire qu'ils sont sensiblement différents de zéro au niveau de confiance de 95%. Ceci est en parfaite harmonie avec les résultats du diagramme de Pareto, qui indique que le temps et le ratio influencent significativement l'enrichissement de l'huile.

R^2 , étant une valeur indicatrice du degré d'explication de l'influence des facteurs sur la réponse, est égal à 96%, ce qui mène à dire que le modèle pourrait bien être appliqué pour prévoir l'influence des facteurs étudiés sur l'enrichissement de l'huile d'olive en polyphénols du grignon. De plus, La valeur Lack of-fit a été conçue pour déterminer si le modèle choisi est valable pour décrire les données observées (**Achat et al, 2012**), si bien que cette valeur soit supérieure à 0,05 qui est témoin de la validité de ce plan.

7.2 Analyse desurfaces

Une fois calculées, les concentrations en polyphénols totaux sont intégrées dans le logiciel Statgraphics qui va estimer l'importance de chacun des paramètres de l'étude. Le premier résultat est le diagramme de Pareto qui permet de déterminer quels sont les paramètres influençant de façon significative la concentration finale en PT (**Fig V.7**).

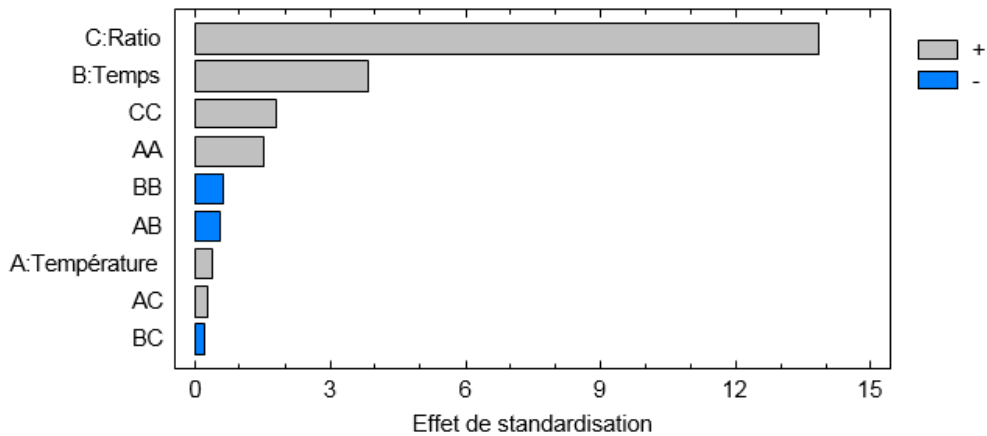


Figure V.7 : Diagramme normalisé de Pareto pour la concentration en polyphénols totaux

Comme le montre la figure 20, le paramètre le plus influençant est le ratio, devant le temps. La température n'a pas d'influence significative sur l'enrichissement. Même si les résultats de l'étude préliminaire stipulent qu'il y avait une légère influence, mais celle-ci n'est pas significativement appréciable et donc ne semble pas avoir de grande influence sur l'enrichissement. Ainsi, l'interaction entre ratio, température et temps n'ont montré aucun effet significatif. Ce dernier suggère une absence totale d'interaction entre les variables dans le domaine expérimental étudié. Ces premiers résultats sont ensuite repris plus en détails (**Fig V.8**).

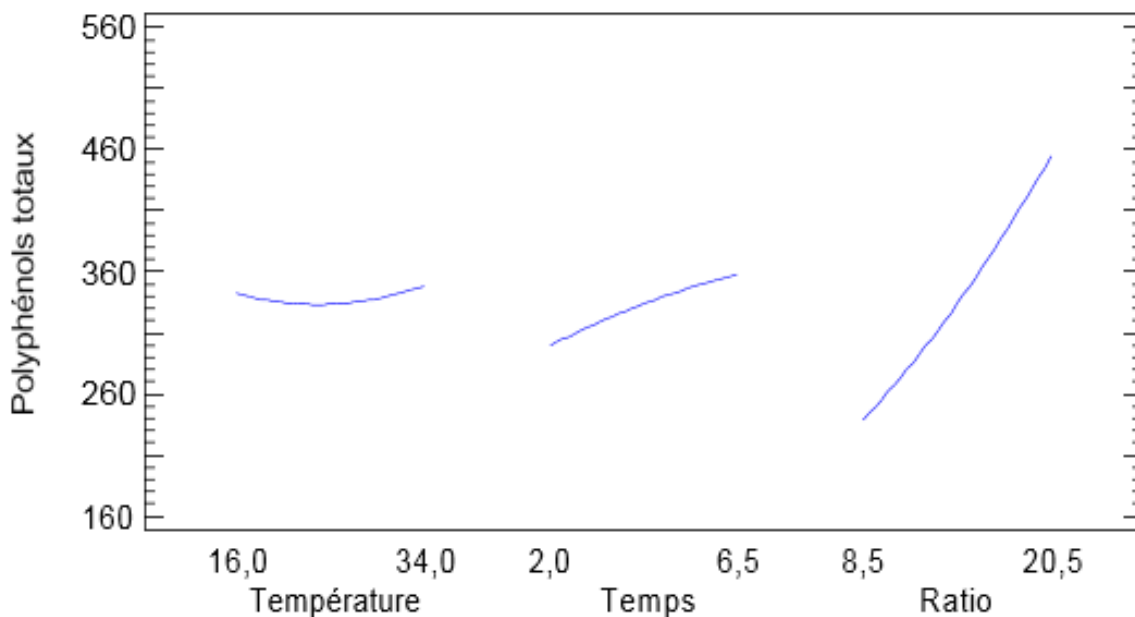


Figure V.8: Interprétation graphique des résultats par Stagraphics : Effet général des facteurs

Il est donc remarquable que le ratio influence de façon quasi linéaire l'enrichissement, ainsi que le temps d'agitation, alors que la température atteint un maximum dans la partie basse de la gamme de températures testées.

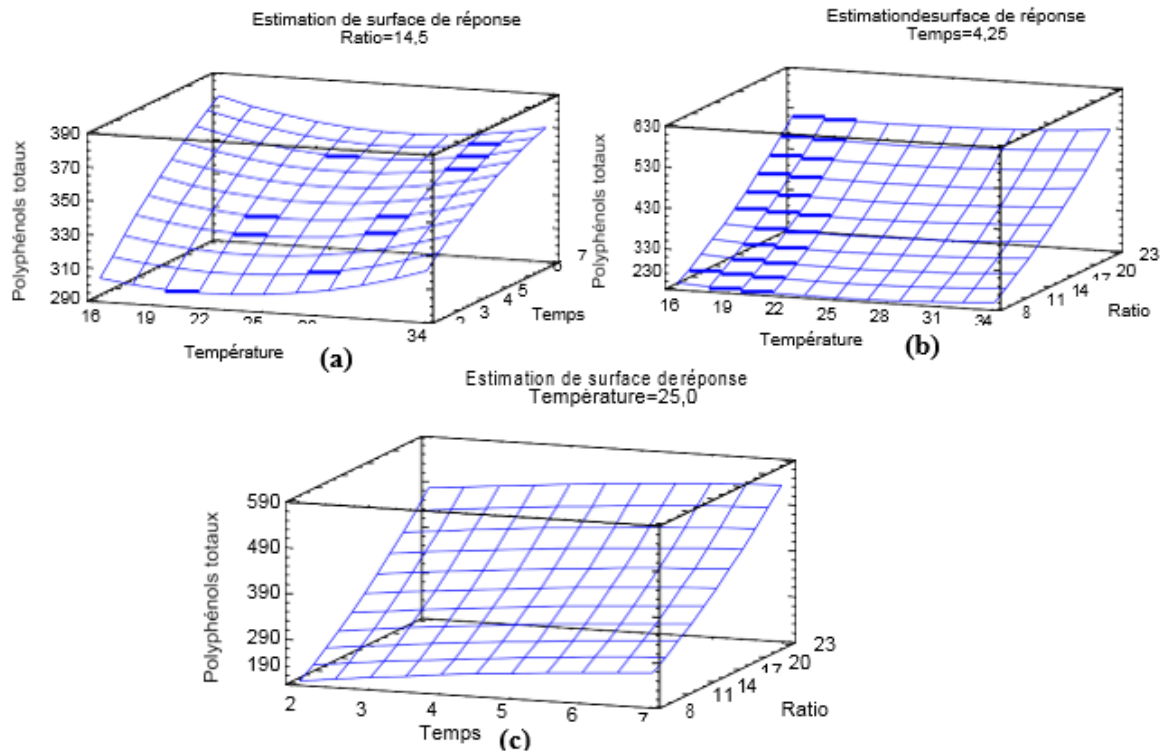


Figure V.9: Surfaces de réponse de l'effet des différents facteurs : (a) : influence du temps et de la température à 14,5%, (b) : influence de la température et du ratio après 4 heures et demid'agitation, (c) : influence du temps et du ratio à 25°C

D'après les observations réalisées lors de l'étude des surfaces de réponse (**Fig V.9**), l'efficacité de l'enrichissement de l'huile d'olive vierge en termes de concentration en PT s'accroît en augmentant le ratio et le temps d'agitation.

De ce fait, l'optimum du ratio et le temps se situe au maximum de ces deux critères, soit 25% et 8 heures d'agitation. Pour ce qui est de la température, l'optimum se situe à 10°C. Sous ces conditions, la valeur expérimentale des PT est égale à $697 \pm 5,35$ mg d'EAG/kg d'huile, qui est raisonnablement proche de la valeur prédite (621mg d'EAG/kg d'huile), celle-ci a été calculée sur la base de l'équation polynomiale du second degré suivante :

$$\text{Polyphénols totaux} = 143,082 - 6,72516 \times \text{Température} + 29,7012 \times \text{Temps} + 6,75444 \times \text{Ratio} + 0,147856 \times \text{Température}^2 - 0,260414 \times \text{Température} \times \text{Temps} + 0,0547917 \times \text{Température} \times \text{Ratio} - 0,958966 \times \text{Temps}^2 - 0,137248 \times \text{Temps} \times \text{Ratio} + 0,360313 \times \text{Ratio}^2.$$

- A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que la modélisation des surfaces de réponse peut être effectivement appliquée pour l'enrichissement de l'huile d'olive vierge par les composés phénoliques du grignon d'olive (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : présentation des paramètres optimisés

Variable	Réponse	
	Polyphénols totaux	
Température (°C)	10	=>697 ± 5,35mg d'EAG/kg d'huile
Temps (H)	08	
Ratio (%)	25	

8. Mesure du pouvoir antioxydant

Le piégeage du radical stable de DPPH^o est une méthode employée couramment pour évaluer les activités antioxydantes. Cette méthode est caractérisée par sa brève durée par rapport à d'autres méthodes (Sacan et al, 2010).

Plusieurs auteurs ont déterminé l'effet scavenger des huiles sur le radical DPPH^o à 517nm (Chiou et al, 2009, Salta et al, 2007), et les résultats obtenus pour les huiles, brute et enrichie, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH^o, sont résumés dans la figure suivante.

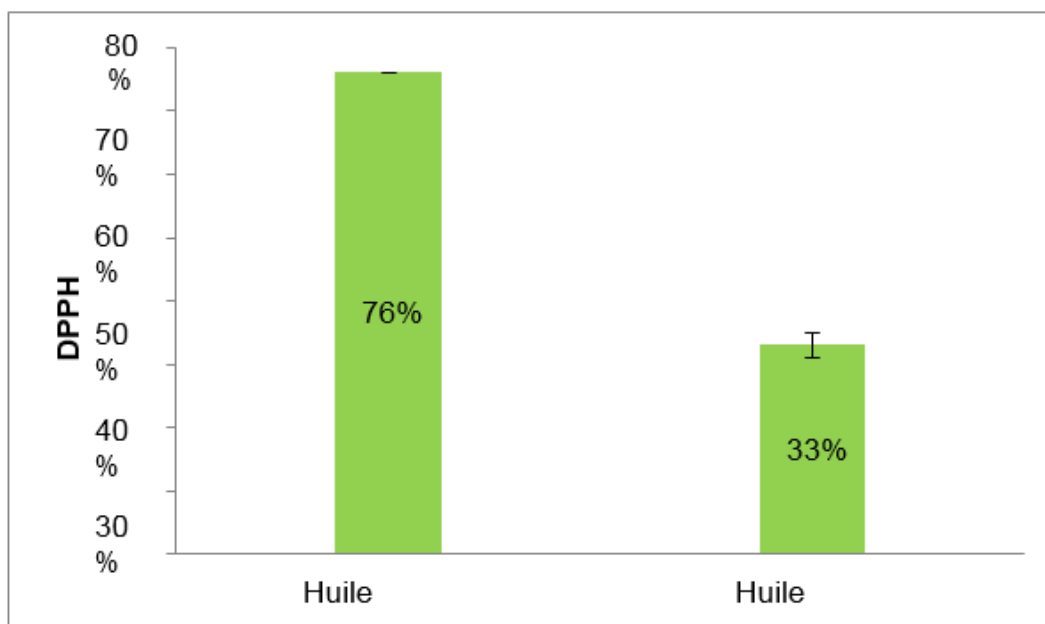


Figure V.10 : Pouvoir anti-radicalaire des extraits méthanoliques des huiles analysées

A la lumière de la figure précédente, les résultats du pouvoir anti-radicalaire des extraits des huiles (brute et enrichie), indiquent que la capacité à piéger le radical DPPH^o par l'huile d'olive enrichie est beaucoup plus importante (76±0,01%), deux fois plus élevée, que celle d'huile d'olive brute (33±0.02%).

Les capacités antioxydantes des extraits méthanoliques des huiles dépendent en grande

partie de la composition chimique des extraits, essentiellement les composés phénoliques (Liet al, 2008). En effet, plusieurs auteurs ont démontré que divers principes actifs tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques présents dans les huiles et les grignons, sont connus pour être responsables du potentiel antioxydant. Le contenu phénolique élevé est aussi un facteur important qui détermine les capacités antioxydantes des huiles (Li et al, 2008, CaiY et al, 2004, Ksouri et al, 2007). Les différents dosages effectués dans cette étude ont démontré la richesse de l'huile d'olive enrichie en ces composés (de $56 \pm 4,29$ à $697 \pm 5,35$ mg d'EAG/kg d'huile), ce qui explique sa capacité antiradicalaire élevée par rapport à l'huile d'olive vierge (CaiY et al, 2004).

La caractéristique principale d'un polyphénol (antioxydant), est basée sur sa capacité à agir en tant que piègeur du radical en donnant un atome d'hydrogène suivant la réaction ci-dessous :

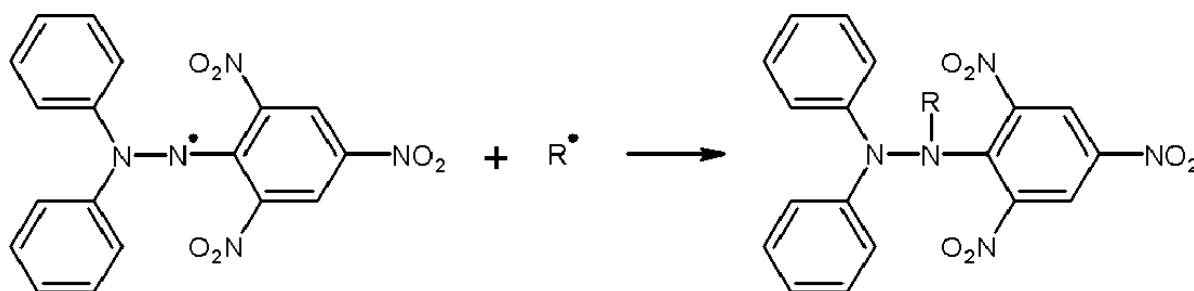


Figure V.11: Réaction d'un antioxydant avec le radical $DPPH^\circ$ (Silva et al, 2007)

9. Effet de la concentration

Pour se renseigner encore davantage sur l'évolution du pouvoir de réduction du radical $DPPH^\circ$, une gamme de concentration des extraits des huiles étudiées a été testée (Fig V.12).

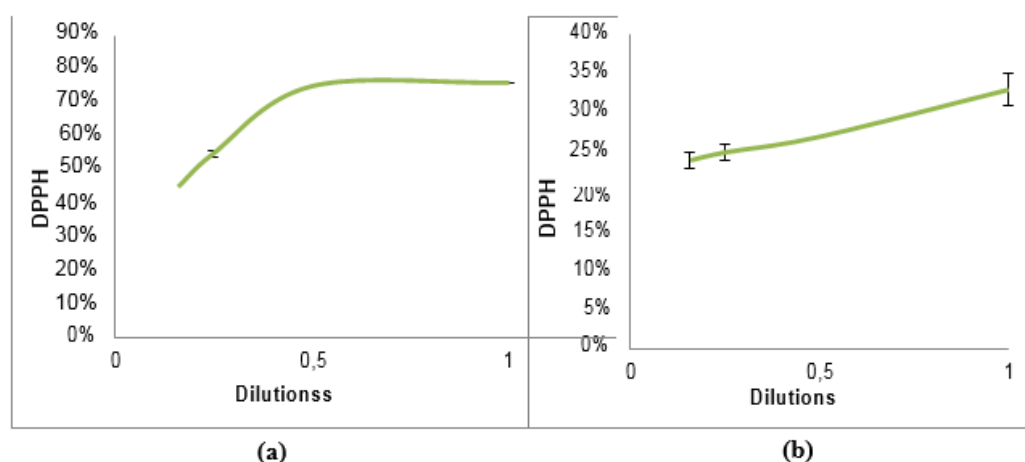


Figure V.12: Evolution du $DPPH^\circ$ en fonction de la concentration en polyphénols des huiles :

brute (a) et enrichie (b)

Au reflet de la figure 25, l'évolution du DPPH[°] est étroitement liée à la concentration en polyphénols. Cette évolution montre une augmentation progressive, à faible et à forte concentrations dans le cas de l'huile d'olive vierge (**Fig. V.12. b**), contrairement à l'huile d'olive enrichie qui présente une relation proportionnelle à faible concentration, mais au-delà de la dilution 1/2, soit un taux de PT de 349mg d'EAG/kg d'huile, elle devient stable et marque une phase stationnaire (**Fig. V.12. a**). Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'extrait de l'huile enrichie soit très riche en composés phénoliques, ayant tendance à saturer le DPPH[°] aux concentrations élevées. En effet, ce phénomène a été bien constaté dans le cas pratique, avec le virage de couleur en un temps vraiment très court, lors du contact de l'extrait et du DPPH[°]. En revanche, l'huile brute, qui contient une teneur négligeable en ces composés, reçoit une quantité suffisamment importante de DPPH[°], si bien qu'elle nécessite un peu plus de temps pour avoir le virage de couleur, témoin de la réduction du radical DPPH[°] par les polyphénols.

En fin, nous pouvons dire que l'ensemble de ces résultats, concorde parfaitement avec ceux enregistrés sous les conditions optimales suggérées par le plan d'expérience, en d'autres termes le transfert des polyphénols du grignon vers l'huile d'olive pourrait être jugé comme avoir lieu et être responsable de cette importante activité antioxydante.

Du point de vue physiologique, la neutralisation des radicaux libres inhibe l'oxydation des lipides qui peut être nuisible aux composants et aux fonctions cellulaires, ainsi la consommation des antioxydants naturels, comme ceux présents dans l'huile d'olive, peut contribuer à la protection contre les maladies dégénératives induites par le stress oxydatif (**Lim et al, 2011**).

10. Evaluation sensorielle

Les préférences des consommateurs sont devenues un enjeu primordial pour les industriels en général et les oléiculteurs en particulier, qui pour la plupart ont pour objectifs de ne faire aucun compromis sur les qualités sensorielles de leurs produits, de mêmes façons qu'ils n'en font pas sur les qualités sanitaires.

Afin de receler les propriétés organoleptiques de l'huile enrichie par les grignons, un profil sensoriel a été établi et réalisé, rassemblant les différences existantes entre celle-ci et l'huile d'olive brute. Ceci a conduit aux résultats récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Résultats de l'analyse sensorielle

	HUILE BRUTE	HUILE ENRICHIE
AMER	1	2
RANCE	1	1
AUTRES	2	3
ACCEPTABILITE	4	4
TOTALE		
PREFERENCE	4	4
TOTALE		

Le recueil des résultats, montre que les caractéristiques sensorielles des huiles, brute et enrichie, ont indiqué que l'acceptabilité globale était pratiquement bonne et avec absence de rancissement pour les deux échantillons. Bien que le sous-produit rajouté soit perceptible à une grandeur de 3 sur une échelle de 5 dans l'huile supplémentée, elle reste en effet acceptable et préférée au même titre que l'huile de référence. Cependant, elle présente une légère augmentation de l'amertume qui est associée à la présence d'antioxydants (polyphénols) dont la concentration a augmenté suite à l'enrichissement réalisé (COI, 2005). Par ailleurs, l'évaluation de cette huile par un panel de dégustateurs qualifiés est nécessaire dans la perspective du développement de ce produit.

Conclusion
générale

Conclusion générale

L'huile d'olive est un jus unique, qui occupe une place certaine parmi les autres huiles. Elle est la plus appréciée grâce à sa valeur nutritionnelle de pointe et surtout ses effets bénéfiques pour la santé. Il est maintenant clair que les acides gras constitutifs de l'huile d'olive à eux seuls, ne sont pas suffisants pour expliquer ces effets, mais il existe une fraction de composés mineurs, avec des fonctions physiologiques et pharmacologiques appropriées. Parmi ces composés, on trouve les polyphénols, qui sont dotés d'un pouvoir antioxydant contribuant à la stabilité oxydative de l'huile mais aussi à des effets bénéfiques pour la santé. Si bien qu'un renforcement de ceux-ci constitue un réel intérêt pour la santé humaine.

Dans cette étude, nous avons évalué l'effet des margines et du grignon d'olive sur la croissance des rhizobiums ainsi que la capacité de ces derniers à les dégrader et les utiliser comme substrats carbonés pour leur croissance

La recherche de l'effet inhibiteur a permis de mettre en évidence la présence de substances toxiques pour ces microorganismes. Ainsi, la croissance varie en fonction de la souche considérée, de la nature du produit testé et de la concentration de ces produits.

Les margines présentent un effet inhibiteur sur la plupart des souches de rhizobiums. La souche S5 (AKE1) semble être la plus affectée par les margines, elle présente une CMI qui est supérieure à 0.0156 mg tandis que, les souches S4, S6, S7 et S8 sont les plus tolérantes et présentent des CMIs supérieures à 0.5 mg. Par contre l'étude de l'effet inhibiteur du grignon d'olive montre qu'aucun effet inhibiteur n'est observé avec toutes les souches de rhizobiums testées.

D'après les résultats de test de biodégradabilité du grignon et les margines, l'évaluation de la croissance des différentes souches de rhizobiums sur des milieux YMB modifiés (grignon et margine) en fonction du temps d'incubation, montre une forte dégradation des margines et une faible dégradation des grignons chez la plupart des souches testées.

La toxicité des margines et du grignon est liée essentiellement à des composés phénoliques qui sont difficilement biodégradable. Ceci est probablement dû à leur effet inhibiteur sur les rhizobiums à des concentrations égales ou inférieures à 0.5mg. Qui ont marqué sa différence par rapport au grignon qui ne présente aucun effet sur la croissance des rhizobiums à des concentrations testés.

La biodégradation des margines est très lente mais reste supérieur à celle du grignon.

En perspectives, il serait intéressant d'explorer les voies de recherches suivantes :

- Tester l'activité antimicrobienne des margines et du grignons d'olive à des concentrations plus

élevés.

- Déterminer la composition physico-chimique des margines et du grignon.
- Mesurer la DBO et la DCO
- Optimiser les conditions de culture (l'agitation, l'aération, la charge de l'inoculum, la concentration en margine et grignon,...).
- Faire le suivi de la dégradation par dosage du substrat.
- Il serait intéressant de suivre l'évolution du C/N en fonction du temps et de même le pH et CE.

Malgré les pertes subies par l'huile d'olive au cours de son procédé d'extraction, nous trouvons ici une alternative simple, toute naturelle, qui consiste en l'enrichissement de l'huile d'olive par les composés phénoliques des grignons d'olive. L'efficacité de cette étude, est appuyée sur l'intégration d'une technique statistique qui est la RMS, qui permet d'obtenir un maximum d'informations, avec un minimum d'expériences.

Le transfert des polyphénols de la matrice à l'huile est influencé par la charge et le temps d'agitation et prend son optimum sous les conditions suivantes :

- Température de 10°C
- Ratio solide-liquide de 25%
- Et un temps d'agitation de 8 heures

Sous ces conditions, les polyphénols sont estimés à $697 \pm 5,35$ mg d'EAG/kg d'huile, une valeur approximativement proche de celle proposée par le plan (622mg d'EAG/kg d'huile), qui est douze fois plus importante que celle de l'huile témoin ($56 \pm 4,29$ mg d'EAG/kg d'huile). Ce résultat a été confirmé par la capacité antiradicalaire de l'huile enrichie ayant enregistré un potentiel antioxydant important, vis-à-vis du radical stable DPPH°.

En résumé, ce modeste travail, constitue à la fois une valorisation pour un déchet qui est le grignon, mais aussi une amélioration de la qualité de l'huile d'olive en lui apportant plus de principes actifs, en l'occurrence les composés phénoliques ayant des propriétés antioxydantes.

La présente étude est certainement incomplète, mais reste une porte ouverte pour d'autres travaux ayant les mêmes ambitions, pour cela, il serait intéressant de :

- Déterminer les caractéristiques physicochimiques de l'huile enrichie (indice d'acide, iode, saponification, peroxyde, couleur, etc.);
- Evaluer l'effet du chauffage sur l'huile enrichie (test de friture);
- Faire une analyse qualitative des extraits des huiles testées, afin de caractériser les substances transférées ;
- Etudier l'altération des huiles (dosage des produits d'oxydation);

Comparaison de la macération conventionnelle aux nouvelles technologies.

Références

Bibliographiques

Achat S., Tomao V., Madani K., Chibane M., Elmaataoui M., Dangles Olivier., Chemat F. (2012).Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 777–786.

Archives de document de la FAO. Département de l'Agriculture.

Argenson. C et all. L'olivier, les éditions CTIFL, 1999, 204 pages.

Beltran G., Jiménez A., del Rio C., Sanchez S., Martinez L., Uceda M., Aguilera Maria P. (2010).Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors.

Benderredji L ; Djebri Z ; Rebbas K.F ; Ghadbane M ; Bounar R ; Benniour. (2016). Oléiculture de la région d'El-Hodna (M'sila, Algérie) : état des lieux et génération in vitro de l'olivier en revue agriculture, 1, 259-264 .

Benhayoun G ; Lazzeri Y.(2007). L'olivier en méditerranée : du symbole à l'économie. Editions l'Harmattan. Paris, - p137. PP17.

Blaquez J.M. (1997). Origine de la culture d'olivier. Livre COI encyclopedia de l'olivier. Madrid. 19-20.

Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M. et Sayadi S. (2008).Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108: 253–262.

Boukhari R. (2014). Contribution à l'analyse génétique et caractérisation de quelques variétés d'olivier et l'influence de l'environnement sur leurs rendements au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou, Magister en agronomie, Amélioration de la production végétale et biodiversité, Université Abou Beker Belkaid-Tlemcen, Tlemcen, 86p.

Boukhari R; Kiciri S; Gaouar S.B.S. (2017). Les variétés d'olivier à diffusion très restreinte dans l'Est Algérien : Un potentiel génétique non exploité, une richesse en voie de disparition In Le Secteur Oléicole : Contraintes, Enjeux et Défis, p16.

Bouskou Dimitrios. (2006). Olive Oil chemistry and technology, 2eme Edition, AOCS Press.

Cai Y., Luo Q., Sun M. et Corke H. (2004). Antioxydant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74 : 2157-2184.

- Chauveau J.C. et Jean-Paul.** Chassaing introduction à la méthode des plans d'expériences par la méthode Taguchi. C.N.E.D Génie Electrotechnique. Compléments au cours d'asservissement.
- Chiou A., Kalogeropoulos N., Salta F.N., Efstathiou P., Andrikopoulos N.K. (2009).** Pan-frying of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1090–1097.
- Colodoveo M. L., Conlan X. A., Sinclair A. J. et Keast, R. S. J. (2009).** Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 218-236.
- Conseil Oléicole International (COI). (2011).** Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. COI/T.15/NC n°3/Rév. 6.
- Conseil Oléicole International. (2005).** Méthode d'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge extra en appellation d'origine. COI/T.20/Doc. n° 22.
- Covas M.I., Nyyssonen K., Poulsen H.E., Kaikkonen J., Zunft H.J., Kiesewetter H., et al. (2006).** The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145: 333-41.
- Cuellar L.R. (1990).** amélioration de la qualité de l'huile d'olive, collection : manuel pratique (Conseil Oléicole International).
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4) : 348-361.
- Da-Peng Yang., De-Xin Kong., Hong-Yu Zhang. (2007).** Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry* 104 : 1269–1271.
- Djadoun S. (2010).** Influence de l'hexane acidifié sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive assistée par micro-ondes. Thèse de Magister. *Université Mouloud Maameri de Tizi-Ouzou, faculté des Sciences, Département de Chimie.* 65p.
- Doymaz I., Gorel O., et Akgun N.A. (2004).** Drying characteristics of the solid by product of olive oil extraction. *Biosystem Engineering*, 88: 213-219.
- Dupont F. et Guignard J-L. (2007).** Botanique systématique moléculaire. *Ed(14) Elsevier Masson*, 165-167 pp.

El HajjoujiHouda . (2007). Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olive au cours de traitements biologique et chimique, thèse de doctorat, institut polytechnique de Toulouse (France).

Elsayed K., et Lacor C. (2010). Application of response surface methodology for modeling and optimization of the cyclone separator for minimum pressure drop. *V EuropeanConference on ComputationalFluid Dynamics.*

Foin Julien ; Claude Sarfati.(2002). Le guide des huiles d'olive, édition du Rouergue.

Gharbi F.R., Benarif T. (2011).Opportunité économique de l'introduction de grignons d'olive dans l'alimentation des animaux en Tunisie. [*Biotechnology, Agronomy, Society andEnvironment.*](#) 15(2) : 259-270.

Goupy J. (1999). Plan d'expériences pour surfaces de réponses. *Ed Dunod.* Paris. 408p.

Goupy J. (2006). Les plans d'expériences. *Revue Modulad,* 34 :74-116.

Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. (2003).Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 51: 615–622.

Grignons par des méthodes de laboratoire. Séminaire sur l'olivier et autre plantes

Hakiman M. et Maziah M. (2009). Non enzymatic antioxidant activities in aqueous extract of different Ficusdeltoideaaccessins. *Journal of Medicinal Plants Research,* 3(3):120- 131.

Hammadi Chimi . (2006).Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité, Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA.N° 141, Maroc.

Japón-Luján R. et Luque de Castro M. (2008).Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasound-assisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 56(16): 7231-5.

Johns O. (1999).Xinthin oxidase inhibitory northeastern north American plant remedies used for gout. *Journal of Ethno-Pharmacology.* 64 : 149-160.

Journal of Agriculture Food Chemistry, 51: 2866-2887.

Journal of Food Composition and Analysis, 23: 633–639.

Knupp G., Rücker G., Ramos A., Cormenzana S., Garrido Hoyos., Neugebauer M., Ossenkop T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial

degradation of olive mill waste water, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38: 277-282.

Ksouri. R., Megdiche. W., Debez. A., Fellah. H., Grignon. C et Abdelly. C. (2007).

Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant physiology and biochemistry*, 45 : 244-249.

Kyi T.M., Ramli W., Daud W., Mohammad A.B., Samsudin M.W., Kadhum A.A.H., Talib M.Z.M. (2005). The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol(40), 3: 323–331p.

Lalas S., Aggelousis G., Gortzi O., Dourtoglou V., et Tsaknis J. (2007). Protection of traditional Greek foods using a plant extract. *Italian Journal of Food Science*, 19 (03): 279–286.

Larrauri J.A., Rupérez P., Saura-Calixto F. (1997). Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (4), 1390–1393 pp.

Li. H. B., Wonga C. C., cheng K. W et Chen. F. (2008). Antioxydant proprieties in vitro and total phenolic ontenents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 385-390.

Lim D.H., Choi D., Choi O. Y., Cho K. A., Kim R., Choi H. S. et Cho H. (2011). Effect of *Astragalus sinicus L.* seed extract on antioxydant activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 17: 510-516.

Macheix J.J., Fleuriet X.X., Billot J.A. (1990). Fruit phenolics. *CRC press Inc, Boca Raton Florida*, 378 pp.

Maggio R.M., Kaufman T.S., Del Carlo M., Cerretani L., Bendini A., Cichelli A., Compagnone D. (2009). Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry*, 114: 1549–1554.

Malik S.Y. Haddadin., Haddadin J., Arabiyat O.I., Hattar B. (2009). Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 100 : 4773–4782.

Manai-Djebali H., Krichène D., Ouni Y., Gallardo L., Sánchez., Osorio E., Daoud D., Guido., Zarrouk M. (2012). Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27: 109–119.

Marxen K., Vanselow K.H., Lippermeir K.S., Hintze R., Ruser A et Hansen U-P. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Full research Paper*, 07: 2080-2095.

Mendil M ; Sebai A. (2006). Catalogue national des variétés de l'olivier.

Meziti A. (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Etude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister en Biochimie Appliquée, *Université El-Hadj Lakhdar de Batna*, 71p.

Michailides M., Christou G., Akratos C.S., Tekerlekopoulou A.G., Vayenas D.V. (2011). Composting of olive leaves and pomace from a three-phase olive mill plant. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 560-564.

Molina E., Aguilera J.F. (1991). Utilisation des sous-produits de l'olivier dans l'alimentation des ovins. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires*, 16 : 163-166.

Molyneux P. (2004.) the use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakar. *Original Article*, 26(2): 211-219.

Montedero G., Anichini F., Fantazzo P. (1980). Composés phénoliques de l'huile d'olive, leur influence sur la technologie d'extraction, sur la résistance à l'oxydation et sur les caractéristiques organoleptiques de l'huile. *Bulletin liaison Groupe Polyphénols*, 9: 39- 55.

Moyano M.J., Antonio J. Meléndez-Martínez., Alba J., Francisco J. Heredia. (2008). A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (I): CIEXYZ non-uniform colour space. *Food Research International*, 41: 505–512.

Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3509-14.

Nefzaoui A. (1984). Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. In : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. *Étude FAO production et santé animales 43*, Rome.

Nefzaoui A. (1987).étude de la composition chimique du grignon d'olive produit par l'unité pilote Zouila- recherche sur les possibilités d'amélioration de la valeur alimentaire des oléagineuses cultivées en Tunisie. Mahdia 3-7 Juillet 1987. Tunisie.

Nefzaoui Ali. (1991). Valorisation des sous produits de l'olivier, CIHEAM-Options méditerranéennes. Série séminaires-N° 16-61-65.

Negi, PS., Jayaprakasha, GK., Jena, BS. (2003).Antioxdnt and multimultagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*. 80: 393-397.

Nevado J.J.B., Robledo V.R., Callado C.S.C. (2012).Monitoring the enrichment of virgin olive oil with natural antioxidants by using a new capillary electrophoresis method. *Food Chemistry*, 133: 497–504.

Owen R. W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38 : 647-659.

Paris M. et Hurabeille M. (1981). Abrégé de matière médicale, pharmacognosie. *Ed Masson*. Paris. 210–215 pp.

Pietta P. et Simonettil P. (1999).Dietary Flavonoids and Interaction with Physiologic Antioxidants. *ITBA-CNR Milan, Italy tdiSTAM University of Milan Milan, Italy*.

Plan d'expériences : Mise au point d'une méthode en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP, HPLC) en vue d'un dosage avec étalon interne. M. Rivière ENCPB / RNChimie.

Ribbreau-gayon G. (1968).etude des mecanismes de synthese et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *vitisvinifera*L. *Phytochemistry*, Vol.7, 1471-1482 pp

Robbins R.J. (2003). Phenolics acids in food : An overview of analytical methodology.

Rodis P. S., Karathanos V. T. et Mantzavinou A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3): 596-601.

Rubio L., Motilva M.J., Macia A., Ramo T., Romero M.P. (2012). Development of a Phenol-Enriched Olive Oil with Both Its Own Phenolic Compounds and Complementary Phenols from Thyme. *Journal Agriculture. Food Chemistry*. 60: 3105–3112.

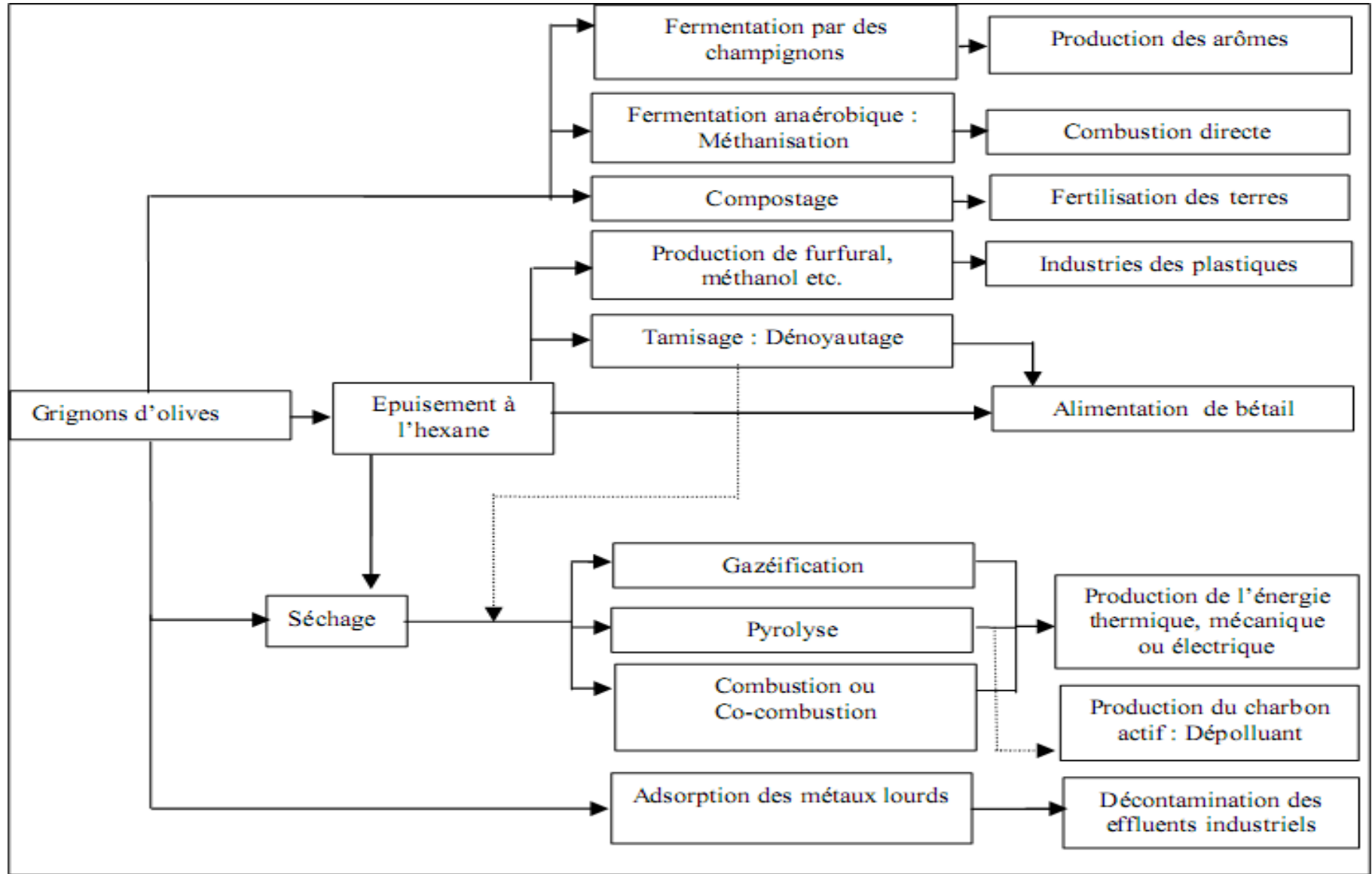
- Sacan O., Khan M. R et Khan R. A. (2010).** Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa apacafruits*. *Food Chemistry*: 1-7.
- Salta F.N., Mylona A., Chiou A., Boskou G. et Andrikopoulos N.K. (2007).** Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology International*, 13: 413.
- Sansoucy R. (1984).** Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin méditerranéen. *Archives de documents de la FAO*. M-23 ISBN 92-5-201488-8.
- Servili M ; Selvaggini R ; Esposto S ; Taticchi A ; Montedoro G.F ; Morozzi G, (2004).** Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054: 113–127.
- Silva E. M., Rogez H. et Larondelle Y. (2007).** Optimization of extraction of phenolic from *ginga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55 : 381-387.
- Silva S., Gomes L., Leitao F., Bronse M., Caelho A.V et Boas V. (2010).** Secoiridoids in olive seed : Characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, 61 (2) : 157-164.
- Thabet Boubakker ; Laajimi Abderraouf, (2006).** L'huile d'olive : un produit méditerranéen à valoriser d'avantage, les notes d'alerte du CIHEAM (centre international des hautes études agronomiques méditerranéennes) N°14-20.
- Tovar M. J., Paz Romero M., Girona J. et Motilva M. J. (2002).** L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europea. L. cv Arbequina*) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82: 892-898.
- Trigui A. (2008).** PNUD-Tunisie/ANME. Etude en vue de l'élaboration d'un plan d'action pour l'utilisation énergétique des sous-produits de l'oliveraie tunisienne, projet 00058135, (33).
- Tsimidou M. (1998).** Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Journal of Food Sciences*, 10 (2): 99-112.
- Tsimidou M., Papadopoulus G., Boskou D. (1992).** Phenolic compounds and stability of virgin olive oil part 1. *Food Chemistry* 45: 141–144.

- Veillet S. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation. Thèse de doctorat, *Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse*. 132p.
- Veillet S., Tomao V., Chemat F. (2010).** Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123: 905–911.
- Vermerris W. et Nicholson R. (2006).** Phenolic compound biochemistry. P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
- Villa, 2006.** la culture de l'olivier, Edition de Vecchi, page 143.
- Wang. J et Wan. W. (2009).** Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (03): 1253-1259.
- Xiuzhen H., Tao S. et Hongxiang L. (2007).** Dietary polyphénols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 950-988.
- Yodanov H. et Christova A.G. (1997).** Quantitative spectrophotometric and EPR-determination of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 358: 610-613.
- Zaidi F., Hassissene N., Allouache H., Kichou M., Ourdani S., Rezki K., Bellal M. M., Grongnet J.F., Youyou A. (2009).** Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue Méd. Vét.*, 160(2) : 67-73.
- Zouitten ; El-Hadrani. (2001).** Le psylle de l'olivier : état des connaissances et perspectives de lutte. Cahier d'étude et de recherches francophones in Agriculture. OCL, Vol 10, No4, pp. 32-225

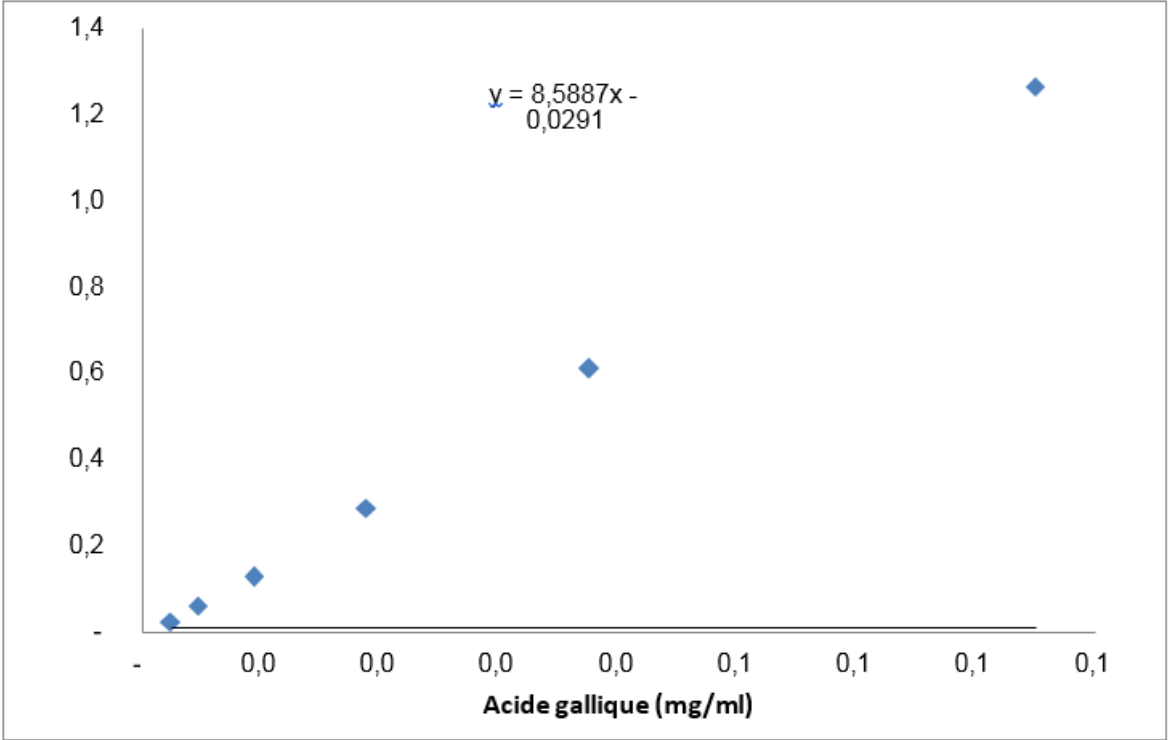
Annexes

Annexe 1 : Caractéristiques et limites prévues par la norme commerciale internationale applicable aux huiles d'olive et grignons d'olive (COI, 2011)

	Huile d'olive vierge extra	Huile d'olive vierge	Huile d'olive vierge courante	Huile d'olive vierge lampante	Huile d'olive raffinée	Huile d'olive	Huile de grignons d'olive brute	Huile de grignons d'olive raffinée	Huile de grignons d'olive
Caractéristiques organoleptiques									
Odeur	Irréprochable	Irréprochable	Bonne	Défectueuse	Acceptable	Bonne		Acceptable	Bonne
Gout	éprochable	éprochable	Bon	fectueux	Acceptable	Bon		Claire	Claire
couleur	Claire (jaune à vert)	Claire (jaune à vert)	Claire (jaune à vert)		Claire (jaune à vert)	Claire (jaune à vert)		(jaune à vert)	(jaune à vert)
Acidité libre en % exprimée en acideoléique	≤ 0,80	≤ 0,20	≤ 3,30	> 3,30	≤ 0,30	≤ 1,00	Non limitée	≤ 0,30	≤ 1,00
Indice de peroxyde en meq d'O₂ de peroxyde par kg d'huile	≤ 20	≤ 20	≤ 20	Non limité	≤ 5	≤ 15	Non limité	≤ 5	≤ 15
Absorbance dans l'ultraviolet									
à 270nm	≤ 0,22	≤ 0,25	≤ 3,00		≤ 1,10	≤ 0,90		≤ 2,00	≤ 1,70
à 232nm	≤ 2,50	≤ 2,60			≤ 0,16	≤ 0,15		≤ 0,20	≤ 0,18



Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Annexe 4 : Profil sensoriel (carte sensorielle)

Feuille de profil : Analyse sensorielle de l'huile d'olive

Echantillon1

Attributs	Intensité de perception				
	1	2	3	4	5
Amer					
Autres					
Acceptabilitétotale					
Rance					
Préférencetotale					

Echantillon2

Attributs	Intensité de perception				
	1	2	3	4	5
Amer					
Autres					
Acceptabilitétotale					
Rance					
Préférencetotale					

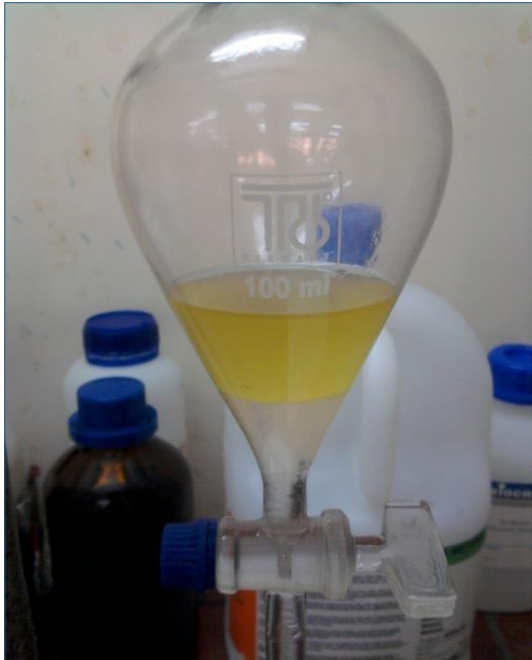
Notes explicatives :

Rance : propre aux huiles ayant subi un processus d'oxydation

Autres : qui proviennent des sous-produits d'olive mélangés à l'huile d'olive

Sous-produits : Feuilles d'olivier, Margines, Grignons d'olive

Annexe 5 : Extraction

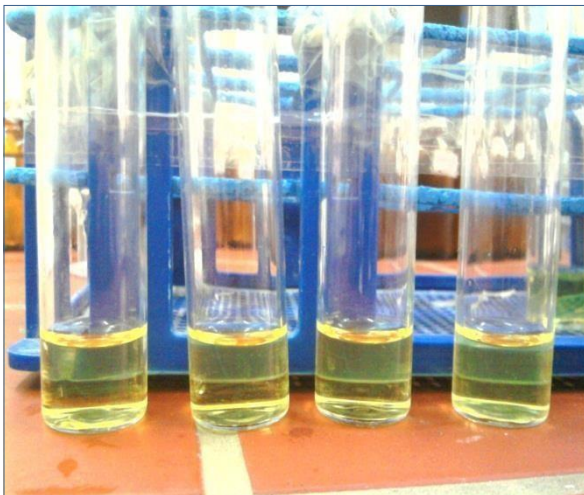


Les phases : méthanoliqueethexanique



Dispositif defiltration

Annexe 6 : Dosage



Ajout du réactif deFolinCiocalteu



Ajout de Carbonate deSodium

Annexe 7 : Composition des milieux de culture

Composition du milieu : Yeast-mannitol-Agar (YMA)

Mannitol.....	10g
Extraitdelevure... ..	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0.2g
NaCl.....	0.1g
Agar... ..	15g
H ₂ O.....	1L

Composition du milieu : Yeast-mannitol-Broth (YMB)

Mannitol.....	10g
Extraitdelevure... ..	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0.2g
NaCl.....	0.1g
H ₂ O.....	1L

**Annexe 08 : Composition des milieux de culture (YMB) modifié YMB
modifié (margine)**

Margine.....	0.2g
KNO ₃	0.1g
K ₂ HPO ₄	0.1g
MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0.04g
NaCl.....	0.02g
H ₂ O.....	200ml

YMB modifié(Grignon)

Grignon.....	0.2g
KNO ₃	0.1g
K ₂ HPO ₄	0.1g
MgSO ₄ ,7H ₂ O.....	0.04g
NaCl.....	0.02g
H ₂ O.....	200ml

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet des margines et du grignons d'olive sur la croissance de rhizobium et de tester leur capacité à dégrader les sous produit de l'industrie oléicole et leur utilisation comme composé carboné. Pour ce faire, nous avons mené deux tests : un test a démontré l'effet inhibiteur des margines et du grignon par la détermination de la CMI pour différentes souches de rhizobium par la méthode de diffusion sur disque, le 2ème test consiste à étudier la biodégradabilité de ces effluents par l'évaluation de la croissance de différents souche de rhizobium sur des milieux YMB modifié (grignon et margine) en fonction des différent temps d'incubation.

Les résultats de cette étude ont montré que les margines ont un effet inhibiteur sur la croissance de rhizobium a des concentrations inférieures à 0.5mg, tandis que le grignon d'olive ne présente aucune effet sur la croissance des rhizobiums aux concentrations testées. La biodégradation de ces effluent est très lente et difficilement biodégradables et la potentialité de l'assimilation de la source de carbone dans les margines est supérieure à celle du grignon.

La possibilité d'améliorer la valeur nutritionnelle de l'huile d'olive en l'enrichissant par les composés phénoliques des grignons d'olive a été étudiée. L'efficacité de cette étude est appuyée sur l'utilisation de la méthode de surface de réponse (RMS). L'analyse de la variance a confirmé que la contribution d'un modèle quadratique était significative pour la réponse. Les conditions optimales basées sur des réponses de combinaison étaient : une température de 10°C, un ratio de 25% et un temps d'agitation de 8 heures. Sous ces conditions, les polyphénolstotaux ont été passé de $56 \pm 4,29$ mg d'EAG/kg d'huile à $697 \pm 5,35$ mg d'EAG/kg d'huile quiest raisonnablement proche de la valeur prédite (621mg d'équivalent gallique d'acide/kg d'huile). En outre, le test de DPPH réalisé, a confirmé son enrichissement en antioxydants. L'évaluation sensorielle de cette huile a montré une légère augmentation de l'amertume mais reste acceptable et préférable au même titre que l'huile d'olive vierge.

Mots clés : Margine, grignon, rhizobium, inhibition, biodégradabilité, Enrichissement, Huile d'olive, Composés phénoliques.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of olive wastewater and olive-pomace on the growth of rhizobium and tested its ability to degrade by-products of the olive industry and their use as a carbon substrate. In order to do this, we carried out two tests: a test that showed the inhibitory effect of olive wastewater and olives by determining the MIC for different strains of rhizobium by the diffusion method on disk, the second test consists in studying The biodegradability of these effluents by evaluation the growth of different rhizobium strain on modified YMB media (olive wastewater and olive pomace) as a function of the different incubation times.

The results of this study showed that olive wastewater had an inhibitory effect on the growth of rhizobium at concentrations of less than 0.5 mg, while olive pomace had no effect on the growth of rhizobia at the concentrations tested. The biodegradation of these effluents is very slow and difficult to biodegrade and the potential for assimilation of the carbon source in olive wastewater is higher than that of the olive-pomace.

The possibility to improve the nutritional value of olive oil by enriching it in phenolic compounds from olive pomace was studied. The Response Surface Methodology (RMS) has being used to investigate the performance of this study. The analysis of the variance showed that the contribution of a quadratic model was significant for the response. The optimal conditions based on combination responses were: temperature of 10°C, ratio of 25% and maceration time of 8 hours. With these conditions, the total polyphenols was passed from $56 \pm 4,29$ mg of Gallic Acid Equivalent/kg of oil to $697 \pm 5,35$ mg of Gallic acid Equivalent/kg of oil which reasonably close to the predicted value (621mg of Gallic Acid Equivalent/ kg of oil). Furthermore, the radical-scavenging activity of the processed oil (DPPH test) confirmed its enrichment in antioxidants. The sensory evaluation of this oil showed a slight increase in the bitterness, but remains acceptable and preferable as well as the virgin oliveoil.

Keywords: Enrichment, Olive oil, Olive pomace, Phenolic compounds.