

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique**  
**Université Saad Dahlab -Blida 1-**



**Faculté des sciences**

**Département de chimie**

## **Mémoire de Master**

**Spécialité : chimie des produits naturels**

**Présenté par :**

**Saloua BOUKHATEM**

**Mohamed Riadh BELKEBIR**

### **ÉTUDE CHIMIQUE D'UN EXTRAIT PHÉNOLIQUE DE MARGINES**

**Devant le jury composé de :**

**Y. DAGHBOUCHE**

**Professeur**

**Présidente**

**O.TOUAFEK**

**MCA**

**Examinatrice**

**M.EL HATTAB**

**Professeur**

**Promoteur**

**Septembre 2021**

## Résumé

Le présent travail, est mené sur l'étude de la composition chimique d'un extrait phénolique de margines, qui sont considérés comme un polluant de l'industrie oléicole en raison de leurs charge en matière organique en particulier les composés phénoliques (0,002 - 11,5 g/L), leurs DCO (16,5 - 190 g/L) et DBO (41,3 - 46 g/L), leurs salinité élevée et leurs pH acide (4,2 - 5,7).

Les margines sont l'un des sous-produits oléicole qui font actuellement l'objet de nombreuses recherches scientifiques en raison de leurs composition phénoliques qui sont visés à explorer leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne tant appréciées dans le domaine thérapeutique, cosmétique et alimentaire.

L'objectif de ce travail est de préparer un extrait de polyphénols totaux (ppt) à partir des margines par une extraction liquide-liquide au moyen de l'acétate d'éthyle qui permet d'obtenir de meilleure rendement.

Cet extrait subit un fractionnement sur une colonne chromatographique en mode gradient (chloroforme /méthanol), avec 100% de  $\text{CHCl}_3$  à 100% de  $\text{CH}_3\text{OH}$  suivie par une séparation sur couche mince afin de regrouper les fractions qui ont des compositions identiques. Les analyses sur CLHP ont montrés que la composition majoritaire de l'extrait est des produits polaires de nature phénolique tels que l'acide gallique que nous avons identifiés.

Les analyses qualitatives ATR-FTIR de l'extrait ppt ont montrés la présence des zones riches en fonctions chimiques qui indique la présence des produits polaires.

**Mots clés : Margines, composés phénoliques, Extraction, huiles végétales, Analyse chimique, CLHP, ATR-FTIR**

## **Abstract**

The present work, is conducted on the study of the chemical composition of a phenolic extract of olive mill waste water (OMWW), which are considered as a pollutant of the olive industry due to their load of organic matter especially phenolic compounds 0.002 - 11.5 g/L, their COD (16.5 - 190 g/L) and BOD (41.3 - 46 g/L), their high salinity and their acidic pH (4.2-5.7).

The OMWW are one of the olive by-products that are currently the subject of much scientific research due to their phenolic composition that are targeted to explore their antioxidant and antimicrobial properties so appreciated in the therapeutic, cosmetic and food fields.

The objective of this work is to prepare an extract of total polyphenols (ppt) from OMWW by a liquid-liquid extraction using ethyl acetate which allows to obtain a better yield.

This extract undergoes a fractionation on a chromatographic column in gradient mode (chloroform /methanol), with 100% CHCl<sub>3</sub> to 100% CH<sub>3</sub>OH followed by a separation on a thin layer in order to group the fractions that have identical compositions. The HPLC analyses showed that the majority of the composition of the extract is made up of polar products of phenolic nature such as gallic acid that we have identified.

The qualitative analyses ATR-FTIR of the extract ppt showed the presence of zones rich in chemical functions that indicate the presence of polar products.

**Keywords: Olive mill wastewater, phenolic compounds, Extraction, vegetables oil, Chemical analysis, HPLC, ATR-FTIR.**

## ملخص

في هذا العمل قمنا بدراسة البنية الكيميائية لمستخلص فينولي للمياه النباتية. والتي تعتبر من الملوثات في مصنع الزيتون وذلك بسبب احتوائها على مواد عضوية وخاصة المركبات الفينولية 0.002 - 11,5 غ / لتر حيث ال DCO الخاصة بهم (16.5-190 غ / ل) وال DBO (41.3-46 غ / ل) وملوحة عالية ودرجة حموضة (4.2-5.7).

تعتبر المياه النباتية أحد منتجات الزيتون الثانوية التي تخضع حاليًا للكثير من البحث العلمي بسبب تركيبها الفينولية التي تهدف إلى استكشاف خصائصها المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات التي تحظى بتقدير كبير في المجالات العلاجية والتجميلية والغذائية.

الهدف من هذا العمل هو تحضير مستخلص من البولي فينول الكلي (ppt) من المياه النباتية عن طريق استخلاص سائل-سائل باستخدام أسيتات الايثيل الذي يسمح بالحصول على مردود أفضل.

يخضع هذا المستخلص للتجزئة على عمود كروماتوغرافي في وضع التدرج (كلوروفورم / ميثانول) مع قطبية متزايدة من 100% CHCl<sub>3</sub> إلى 100% CH<sub>3</sub>OH متبوعًا بفصل طبقة رقيقة لدمج الكسور المتماثلة.

أظهرت تحليلات HPLC أن غالبية تركيبات المستخلص هي منتجات قطبية ذات طبيعة فينولية مثل حمض الغاليك التي تم التعرف عليه .

أظهرت تحليلات ATR-FTIR النوعية لمستخلص ppt وجود مناطق غنية بالوظائف الكيميائية التي تشير إلى وجود منتجات قطبية.

الكلمات المفتاحية: ماء الزيتون (المرج) , المركبات الفينولية, استخلاص, الزيوت النباتية, التحاليل HPLC, ATR-FTIR, الكيميائية

## **Remerciements**

*Nous tenons tous d'abord à remercier Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce mémoire.*

*En second lieu, nous tenons à remercier le Pr. El HATTAB, notre promoteur pour la qualité de son encadrement, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous remercions aussi la Doctorante Ait si Saïd Chahinez pour son aide pratique et ces précieux conseils.*

*Nos profonds remerciements pour les membres de jury qui ont accepté d'évaluer ce travail :*

*A Mme DAGHBOUCHE.Y, Professeur à l'université Saad Dahlab BLIDA, nous fait l'honneur d'être présidente du jury.*

*A Mme TOUAFEK.O, Maître de conférence A à l'université Saad Dahlab BLIDA nous fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements à tous nos professeurs qui ont contribués à notre formation, pour leurs compétences et leurs soutiens dans la poursuite de nos études.*

*Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont soutenus de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

## *Dédicace*

*Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail :*

### *A ma Chère mère*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentie pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A mon père, qui m'a toujours encouragée, pour son soutien, son affection et pour la confiance qu'il m'a accordée.*

*A ma très chère sœur mimi, qui n'a pas cessée à me conseiller, encouragée et soutenir tout au long de mes études. Que dieu la protège et offre la chance et le bonheur.*

*A mes petites sœurs, Ikram et Yasmine et mon chéri petit frère Taki.*

*A mes meilleures amies, « kaouther et Nesrine » que j'ai passées tous les bons moments avec eux.*

*A tous mes cousines, tous les amis que j'ai connus jusqu'à maintenant.*

*A tous la promotion CPN 2021*

*Enfin, je remercie mon binôme « Riadh » qui a attribué à la réalisation de ce projet.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*« Saloua »*

## *Dédicace*

*C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :*

### ***A mes très chers parents***

*A l'être le plus cher de ma vie, ma mère.*

*A celui qui a fait de moi un homme, mon père. .*

*Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements.*

*Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.*

*Que Dieu le tout puissant vous préserve et accorde santé, longue vie et*

*Bonheur !*

### ***A mes très chères sœurs***

*Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !*

### ***A tous les membres de ma famille***

*Toute personne qui occupe une place dans mon cœur.*

### ***A mes amis et collègues***

*À tous ceux qui me sont chers, ainsi que tous les gens qui m'ont aidé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail et de ma réussite.*

**« Mohamed Riadh »**

*«La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information »*

*Albert Einstein*



## Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciement

Dédicace

Liste d'abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

### Première partie: Étude bibliographique

Introduction générale .....	1
I. Généralités sur l'olivier .....	4
I.1 Historique de la culture d'olivier .....	4
I.2 Caractérisation et origine botanique de l'olivier .....	4
I.2.1 Taxonomie et systématique .....	5
I.2.2 Le fruit de l'olivier .....	5
II. Situation oléicole en Algérie .....	6
III. Huile d'olive .....	6
III.1 Processus d'obtention l'huile d'olive .....	7
III.1.1 Récolte .....	7
III.1.2 Trituration .....	7
III.1.3 Séparation des phases .....	8
III.1.4 Types d'extraction de l'huile d'olive .....	9
IV. Sous produits de l'extraction de l'huile d'olive .....	15
Introduction .....	15
IV.1 Grignons .....	15
IV.1.1 Définition .....	15
IV.1.2 Valorisation des grignons .....	16

IV.2 Margines.....	16
IV.2.1 Définition .....	16
IV.2.2 Caractéristiques physico-chimiques des margines.....	16
IV.2.3 Impact les margines sur l'environnement.....	21
IV.2.4 Traitement des margines et leurs valorisations .....	23
V- Composés phénoliques .....	24
V.1 Définition .....	24
V.2 Polyphénols.....	25
V.3 Diversité structurale et source alimentaire.....	26
V.4 Classification des composés phénoliques .....	26
V.5 Rôle et fonctions biologiques.....	27
VI. Composés phénoliques des margines.....	29
VII. Antioxydants et l'activité antioxydante .....	31
VII.1 Introduction.....	31
VII.2 Définition .....	31
VII.3 Mode d'action des antioxydants .....	32
VII.4 Classement des antioxydants.....	32
VIII. Les radicaux libres .....	33
VIII.1 Définition .....	33
VIII.2 Nature des radicaux libres .....	33
VIII.3 Piégeage des radicaux libres .....	34
IX. Activité antimicrobiennes .....	35
IX.1 Introduction.....	35
IX.2 Les principales substances antimicrobiennes .....	36
IX.2.1 Les antibiotiques .....	36
IX.2.2 Les composés phénoliques .....	36
X. Intérêt biologiques des produit dérivant des margines.....	37

## **Deuxième partie: Étude Expérimentale**

I. Matériels et méthodes.....	39
I.1 Matériels .....	39
I.1.1 Matériel végétal (margines) .....	39
I.1.2 Appareillage.....	39
I.1.3 Réactifs et produits chimiques.....	40

I.2 Méthodes .....	41
I.2.1 Détermination des propriétés physico-chimiques de la margine.....	41
I.2.2 préparation des extraits phénoliques .....	42
I.2.3 Rendement d'extraction.....	44
I.2.4 Fractionnement sur colonne chromatographique .....	46
I.2.5 Conservation des fractions .....	47
I.2.6 Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	48
I.2.7 Révélation de plaque CCM.....	49
I.2.8 Caractérisation par HPLC :.....	52
I.2.9 Caractérisation par ATR-FTIR .....	52
II. Résultat et discussion .....	53
II.1 Paramètres physico-chimiques .....	53
II.1.1 Acidité (PH) : .....	53
II.1.2 Matière sèche : .....	53
II.1.3 Teneur en eau ou Humidité (TE) .....	53
II.2 Extraction des polyphénols .....	53
II.2.1 Acidification des margines: .....	53
II.2.2 Rendement d'extraction : .....	54
II.3 Analyse des fractions obtenues par CCM : .....	54
II.4 Résultat de l'analyse par HPLC .....	54
II.4.1 Analyse de l'extrait phénolique .....	54
II.4.2 Analyse des fractions.....	55
II.4.3 Analyse des étalons.....	58
II.5 Résultat de l'analyse par ATR-FTIR .....	60
II.5.1 Région des groupes fonctionnels (4000-1300cm <sup>-1</sup> ) .....	60
II.5.2 Région de l'empreinte digitale (1300-900cm <sup>-1</sup> ) .....	61

## **Conclusion**

## **Références bibliographiques**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique.

ATR-FTIR : Réflectance totale atténuée-Fourier Transform infrared.

BHA : butylhydroxyanisole.

BHT : butylhydroxytoulène.

CI50 : concentration de l'antioxydant qui provoque l'inhibition de 50%.

CP : composé phénolique.

CUPRAC : capacité antioxydant par réduction de cuivre.

CEC : capacité d'échange cationique.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CC : chromatographie sur colonne.

DBO : demande biologique en oxygène.

DCO : demande chimique en oxygène.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

ERO : espèces réactive de l'oxygène.

HPLC : chromatographie liquide à haute performance.

HCl: acide chlorhydrique.

LDL: Low Density Lipoprotein. (Lipoprotéine de basse densité)

MG : matière grasse.

MS : matière sèche.

MES : matière en suspension.

PP : polyphénols.

ppt : polyphénols totaux.

R% : Rendement.

TE : teneur en eau.

THBQ : 2-tertiobutyl-4-hydroxyquinone.

UV : ultra-violet.

(V / V) : (volume /volume).

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Composition de l'olive .....	6
<b>Figure 2:</b> Extraction par presse (méthode traditionnelle).....	10
<b>Figure 3:</b> Chaîne continue à trois phases pour l'extraction d'huile d'olive .....	11
<b>Figure 4:</b> Chaîne continue à deux phases pour l'extraction d'huile d'olive . .....	11
<b>Figure 5:</b> Système d'extraction de l'huile d'olive.....	14
<b>Figure 6:</b> Structure d'un composé phénolique.....	25
<b>Figure 7:</b> Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques .....	35
<b>Figure 8:</b> Acidification des margines. ....	42
<b>Figure 9:</b> Délipidation de margine avec l'hexane.....	43
<b>Figure 10:</b> Extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle .....	44
<b>Figure 11:</b> Procédé d'extraction des composés phénoliques des margines.....	45
<b>Figure 12:</b> L'aspect de la colonne chromatographique.....	46
<b>Figure 13:</b> Fractions récupérées. ....	47
<b>Figure 14:</b> Révélation d'extrait sous la lampe UV.....	49
<b>Figure 15:</b> Révélation des fractions sous la lampe UV.....	51
<b>Figure 16:</b> Chromatogramme HPLC de l'extrait de margine .....	55
<b>Figure 17:</b> Chromatogramme HPLC de la fraction 3 .....	55
<b>Figure 18:</b> Chromatogramme HPLC de la fraction 4 .....	56
<b>Figure 19:</b> Chromatogramme HPLC de la fraction 5 .....	56
<b>Figure 20:</b> Chromatogramme HPLC de la fraction 6 .....	56
<b>Figure 21:</b> Chromatogramme HPLC de la fraction 7 .....	57
<b>Figure 22:</b> Chromatogramme HPLC de la fraction 8 .....	57
<b>Figure 23:</b> Chromatogramme HPLC de l'acide gallique .....	58
<b>Figure 24:</b> Chromatogramme HPLC de l'acide quinique .....	58
<b>Figure 25:</b> Chromatogramme HPLC de l'acide quinique .....	59
<b>Figure 26:</b> Chromatogramme HPLC de l'acide pyrocatechol .....	59
<b>Figure 27:</b> Spectre IR de l'extrait phénolique de margines.....	60

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Noms vernaculaires de l'olivier .....	4
<b>Tableau 2:</b> Origine botanique de l'Olea europea .....	5
<b>Tableau 3:</b> Comparaison entre les trois principaux systèmes d'extraction .....	13
<b>Tableau 4:</b> Quantité du sous-produit obtenu par les trois types d'extraction. ....	15
<b>Tableau 5:</b> Principaux caractéristiques des margines .....	18
<b>Tableau 6:</b> Teneurs des composés minéraux des margines .....	19
<b>Tableau 7:</b> Conséquences environnementales des rejets de margine dans le milieu naturel .....	22
<b>Tableau 8:</b> Les principales classes des composés phénoliques. ....	27
<b>Tableau 9:</b> Activités biologiques de quelques composés phénoliques .....	28
<b>Tableau 10:</b> Les monomères phénoliques des margines. ....	29
<b>Tableau 11:</b> Les principaux composés phénoliques polymériques retrouvés dans les margines .....	31
<b>Tableau 12:</b> Les principales activités biologiques des quatre composés phénoliques majeurs des margines. ....	38
<b>Tableau 13:</b> L'appareillage utilisé lors de l'expérimentation : .....	39
<b>Tableau 14:</b> Les produits chimiques utilisés dans notre étude. ....	40

### **Introduction générale**

L'industrie oléicole fait partie de la vie de civilisations méditerranéennes depuis très longtemps car l'olivier est une plante emblématique [1]. Elle a toujours répondu à de nombreux besoins essentiels du quotidien avec notamment l'huile d'olive produite qui est l'une des huiles le plus prisées en raison de ses qualités nutritives.

Les pays Méditerranéens sont devenus les plus grands consommateurs, producteurs et exportateurs des olives et de l'huile d'olive. Ils fabriquent approximativement 90 % du total de l'huile d'olive produits [2]. L'Algérie qui se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce, la Tunisie et le Maroc qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs de l'huile d'olive [3] et à l'échelle mondiale, elle est le 9<sup>ème</sup> pays producteur de l'huile d'olive avec une production de 80.000 tonnes en 2017/2018 de la production méditerranéenne[4].

De nos jours, avec la promotion des vertus bénéfiques pour la santé de l'huile d'olive, la demande ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment [5].

Les procédés traditionnels et industriels de fabrication de l'huile d'olive [6] en plus de leur production principale qui est l'huile, laissent deux sous produits l'un solide appelé grignon et l'autre liquide appelé margine [7]. Les grignons ne pose pas de problèmes environnementaux majeurs de fait qu'ils sont réutilisés en industrie et en agriculture, alors que les margines sont habituellement déchargées dans des canalisations non adaptées ou directement dans des terres agricoles [6] ce qui peut avoir un grand impact environnemental sur le sol et sur l'eau en raison de leur forte phytotoxicité [8]. Cent Kg d'olives produisent en moyenne 35 Kg de grignon et 100 litres de margines.

Les margines sont des eaux de végétation générées lors de l'extraction de l'huile d'olive vierge. Ces rejets ont un caractère acide et polluant en raison de leur richesse en matière organique (composés phénoliques, lipides et des sucres).



## ***Introduction Générale***

L'olivier est très riche en composés phénoliques, mais uniquement 2% de la teneur en phénols totaux du fruit passent dans la phase huileuse, tandis que la quantité restante est perdue dans les margines (~ 53%) et dans les grignons (~ 45%) [9]. La problématique posée par les margines réside principalement dans leur teneur élevée en polyphénols, 18 à 125 mg/g d'après [10]. Ces valeurs dépassent même dix fois plus celles de la phase huileuse. D'une part, ces composés difficilement biodégradables empêchent les cycles biologiques du sol et souillent les eaux naturelles [11].

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 oléicole. Cependant, les polyphénols récupérés de ces rejets possèdent une large gamme d'activités (antioxydant, antimicrobien). Ils sont identifiés comme des antioxydants phénoliques naturels largement utilisés en agroalimentaire. Ils sont connus par leur forte activité inhibitrice contre les radicaux libres. Les consommateurs ont une préférence pour tout ce qui est naturel [12] et rejettent tous les additifs alimentaires tels que les antioxydants synthétiques qui possèdent des effets toxiques et cancérigènes.

De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives, ayant des effets secondaires limités ou inexistantes, depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Notre objectif est de récupérer un extrait phénolique à partir des margines qui ont été ramener d'une huilerie à trois phases. Nous sommes intéressés à l'extraction des composés phénoliques et à l'étude chimique de cet extrait.

Le travail sera principalement axé sur les PP totaux extraits de margines brutes.

Pour répondre aux objectifs fixés à ce travail, nous l'avons mené comme suit :

- ✓ Une synthèse bibliographique actuelle portant sur :
  - Une description de l'huile d'olive et les procédés d'extractions.

## ***Introduction Générale***

- Sur la caractérisation des margines (rejet de l'industrie oléicole).
- Sur quelques aspects concernant les polyphénols rencontrés dans la nature en général et dans les margines.
  - ✓ La partie expérimentale comporte :
    - La Détermination de quelques paramètres physico-chimiques de margines.
    - Extraction liquide-liquide des polyphénols totaux à partir des margines brutes.
    - Une étude chimique de l'extrait phénolique récupéré.

Et on termine par une conclusion générale.

### I. Généralités sur l'olivier

#### I.1 Historique de la culture d'olivier

Parmi les plus vieux arbres cultivés dans le monde apparaît l'olivier [13]. L'olivier a pour origine, la région syro- iraniennne [14]. La culture de l'olivier serait ensuite étendue à un peu partout dans le monde, mais elle se trouve concentrée dans le bassin méditerranéen [15] qui représente environ 95 % du patrimoine oléicole mondial [16] Donc, il est très difficile de reconnaître la renaissance de l'olivier. Des fossiles de feuilles datant de six millions d'années ont été découverts à Mongardino en Italie, et des restes d'arbres du XIIème millénaire avant Jésus-Christ (av-J-C) en bordure du Sahara. En méditerranée orientale, des feuilles fossilisées datées de 37000 ans av-J-C ont été trouvées à Santorin, île de la mer Egée [17].

**Tableau 1:**Noms vernaculaires de l'olivier [18].

Noms vernaculaires de l'olivier
Français : olivier (olive)
Anglais : olivetree (olive)
Allemand : olbaum (olive)
Italien : ulivo (olivo)
Espagnol : olivo (aceituna)
Portugais : Oliveira (azeitouna)
Arabe : chajaret azzeitoun (zeitouna)

#### I.2 Caractérisation et origine botanique de l'olivier

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, de 6 à 8 mètres de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre, crevassée. Les feuilles, blanc argenté à la face inférieure, vert grisâtre à la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces, lancéolées. Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grappes dressées. Les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme [19].

### 1.2.1 Taxonomie et systématique

L'espèce *Olea europaea* L. a été nommée par Linné en raison de son aire géographique. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*. Le genre est appelé *Olea* et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. On distingue deux sous-espèces, l'olivier cultivé ou olivier commun ***Olea europaea sativa*** et l'olivier sauvage ou oléastre ***Olea europaea sylvestris*** [20 ; 21].

Le tableau 2 présente la classification botanique de l'olivier.

**Tableau 2:** Origine botanique de l'*Olea europea* [18]

<b>Règne</b>	<b><i>Plantae</i></b>
<b>Embranchement</b>	<b><i>Magnoliophyta</i></b>
<b>Sous-embranchement</b>	<b><i>Magnoliophytina</i></b>
<b>Classe</b>	<b><i>Magnoliopsida</i></b>
<b>Sous-classe</b>	<b><i>Dialypétales</i></b>
<b>Ordre</b>	<b><i>Lamailes</i></b>
<b>Famille</b>	<b><i>Oleaceae</i></b>
<b>Genre</b>	<b><i>Olea</i></b>
<b>Espèce</b>	<b><i>Olea europea</i></b>

### 1.2.2 Le fruit de l'olivier

L'olive est le fruit de l'olivier. C'est une drupe avec une pulpe charnue riche en matière grasse, sa forme est ovoïde. Ses dimensions sont très variables suivant les variétés, sa couleur change au cours de son cycle de maturation passant de la couleur verte à la couleur violette ou rouge puis noire à maturité complète [22]. La maturation des olives s'étend sur plusieurs mois, son goût et sa composition chimique dépendent des conditions de croissance (la latitude, la disponibilité de

## Partie I : Étude Bibliographique

l'eau, et la température). La maturation, la récolte et le processus de développement des olives et l'huile d'olive dépendent fortement des techniques régionales [23].

Sa composition dépend du sol, du climat et la variété de l'olive, leur contenu est composé du noyau (17,3% - 23%), d'amandon (2% - 5,5%), d'épicarpe (2% - 2,5%) et de la pulpe (71,5%-80,5%) par rapport au poids sec de l'olive [24].

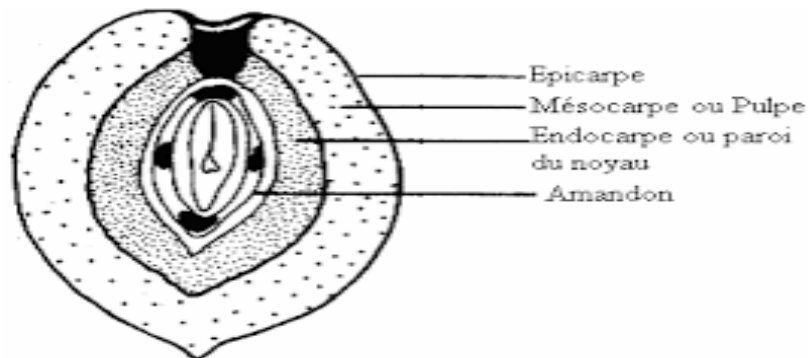


Figure 1:Composition de l'olive [24].

### II. Situation oléicole en Algérie

La filière oléicole constitue actuellement un des segments important pour le développement de l'économie en Algérie. Cependant, le secteur est confronté à un double défi : Faiblesse des productions et une faible compétitivité-prix. De par sa situation et ses potentialités naturelles et économiques, l'Algérie doit faire partie des principaux pays méditerranéens, producteurs d'huile d'olive [25]. L'Algérie se positionne après l'Espagne, L'Italie, la Grèce, la Tunisie et le Maroc qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive [26].

Le nombre d'oliviers en Algérie est estimé à environ 32 millions et occupent une superficie de l'ordre de 930000 hectares [15], répartie dans 3 régions : le centre, l'Est et l'Ouest avec 54.3%, 28,3% et 17% par ordre d'importance.

### III. Huile d'olive

L'huile d'olive est un pur jus provenant uniquement du fruit de l'olivier à partir d'une série d'opération physiques , elle est la meilleure huile végétale et la plus recommandée car non seulement, elle est appétissante mais aussi elle est très

## **Partie I : Étude Bibliographique**

stable, difficilement oxydable, riche en acide oléique et linoléique, faible en acide gras saturé et aucun additif n'est ajouté pour allonger sa durée de vie, car elle contient naturellement des antioxydants qui lui permettent de résister au rancissement [27]. Leur production doit être constante et garantir une bonne rentabilité en termes de qualité et de quantité d'huile.

### III.1 Processus d'obtention l'huile d'olive

Les méthodes d'obtention l'huile d'olive les plus utilisés par les huileries sont le système discontinu par presse et le système continu avec centrifugation à trois phases ou à deux phases. Ces industries produisent, mis à part « l'huile d'olive » des sous-produits tels que les margines (eaux de végétation) et les grignons d'olives. L'obtention de l'huile d'olive passe par plusieurs étapes :

#### III.1.1 Récolte

Pour fabriquer une huile d'olive riche en arôme, délicatement parfumée, et de bonne qualité, la récolte des fruits est la première étape qui doit être faite soigneusement en respectant : la période et la méthode de la cueillette [28].

#### III.1.2 Trituration

Le procédé d'extraction de l'huile d'olive consiste à broyer l'olive pour éclater les cellules de la pulpe et libérer l'huile, puis à la séparer par tous les moyens disponibles (pression, centrifugation et percolation) [29;30], processus est réalisé par une succession d'opérations: lavage, broyage, malaxage de la pâte obtenue, puis l'extraction proprement dite [14].

##### III.1.2.1 Effeillage et lavage

Ces opérations sont effectuées, dans l'ordre par des appareils automatiques munies d'un système d'aspiration pour l'élimination des feuilles et d'un bassin à circulation forcée d'eau, pour le lavage des olives. L'effeuillage et le lavage ont pour but de débarrasser les olives de toutes les impuretés (terre, cailloux, feuilles...) [31].

### III.1.2.2 Broyage

Cette opération a pour but de déchiqueter les cellules de la pulpe et de faire sortir les gouttelettes d'huile des vacuoles de manière à ce qu'elles puissent se réunir et former des gouttes aux dimensions plus grandes qui soient en mesure de se séparer des autres phases, liquides et solides, de pâte. Cette étape est réalisée principalement à l'aide de deux types d'appareils : broyeurs à meules et broyeurs métalliques [32].

### III.1.2.3 Malaxage

L'olive passe dans un malaxeur à pour le but d'homogénéiser la pâte et de détacher les cellules lipidiques. Elle a aussi comme but d'augmenter le pourcentage d'huile « libre » tout en favorisant, d'une part, la réunion des gouttelettes d'huiles en des gouttes plus grosses pour former une phase continue et, d'autre part, la rupture de l'émulsion huile/eau [32]. Cette étape est très importante pour l'amélioration du rendement [33].

### III.1.3 Séparation des phases

Cette opération consiste à [27] :

- La séparation des phases liquides-solides : après le broyage et le malaxage, on obtient d'une pâte qui contient la matière solide et fluide. La matière solide appelée grignon est formée de débris de noyaux, d'épiderme de parois cellulaires et l'autre partie qui est fluide contient l'huile et l'eau de végétation connue par le nom : margine.
- La séparation des phases liquides-liquides : Les deux phases aqueuse et huileuse se séparent par une simple décantation ou par centrifugation. Cette séparation est basée sur la différence de densité entre l'huile d'olive et l'eau de végétation.

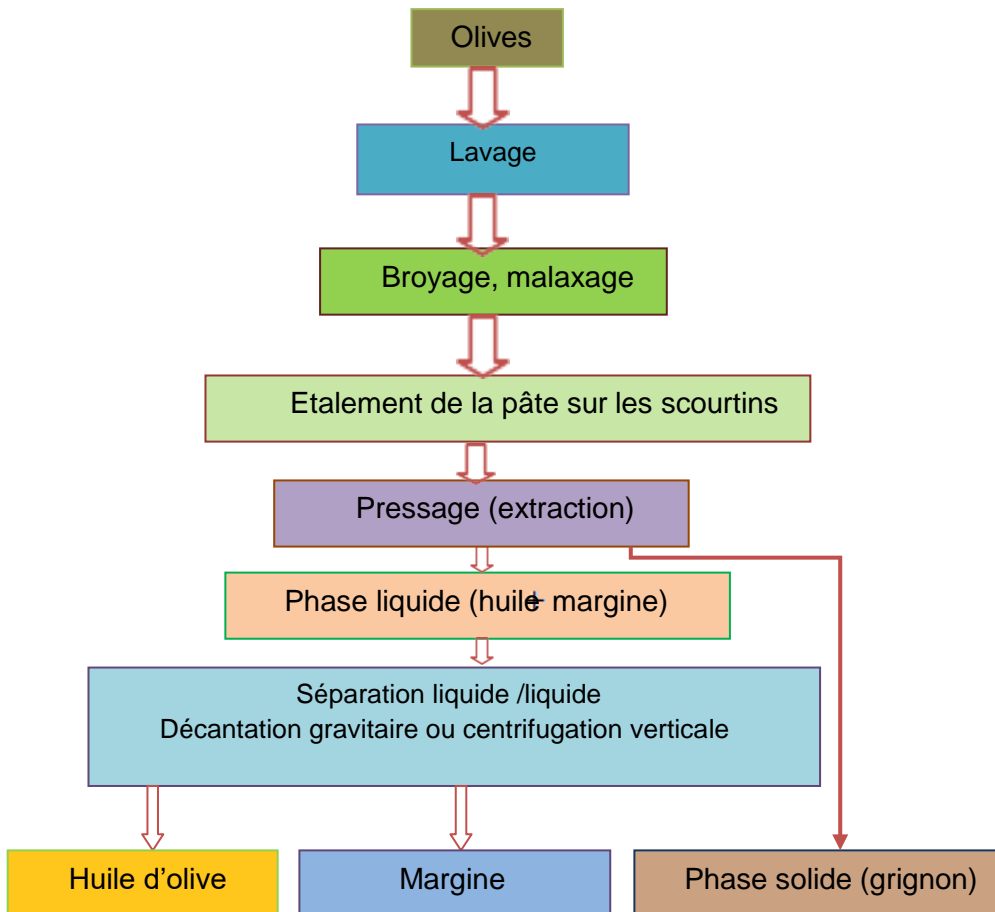
### III.1.4 Types d'extraction de l'huile d'olive

Trois systèmes sont utilisés à travers le monde pour l'extraction de l'huile d'olives à l'échelle industrielle, à savoir le système traditionnel par presse, le système de centrifugation à trois phases, le système moderne de centrifugation à deux phases. Actuellement les systèmes avec centrifugation à deux et à trois phases sont les plus couramment utilisés dans le monde [34].

#### III.1.4.1 Système d'extraction discontinu par presse

Ce système de presse correspond à un procédé discontinu qui est une méthode traditionnelle pour produire l'huile d'olive (**figure 2**), 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 [14;35]. La pâte issue du broyage est empilée sur les scourtins ; à raison de 5 à 10 kg par scourtins. 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 [36]. La plupart des moulins utilisent désormais des presses hydrauliques [35].





**Figure 2:** Extraction par presse (méthode traditionnelle) [33].

### III.1.4.2 Système d'extraction en continu avec centrifugation

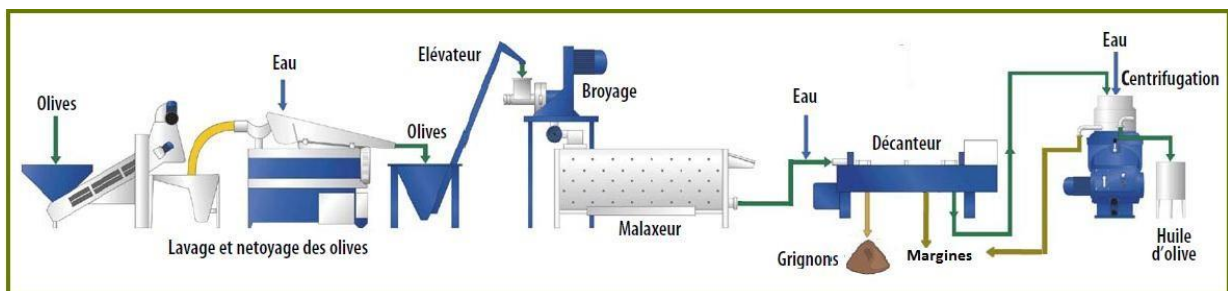
Le procédé continu d'extraction d'huile d'olive utilise un décanteur industriel pour séparer toutes les phases par centrifugation. Il est basé sur les différences de densité des composants de la pâte d'olives (huile, eau et résidus insolubles). Les décanteurs, avec des modifications mineurs, peuvent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

#### a) Système d'extraction à trois phases

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives (**figure 3**) 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 comme suit [37]:

## Partie I : Étude Bibliographique

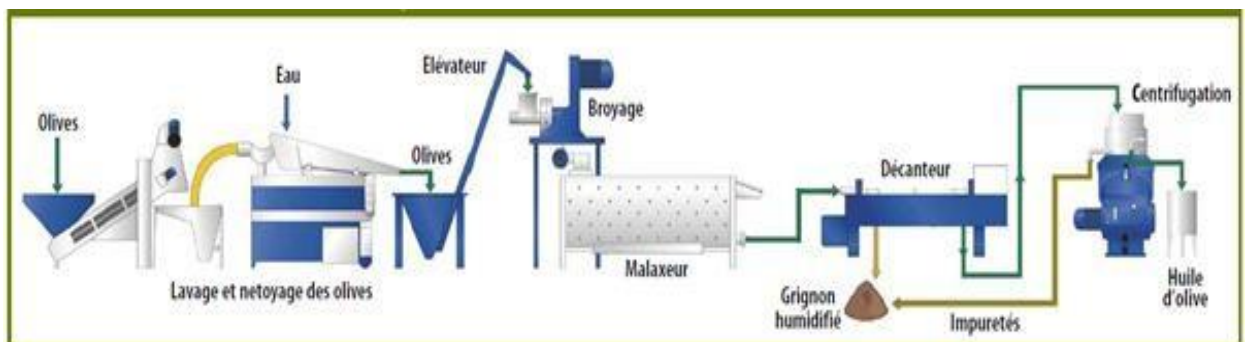
- le grignon ( $\rho \sim 1,2 \text{ kg/dm}^3$ ) qui va dans la partie la plus éloignée de l'axe de tour.
- les margines, ou eau de végétation ( $\rho \sim 1,015 \text{ à } 1,086 \text{ kg/dm}^3$ ) qui se trouvent sur l'anneau intermédiaire.
- l'huile ( $\rho \sim 0,916 \text{ kg/dm}^3$ ) qui reste autour de l'axe [38].



**Figure 3:** Chaîne continue à trois phases pour l'extraction d'huile d'olive [36].

### b) Système d'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 4**). Ce procédé est dit écologique [36].



**Figure 4:** Chaîne continue à deux phases pour l'extraction d'huile d'olive [36].

### III.2 Comparaison des procédés de l'extraction de l'huile d'olive

Aucun procédé n'est parfait, chacun d'eux possède des avantages et des inconvénients, le **tableau 3** résume une comparaison des principaux procédés (traditionnel, moderne à trois phases et à deux phases).

## Partie I : Étude Bibliographique

Tableau 3: Comparaison entre les trois principaux systèmes d'extraction [39] :

Système traditionnel "presse"	Système moderne à 3 phases	Système moderne à 2 phases
Nécessite une importante main d'œuvre	Permet de réduire la main d'œuvre	
Faible capacité de production	Grande capacité de production	
Altération des huiles après exposition de la pâte des olives à l'air libre durant environ 1 heure de trituration parfois plus.	Les opérations de transformation se passent en clos, ce qui protège l'huile de l'altération par l'oxygène de l'air.	
Consommation moyenne d'eau.	Consommation élevée d'eau.	Très faible consommation d'eau.
Les huiles extraites sont riches en antioxydants.	Les huiles extraites sont pauvres en antioxydants	Les huiles extraites sont riches en antioxydants.
Généralement l'huile est relativement acide (le respect des règles d'hygiène est difficile)	Faible acidité de l'huile	
Grand risque de contamination	Faible risque de contamination	
Faible résistance de l'huile à l'oxydation à cause des acides gras libres.	Faible résistance de l'huile à l'oxydation à cause de sa pauvreté en antioxydants.	Stabilité de l'huile à l'oxydation.
Quantité moyenne de margines	Très grande quantité des margines	Pas de margines
Faible quantité de grignons (28 ±4%)	Quantité moyenne de grignons (48 ± 4 %)	Grande quantité de grignons (60 ± 4%)

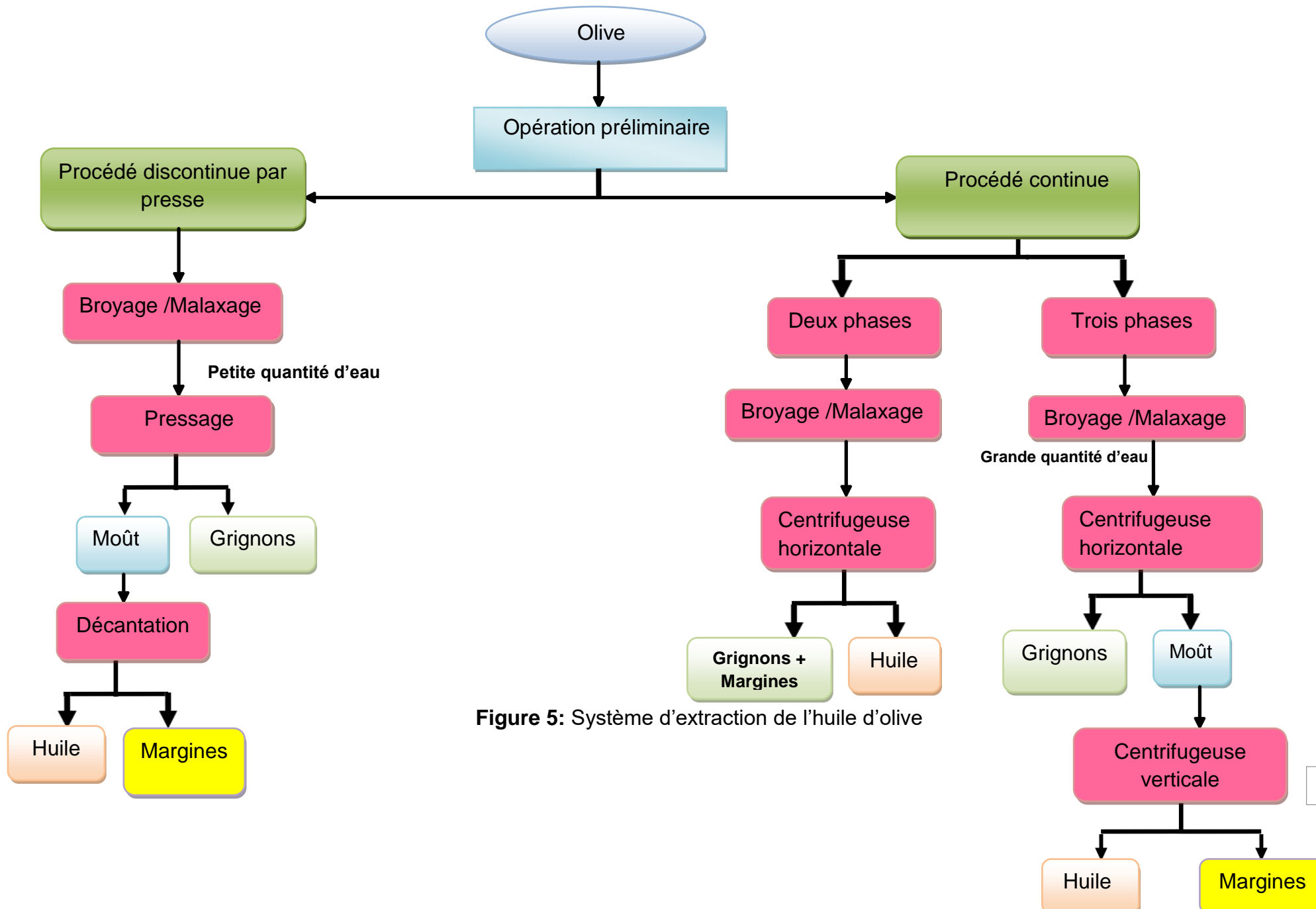


Figure 5: Système d'extraction de l'huile d'olive

### IV. Sous produits de l'extraction de l'huile d'olive

#### Introduction

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile comme produit principal, de grandes quantités de sous-produits. L'un liquide : margine 30 % et l'autre solide : grignon 50 % par rapport aux poids total des olives traitées [40]. Cent kg d'olive produisent en moyenne 35 kg de grignon et 100 litres de margine. La taille de l'olivier laisse en moyenne 25 kg de feuilles et brindilles annuellement [41].

Le tableau 4 regroupe la quantité des sous-produits obtenus par les trois types d'extraction [42].

**Tableau 4:** Quantité du sous-produit obtenu par les trois types d'extraction.

Type d'extraction	Grignons (Kg/100Kg d'olives)	margine (Litres /100Kg d'olives)
<b>Traditionnelle</b>	45.5	<b>75</b>
<b>Deux phases</b>	75.5	<b>3.6</b>
<b>Trois phases</b>	<b>57.5</b>	<b>902</b>

#### IV.1 Grignons

##### IV.1.1 Définition

Les grignons sont les résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives [43]. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite de grignons d'olive après extraction chimique [44].

Il existe différentes types de grignons :

**Grignon brut** : qui est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive. Les grignons contiennent 4 à 5 % d'huile quand ils sont bien épuisés dans le cas d'une extraction à double pression.

**Grignon épuisé** : c'est le grignon brut à partir duquel, l'huile est extraite par solvant. Ce type de grignon est caractérisé par une faible

teneur en matière grasse et une faible teneur en eau [45].

### IV.1.2 Valorisation des grignons

- Utilisation des grignons d'olive dans l'alimentation animale après addition d'autres composantes (son, cactus, mélasse, fourrage, minéraux...).
- Le grignon d'olive est un combustible de valeur calorifique moyenne (2950 Kcal/kg).
- Après séparation de la pulpe du noyau, la pulpe est transformée en pellets et les noyaux peuvent être utilisés directement dans les chaudières [46].

### IV.2 Margines








#### IV.2.1 Définition

Les margines ou eaux de végétation, dénommés parfois alpechine, ce sont des sous-produits liquides aqueux obtenus lors de l'extraction de l'huile d'olive, sont de couleur rouge foncé à noire, d'aspect trouble et une odeur qui rappelle celle de l'huile d'olive [1]. Elles possèdent un caractère faiblement acide avec une conductivité élevée. Sa couleur noire est due à la présence des polyphénols [47]. Les quantités produites sont abondantes dans l'extraction à 3 phases car elle nécessite une injection d'eau à la pâte avant centrifugation [38]. Elles contiennent un pourcentage négligeable de l'huile et de matière solide provenant de la pâte d'olive, ce pourcentage varie en fonction du système d'extraction [48].

#### IV.2.2 Caractéristiques physico-chimiques des margines

Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre à noire avec une forte odeur d'olive et un aspect trouble. Leur pH est acide (4 - 5,5) avec un fort pouvoir tampon et une odeur fétide qui se développe au fur et à mesure que les margines vieillissent. Elles ont généralement une forte salinité due à l'ajout important de sel pour la conservation des olives (conductivité supérieure à 10 mS.cm<sup>-1</sup>) [49].

Les changements dans les caractéristiques des margines résultent

-  La variété d'olive.
-  Les conditions climatiques.
-  Le Taux de maturation des olives.
-  La saison de récolte.
-  Le système d'extraction mis en jeu qui représente l'élément le plus important.
-  Temps de stockage des olives avant la trituration,
-  Techniques et lieu de stockage,

La caractérisation physico-chimiques des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes retenus pour l'extraction d'huile d'olive et diffère d'un pays à l'autre.

### IV.2.2.1 Valeurs de pH et de conductivité des margines

Les margines ont un pH acide avec des valeurs comprises entre 4,2 et 5,9 [50] et entre 2,24 et 5,9 selon [51] cité par [52]. Lors des traitements biologiques des margines, une correction du pH peut s'avérer nécessaire [53]. La chaux vive a été souvent utilisée pour ajuster le pH des margines. En effet, ils ont rapportés qu'il faut 1 kg de chaux par 1 m<sup>3</sup> d'effluent afin de faire augmenter le pH d'un point.

- La conductivité électrique est étroitement liée à la concentration des substances dissoutes et à leur nature. Dans le cas des margines, les valeurs de cette conductivité varient entre 18 et 50 ms.cm<sup>-1</sup> [54]. Cette mesure ne donne pas forcément une idée immédiate sur la charge minérale du milieu. L'extrait sec des margines est extrêmement élevé et variable. Il est situé entre 15,5 et 266,5 kg.m<sup>-3</sup> pour les margines de pression et entre 9,5 et 161,2 kg.m<sup>-3</sup> pour les margines de centrifugation.



- ❖ Les margines peuvent être considérées comme un complexe chargé en matières organique et minérale. Leur composition a été étudiée par plusieurs chercheurs et comporte approximativement 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de substances minérales.

**Le tableau 5** montre Les analyses menées sur les margines qui peuvent nous renseigner sur les intervalles de variation de leurs différents composants chimiques.

**Tableau 5:** Principaux caractéristiques des margines [55 ; 56].

Composant	Gamme des valeurs
<b>Matière sèche</b>	1,4- 17 %
<b>Matière minérale</b>	10-15 %
<b>Sucres divers</b>	30-50 %
<b>Graisses et huiles diverses</b>	12- 35 %
<b>Composés phénoliques</b>	5,0- 25 %
<b>Azote organique</b>	<10%
<b>DCO (g/l)</b>	16,5- 190
<b>DBO (g /l)</b>	41,3- 46
<b>pH</b>	4,2- 5,7
<b>Conductivité (µs/cm)</b>	5 – 41

### IV.2.2.2 Fraction minérale



Les margines contiennent des quantités significative en sels minéraux [56].

**Tableau 6:** Teneurs des composés minéraux des margines [56] :

Élément	Gamme de valeurs
Plomb (Pb) (µg/l)	6.7-10
Cadmium (Cd) (µg/l)	0.03-10
Fer (Fe) (mg/l)	0.45-20
Zinc (Zn) (mg/l)	1.7-4.98
Cuivre (Cu) (mg/l)	0.49-2.96
Manganèse (Mn) (mg/l)	0.46-20
Magnésium (Mg) (g/l)	0.03-0.17
Calcium (Ca) (g/l)	0.03-0.29
Potassium (K) (g/l)	0.73-6.1
Chlore (Cl) (g/l)	0.76-1
Sodium (Na) (g/l)	0.03-0.13

### IV.2.2.3 Fraction Organique

Les margines comportent deux fractions organique [57]:

-  Fraction insoluble constituée essentiellement de pulpe d'olives .Cette fraction représente les matières en suspension et colloïdales.
-  Fraction soluble dans la phase aqueuse et contient des sucres, les lipides, les huiles, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les composés phénoliques.

#### a- Les sucres

Les études effectués sur les margines ont montrées que la teneur glucidique varie entre 2 et 8% du poids de la pulpe d'olive fraiche. La présence d'autres sucres simples tels que : glucose, saccharose, mannose, raffinose, arabinose et xylose [56 ; 58].

### b- Composés azotés

La fraction azotée représentée principalement par les protéines avec une concentration variante entre 1,2 et 2,4% (P/V). Presque tous les acides sont présents dans les margines. Les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine [56 ; 58].

### c- Les vitamines

Les margines contiennent des vitamines. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D avec une concentration de 124 mg. Kg-1 de margines [26].

### d- Les Huiles

La concentration d'huile résiduelle est très variable selon le procédé d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1% [59]. L'acide oléique se trouve en grande teneur avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité huile [60].

### e- Les acides organiques

Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumariques, glycériques, lactiques et maloniques [56; 58].

### f- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques des margines sont très divers et leurs structures sont très variables, monomère ou polymère [61]. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur teneur varie entre 0,02 et 11,5g /l [56]. Leur pouvoir polluant est représenté par deux valeurs importantes à savoir, le DCO (demande chimique en Oxygène) et le DBO (demande biologique en Oxygène) qui peut atteindre les valeurs suivantes respectivement : 16.5-190 g/l et 41.3-46 g/l [56].

### IV.2.3 Impact les margines sur l'environnement

Les huileries d'olive génèrent des grandes quantités de margines et sans aucun traitement au préalable sont épandues dans les égouts ou bien directement sur la terre qui résultent des grands problèmes de pollution dans les milieux aquatiques et les sols en raison de leurs fortes charges organiques et leur teneur en substances phénoliques phytotoxiques et antimicrobiennes [62].

Les études de toxicité et de la biodégradabilité des margines, dans des conditions anaérobiques montrent que les composés phénoliques avec haut poids moléculaires sont responsables de la couleur noire des margines, ne sont pas facilement biodégradables, et présentent une faible toxicité. En revanche, les simples composés phénoliques et les tannins sont hautement toxiques mais biodégradables [63 ; 64].

#### IV.2.3.1 Impact sur le Sol

De nombreux auteurs ont observé les effets négatifs sur les propriétés des plantes et du sol quand les margines sont utilisées directement comme un engrais organique [65].

Les substances toxiques contenues dans ces eaux se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne du sol, d'autres, des résidus de pesticides notamment, sont nocifs aux plantes [36]. Les acides, les éléments minéraux et les substances organiques aboutissent à une destruction de la capacité d'échange cationique du sol (CEC), par suite, une réduction de la fertilité [66].

#### IV.2.3.2 Impact sur les Eaux

Les margines rejetées par épandage sur les sols peuvent polluer les eaux souterraines et les nappes phréatiques elles-mêmes [67] ce qui affecte la qualité de l'eau potable. L'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates des nappes situées dans la zone ou à

proximité de la zone d'épandage [36]. La pollution par les margines diminue aussi la population des poissons et les organismes aquatiques [68].

De plus, la margine contient des quantités élevées de sucres et de lipides qui forment un film imperméable, ce qui empêche la pénétration des rayons lumineux et de l'oxygène [68]. De même que l'accumulation du phosphore provoque l'eutrophisation des eaux et favorise la multiplication des pathogènes.

### IV.2.3.3 Impact sur les plantes

L'application incontrôlée des margines pourrait inhiber la germination des graines et le développement des plantes [69].

De l'autre côté, l'application des margines à des doses convenables pourrait être bénéfique pour la vie des plantes du fait de la richesse de ces effluents en matières organiques et en éléments nutritifs [70].

**Tableau 7:** Conséquences environnementales des rejets de margine dans le milieu naturel [70]:

Milieu	Cause	Effet
Sols	<ul style="list-style-type: none"><li>- Composés phénoliques</li><li>- Acidité</li><li>- Huiles et matières grasses (MG)</li><li>- Matières en suspension (MES)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sols obturés et suffoqués.</li><li>- Mauvaise odeur.</li><li>- Pollution de l'aquifère.</li><li>- Coloration des eaux naturelles.</li><li>- Effet phytotoxique sur la population microbienne.</li></ul>
Espèces Aquatiques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Matières organiques</li><li>- Huile et MG</li><li>- MES</li><li>- Composés phénoliques</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Augmentation de la demande en oxygène.</li><li>- Formations des croûtes.</li><li>- Toxicité de la microflore.</li></ul>
Air	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fortes teneurs en sels</li><li>- Acidité</li><li>- Forte charge organique</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- dégagements d'odeurs désagréables</li><li>- formation d'hydrogène sulfureux (H<sub>2</sub>S).</li></ul>

Egouts	- Acidité - MES	- La corrosion des matériaux. - Putréfaction.
Station d'épuration des eaux usées	- Acidité - MES - Huile et matière grasse - Matières organiques - Polyphénols	- Perturbation de l'activité des digesteurs des boues. .

**MG** : Matière grasse.

**MES** : Matière en suspension.

### IV.2.4 Traitement des margines et leurs valorisations

Les margines sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques. Dans ce cas, la recherche viserait à mettre au point leur valorisation aussi bien à l'échelle laboratoire qu'à l'échelle industrielle [71]. Cette valorisation a pour objectif d'éliminer les composés phénoliques, d'une part, d'utiliser les margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie, de l'agriculture et d'autre part, réduire leurs effets négatifs sur l'environnement [72].

#### IV.2.4.1 Biodégradation anaérobie

- L'application du processus de la digestion anaérobie aux margines permet de transformer environ 80% des substances organiques en biogaz (65 à 70% de méthane).
- L'épuration anaérobie des margines permet de parvenir à l'autonomie énergétique, voire à un léger excédent [73].

#### IV.2.4.2 Biodégradation aérobie

Elle repose sur l'utilisation des espèces bactériennes spécifiques pour réduire la toxicité des margines. En général, les bactéries aérobies apparaissent être très efficaces contre certains composés phénoliques de faibles poids moléculaires, mais sont relativement inefficaces contre les composés phénoliques les plus complexes [73].

### IV.2.4.3 Coagulation-floculation

Elle consiste à favoriser l'agglomération des particules hydrophiles par des tensioactifs ou coagulant. L'inconvénient majeur de ce traitement réside dans le fait qu'on a un simple transfert de la pollution de l'état soluble à l'état boueux [74].

### IV.2.4.4 Compostage

Les margines peuvent être utilisées pour obtenir un compost fertilisant pour les sols. L'avantage du compost formé à partir des margines est l'absence des micro-organismes pathogènes avec des concentrations élevées en phosphore et en potassium contrairement aux résidus solides urbains [75].

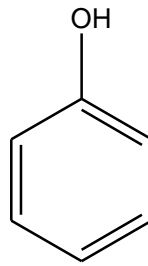
### IV.2.4.5 Extraction des produits de valeur

Les margines sont riches en composés de valeur, telles que les substances antioxydantes, qui peuvent être utilisées en industries pharmaceutique et en cosmétique. Les plus importants antioxydants commercialisables trouvés dans la pulpe d'olive sont le tyrosol, l'Hydroxytyrosol et l'oleuropéine [75]. Les composés antioxydants sont les substances phénoliques ayant une capacité de blocage et de lutte contre les attaques chimiques de l'ADN cellulaire par les radicaux oxydants. Par la suite, ils peuvent être utilisés en industrie pharmaceutique [76].

## V. Composés phénoliques

### V.1 Définition

Les composés phénoliques sont synthétisés par les plantes en réponse au stress de l'environnement. Ce sont les produits du métabolisme secondaire des plantes, ils fournissent des fonctions essentielles dans la reproduction et la croissance des plantes, agissant dans les mécanismes de défense contre les pathogènes, parasites et les prédateurs, de même ils contribuent à la coloration des plantes. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées [77]. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Figure 6**) qui peuvent être libres ou engagées avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...).



**Figure 6:** Structure d'un composé phénolique.

### V.2 Polyphénols

Les polyphénols forment une immense famille de plus de 8000 structures phénoliques identifiées [77;78] allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins.

Ils sont divisés en plusieurs catégories [79]:

- Les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ;
- Les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes.
- Les acides phénoliques et les coumarines.
- Les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables.

Les CP peuvent intervenir dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, se trouvent les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins. Ils peuvent permettre aussi aux plantes de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes et environnementales [80].

Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales [81].



### V.3 Diversité structurale et source alimentaire

Le ou les cycles aromatiques des polyphénols sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du Shikimate et celle de l'acétate [19]. La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine synthétique et elle augmente souvent avec la participation simultanée du Shikimate et de l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stilbènes, xanthones, etc.). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans les plantes et dans les aliments d'origine végétale [82].

- **Voie Shikimate** : C'est la voie la plus courante, conduit des oses aux acide aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : Acides benzoïques, acétophénones, lignanes, lignines et coumarines, etc.
  
- **Voie de l'acétate** : Elle conduit à des poly- $\beta$ -cétoesters de longueur variable, les polyacétates qui engendrent par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent Polycycliques : Isocoumarines, xanthones, quinones, etc... [19].

### V.4 Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes [81], (**tableau 8**) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques).

**Tableau 8:** Les principales classes des composés phénoliques [81].

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
<b>C<sub>6</sub></b>	Phénols simples	Catéchol	<b>Nombreuses espèces</b>
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub></b>	Acides Hydroxybenzoïque	p-Hydroxybenzoïque	<b>Epices, fraise</b>
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub></b>	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique, Acide férulique	<b>Pomme de terre, pomme</b>
	Coumarines	Scopolétine	<b>Citrus</b>
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub></b>	Naphtoquinones	Juglone	<b>Noix</b>
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub></b>	Stilbènes	Resvératrol	<b>Vin</b>
<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub></b>	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonols</li> <li>• Anthocyanes</li> <li>• Flavanols</li> <li>• Flavanones</li> </ul>	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine	<b>Fruits, légumes, fleurs fruits rouges Pomme, raisin Citrus</b>
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	<b>Soja, pois</b>
<b>(C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>)<sub>2</sub></b>	Lignanes	Pinorésinol	<b>Pin</b>
<b>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub></b>	Lignines		<b>Bois, noyau des fruits</b>
<b>(C<sub>15</sub>)</b>	Tannins		<b>Raisin rouge, kaki</b>

### V.5 Rôle et fonctions biologiques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques [83;84]. Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes [85]. Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire [86].

Les polyphénols présentent un impact positif sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en

polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique.

Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes sur la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques [87]. Le tableau 9 récapitule les effets biologiques des polyphénols rapportés par la littérature.

**Tableau 9:** Activités biologiques de quelques composés phénoliques selon [88;89].

Composés phénoliques	Activité biologique
Acides Phénols	Antifongique, antioxydante Antibactérienne
Tanins	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, antidiarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur.
Flavonoïdes	Antitumorale, anticarcinogène, anti - inflammatoire, antioxydante, anti-allergique, anti-ulcéreuse, antivirale, Antimicrobienne, hypotenseur, diurétique.
Coumarines	Anticoagulante, antioxydante, protectrice vasculaire et antioedémateuse.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, antitumoraux, antifongiques et anti-inflammatoires.
Tannins galliques etcatéchiques	Antioxydantes
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques

### VI. Composés phénoliques des margines

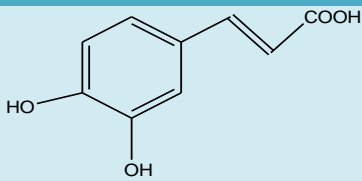
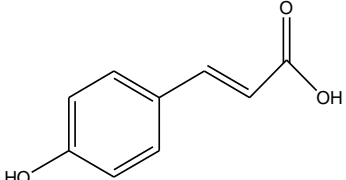
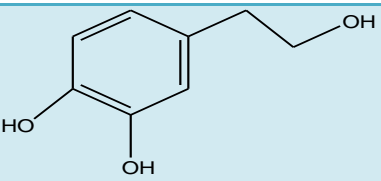
Les composés phénoliques des margines sont très divers et leurs structures sont variables. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation. Ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines [90]. Les caractéristiques organoleptiques de l'huile d'olive vierge dépendent de la présence des composés phénoliques et des substances volatiles [91].

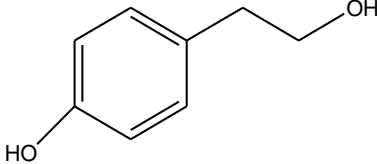
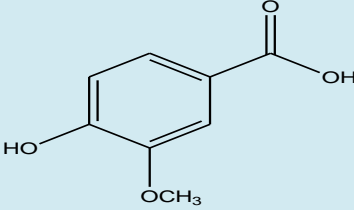
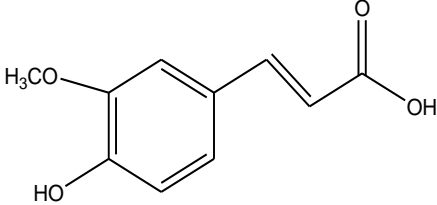
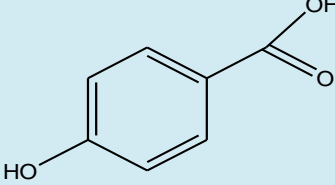
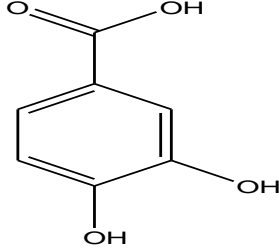
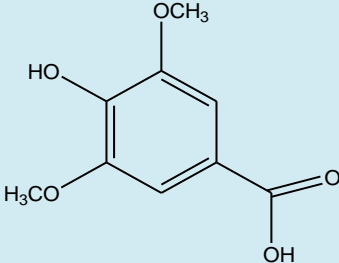
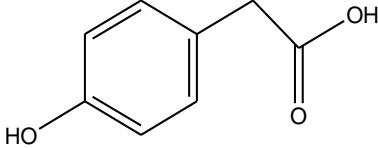
La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction, le procédé de trituration, la variété d'olive. En générale, elle varie entre 3 et 5 g.L<sup>-1</sup> et elle peut même dépasser 9 g.L<sup>-1</sup> [92].

Plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés [92], il s'agit de monomères aromatiques (les acides phénoliques) et des composés phénoliques à haut poids moléculaires comme les tanins.

- ❖ Les monomères les plus rencontrés dans les margines sont présents dans le tableau suivant :

**Tableau 10:** Les monomères phénoliques des margines.

Composé phénolique	Structure	Référence
Acide Caféique		[93]
Acide <i>p</i> -comarique		[93]
Hydroxytyrosol		[57]

<p><b>Tyrosol</b></p>		<p>[57]</p>
<p><b>Acide vanillique</b></p>		<p>[94]</p>
<p><b>Acide Férulique</b></p>		<p>[93 ; 57]</p>
<p><b>Acide p-Hydroxybenzoïque</b></p>		<p>[95]</p>
<p><b>Acide Protocatéchique</b></p>		<p>[95]</p>
<p><b>Acide Syringique</b></p>		<p>[96]</p>
<p><b>Acide 4-hydroxy phénylacétique</b></p>		<p>[96]</p>

### ❖ Les polymères phénoliques

Les composés phénoliques à haut poids moléculaire identifiés dans les margines sont essentiellement les tannins : leur structure est très complexe, leur concentration peut atteindre 12 g/L. Le catécholmélaminique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines [92]. Il est formé par la polymérisation de la catéchine à différents degrés. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3 000.

**Tableau11:** Les principaux composés phénoliques polymériques retrouvés dans les margines [56].

Composés phénoliques à haut poids moléculaires principalement les tanins	
Tanins hydrolysables	Tanins condensés (flavotanin)
- Esters d'acides phénoliques	- Le catécholmélaminique
- Esters d'acides phénoliques et sucres	

## VII. Antioxydants et l'activité antioxydante

### VII.1 Introduction

La protection contre les effets induits par les radicaux libres oxygénés s'effectue par trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle comme les caroténoïdes (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentielle pour l'homme [97].

### VII.2 Définition

Un antioxydant peut être défini comme une substance, que si elle se présente à des faibles concentrations comparées à celles d'un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat [98]. Les substrats oxydables incluent les hydrates de carbone, l'ADN, les protéines et les lipides.

Un antioxydant est une substance qui peut réduire efficacement le pro-oxydant avec formation concomitante des produits qui ne sont pas ou peu toxiques [99].

### VII.3 Mode d'action des antioxydants

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction la plupart de temps, parce que la structure des antioxydants est relativement stable [100].

Selon [101] il y a 5 modes d'intervention des antioxydants :

- ✚ Interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires.
- ✚ Chélation des métaux de transition.
- ✚ Désactivation des espèces oxygénées réactives.
- ✚ Inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation.
- ✚ Abaissement de la pression partielle en oxygène.

### VII.4 Classement des antioxydants

Les antioxydants sont classés en deux catégories différentes :

- Les antioxydants naturels.
- Les antioxydants synthétiques.

#### a- Les antioxydants naturels

Les plantes constituent une source importante des antioxydants. Ils ont donnés une efficacité bien reconnue dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine tels que : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols.

#### b- Les antioxydants synthétiques

Ils sont introduits dans toutes les formulations contenant des acides gras insaturés. Leur concentration d'utilisation est dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 % [97]

Ce sont :

- Le butylhydroxytoulène BHT (E 321).
- Le butylhydroxyanisole BHA (E 320).

- Des esters de l'acide gallique : gallate de propyle (E 310), gallate d'octyle (E 311), et de dodécyle (E 312).

On peut citer aussi la 2-tertiobutyl-4-hydroxyquinone ou TBHQ, c'est un paradiphénol de synthèse. Il est cinq à sept fois plus puissant que le BHA et le BHT, ainsi qu'il prolonge la durée d'utilisation du produit cité par [102]. Elle est interdite au sein de l'union européenne [103] car suspecté de génotoxicité.

### VIII. Les radicaux libres

#### VIII.1 Définition

Un radical libre est une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui la rend très réactif, ainsi une réaction en chaîne débute lorsque ce radical essayant d'acquiescer leur stabilité par la capture d'un électron d'une autre molécule stable est la plus proche qui devient elle-même un radical libre [104].

Les sources des radicaux libres sont nombreuses, il existe deux grandes voies de formations de ces derniers [97] :

- ❖ La première voie consiste en un transfert d'électron catalysé par les métaux de transition (Fe ; Cu), ils transforment  $H_2O_2$  en radical hydroxyle (OH $\cdot$ ), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique.
- ❖ La deuxième voie se fait au niveau de la scission homolytique des liaisons covalentes des molécules. Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons.

#### VIII.2 Nature des radicaux libres

##### a. Espèces réactives dérivés de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire. Dans les organismes vivants, elles sont le plus souvent générées à cause de l'importance du métabolisme aérobie [105]. À



présent, le terme « espèces réactives de l'oxygène » désigne un ensemble plus large de molécules :

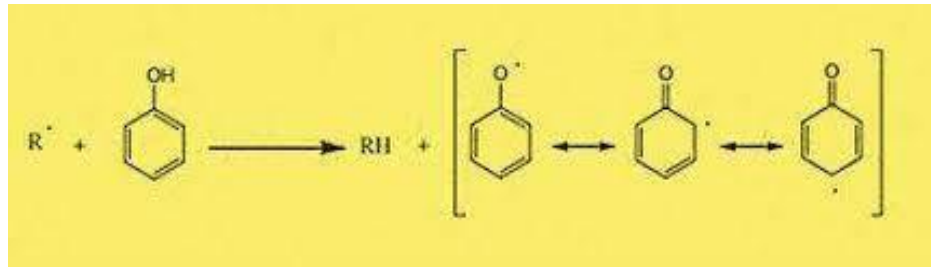
- Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié : (l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , les radicaux hydroxyles  $\text{HO}^\bullet$ , peroxyde  $\text{ROO}^\bullet$ , alkoxyde  $\text{RO}^\bullet$  [106].
- Des dérivés de l'oxygène non radicalaire tels que le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  et le nitroperoxyde  $\text{ONOOH}$ , qui sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux libres [106].

### b. Espèces libres non oxygénés

Les espèces libres non oxygénés sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives oxygénés (ERO). Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs [95].

### VIII.3 Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques sont connus par leurs propriétés antioxydantes dues à leur capacité à piéger et à neutraliser les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène en raison de leurs nombreux groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques, et aussi à la proximité des groupes alkyles [107], ce processus est radicalaire [108]. Les polyphénols interviennent dans l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwani : l'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées [108].



**Figure 7:** Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques [108].

La structure chimique des composés phénoliques est idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils contiennent [109] :

- Des groupements hydroxyles qui sont capables de céder facilement un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- La résonance aromatique qui permet la stabilisation de la structure.

### IX. Activité antimicrobiennes

#### IX.1 Introduction

Les substances antibactériennes sont définies comme des substances qui peuvent tuer les bactéries ou empêcher leur reproduction. L'effet antibactérien dépendra du micro-organisme lui-même, de l'agent antibactérien et de l'environnement dans lequel il agit. Ainsi, lorsqu'une substance antibactérienne empêche les bactéries de se multiplier, on parlera d'effets antibactériens, et lorsqu'elle élimine complètement les bactéries, on parlera d'effets bactéricides [110].

Le traitement de l'infection bactérienne repose principalement sur l'utilisation d'antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces médicaments peut conduire à la sélection de souches multirésistantes, la recherche s'oriente donc vers l'importance de découvrir de nouvelles voies qui sont une source d'inspiration pour de nouvelles herbes [111].

Un certain nombre d'études ont montré que les extraits de plantes utilisés en médecine traditionnelle peuvent fournir des composés qui agissent sur de

nouveaux récepteurs avec de nouveaux mécanismes d'action contre les souches pathogènes multirésistantes. [112].

### IX.2 Les principales substances antimicrobiennes

#### IX.2.1 Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques qui peuvent inhiber la croissance des bactéries ou tuer les bactéries. Ils ont des activités sélectives et spécifiques liées à des mécanismes d'action précis, et sont les armes médicamenteuses principales et les plus efficaces utilisées pour lutter contre les infections bactériennes. [113].

#### IX.2.2 Les composés phénoliques

Un certain nombre d'études in vitro et in vivo ont porté sur l'évaluation des propriétés antibactériennes des polyphénols. À l'heure actuelle, cet effet est affirmatif et a été prouvé par un grand nombre d'études expérimentales. Les flavan-3-ols, les flavonols et les tanins ont une activité antibactérienne à large spectre et forte par rapport aux autres polyphénols, et peuvent inhiber de nombreux facteurs de virulence microbienne, tels que l'inhibition de la formation de biofilm, la réduction de l'adhésion du ligand hôte et la neutralisation. Les toxines bactériennes et leur capacité à travailler en synergie avec certains antibiotiques [114].

Les activités antimicrobiennes de l'oleuropéine, de Hydroxytyrosol et de tyrosol et des autres phénols ont été étudiés in vitro contre beaucoup de micro-organismes pathogènes : bactéries (*S. aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*), mycoplasmes, champignons, virus et protozoaires [115].

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on peut citer :

- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique [116].
- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique [117].
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien.

### X. Intérêt biologiques des produit dérivant des margines

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres qui initient des réactions d'oxydation chaîne destructrices. Les antioxydants peuvent neutraliser ces radicaux libres et empêcher les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.

Les polyphénols préviennent le développement des maladies cancérigènes dans l'organisme en inhibent les réactions oxydatives et empêchant la formation d'ADN anormal [118].

Des études sur le cancer ont montré que les composés phénoliques d'huile d'olive réduisent la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses [119].

La présence de l'Hydroxytyrosol et de quelques polyphénols est corrélée à une réduction de la formation des molécules pro-inflammatoires [120].

L'acide caféique, l'acide férulique ainsi que l'Hydroxytyrosol sont impliqués dans la protection contre les maladies cardiovasculaires. Ils ont pour effet de bloquer l'augmentation de la concentration de  $Ca^{++}$  en réponse à l'oxydation des LDL [121].

**Tableau 12:** Les principales activités biologiques des quatre composés phénoliques majeurs des margines.

Composés phénoliques	Activités	Auteur
Hydroxytyrosol	antimicrobien Antifongique	[122]
	Anti-athérogénique	[123]
	Chemopréventif (cancer) Antioxydant	[124]
	Anti-inflammatoire	[125]
Oleuropéine	Antioxydant Anti-inflammatoire	[126]
	Cardioprotectif Anti-athérogénique	[127]
	Régulation des enzymes	[128]
Oleuropéine aglycone	Antioxydant Antimicrobien	[129]
Tyrosol	Antioxydant Anti-inflammatoire Cardioprotectif Anti-athérogénique	[127]

### I. Matériels et méthodes

La présente étude a été réalisée au sein du laboratoire de recherche «chimie des produits naturels et biomolécules (LCSN-BioM)» de la Faculté des Sciences de l'Université Saad Dahlab Blida 1.

#### I.1 Matériels

##### I.1.1 Matériel végétal (margines)

Les margines utilisées ont été récupérées d'une huilerie moderne qui fonctionne selon un processus d'extraction à trois phases. Cette huilerie est située dans la région de Larbaa de la Wilaya de Blida (Algérie). La collecte des olives a été réalisée pendant la période de cueillette hivernale.

##### I.1.2 Appareillage

**Tableau 13:** L'appareillage utilisé lors de l'expérimentation :

<b>Appareil</b>	<b>Nom</b>
<b>Balance de précision</b>	OHAUS
<b>Etuve</b>	MEMMERT
<b>Évaporateur rotatif</b>	HEIDOLPH
<b>Lampe UV</b>	VL-6.C
<b>HPLC</b>	SCHIMADZU
<b>ATR-FTIR</b>	OMNIC
<b>pH-mètre</b>	OHAUS

## Partie II : Étude Expérimentale

### I.1.3 Réactifs et produits chimiques

Les produits chimiques utilisés sont :

**Solvants organiques** : acétate d'éthyle, hexane, méthanol, chloroforme, isopropanol, acétonitrile, acide acétique.

**Acide** : acide chlorhydrique HCl.

**Sels** : sulfate de magnésium anhydre.

**Autres matériels** : plaque CCM, colonne chromatographique, agitateur magnétique.

**Tableau 14:** Les produits chimiques utilisés dans notre étude.

Solvants	Utilisation
HCl	Extraction des polyphénols
Acétate d'éthyle	
n-hexane	
Chloroforme	Séparation et identification chromatographique sur colonne et sur couche mince
Méthanol	
Acétonitrile	Analyse chromatographique liquide à haute performance (phase mobile)
Acide acétique	
Méthanol	
Eau ultra pur	
Isopropanol	Nettoyage ATR-FTIR

### I.2 Méthodes

#### I.2.1 Détermination des propriétés physico-chimiques de la margine

##### I.2.1.1 Acidité (pH)

La mesure de pH et de l'acidité a été faite par un échantillon de margine brut non diluée. Après étalonnage du pH mètre de type **OHAUS**, l'électrode de mesure de pH a été introduit dans un bécher contenant 30 ml de margines.

##### I.2.1.2 Teneur en eau ou Humidité (TE)

En calculant la différence entre le poids d'échantillon humide et celui sèche.

Un échantillon de 30g de margine a été séché à 105°C pendant 24h puis refroidis dans un dessiccateur, la teneur en eau est exprimée en % de masse.

$$\text{TE (\%)} = \frac{p - p_s}{p - p_0} \times 100$$

- **TE** : teneur en eau (%)
- **p** : masse d'échantillon dans le creuset avant séchage.
- **P<sub>s</sub>** : masse d'échantillon après séchage.
- **P<sub>0</sub>** : masse de creuset vide.

##### I.2.1.3 Matière sèche (MS)

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension contenues dans les margines. La détermination de leur MS consiste à sécher 30 ml de margine dans un creuset placer dans une étuve à 105°C pendant 24 heures. La teneur en matière sèche est exprimée par la relation suivante :

Équation (1).....

$$\text{MS (\%)} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

- **MS**: Teneur en matière sèches en (%).
- **M<sub>2</sub>** : masse des margines après séchage (g).
- **M<sub>0</sub>** : masse du creuset vide (g).
- **M<sub>1</sub>** : masse de l'échantillon dans le creuset avant séchage (g).



## **Partie II : Étude Expérimentale**

### I.2.2 préparation des extraits phénoliques

#### I.2.2.1 Méthode d'extraction des polyphénols à partir des margines brutes :

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

##### I.2.2.1.a Acidification des margines

580 ml de marge est filtrée pour être versée dans un bécher, l'ensemble est agité grâce à un agitateur magnétique. Une quantité suffisante d'une solution d'acide chlorhydrique (2N) été ajoutée pour acidifiée les margines, correspond à un pH=2 alors qu'au début le pH était de 4,7.



**Figure 8:** Acidification des margines.

### I.2.2.1.b Délipidation des margines

La margine acidifiée est versée dans une ampoule à décanter ; 100 ml d'hexane est ajouté. Le mélange subit ensuite une agitation suivie d'une décantation. Les margines délipidées sont recueillies après séparation complète en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (phase aqueuse) prêtes à une extraction liquide-liquide. Cette étape est reprise trois fois. Le dispositif d'extraction liquide-liquide par l'hexane est donné par la **figure 9**.



**Figure 9:** Délipidation de margine avec l'hexane.

### I.2.2.1.c Extraction à l'acétate d'éthyle

L'extraction des composés phénoliques est effectuée dans une ampoule à décanter. La margine délipidée est mélangée avec 100ml d'acétate d'éthyle, le mélange subit ensuite d'une agitation suivie d'une décantation. L'opération d'extraction est répétée trois fois dans le but de récupérer le maximum de composés phénoliques (**figure 10**). La phase organique riche en composés

phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40°C pour éliminer l'acétate d'éthyle.



**Figure 10:** Extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle

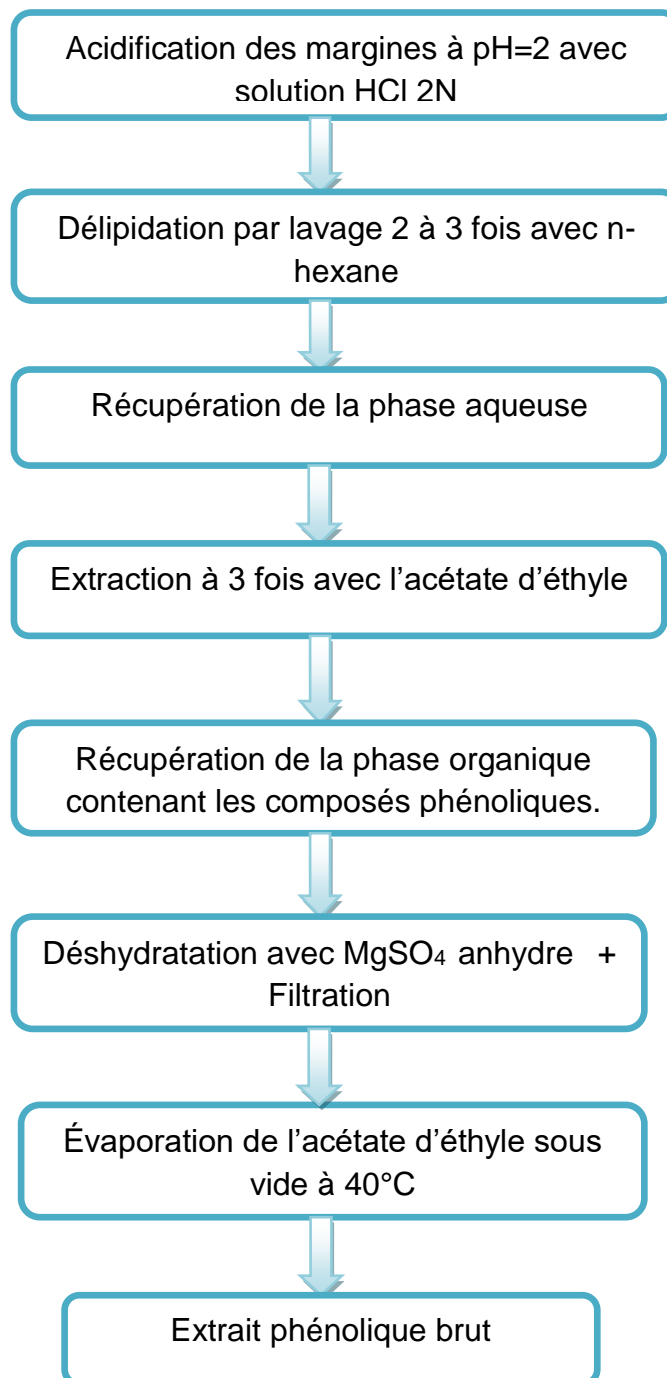
- Le résidu sec a été dissous dans le méthanol et cette solution a été utilisée pour la caractérisation, et le fractionnement des composés phénoliques.

### 1.2.3 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M}{M_0} \times 100$$

- **R (%)** : rendement exprimé en %.
- **M** : masse de l'extrait sec résultant (g).
- **M<sub>0</sub>** : masse en gramme de margines à traiter (g).



**Figure 11:** Procédé d'extraction des composés phénoliques des margines.

### I.2.4 Fractionnement sur colonne chromatographique

Dans le but de réduire la complexité d'un extrait brut et d'identifier les molécules actives, on fait appel au fractionnement qui va permettre de séparer leurs molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

Comme le montre la **figure 12**, une colonne ouverte est envisagée pour le fractionnement. Ainsi, dans un premier lieu du coton est introduit et sera fixé au fond de la colonne, ensuite 210g de silice 60 mélangée avec un volume de chloroforme qui seront introduits dans la colonne

Enfin, 5g de notre extrait phénolique de margine est introduit, et la colonne est prête. Au-dessus de cette colonne une ampoule à décanter a été placée pour verser l'éluant ; tout en commençant avec 100% chloroforme, puis la polarité a été progressivement augmentée avec 95%-5% de méthanol et passer à 90%-10% et par la suite 85%-15% et 80%-20% et terminer avec 100% de méthanol.



**Figure 12:** L'aspect de la colonne chromatographique.

## Partie II : Étude Expérimentale

### 1.2.5 Conservation des fractions

Les fractions sont récupérées par rapport au volume précis, ensuite sont distillées à sec à l'aide du rotavapor. Ces fractions sont conservées dans le méthanol dans des petits flacons en verres (**figure 13**).



**Figure 13:** Fractions récupérées.

### I.2.6 Caractérisation par Chromatographie sur couche mince (CCM)

#### Protocole expérimental :

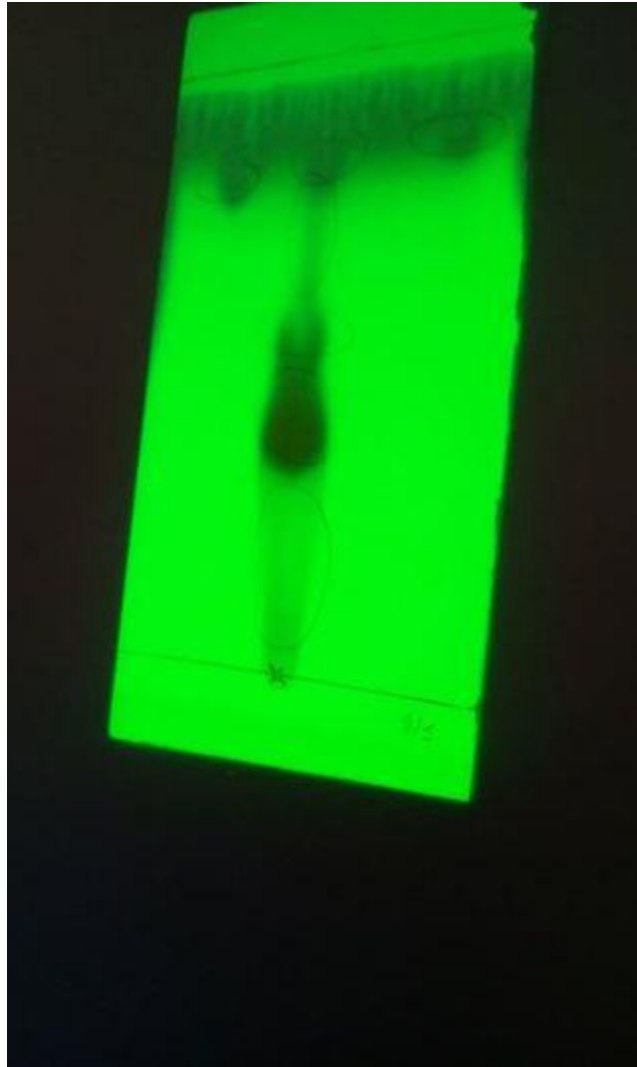
Dans la présente étude, les échantillons sont analysés en utilisant des plaques de gel de silice conditionnées (Silica gel 60G F<sub>254</sub>).

La caractérisation a été effectuée pour l'extrait brut et pour les différentes fractions récupérées (**figure 14-15**).

**Système d'élution utilisés :** Chloroforme /méthanol avec les proportions respectivement : (90% - 10%)

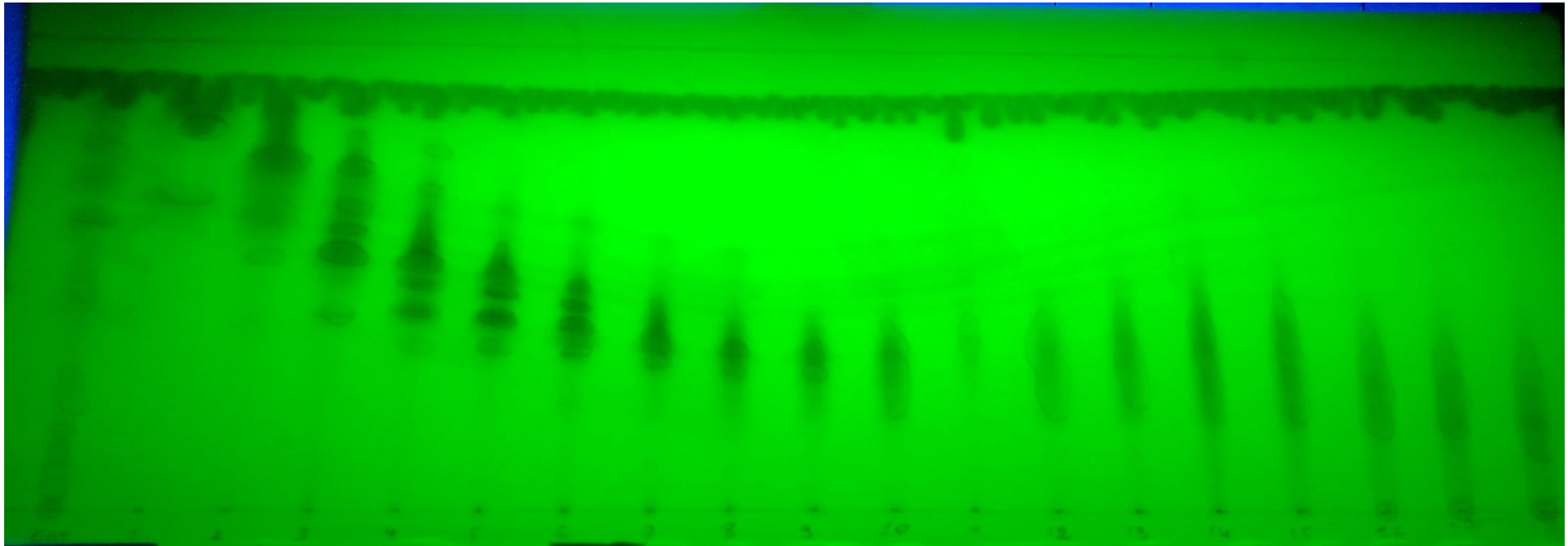
### I.2.7 Révélation de plaque CCM

La révélation a été effectuée en utilisant une lampe UV (VL-6.C / 230V, 50/60HZ).

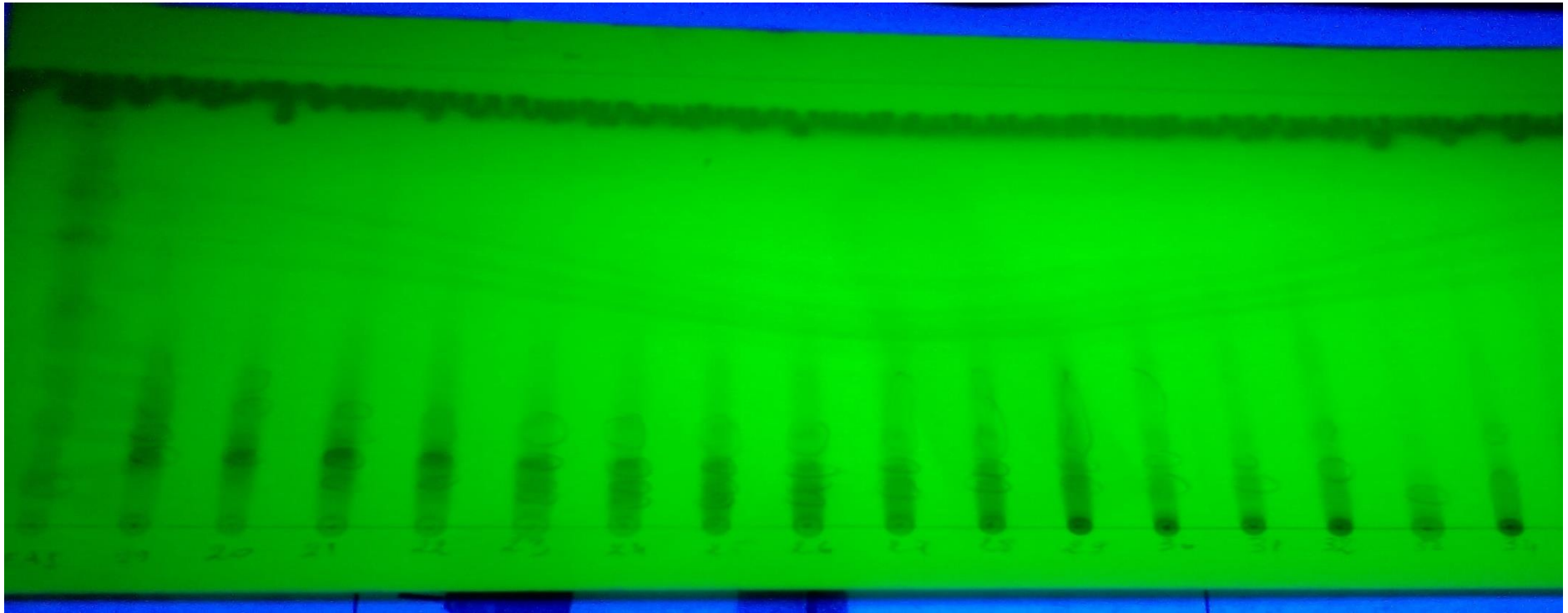


**Figure 14:** Révélation d'extrait sous la lampe UV à 254 nm.





**Figure 15a** : Révélation des fractions sous la lampe UV.



**Figure 15b:** Révélation des fractions sous la lampe UV.

### I.2.8 Caractérisation par HPLC :

La séparation des composés phénoliques dans les extraits de margine a été réalisée par la chromatographie liquide à haute performance.

L'appareil HPLC est caractérisé par :

- ✚ Une pompe avec une pression de 400 bars et un dégazeur DGU-20A3R intégré avec la pompe.
- ✚ Un four de type CTO-20A/20AC avec une température [0-90°C]
- ✚ Un détecteur à indice de réfraction de type RID-20A ayant un volume de la cellule de 9µL et un intervalle d'indice de réfraction de : [1 - 1,75].

L'analyse a été effectuée avec une phase inverse en mode isochratique en utilisant comme mélange d'éluant acétonitrile /méthanol/acide acétique avec (70% ,29%,1%).

Les fractions sont préparées au préalable à une concentration de 60mg/ml pour être injectés par la suite avec un volume de 20µl.

- L'identification des pics de polyphénols à été effectuée en se référant à des étalons : Acide gallique, acide quinique et l'acide pyrocatechol.

### I.2.9 Caractérisation par ATR-FTIR

La caractérisation des différentes fractions a été effectuée en utilisant le logiciel OMNIC ATR-FTIR.

L'appareil est caractérisé par:

- ✚ Un détecteur DTGS-KBr.
- ✚ Une séparatrice XT-KBr.
- ✚ Une source IR (moyen).
- ✚ Un cristal Diamant.

Les conditions opératoires :

- ✚ Une température de 26°C.
- ✚ L'humidité de 45%.

Les conditions d'acquisition des spectres :

- ✚ Nombre de balayage : 32 scans.
- ✚ Résolution : 4cm<sup>-1</sup>
- ✚ Gamme spectrale : 4000-525cm<sup>-1</sup>

### II. Résultat et discussion

#### II.1 Paramètres physico-chimiques

##### II.1.1 Acidité (pH) :

La mesure du pH des margines a donné une valeur de l'ordre de 4,70. Cette valeur se trouve dans l'intervalle de [4,2 – 5,9] citée dans la littérature [51].

Les margines sont donc des effluents acides en raison de la présence des acides organiques (acide phénoliques, acide gras...etc.)

##### II.1.2 Matière sèche :

Les matières sèches des margines sont déterminées par étuvage. Par ailleurs en appliquant la relation citée précédemment (Equation N°1), on obtient :

$$\mathbf{MS = 6,9 \%}$$

Cette valeur appartient à l'intervalle [1,4-17%] selon la littérature [56 ; 57].

##### II.1.3 Teneur en eau ou Humidité (TE)

Le résultat obtenu pour la teneur en eau est de l'ordre de 93,10 %, cette valeur se situe dans l'intervalle de valeurs (83-94%) rapportée dans la littérature [130]. Les taux d'humidité élevés des margines s'expliquent par l'eau existant dans les olives d'une part et d'autre part, par l'eau rajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive [131].

#### II.2 Extraction des polyphénols

##### II.2.1 Acidification des margines:

L'ajout de HCl aux margines a provoqué le changement de la couleur brune rougeâtre vers le rouge clair, ce qui indique une acidification du milieu d'un pH=4,7 vers un pH=2.

### II.2.2 Rendement d'extraction :

R= 0,3379 %

Le rendement obtenu pour l'acétate d'éthyle exprimé en % est de 0,3379% équivalent de 3,4g/l, cette valeur est située dans l'intervalle des valeurs obtenues par les chercheurs (entre 3 et 6g/L) [94].

### II.3 Analyse des fractions obtenues par CCM :

Après plusieurs essais de systèmes de solvants, nous avons adopté, après optimisation, le système suivant : Chloroforme/méthanol (v/v) (9/1). Après développement dans la cuve en verre, la lecture a été faite par observation des sous lampe UV 254 nm.

On remarque que les fractions possèdent un caractère polaire en se référant au système d'élution.

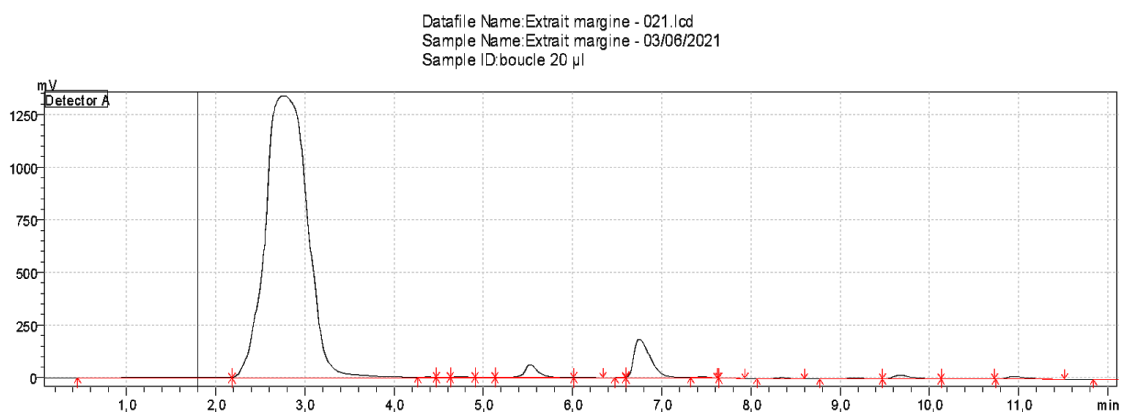
Ensuite, les fractions ayant montré le même profil ont été collectées et regroupées ensembles.

### II.4 Résultat de l'analyse par HPLC

L'identification des composés phénoliques dans les extraits de margines est déterminée par HPLC, en comparaison des temps de rétention relatifs avec ceux des solutions standards.

#### II.4.1 Analyse de l'extrait phénolique

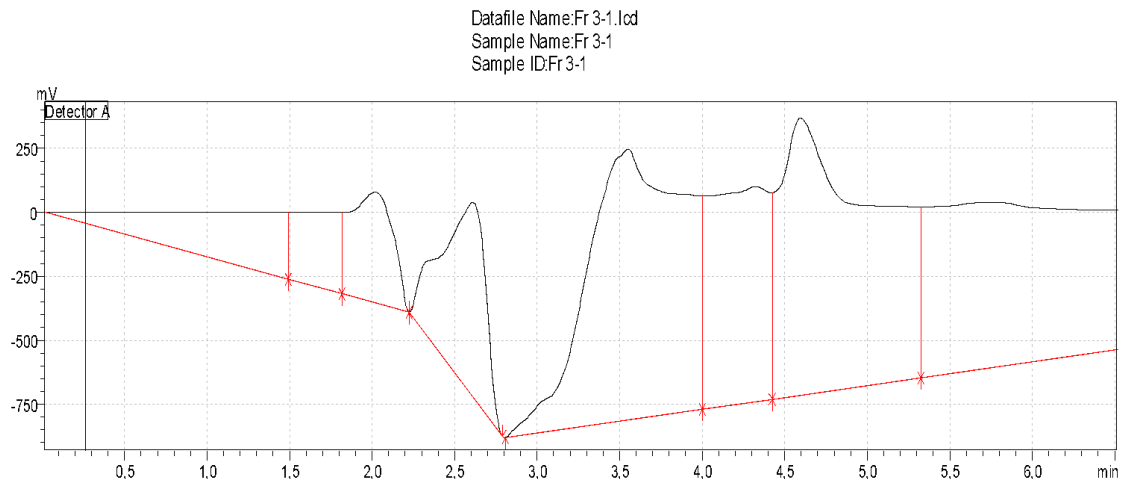
En réalisant l'analyse de l'extrait phénolique des margines, nous avons obtenu le chromatogramme représenté par la **figure 16**.



**Figure 16:** Chromatogramme HPLC de l'extrait de margine (Éluant : Méthanol : 29% ; Acide acétique : 1% ; Acétonitrile : 70%).

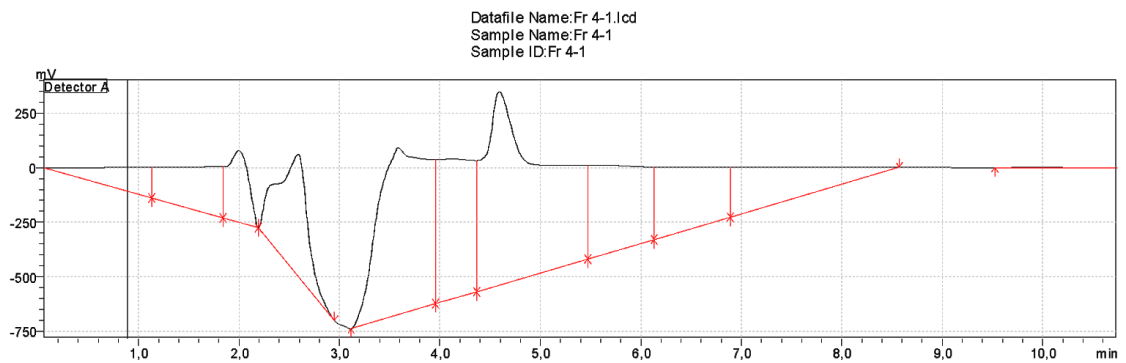
Le chromatogramme de l'extrait phénolique de margine présente 3 pics différents, on constate la présence d'un pic intense et très important à  $t_r = 2,6$  min, suivi de deux pics de faible intensité à  $t_r = 5,5$  min et  $t_r = 6,8$  min. Le pic à  $t_r = 2,6$  min devrait regrouper tous les produits polaires de l'extrait de margine, il semble que l'extrait de margine est en majorité constitué de produits polaires.

### II.4.2 Analyse des fractions



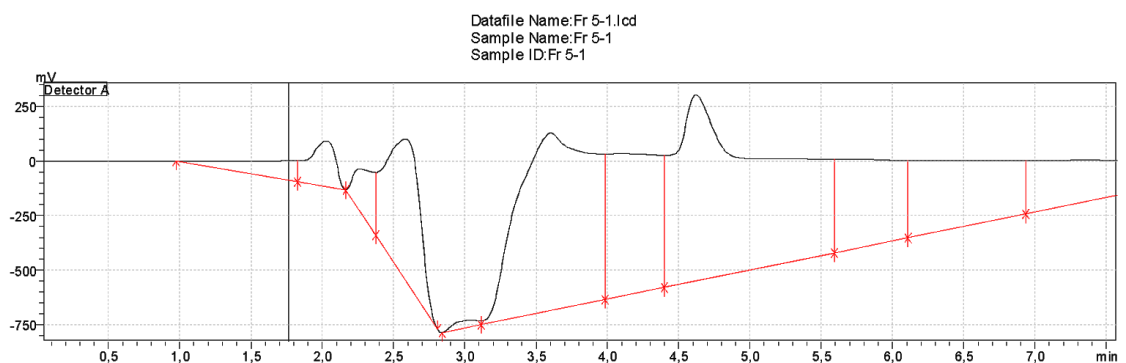
**Figure 17:** Chromatogramme HPLC de la fraction 3 (Éluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

Le profil chromatographique de la fraction 3, dans les conditions ci-dessus citées, révèle la présence d'un seul produit à  $t_r = 4,7$  min, il se pourrait qu'il soit un mélange de produits ayant un caractère polaire au regard des conditions d'analyse.

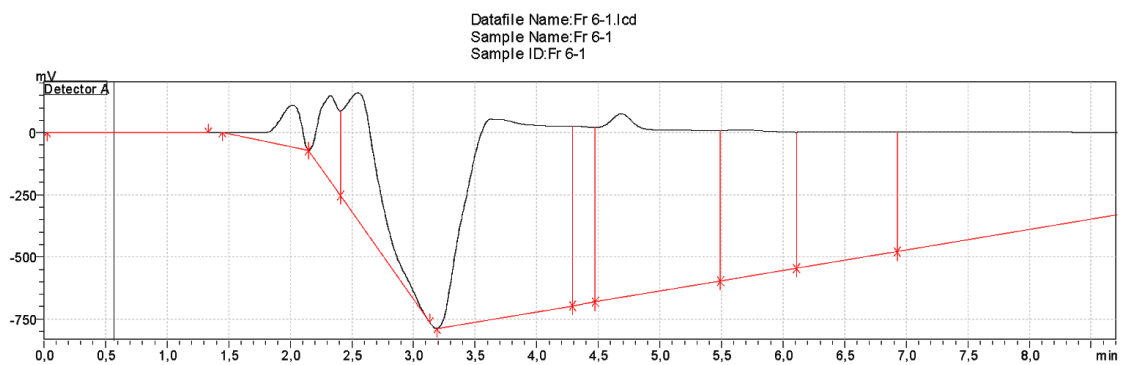


**Figure 18:** Chromatogramme HPLC de la fraction 4 (Éluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

- La fraction 4 est globalement identique à la fraction 3. Le même pic à  $t_r = 4.7$  min apparaît sur le chromatogramme.

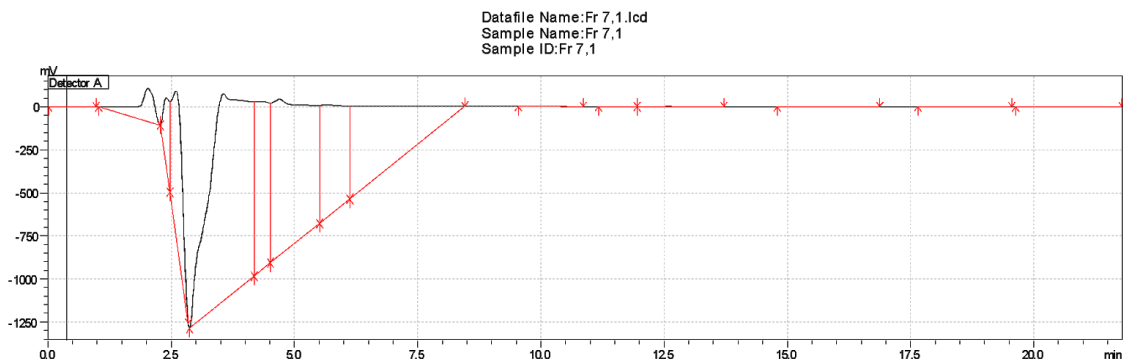


**Figure 19:** Chromatogramme HPLC de la fraction 5 (Éluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

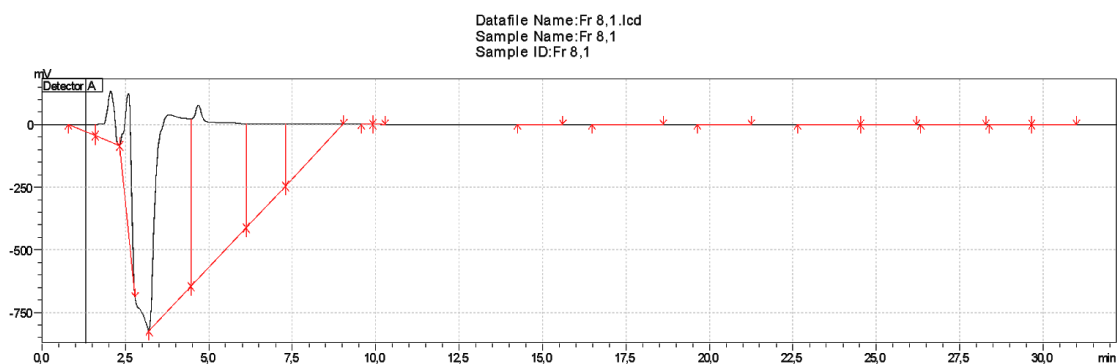


**Figure 20:** Chromatogramme HPLC de la fraction 6 (Éluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

- Les fractions 5 et 6 sont identiques aux fractions 3 et 4 avec la présence du même produit.



**Figure 21:** Chromatogramme HPLC de la fraction 7:(Eluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

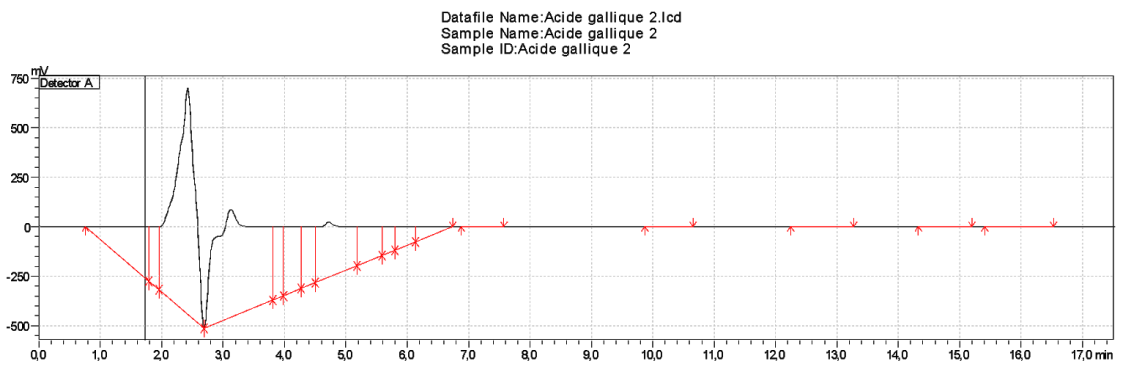


**Figure 22:** Chromatogramme HPLC de la fraction 8 (Eluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

- Les fractions 5 à 8 sont identiques aux fractions 3 et 4 avec la présence du même produit. Par conséquent les fractions de 3 à 8 de composition quasiment similaire peuvent être regroupées.

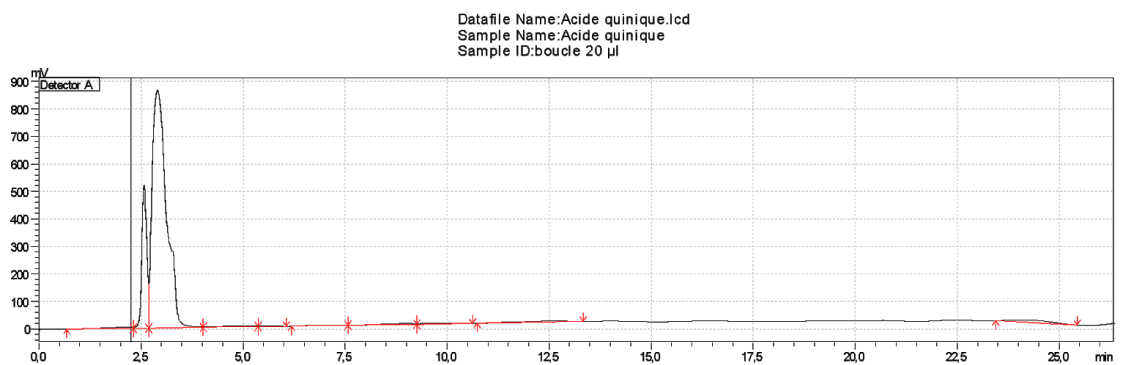


## II.4.3 Analyse des étalons

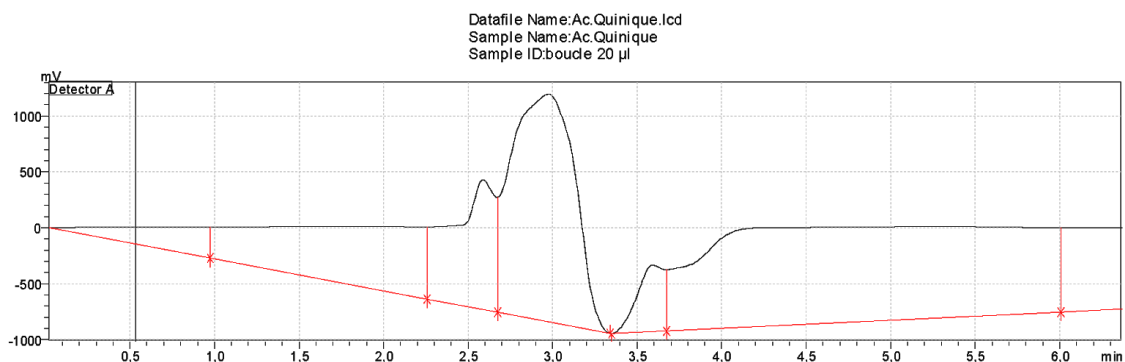


**Figure 23:** Chromatogramme HPLC de l'acide gallique (Eluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

- L'acide gallique analysé dans les mêmes conditions que les fractions 3 à 8 montrent un pic à environ 4.7 min soit exactement au même temps de rétention que celui observé dans les fractions 3 à 8. Par conséquent, le produit (ou mélange) élué à 4.7 dans les fractions 3 à 8 devrait contenir l'acide gallique à l'état pur ou en mélange.

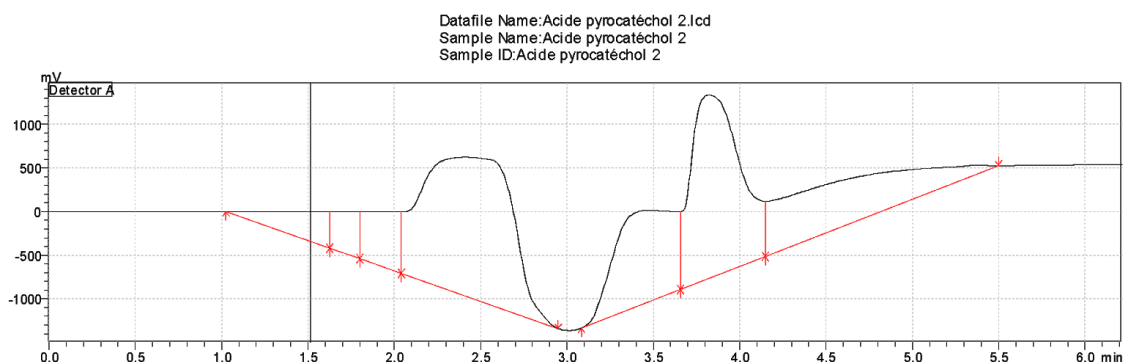


**Figure 24:** Chromatogramme HPLC de l'acide quinique (Eluant : Méthanol 29% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 70%).



**Figure 25 :** Chromatogramme HPLC de l'acide quinique (Eluant : Méthanol 95% ; Acide acétique 5%).

L'acide quinique analysé dans les conditions citées ci-dessus devrait être élué dans le mélange (phase mobile et autre) à 2.7 min (**figure 24 et figure 25**). Il s'avère que les phases mobiles relativement moins polaire utilisées ne lui a pas permis d'être séparé du mélange. Il faut absolument l'injecter avec une phase mobile nettement plus polaire.

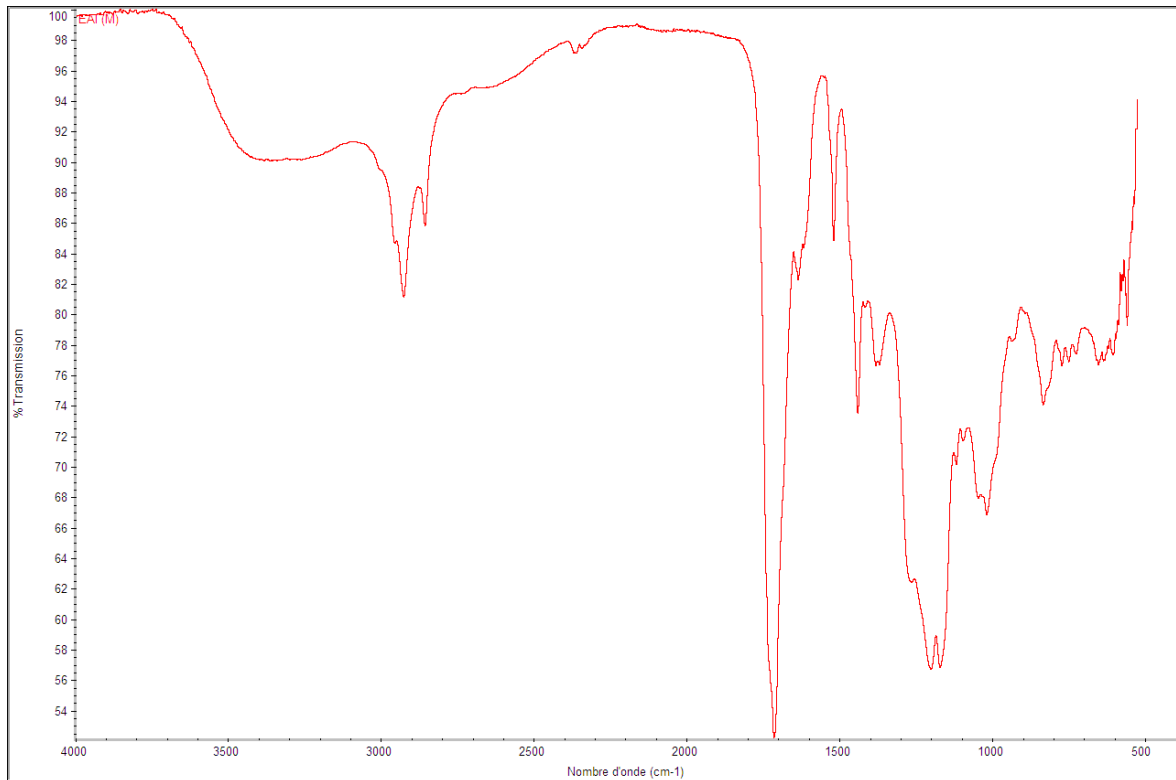


**Figure 26:** Chromatogramme HPLC de l'acide pyrocatechol (Eluant : Eau 50% ; Acide acétique 1% ; Acétonitrile 49%).

L'acide pyrocatechol analysé dans les conditions ci-dessus (**figure 26**) est clairement séparé. Ce sont les conditions relativement correctes pour son analyse CLHP. Etant donné que ce sont les mêmes conditions d'analyse que celles des fractions 3 à 8, il semble que l'acide pyrocatechol ne soit pas présent dans les fractions 3 à 8. Il est nettement plus polaire que les produits des fractions citées.

### II.5 Résultat de l'analyse par ATR-FTIR

Le résultat d'analyse de l'extrait phénolique de margine par ATR-FTIR est représenté par le spectre de la figure 27:



**Figure 27:** Spectre IR de l'extrait phénolique de margines.

#### II.5.1 Région des groupes fonctionnels (4000-1300cm<sup>-1</sup>)

En analysant le spectre obtenu dans cette région on remarque une présence d'une bande large entre 3100cm<sup>-1</sup> et 3700cm<sup>-1</sup> elle représente la fonction OH. Par ailleurs vers 1710cm<sup>-1</sup> une bande intense est remarquée qui représente la présence d'une fonction carbonyle C=O. D'autre part une bande plus ou moins intense vers 2900cm<sup>-1</sup> qui indique la présence d'une elongation C-H qui est aussi indiquée par la bande de forte intensité vers 1400cm<sup>-1</sup>. En effet, une bande forte vers 1300cm<sup>-1</sup> montre une déformation de CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>. Ainsi, une fonction acide a pu être remarquée avec la bande de forte intensité vers 1300cm<sup>-1</sup> indiquant la

présence de la liaison C-O en plus de la bande large d'OH et la présence de C=O interprétées précédemment.

### II.5.2 Région de l'empreinte digitale (1300-900cm<sup>-1</sup>)

On observe une bande moyenne vers 720cm<sup>-1</sup> qui indique la présence d'une déformation de CH<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub>.

Enfin, en faisant une interprétation sur le spectre IR, on pourra déduire que notre extrait est caractérisé par :

- La présence de fonction alcène et de noyau aromatique.
- La présence d'alcane.
- La présence de fonction acide.
- La présence de fonction alcool.

## **Conclusion générale**

- Les margines sont caractérisées par leur contenu phénolique important.
- Les polyphénols sont des substances bioactives qui suscitent actuellement l'intérêt de plusieurs chercheurs en raison des bénéfices de santé qu'ils procurent à l'homme, effet antioxydant et effet antimicrobien.
- Les margines sont des effluents moyennement acides, riches en eau, en charge organique et plus particulièrement en polyphénols.

L'objectif de notre travail était d'étudier les margines de façon générale par leurs propriétés physico-chimiques et ensuite les polyphénols qui les constituent de façon spécifique par HPLC et par ATR-FTIR.

Nous avons étudiés :

- Quelques paramètres physico-chimiques des margines.
- On a préparé un extrait phénolique en passant par une extraction liquide-liquide de margines.
- L'extrait phénolique a été fractionnés grâce à une chromatographie sur colonne, les fractions similaires chimiquement ont été collectées ensembles et sont directement dirigées pour une analyse par HPLC puis par ATR-FTIR.

La détermination de l'acidité de margine montre un caractère acide avec une valeur de (pH=4,7).

L'extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle nous a permis de récupérer un bon rendement (0,33%) équivalent à 3,37g/L.

On a constaté grâce à l'HPLC que l'extrait de margine est en majorité constitué de produits polaires. D'autre part, grâce aux étalons testés pour essayer d'identifier les composés des fractions, l'acide gallique a été identifié, et donc une des fractions pourrait le contenir.

Grace à l'analyse par ATR-FTIR, on a confirmé la présence de polyphénols dans les extraits de margines par la présence de noyau aromatique et la bande de OH et du carbonyle C=O.

## ***Conclusion générale***

Dans le but de progresser dans ce domaine, il est indispensable :

- d'identifier les différents composés phénoliques présents dans les margines ainsi que leur structure afin d'élucider le rapport structure et activité biologique.
- Déterminer la composition quantitative par des méthodes appropriées notamment la HPLC.

## Références bibliographiques

- [1]: IBoukhoulef., H. «Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancée basé sur le système fenton-like (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cu)» Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie, (2014).
- [2]: Huang, C.L., Sumpio B. E., «Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health». J Am Coll Surg, V.3, (2008), 407-416.
- [3]: Tsagaraki, E., Lazarides, H. N., & Petrotos, K. B. «Olive mill wastewater treatment». In Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food Industry, (2007), 133-157.
- [4]: Senani-oularbi, N. «Etude des activités anti-oxydante, antifongique et hypoglycémiantes des margines d'olives et de leur extrait phénolique. Applications sur matrice alimentaire et sur modèle murin et cellulaire ». Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie, (2018).
- [5]: Benyahia N et Zein K., «Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées». Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) (SBA) à Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II), (2003) ,1-8
- [6]: El Hadrami A., Belaziz M., El Hassni M., Hanifi S., Abbad A., Capasso R., Gianfreda L., El Hadrami I. «Physico-chemical characterization and effects of olive oil mill wastewaters fertirrigation on the growth of some Mediterranean crops». Journal of Agronomy, V.3, n°4, (2004), 247-254.
- [7] : Moussaoui R., «Valorisation des sous produits de l'huilerie d'olive : grignons et margines». Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie, (2007), p133
- [8] : Roig A., Cayuela M. L., Sánchez-Monedero M. A. «An overview on olive mill wastes and their valorisation methods». Waste Management, V.26, (2006), 960-969.
- [9]: Rodis P. S., Karathanos V. T., Mantzavinou A., «Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases». Journal of Agricultural and Food Chemistry, V.50, (2002), 596-601.

## Références bibliographiques

- [10]: Gamel T.H. et Kiritsakis A. «Effect of methanol extracts of rosemary and olive vegetable water on the stability of olive oil and sunflower oil». *Grasas y Aceites*, V.50, (1999), 345-350.
- [11]: Belaid.C., Kallel.M. et Elleuch.B. «Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines)». *Déchets sciences& technique*, V. 27, (2002) ,30-34.
- [12]: Bianco. A, Uccella.N. «Biophenolic components of olives», *Food Research International*, V.33, (2002), 475-485.
- [13]: Liphschitz, N., Gophna, R., Hartman, M., & Biger, G. «The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the Old World: a reassessment». *Journal of Archaeological Science*, V.18, n°4, (1991), 441-453.
- [14] : Artajo L. S., Romero M-P., Suárez M., Motilva M-J., . «Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process». *European Food Research and Technology*, V.225, (2007), 617-625
- [15]: Ryan, D., Robards, K., & Lavee, S. «Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, V.832, n°1-2, (1999). 87-96.
- [16]: Cuéllar L. R., «Catalogue mondial des variétés d'olivier». Conseil Oléicole International. Madrid (Espagne), (2000). 360 p
- [17]: Fouin, J., Sarfati, C., & Guillard, J. «Le guide des huiles d'olive». Ed. Du Rouergue. (2002), 335 p
- [18]: Ghedira K., « L'olivier». *Phytothérapie*, V. 6, (2008), 83-89
- [19]: Bruneton J. «Pharmacognosie- Phytochimie- Plantes médicinales». 3<sup>ème</sup> édition. Technique et Documentation, Paris (1999).
- [20]: Spichiger .E., al. «Botanique systématique des plantes à fleurs». Edition Presses polytechniques et universitaires romandes. 2eme édition, (2002) ,418 p



## Références bibliographiques

- [21]: Dupont F.J., L. Guignard. «Botanique systématique moléculaire». Edition Elsevier Masson. 14 éditions révisées. (2007), 285 p.
- [22] : Brousse G., Loussert R. «L'olivier». Maisonneuse la rose, Paris, (1978).
- [23]: Huang C. L, Sumpio B. E., «Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health». J Am Coll Surg, V.3, n° 207, (2008), 407-416.
- [24]: Nefzaoui, A. «Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie». Étude FAO production et santé animales. P, (1984). 1-121.
- [25] : Bouyoucef-barr Djamila ., Moussouni Akli. «Enjeux De La Filière Oléicole En Algérie Et Axes De Développement Dans Le Nouveau Contexte Mondial». Revue des reformes Economique et intégration dans l'économie mondiale. V.9, n°18, (2014), 262-283.
- [26]: E.Tsagariki, N.Harris, Lazarides, B.P. Konstantinos, «Olive mill waste water treatment», Springerlink, (2009), 133-157.
- [27]: Labdaoui, D. «Impact socio-économique et environnemental du modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilités de sa diffusion dans la région de Bouira (Algérie)».Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Babis, Mostaganem, Algérie. (2017).
- [28]: Amouretti. M-C., Comet. G., « Le livre de l'olivier», édition Edisud., (1985), 173.
- [29] : Espiard Etienne., «Introduction à la transformation industrielle des fruits», éditions TEC et DOC. (2002).
- [30]: Boskou. D. «Olive oil»: chemistry and technology, edition AOCS Press. (1996).
- [31]: Aggoun-Arhab, M. «Caractérisation de la composition en micro constituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière».Thèse de Doctorat, Institut National de

## Références bibliographiques

l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaire (INATAA), Constantine, Algérie). (2016).

[32]: Cuellar. L.R. «Amélioration de la qualité de l'huile d'olive», Collection : Manuel pratique (Conseil Oléicole International). (1990)

[33]: Boskou Dimitrios,. «Olive Oil Chemistry and technology», 2<sup>ème</sup> Edition, AOCS Press. (2006).

[34]: Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J., «Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes». Appl Microbiol Biotechnol, V.82, (2009). 25-39.

[35]: Foin Julien., Claude Sarfati. « Le guide des huiles d'olive».édition du Rouergue. (2002).

[36] : Hammadi Chimi,. «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. (2006).

[37] : El Hajjouji Houda. «évolution 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). (2007).

[38] : Benyahia.N., Zein.Karim, «Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de « Sustainable Business Associates » à l'atelier «Pollution and Developement issues in the Mediterranean Basin», 2ème Conférence Internationale « Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries » (SESEC II) à Lausanne, Suisse (2003).

[39]: Niaounakis\_ M., Halvadakis. «C.P, Olive Processing Waste Management», 2nd Edition, Elsevier, (2006).

[40]: Chouchene, A., Jeguirim, M., Favre-Reguillon, A., Trouvé, G., Le Buzit, G., Khiari, B., & Zagrouba, F.«Energetic valorisation of olive mill wastewater

## Références bibliographiques

impregnated on low cost absorbent: Sawdust versus olive solid waste». *Energy*, V.39, n°1, (2012), 74-81.

[41]: Nefzaoui Ali, «Valorisation des sous-produits de l'olivier», CIHEAM-Options méditerranéennes. Série séminaires (1991), 61-65.

[42]: Chimi, H. «Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité». *Bulletin de transfert de technologie, MADRPM/DERD*, (2006), 141 p.

[43]: CNUCED, Huile d'olive site Internet:  
<http://r0.unctad.org/infocomm/francais/olive/technologie.htm>

[44]: Chiofalo, B., Liotta, L., Zumbo, A., & Chiofalo, V. «Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition». *Small Ruminant Research*, V.55, n° (1-3), (2004). 169-176.

[45]: Moussaoui R., «Valorisation des sous produits de l'huilerie d'olive : grignons et margines». Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie, (2007), 133pp.

[46]: Fiestas Ros d'Ursinos., al. «Valorisation des sous-produits de l'olivier». *Fellah trade plateforme d'information et service agricole* (1983).

[47]: Lesage-Meessen. L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J-C., Lorquin, J., Delattre M., Simon J-L. et Labat M. «Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems». *Food Chemistry*, V.75, (2001), 501-507

[48]: Takaç, S., & Karakaya, A. «Recovery of phenolic antioxidants from olive mill wastewater». *Recent Patents on Chemical Engineering*, V.2, n°3, (2009), 230-237.

[49]: Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G. «Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity». *Bioresource Technology*, V.84, (2002), 251-257

[50]: Eroglue E., Eroglu I., Gunduz U. and Yucel M. «Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater». *Bioresource Technology*, V.99, (2008), 6799-6808.

## **Références bibliographiques**

- [51]: Akar T., Tosuni I., Kaynak Z., Ozkara E., Yeni O., Sahin EN. and Akar ST. «An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace». *J. Hazard. Mater.* V.166, (2009), 1217–1225.
- [52]: Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F. and Michaud P. «Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies». *Process Biochemistry.* V.48, (2012), 1532-1552.
- [53]: EL Hajjouji H., Ait Baddi G., Yaacoubi A., Hamdi H., Winterton P., Revel J.C. and Hafidi M. «Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater». *Bioresource Technology.*, V.99, (2008), 5505-5510
- [54]: DI Serio M. G., Lanza B., Mucciarella M. R., Russi F., Iannucci E., Marfisi P. and Madeo A. «Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical and microbiological characteristics of soil. Inter». *Biodeter. & Biodegr.*, V.62, (2008). 403-407.
- [55] : Lutwin B., Fiestas Ros De Ursinos J.A., Geissen K., Kachouri M., Klimm E., De Ladorde Monpezat G., Xanthoulis D. «Les expériences méditerranéennes dans le traitement et l'élimination des eaux résiduaires des huileries d'olives», Editions (GTZ) GmbH, Eschborn. République Fédérale d'Allemagne. (1996).
- [56]: Zbakh, H., El Abbassi, A. «Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review». *Journal of Functional Foods*, V.4, n°1, (2012), 53-65.
- [57]: Fki, I., Allouche, N., & Sayadi, S. «The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants». *Food Chemistry*, V.93, n°2, (2005), 197-204.
- [58]: Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M., & Penninckx, M. J. «Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters». *Enzyme and microbial technology*, V.33, n°6, (2003), 802- 809.

## **Références bibliographiques**

[59]: De Ursinos, J. F. R., & Padilla, R. B. «Use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain». *Grasas y aceites*, V.43,n°2, (1992), 101-106

[60] : Hamdi, M. «Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive.» Thèse de Doctorat, Université de Provence. (1991).

[61]: Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G., & Cascio, B. L. «Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf) .germinability». *Chemosphere*, V.50, n°8, (2003), 959-966.

[62]: Aktas E. S., Imre S., Ersoym L., «Characterization and lime treatment of olive mill wastewater». *Water Research*, V.35, n°9, (2001), 2336-2340.

[63]: Hamdi M., «Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion». *Appl Biochem Biotechnol*, V.37, (1992), 155 p.

[64]: Paixão S. M., Anselmo A. M., «Effect of olive mill wastewaters on the oxygen consumption by activated sludge microorganisms: An acute toxicity test method». *Journal of Applied Toxicology*, V.22, (2002), 73-176.

[65]: Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruañas R., Garan M. A., «Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal». *Sci Total Environ*, V.279, (2001), 207-214.

[66]: Lacomelli A., «Olive mill waste water & SAP adopted by BACRON contracting parties. Work Shop on Agro-industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry». Beirut- Lebanon, 4-6 December. (2000).

[67]: Mechichi T., Sayadi S., «Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters». *Proc Biochem*, V.40, (2005), 139-145.

[68]: Fiorentino A., Gentili A., Isidori M., Monaco P., Nardelli A., Parrella A., Temussi F., «Environmental effects caused by olive mill wastewaters: Toxicity

## ***Références bibliographiques***

comparison of low-molecular-weight phenol components». *Journal of Agricultural Food Chem.*, V.51, (2003), 1005- 1009.

[69]: Mekki, A., Dhouib, A., & Sayadi, S. «Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth». *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, V.2, n°1, (2013), 1-7.

[70]: Saadi, I., Laor, Y., Raviv, M., & Medina, S. «Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity». *Chemosphere*, V.66, n°1,(2007), 75-83.

[71]: Chowdhury, A. K. M. M. B., Akratos, C. S., Vayenas, D. V., & Pavlou, S. «Olive mill waste composting: a review». *International Biodeterioration & Biodegradation*, V. 85, (2013), 108- 119.

[72]: José, A., Lorite, M., Jiménez, J., & Castro, E. «Valorisation of wastewater from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production». *Journal of Hazardous Materials*, V.169, n°1-3, (2009), 271-278.

[73]: McNamara C. J., Anastasiou C. C., O'Flaherty V., Mitchell R., *Bioremediation of olive mill wastewater. Int Biodet Biodeg*, V.61, (2008), 127-134.

[74]: Edeline F. *L'épuration physico-chimique des eaux. Théorie et technologie.* Edition Cebedoc, Lavoisier. (1992).

[75]: Roig A., Cayuela M. L., Sánchez-Monedero M. A. «An overview on olive mill wastes and their valorisation methods». *Waste Management*, V.26, (2006), 960-969.

[76]: Vlyssides A. G., Loizides M., Karlis P. K., «Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products». *Journal of Cleaner Production*, V.12, (2004), 603-611.

[78]: Tao L., Lambert J.D. «Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer». *Polyphenols in Human Health & Disease.*, V.2, (2014), 1191-1198.

## Références bibliographiques

- [78]: Williamson G., Manach .C. «Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II». Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* V.81, (2005), 243S-255S.
- [79]: Dacosta .Y. «Les phytonutriments bioactifs». Ed Yves Dacosta. Paris, (2003), 317 p.
- [80]: Gee J.M., Johnson I.T. «Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health». *Current Medicinal Chemistry*, V.8, (2001), 1-182.
- [81]: Macheix J-J., Fleuriet A., Jay –Allmend C. «Les composés phénoliques des végétaux .collection biologie». Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. (2005).
- [82]: Habauzit. V.,Horcajada M.N. «Phenolic phytochemicals and bone». *Phytochem Rev.*, V.7, (2008), 313–344.
- [83]: Middleton, E., Kandaswami, C.,Theoharides, T.C. «The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer». *Pharmacol Rev.*, V. 52, (2000), 673-839.
- [84]: Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., ABDELLY.C. « Salinity effects on polyphenol content and antioxidant Activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant» Physiol Bioch*, V .45 , (2007), 244-249
- [85]: Pulido R., Bravo L.,Saura-Calixto F. «Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay». *J Agric Food Chem.*, V.48, n° 8, (2000), 3396-402.
- [86]: Leong LP., Shui G. «An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets». *Food Chem.*, V. 76, (2002), 69-75.
- [87]: Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. « Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif». *Phytothérap.* Springer-Verlag, V.1, (2004), 3-6

## ***Références bibliographiques***

- [88]: Balasundram N., Sundram K., Samman S. «Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential use». *Food Chem.*, V.99, (2006), 191–203.
- [89]: Hennebelle, T., Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. «Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*». *Biochem. Syst. Ecol.*, V.35, (2007), 624-626.
- [90]: Ranalli A. «The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation». *Olivae*, V.37, (1991), 30-39.
- [91]: Bendinin A., Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A., Ana Maria Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernandez- Guierrez A. and Lercker G. «Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods». An overview of the last decade. *Mol.*, V.12, (2007), 1679-1719.
- [92]: Aissam., H. «Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase». Thèse de doctorat national. Université sidi Mohamed ben Abdallah. Fès. (2003), 156 p.
- [93]: EL hajjouji H., Fakharedine N., Baddi G.A., Winterton P., Bailly J.R., Revel J.C. Et Hafidi M. «Treatment of olive mill waste water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy». *Bioresource Technology*. V.98, (2007), 3513-3520
- [94]: Azabou S., Najjar W., Gargoubi A., Ghorbel A. and Sayadi S. «Catalytic wet peroxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants: Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in model and real effluent». *Applied Catalysis B: Environmental*. V.77, (2007), 166-174.
- [95]: Vazquez R.A., Maestro D.R., Graciani C.E. «Compentes fenolicos de la aceituna.II». *Polifenoles del alpechin. Grasas y Aceite*. V. 25, (1974), 341-345.



## **Références bibliographiques**

- [96]: Cichelli A. et Solinas M. « I composti fenolici delle olive e dell'olio di oliva ». Riv. Merceol. V.23, (1974), 55-69.
- [97]: Boumred., S «Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales». Thèse de magister, Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach-Alger. (2011). 160 p.
- [98]: Halliwell B. «How to characterize a biological antioxidant». Free Radical Research Communication, V.9, (1990), 1-32.
- [99]: Magalhães L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. F. C. «Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties». Analytica Chimica Acta, V.613, (2008), 1-19
- [100]: Mohammedi Z. «Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen». Thèse magistère, Univ. Abou bakr belkaïd Tlemcen, Faculté des sciences, (2006), 155 p.
- [101]: Berset C. et Cuvelier M.-E. «Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant = Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power». Scien. des alim. V.16, n° 3, (1996), 219-245.
- [102]: Nassif D. «Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales». Mémoire DEA, IRAL (Liban), (2004), 40 p.
- [103]: Helme J-P, Chazan J-B., Perrin J-L., «Les antioxydants, 337-352 in Martini M-C et Seiller M. Actifs et additifs en cosmétologie». Edition Tec & Doc (Paris), (1999), 656 p.
- [104]: Martinez-Cayueta, M. «Oxygen free radicals and human disease». Biochimie, V.77, n°3, (1995), 147-161.

## Références bibliographiques

- [105]: Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. «Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease». *The international journal of biochemistry & cell biology*, V.39, n°1, (2007), 44-84.
- [106]: Favier, A. «Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique». *Actualité chimique*, (2003), 108-115.
- [107]: Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. «Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids». *Free radical biology and medicine*, V.20, n°7, (1996), 933-956.
- [108]: Sökmen, B. B., Aydın, S., & Kınalıoğlu, K. «Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb)». *Norman. IUFS Journal of Biology*, V.71, n°1, (2012), 43-51.
- [109]: Dai, J., & Mumper, R. J. «Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties». *Molecules*, V.15, n°10, (2010), 7313-7352
- [110]: MEYER A., DEIANA J. «Cours de microbiologie générale». Doin éditeurs, paris. (1988), 201-224.
- [111]: Billing J., Sherman P.W. «Antimicrobial function of spices». *Quarterly Review of Biology*, V.73, (1998), 3-49.
- [112]: Clements J.M., Coignard F., Johnson I., Chandler S., Palan S., Waller A., Wijkmans J., Hunter M.G. «Antibacterial activities and characterization of novel inhibitors of LpxC». *Antimicrob. Agents Chemother*, V.46, n° 6, (2002), 1793- 1799.
- [113]: Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. and Ouar Korich M.N. «Classification et mode d'action des antibiotiques». *Médecine du Maghreb*, n° 91, (2001).
- [114]: Daglia M. «Polyphenols as antimicrobial agents». *Current Opinion in Biotechnology*, V.23, (2011), 1-8.
- [115]: Baidez A.G., Gomez P., Del Rio J.A. and Ortuno A. «Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora*

## Références bibliographiques

megasperma Drechsler and *Cylindrocarpon des tructans* (Zinssm.) Scholten». *Physiol Mol Plant*, V.69, n° (4-6), (2007), 224-229.

[116]: Hilliard J.J., Krause H.M., Bernstein J.I., et autre. «A comparison of active site binding of 4- quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase». *Adv. Exp. Med. Biol*, V.390, (1995), 59-69

[117]: Tsuchiya H., Inuma M. «Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*». *Phytomedicine*. V.7, (2000), 161- 5.

[118]: Ross R. «Atherosclerosis, inflammatory diseases». *New England Journal of Medicine*. V.340, n° 2, (1990), 115-126

[119]: Nkondjock A., Shatenstein B., Maisonneuve P., Ghadirian P. «Assesment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case control study». *International journal of Epidemiology*. V.32, n°2, (2003), 200-209

[120]: Viera O., Laranjinha J., Madeira V. «Cholesterly ester hydroperoxyde formation in myoglobin-catalysed low-density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate». *Biochemical pharmacology*. V.55, n° 3, (1998), 333-340

[121]: Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. «Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolite secondaire d'importance économique)». Edition technique et documentation, Lavoisier. (2005).

[122]: El-Abbassi, A., Saadaoui, N., Kiai, H., Raiti, J., Hafidi, A. «Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection». *Science of the Total Environment*, V.576, (2017), 10-21.

[123]: Leger, C. L., Carbonneau, M. A., Michel, F., Mas, E., Monnier, L., Cristol, J. P., & Descomps, B. «A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes». *European journal of clinical nutrition*. V. 59, n°5, (2005), 727-730.

## Références bibliographiques

- [124]: Bassani, B., Rossi, T., De Stefano, D., Pizzichini, D., Corradino, P., Macrì, N., ... & Bruno, A. «Potential chemopreventive activities of a polyphenol rich purified extract from olive mill wastewater on colon cancer cells». *Journal of Functional Foods*, V.27, (2016), 236-248.
- [125]: Richard, N., Arnold, S., Hoeller, U., Kilpert, C., Wertz, K., & Schwager, J. «Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages». *Planta medica*. V. 77, n°17, (2011), 1890-1897.
- [126]: Bedouhene, S., Moulti-Mati, F., Dang, P. M. C., & El-Benna, J. «Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced neutrophil degranulation and chemotaxis via AKT, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition». *Inflammopharmacology*. V. 25, n°6, (2017), 673-680.
- [127]: Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C. «Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages». *Life sciences*, V.62, n°6, (1998), 541-546.
- [128] : Polzonetti, V., Egidi, D., Vita, A., Vincenzetti, S., & Natalini, P. «Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways». *Food chemistry*, V.88, n°1, (2004), 11-15.
- [129]: Briante, R., La Cara, F., Tonziello, M. P., Febbraio, F., & Nucci, R. «Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic  $\beta$ - glycosidase». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V.49, n°7, (2001), 3198-3203.
- [130]: Noubikh.A., Abderrabba.M., Provist.E. «Temperature and addition effects on the solubility behavior of some phenolic compounds in water J». *Chem. Thermody*. V.39, (2007), 297-303.
- [131]: Procida .G., Ceccon.L. «Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters». *Anal. Chim. Acta*. V.561, (2006), 103-106.