

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
Ecole Nationale Polytechnique

Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'environnement

**Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du diplôme  
d'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement**

Thème

**Extraction des polyphénols à partir de  
rejets d'huileries**

**Présenté par :**  
M. ZIGHED Mohammed

**Dirigé par :**  
Pr. GRIB Hocine.  
Dr:FERGUANE Amel.

*Soutenue le 16 Juin 2015 devant le jury composé de:*

Pr. MAMERI Nabil .....Président  
Pr. ABDI Nadia .....Examinateur  
Pr. GRIB Hocine.....Promoteur

*Dédicaces*

*À mes chers parents*

*À mes neveux Louai Abderrahmane, Asma, Adem, Rokaia et Bayane*

*À mes sœurs et à leur tête Saida*

*À toute ma famille*

*À mes amis et mes collègues*

*À mon ami Tarik Chibane*

*À tous ceux qui aiment la Science*

## *Remerciement*

*Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr Grib Hocine, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseil et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mr Mameri Nabil, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique et membre de l'académie scientifique d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Mme Abdi Nadia, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Aux personnels de l'Unité de Recherche en Ingénierie et Environnement (URIE) pour leur aide, en particulier Mlle L. Bensadallah, Mme R. Chemlal et Mr M. Hariti pour leur aide.*

*Aux personnels du Laboratoire BEKER, en particulier Mr Hakim Z.*

*À tous les étudiants de la promotion du Génie de l'Environnement 2015.*

*À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.*

*À tous mes amis.*

## ملخص:

تقذف معاصر الزيتون كميات هائلة من المستخرجات الثانوية و خاصة مياه عصر الزيتون (الزيبار) وثقل الزيتون التي ليست ذات أهمية اقتصادية كبيرة في الجزائر. يهدف هذا العمل الى استخلاص و تقييم المركبات الفينولية المتواجدة في هذه البقايا كما قمنا بالبحث عن تأثير بعض العوامل على مردود الاستخراج و تحديد الشروط العملية المثلى لهذه العملية. الكلمات الأساسية: ثقل الزيتون, الزيبار, استخلاص, مركبات الفينول, المردود

## Résumé :

Les huileries rejettent dans la nature des quantités énormes des sous-produits, particulièrement les margines et le grignon d'olive qui ont peu de valeur économique en Algérie. La présente étude a pour objectif l'extraction et ensuite l'évaluation quantitative des composés phénoliques contenus dans les extraits des rejets d'huileries. Nous avons également étudié l'influence de certains facteurs sur le rendement d'extraction des polyphénols en recherchant les conditions opératoires favorables pour le fonctionnement de ce procédé d'extraction.

**Mots clés :** Grignon d'olive, margine, extraction, composés phénoliques, rendement.

## Summary:

Oil mills discharge huge amounts of by-products in nature, particularly olive mill wastewaters (OMWW) and olive pomace that have little economic value in Algeria. The aim of this work is the extraction and quantification of phenolic compounds contained in the discharges of oil mill. We have also studied the effect of certain operative parameters on the polyphenols's extraction

**Key words:** olive pomace, olive mill wastewaters, extraction, phenolic compounds, yield.

## Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

### Chapitre I : L'industrie oléicole

I Description botanique de l'olivier .....	2
II Composition des olives .....	2
III Verger oléicole mondial .....	4
IV Production mondiale d'huile d'olive : .....	4
V Les huileries et processus technologiques d'élaboration de l'huile d'olive .....	6
V.1 Récolte .....	6
V.2 Effeillage et lavage .....	6
V.3 Broyage .....	6
V.4 Malaxage .....	6
V.5 Séparation des phases (extraction) .....	7
V.5.1 Système discontinu d'extraction par presse .....	7
V.5.2 Système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases.....	7
V.5.3 Procédé continu à deux phases ou procédé écologique .....	7
VI L'huile d'olive .....	9
VI.1 Définition .....	9
VI.2 Les différents types d'huile d'olive .....	9
VI.3 Composition chimique de l'huile d'olive .....	10
VI.4 Les sous-produits oléicoles .....	10
VI.5 Problématique environnementale .....	11
VI.5.1 Pouvoir polluants des margines : .....	11
VI.5.2 Impact des grignons d'olives sur l'environnement : .....	11

### Chapitre II: Le grignon d'olive et la margine

I Grignon d'olive . .....	12
I.1 Définition. ....	12
I.2 Caractéristiques physiques. ....	12
I.3 Composition chimique de grignon d'olive. ....	13
I.4 Valorisation des grignons d'olive .....	14
II Margine ....	15
II.1 Définition .....	15
II.2 Composition et caractéristiques chimiques des margines : .....	15
II.3 Valorisation des margines : .....	16

## Chapitre III: Les polyphénols

I. Définition .....	18
II. Classification des polyphénols.....	18
II.1 Les formes les plus simples .....	19
II.1.1 Les acides phénoliques .....	19
II.1.2 Les Flavonoïdes.....	20
II.1.3 Alcools phénoliques.....	20
II.2 Les formes condensées.....	21
II.2.1 Tannins : (C15) n .....	21
II.2.2 Lignines : (C6 – C3)n.....	22
II.2.3 Formes liées à des macromolécules non phénoliques.....	22
III. Les composés phénoliques de l'huile d'olive et des sous-produits.....	22
III.1 L'huile d'olive.....	22
III.2 Margine.....	23
IV. Les antioxydants phénoliques.....	24
IV.1 Stress oxydant- Espèces oxygénées réactives.....	24
IV.2 Activité antioxydante des polyphénols.....	24
V. Effets des polyphénols sur la santé.....	25
VI. Valorisation des composés phénoliques.....	25

## Chapitre IV: Les techniques d'extraction

I Extraction Liquide-Liquide.....	27
I.1 Définition et mécanisme.....	27
I.2 Les bases du choix du solvant :(les propriétés du solvant).....	29
I.3 Domaines de l'application de l'extraction liquide –liquide.....	30
II Extraction Solide-Liquide.....	31
II.1 Définition.....	31
II.2 Méthodes d'extraction classiques.....	31
II.2.1 Hydrodistillation.....	31
II.2.2 Extraction par soxhlet.....	32
II.2.3 Extraction Assistée par Ultrasons.....	33
II.3 Méthodes récentes d'extraction de matrices solides.....	33
II.3.1 Extraction par des fluides supercritiques.....	33
II.3.2 Extraction assistée par champ micro-onde.....	34
II.3.3 Extraction accélérée en solvant chaud sous pression.....	34

II.4 Mécanisme de l'extraction solide-liquide par solvants.....	35
II.5 Facteurs intervenant dans l'extraction solide-liquide.....	36

### **Chapitre V: Matériels et méthodes**

I Caractérisation physicochimique du grignon d'olive et de la margine.....	37
I.1 L'humidité.....	37
I.2 Les cendres... ..	37
I.3 pH.....	37
I.4 La conductivité.....	38
I.5 La teneur en polyphénols.....	38
II Réactifs et solvants employés.....	38
III Procédés d'extraction des polyphénols... ..	39
IV Extraction Solide-liquide .....	39
IV.1.1 Extraction par distillation .....	39
V Extraction Liquide-liquide .....	40
V.1 Extraction par distillation .....	40
VI Conditions opératoires .....	41
VII Techniques d'analyse des composés phénoliques .....	41
VII.1 Folin-Ciocalteu (FC) .....	41
VII.2 Identification et quantification par HPLC.....	42
VII.2.1 Principe:.....	42
VII.2.2 Appareillage .....	44
VII.2.3 Les conditions chromatographiques .....	45
VIII La teneur en polyphénols .....	45
IX Le rendement d'extraction :.....	45

### **Chapitre VI: Résultats et discussion**

I Caractérisation physicochimique du grignon d'olive : .....	46
II Résultats de l'étude physico-chimique des margines .....	47
III Méthode de travail.....	48
IV Dosage des polyphénols par la méthode colorimétrique .....	49
IV.1 La courbe d'étalonnage.....	49
IV.2 Analyse des échantillons extraits.....	50
IV.2.1 Grignon d'olive.....	50
IV.2.2 margine : .....	57
V Profil phénolique par HPLC.....	62

Conclusion générale .....64

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1:</b>	<i>Composition de l'olive en (%)</i> .....	03
<b>Tableau I.2 :</b>	<i>L'olivier dans le monde, 2006/07</i> .....	04
<b>Tableau I.2 :</b>	Répartition de la production mondiale d'huile d'olive .....	04
<b>Tableau I.4 :</b>	<i>Constante physiques et chimiques de l'huile d'olive</i> .....	09
<b>Tableau II.1 :</b>	<i>Caractéristiques des grignons bruts issus de divers procédés d'extraction de l'huile [34]</i> .....	13
<b>Tableau II.2 :</b>	<i>Composition chimique général des margines [42]</i> .....	16
<b>Tableau II.3 :</b>	<i>Caractéristiques physico chimiques des margines [47]</i> .....	16
<b>Tableau III. 1:</b>	<i>Les principaux composés phénoliques des margines</i> .....	23
<b>Tableau IV.1 :</b>	<i>Application de l'Extraction Liquide-Liquide</i> .....	30
<b>Tableau V. 1 :</b>	<i>Propriétés physico-chimiques des solvants utilisés</i> .....	38
<b>Tableau VI.1 :</b>	<i>Caractéristiques physicochimiques du grignon d'olive brute</i> .....	46
<b>Tableau VI.2 :</b>	<i>Caractéristiques physicochimiques de la margine</i> .....	47
<b>Tableau VI.3 :</b>	<i>Résultats de la densité optique</i> .....	49
<b>Tableau VI.4 :</b>	<i>La cinétique d'extraction par distillation moyennant plusieurs solvants</i> .....	51
<b>Tableau VI.5 :</b>	<i>Effet de la température sur le rendement d'extraction</i> .....	53
<b>Tableau VI.6 :</b>	<i>Effet de la durée sur le rendement d'extraction</i> .....	55
<b>Tableau VI.7 :</b>	<i>Effet de la masse végétale sur le rendement d'extraction</i> .....	56
<b>Tableau VI.8 :</b>	<i>La cinétique d'extraction par distillation moyennant plusieurs solvants</i> .....	58
<b>Tableau V.9 :</b>	<i>Effet de la température sur le rendement d'extraction</i> .....	60
<b>Tableau VI.10 :</b>	<i>Effet de la durée sur le rendement d'extraction</i> .....	61
<b>Tableau VI.11 :</b>	<i>Données chromatographiques des standards</i> .....	63

## Liste des figures

<b>Figure I.1 :</b>	<i>Composition de l'olive</i> .....	03
<b>Figure I.2 :</b>	<i>La production moyenne d'huile d'olive dans le monde (Entre la campagne 2008/9 et 2013/2014)</i> .....	05
<b>Figure I.3 :</b>	<i>Procédé d'extraction d'huile d'olive par centrifugation, (a) à 3 phases; (b) à 2 phases</i> .....	08
<b>Figure III.1 :</b>	<i>Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques</i> .....	19
<b>Figure III.2 :</b>	<i>Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques</i> .....	20
<b>Figure III.3 :</b>	<i>Squelette de base des flavonoïdes</i> .....	20
<b>Figure III.4 :</b>	<i>Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b)</i> .....	21
<b>Figure III.5 :</b>	<i>Structures de l'oeuropéine</i> .....	21
<b>Figure III.6:</b>	<i>Schéma explicatif de l'effet protectif des polyphénols de l'huile d'olive contre les radicaux libres</i> .....	25
<b>Figure IV.1 :</b>	<i>Schéma de principe de l'extraction liquide-liquide [76]</i> .....	28
<b>Figure IV.2 :</b>	<i>Montage d'hydrodistillation</i> .....	31
<b>Figure IV.3 :</b>	<i>Extracteur de Soxhlet</i> .....	32
<b>Figure IV.4 :</b>	<i>Schéma d'un système d'extraction en solvant chaud pressurisé (Dionex)</i> .....	35
<b>Figure V.1 :</b>	<i>Le grignon d'olive</i> .....	37
<b>Figure V.2 :</b>	<i>La margine</i> .....	37
<b>Figure V.4 :</b>	<i>Dispositif de l'extraction, le distillateur (au milieu)</i> .....	40
<b>Figure V.5 :</b>	<i>Extraction par distillation</i> .....	41
<b>Figure V.6 :</b>	<i>Spectrophotomètre PRIMLIGHT, SECOMAM®</i> .....	42
<b>Figure V.7:</b>	<i>Principe de fonctionnement de l'HPLC</i> .....	44
<b>Figure VI.1 :</b>	<i>Courbe d'étalonnage exprimant les absorbances en fonction des concentrations de l'acide gallique (mg/l)</i> .....	49
<b>Figure VI.2 :</b>	<i>Des solutions diluées de l'acide gallique préparées à partir d'une solution mère (1000mg/L) selon la méthode de FOLIN-CIOCALTEU</i> .....	50
<b>Figure VI.3 :</b>	<i>Évolution au cours du temps des rendements d'extraction des polyphénols à partir du grignon d'olive par distillation</i> .....	52
<b>Figure VI.4 :</b>	<i>Evolution du rendement en fonction de la température d'extraction</i> .....	54
<b>Figure VI. 5 :</b>	<i>Evolution du rendement en fonction du temps d'extraction</i> .....	55
<b>Figure VI. 6 :</b>	<i>Evolution du rendement en fonction de la masse du grignon d'olive</i> .....	57
<b>Figure VI.7 :</b>	<i>Évolution au cours du temps des rendements d'extraction des polyphénols à partir de la margine par distillation</i> .....	59
<b>Figure V.8 :</b>	<i>Evolution du rendement en fonction de la température d'extraction</i> .....	60
<b>Figure VI.9 :</b>	<i>Evolution du rendement en fonction du temps d'extraction</i> .....	62
<b>Figure VI.10 :</b>	<i>Profils chromatographiques des étalons a) acide gallique b) phénol</i> .....	62

Arbre mythique, symbole de paix et de pérennité, l'olivier s'inscrit comme une espèce privilégiée dans le paysage méditerranéen.

L'oléiculture représente une des plus anciennes activités agricoles dans le bassin méditerranéen, Pour ces pays, la production d'huile d'olive est une fortune économique transmise sur plusieurs générations. Toutefois, elle présente l'inconvénient de générer d'énormes quantités de grignon d'olive et de margines dont la fraction organique complexe et la demande chimique élevée en oxygène les rendent un déchet industriel gravement polluant.

La valorisation des sous-produits de l'olivier est donc indispensable, c'est dans ce contexte que notre travail s'intègre, l'objectif visé dans cette étude est d'extraire les polyphénols à partir du grignon d'olive et de la margine.

Les polyphénols suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, anti oxydantes et anti-cancérogènes.

Ce manuscrit comporte six chapitres. Les quatre premiers permettent de présenter l'industrie oléicole, les sous-produits oléicoles, les polyphénols et l'extraction.

Le cinquième chapitre définit les moyens matériels mis en œuvre pour les procédés d'extraction utilisés et la démarche expérimentale adoptée ainsi que les deux méthodes suivies pour l'analyse des polyphénols dans nos extraits (méthode colorimétrique FC et analyse par HPLC).

Le sixième et dernier chapitre a été consacré aux résultats expérimentaux des cinétiques d'extraction par distillation, l'optimisation des conditions opératoires pour obtenir les rendements d'extraction optimales et l'identification de certains polyphénols présents dans les extraits par HPLC.

L'**huile d'olive vierge** peut être considérée comme le jus de fruit de l'olive. C'est une huile claire, de couleur jaune à vert, d'odeur et de saveur spécifiques.

Bien qu'elle ne contribue qu'à environ 3 % du marché mondial des huiles végétales alimentaires, l'huile d'olive fait l'objet d'un intérêt croissant de la part de nouveaux pays, notamment grâce aux résultats des recherches scientifiques qui confirment ses caractéristiques positives. Tandis qu'il est toujours plus apprécié au titre de sa place fondamentale dans la diète méditerranéenne que l'Unesco a récemment inscrite sur sa liste du patrimoine culturel immatériel [1].

## **I. Description botanique de l'olivier :**

L'olivier est classé dans la famille de l'oléacée où on rencontre aussi le frêne et le lilas. Le genre est appelé *Olea* et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce qui est cultivés dans le bassin méditerranéen est l'*Olea europea*, dans laquelle on rencontre l'oléastre ou olivier sauvage, et l'olivier cultivé (*Olea europea sativa*) [2,3].

L'olivier se distingue des autres espèces fruitières par sa très grande longévité et également par sa grande rusticité lui permettant de se développer sous des conditions de climat subaride et sur des sols parfois très pauvres [4].

L'olivier est un arbre des pays à climat méditerranéen où les températures varient entre 16 et 22°C (moyenne annuelle des températures). Il aime la lumière et la chaleur, supporte très bien les fortes températures, même en atmosphère sèche, et ne craint pas les insulations. De même il craint le froid, les températures négatives peuvent être dangereuses particulièrement si elles se produisent au moment de la floraison [5].

## **II. Composition des olives :**

Le fruit est une drupe ovoïde ou ellipsoïde. Elle est constituée d'un épicarpe et d'un endocarpe (Figure I.1) :

- L'épicarpe qui est en fait la peau de l'olive. Elle est recouverte d'une manière cireuse, la cuticule, qui est imperméable à l'eau.

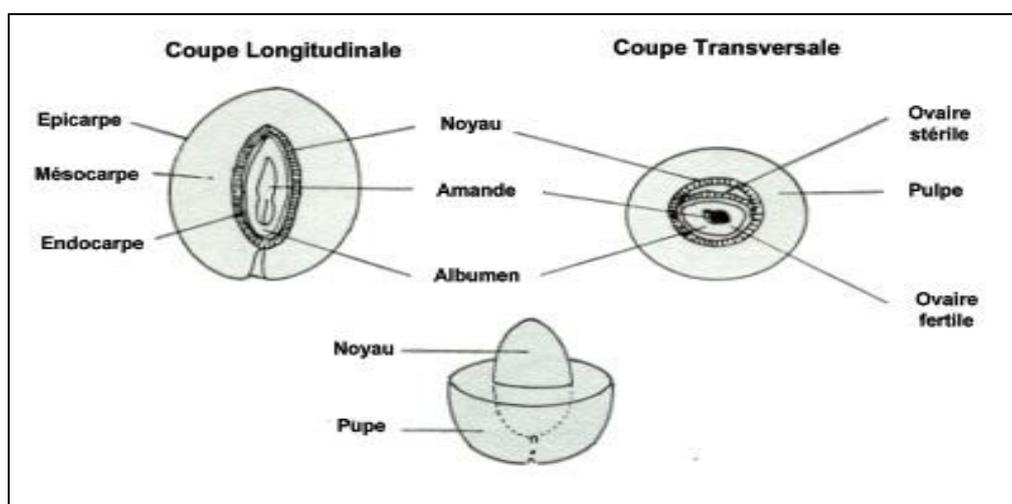
- Le mésocarpe est la pulpe du fruit .Elle est constituée de cellule dans lesquelles vont être stockées les gouttes de graisses qui formeront l'huile d'olives.
- L'endocarpe est le noyau .Il est formé de deux sortes de cellules :
  - L'enveloppe.
  - L'amande à l'intérieur du noyau qui contient deux ovaires dont l'un n'est pas fonctionnel et donc stérile, Le deuxième produit un embryon qui, en situation favorable d'humidité, de chaleur et d'environnement, donnera peut-être un jour un nouvel olivier [6].

D'un point de vue chimique, les principaux constituants de l'olive sont représenté dans le tableau suivant.

**Tab.I.1:** *Composition de l'olive en (%) [6].*

Composants	Pourcentage
Eau	50%
Huile	22%
Sucre	19,1%
Protéines	1,6%
Cellulose	5,8%
Divers	1,5%

La composition de l'olive est schématisée sur la figure ci-dessous (**Fig. I.1**).



**Fig. I.1 :** *Composition de l'olive [6].*

### III. Verger oléicole mondial :

On compte actuellement plus de 900 millions d'oliviers cultivés à travers le monde mais le bassin méditerranéen est resté sa terre de prédilection, avec près de 95 % des oliveraies mondiales. La production mondiale d'olives a varié ces dix dernières années entre 9 et 15 millions de tonnes dont 90 à 95 % est destinée à la fabrication d'huile d'olive [7].

Les quatre premiers pays producteurs (Espagne, Italie, Grèce et Turquie) représentent 80 % de la production mondiale d'olives [7]. L'oléiculture d'aujourd'hui est dominée par l'Espagne qui produit en moyenne plus de 45 % de la production mondiale, pour l'essentiel en Andalousie [1].

Le tableau suivant représente les chiffres concernant l'olivier dans le monde, 2006/2007 (Source des données : Conseil Oléicole International)

**Tab. I.2 :** *L'olivier dans le monde, 2006/07 [7].*

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

### IV. Production mondiale d'huile d'olive :

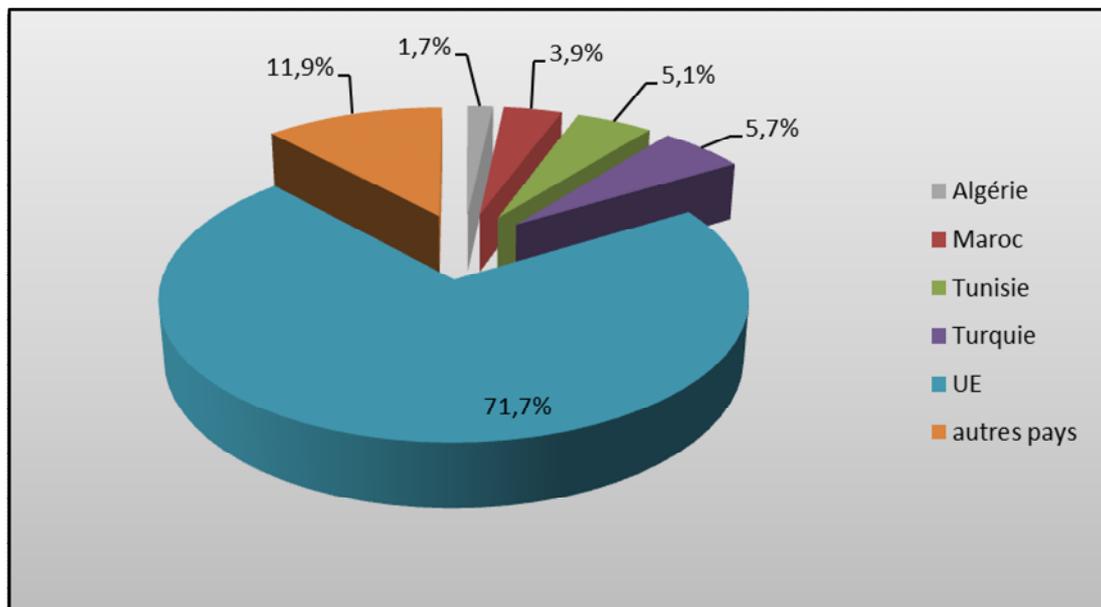
La répartition géographique de la production mondiale d'huile d'olive est représentée dans le tableau I.3 (source : COI [8]).

**Tab. I.3 :** *Répartition de la production mondiale d'huile d'olive (1000 tonnes).*

pays	2006/7	2007/8	2008/9	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14 (prov)	2014/15 (prév)
<b>UE</b>	2,031.0	2,118.5	1,939.0	2,224.5	2,209.0	2,395.0	1,461.5	2,476.5	1,532.0
<b>Turquie</b>	165.0	72.0	130.0	147.0	160.0	191.0	195.0	190.0	190.0
<b>Syrie</b>	154.0	100	130	150	180	198	175	165	50
<b>Maroc</b>	75.0	85	85	140	130	120	100	120	110
<b>Tunisie</b>	160.0	170	160	150	120	182	220	70	260
<b>Algérie</b>	21.5	24	61,5	26,5	67	39,5	66	44	44
<b>Chilli</b>	5.0	6,5	8,5	12	16	21,5	15	15	24
<b>Jordanie</b>	37.0	21,5	18,5	17	27	19,5	21,5	30	35
<b>Total</b>	2,767.0	2,713.0	2,669.5	2,973.5	3,075.0	3,321.0	2,401.5	3,270.5	2,393.0

La production d'huile d'olive est concentrée autour du bassin méditerranéen. Les pays méditerranéens produisent 98% de la production mondiale d'huile d'olive et en consomment l'essentiel, ce qui réduit la part des échanges inter-régionaux [9]. Selon le Conseil Oléicole International (COI, 2014), les pays de l'U.E réalisent 72% de la production mondiale alors que la production moyenne de l'Algérie représente près de 1,7% de la production mondiale [8].

Selon le Conseil Oléicole International, l'Espagne, l'Italie et la Grèce sont les principaux pays européens **producteurs d'huile d'olive**. Durant la campagne 2011/12, ces 3 pays ont produit la quasi-totalité de l'huile d'olive européenne (96% de la production d'UE) et 69,5% de la production mondiale [1] [8].



**Fig. I.2 :** Production moyenne d'huile d'olive dans le monde  
(Entre la campagne 2008/9 et 2013/2014)

## **V. Les huileries et processus technologiques d'élaboration de l'huile d'olive :**

### ***V.1 Récolte :***

Pour fabriquer une huile d'olive riche en arômes, 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 cueillette [10].

### ***V.2 Effeuilage 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, qu'elles soient d'origine végétale, comme les feuilles et les brindilles, ou minérale, comme la poussière, la terre, les pierres et autres matières solides [11].

### ***V.3 Broyage :***

La libération de l'huile des tissus végétaux commence par le broyage des olives. 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 types d'appareils : broyeurs à meules et broyeurs métalliques [11].

### ***V.4 Malaxage :***

L'olive passe dans un malaxeur où s'effectue un chauffage par double enveloppe avec injection d'eau dans certains cas. Cette opération a pour but d'homogénéiser la pâte et de détacher les cellules lipidiques [12]. 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 [11]. Cette étape est très importante pour l'amélioration du rendement [13].

### **V.5 Séparation des phases (extraction) :**

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 [14].

#### **V.5.1 Système discontinu d'extraction par presse :**

L'extraction par pression se réalise traditionnellement sur des presses (figure I.3). Les unités de trituration équipées en presses, et qui sont classées selon la pression exercée ; unités traditionnelles Maâsras dont la pression est de l'ordre de  $100 \text{ kg/cm}^2$ , unités semi-modernes dont la pression est aux environs de  $200 \text{ kg/cm}^2$  et les unités modernes équipées en super-presses pouvant développer une pression de  $400 \text{ kg/cm}^2$  [15].

La pâte est répartie en couche sur des scourtins (disques en fibres naturelles ou synthétiques), à raison de 5 à 10 kg/scourtin, et permettant la filtration lors de la pression. Ces disques sont empilés les uns sur les autres pour être ensuite pressés d'une manière progressive [15,16]. On obtient deux phases, une, liquide l'huile et l'eau de végétation et l'autre solide, les grignons (pulpe et noyaux) qui reste entre les scourtins.

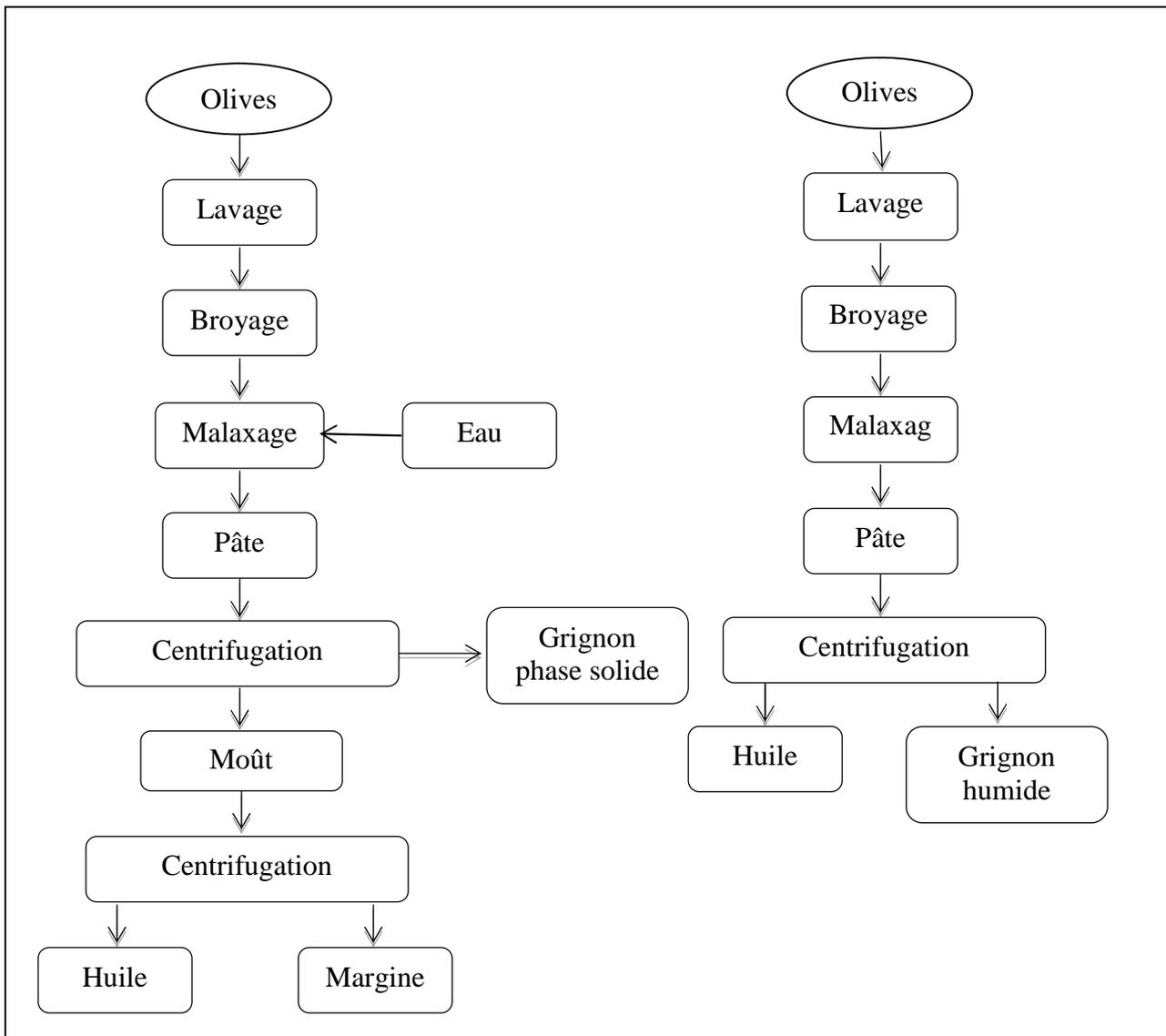
#### **V.5.2 Système continu d'extraction avec centrifugation à trois phases :**

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. La pâte issue du malaxage est diluée avec de l'eau. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation donnant les grignons et le moût. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des effluents d'huileries d'olive (figure 1) [17].

#### **V.5.3 Procédé continu à deux phases ou procédé écologique :**

Ce procédé technologique d'extraction de l'huile d'olive fonctionne avec un système de centrifugation à deux phases (huile et grignons humides) qui ne nécessite pas l'adjonction d'eau pour la séparation des phases huileuses et solides (figure I.3). Ce procédé est dit écologique [18].

Ce système permet d'extraire une huile d'olive de bonne qualité **sans production d'effluents d'huileries d'olive**. Son seul inconvénient est la production de grignons humides. En effet, les grignons résultant de ce procédé contiennent 8 à 10% plus d'eau que ceux du procédé à trois phases. Il est donc indispensable d'équiper les huileries travaillant selon le procédé écologique d'une installation de séchage des grignons [17].



**Figure I.3 :** Procédé d'extraction d'huile d'olive par centrifugation: (a) à 3 phases ; (b) à 2 phases [19].

## VI. L'huile d'olive :

### VI.1 Définition :

Selon le Conseil Oléicole International COI(2003) «l'huile d'olive est obtenue à partir du fruit de l'olivier par des procédés physiques. C'est l'unique huile susceptible d'être consommée directement telle qu'elle sort du fruit » .

Les principales constantes physiques et chimiques de l'huile d'olives sont données dans le tableau I.4.

**Tableau I.4:** Constante physiques et chimiques de l'huile d'olive [20,21].

Constante physiques et chimiques	NORMES
IR (indice de réfraction).....	1,466-1,468
Masse volumique (g.cm <sup>-3</sup> ).....	0,914-0,918
II (indice d'iode) (g I <sub>2</sub> /g d'huile).....	80-88
IS (indice de saponification)(mg KOH/g d'huile)...	185-196
Indice d'amertume.....	0,5-0,9
Polyphénols totaux (mg /kg d'huile).....	169-232

### VI.2 Les différents types d'huile d'olive :

L'huile d'Olive est un corps gras parfaitement réglementé tant pour sa définition que pour sa composition. Le Conseil International d'huile d'Olive (COI) [22] a clairement défini les différents types d'huile d'olive. Le classement des huiles d'olives est le suivant :

- **Huiles d'Olive Vierges :** sont les huiles obtenues à partir du fruit de l'olivier uniquement par des procédés mécaniques ou physiques dans des conditions thermiques notamment, qui n'entraînent pas d'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum 3,3%.
- **L'huile d'olive vierge non propre à la consommation :** en l'état dénommée huile d'olive vierge lampante est l'huile d'olive vierge dont l'acidité libre exprimée en acide

oléique est supérieur à 3,3%. Elle est destinée à la consommation après raffinage ou à l'industrie (savon, cosmétique).

- **L'huile de grignon d'olive** : obtenue par extraction par solvant à partir des grignons d'olives. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum 1%.

### VI.3 Composition chimique de l'huile d'olive :

La composition de l'huile d'olive dépend de la variété du fruit, de la région de culture et des conditions climatiques. Il possède une composition nutritionnelle équilibrée en acides gras et en triglycérides (98% du poids total). L'huile d'olive a une basse teneur en acides gras saturés et une teneur élevée en acides gras mono insaturés. Elle contient aussi les polyphénols, de la vitamine E, de la provitamine A et des minéraux [23].

- **Composition en acides gras** : Le principal acide gras de l'huile est l'acide oléique (55-83%), les deux autres acides importants sont l'acide palmitique (7,5 à 20%) et l'acide linoléique (3,5 à 21%) [24].
- **Composition en insaponifiables** : La fraction insaponifiables renferme un mélange complexe de composés. Elle est 0,4 à 0,8% pour l'huile d'olive [24].
- **Les substances antioxydants** : parmi ces oxydants, on trouve les unions de phénols [phénol, acides phénoliques, polyphénols] [23].

### VI.4 Les sous-produits oléicoles :

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux principaux résidus: l'un liquide appelé margine et l'autre solide appelé grignon d'olive. Les grignons et les margines constituent les principaux sous-produits des huileries d'olive. Chaque année, les pays oléicoles enregistrent des volumes importants de ces deux sous-produits. En moyenne, le traitement de 100 kg d'olives produit environ 20 kg d'huile selon les cas, et en fonction des systèmes d'extraction. Il produit également les quantités suivantes:

- 40 kg de grignon (taux d'humidité environ 50%) et plus de 40 kg d'eaux de végétation si l'on utilise le système traditionnel [25].

- 55 kg de grignon (taux d'humidité de 50%) et plus 100 kg d'eaux de végétation, si l'on utilise le système continu à trois phases [26].
- 70 Kg de grignons (avec une teneur en humidité de l'ordre de 60%) et jusqu'à 3,5 kg de margines, si l'extraction est effectuée par les systèmes en continu à deux phases [27].

## **VI.5 Problématique environnementale :**

Les rejets des industries productrices d'huiles d'olive est un problème majeur surtout dans les pays du bassin méditerranéen.

### **VI.5.1 Pouvoir polluants des margines :**

Les margines sont peu dégradables à cause des substances phytotoxiques et antimicrobiennes (polyphénols, acides gras, etc.) qu'elles contiennent. Les margines sont le plus souvent rejetées dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun traitement préalable et nuisent fortement à la qualité de ces eaux de surfaces. La très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances [28].

Epanchées sur les sols, les margines diminuent la qualité des sols. 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 nocives aux plantes [29].

### **VI.5.2 Impact des grignons d'olives sur l'environnement :**

La majorité des grignons sont rejetés dans la nature et sont source de pollution soit parce qu'ils sont contaminés par des champignons, soit parce qu'ils rejettent des substances toxiques dans l'environnement. Les toxines fongiques ou les composés polyphénoliques qui résistent à la dégradation bactérienne peuvent alors se lixivier, menaçant ainsi la santé humaine et l'environnement. Certaines sources d'eau ont été polluées.

En plus de la production principale (huile d'olive vierge et huile de grignon), l'industrie oléicole génère deux résidus : l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons).

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

## **I.Grignon d'olive :**

### ***I.1 Définition :***

Les grignons sont les résidus solides issus de l'extraction de l'huile d'olive. Ils sont formés des pulpes et noyaux d'olives. Il existe différents types de grignons :

- **Grignon brut :** C'est le résidu de la première extraction de l'huile d'olive. Ses teneurs relativement élevées en eau et en huile favorisant son altération rapide lorsqu'il est laissé à l'air libre [30].
- **Grignon épuisé :** C'est le résidu obtenu après déshuilage du grignon brut par solvant [30].
- **Grignon tamisé :** Il résulte de la séparation partielle entre les débris des noyaux concassés et la pulpe par tamisage [31].

### ***I.2 Caractéristiques physiques :***

Les grignons bruts renferment la coque du noyau réduite en morceaux, la peau et la pulpe broyée de l'olive, environ 25% d'eau et encore une certaine quantité d'huile environ 9%. Les grignons épuisés diffèrent essentiellement par une plus faible teneur en huile et une teneur en eau réduite du fait qu'ils ont été déshydratés au cours du processus de l'extraction. Les grignons épuisés partiellement dénoyautés sont constitués essentiellement par la pulpe (mésocarpe) et contiennent encore une petite proportion de coques qui ne peuvent être séparées complètement par les procédés de tamisage ou de ventilation utilisés [32].

### I.3 Composition chimique des grignons d'olive :

La composition chimique des grignons d'olive varie dans de très larges limites selon le stade de maturité des olives, le procédé d'extraction de l'huile et l'épuisement par les solvants [33].

Cette composition peut se résumer comme suit :

- La teneur en cendres est normalement faible (3 à 5%). Les teneurs élevées rencontrées sont dues à l'absence de lavage et à la présence des olives ramassées à même le sol [33].
- La teneur en matières grasses est relativement élevée et varie principalement selon le procédé technologique employé. L'épuisement du grignon permet d'avoir un produit dont la teneur oscille entre 3 et 4% de la matière sèche. Ces matières grasses sont composées principalement d'acide oléique (84%), stéarique, palmitique, myristique et linoléique [33].
- La teneur en cellulose brute est élevée (15 à 24%) [34].
- Le grignon d'olive peut contenir jusqu'à 2.5% de polyphénols comme le montre le tableau II.1 [34]

**Tab.II.1:** Caractéristiques des grignons bruts issus de divers procédés d'extraction de l'huile [34]

Paramètres (%)	Extraction par pressage	Système continu à	
		3 phases	2 phases
Humidité	27,2	50,23	56,8
Huile	8,72	3,89	4,65
Composés Phénoliques	1,5	0,326	2,43
Protéines	4,77	3,43	2,87
Sucres totaux	1,38	0,99	0,83
Cellulose	24,1	17,37	15,54
Hémicellulose	11,0	7,92	6,63
Carbone total	42,9	29,03	25,37
Cendres	2,36	1,7	1,42
Azote	0,71	0,51	0,43
Phosphore P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,07	0,05	0,04
Lignine	14,1	10,21	8,54
Potassium K <sub>2</sub> O	0,54	0,39	0,32

### ***1.4 Valorisation des grignons d'olive :***

Parmi les possibilités de revalorisation de grignon d'olive, nous pouvons citer :

➤ **Production d'huile à partir de grignon :**

Les grignons ont un débouché important dans l'industrie agroalimentaire, par l'extraction de l'huile résiduelle à l'aide de solvants [35].

➤ **Utilisation comme combustible :**

Elle représente dans la majorité des pays l'application la plus courante. Le grignon d'olive est un combustible de valeur calorifique modeste (2900 à 3000 kcal/kg), cette chaleur est principalement apportée par la coque [36].

➤ **Utilisation comme alimentation du bétail :**

Le grignon et ses dérivés ont une certaine application dans l'alimentation des ruminants, notamment les ovins, les caprins et les camélidés. Sa faible digestibilité rend nécessaire de les mélanger à d'autres sous-produits (mélasse, paille hachée, marcs de raisin...) [37].

➤ **Utilisation comme fertilisants :**

L'épandage direct du grignon d'olive est un produit difficilement dégradable à cause de sa richesse en lignine et à sa phytotoxicité. Donc, pour pouvoir l'utiliser comme fertilisant, il est recommandé de lui faire subir un compostage qui génère une matière organique stabilisée non phytotoxique [38].

➤ **Production de furfural :**

Le grignon est composé en grande partie par les débris de coque qui sont constitués de lignine, cellulose et pentosane. Ces derniers sont des hydrates de carbone complexe, qui par hydrolyse, engendrent des pentoses et après dessiccation, le furfural.

➤ **Elaboration du charbon active :**

Selon Spahis [39], le charbon actif produit à partir de grignon d'olive est un excellent décontaminant des eaux polluées.

En Algérie, Pour la récupération et la transformation des grignons produits en grandes quantités par un parc oléicole avoisinant 500 huileries à travers la wilaya de Tizi-Ouzou, la direction de l'environnement fait état de l'agrément d'un projet initié par un particulier dans la zone d'activité de Boghni pour «la fabrication de briques de chauffage à l'aide de particules solides, alors que les résidus d'huile récupérés servent à la fabrication de savons et des shampoings» [40].

## **II. Margine :**

### ***II.1 Définition :***

Les margines ou eaux de végétation sont des effluents liquides générés par la fabrication de l'huile. Généralement, 40 à 50% de ces eaux proviennent du fruit (eau de végétation), le reste de l'eau ajoutée pendant la trituration. Le volume des margines varie avec le système d'extraction [41].

Les quantités produites sont abondantes dans l'extraction à 3 phases car elle nécessite une injection d'eau à la pâte avant centrifugation [42].

Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux de couleur brune rougeâtre. Ce liquide a une odeur agréable qui rappelle celle de l'huile d'olive mais a un goût amer.

### ***II.2 Composition et caractéristiques chimiques des margines :***

La qualité et la quantité des margines dépendent de l'opération d'extraction d'huile d'olive. Elle sont également influencées par la variété de l'olive, de la saison de cueillette, du taux de maturation des fruits et des conditions climatiques [43].

Les margines sont acides et extrêmement chargées en matières organiques contenant essentiellement des sucres, des lipides, des acides organiques, des acides aminés et des composés phénoliques [44].

Les margines contiennent plusieurs sels minéraux dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) [45, 46].

Les margines sont caractérisées par un pH de 4,5 à 5,5, une conductivité de l'ordre de  $10^{-6}$  S/cm<sup>2</sup> due principalement aux ions potassium (0,6 à 2 kg/m<sup>3</sup>), calcium (0,3 à 0,6 kg/m<sup>3</sup>) et magnésium (0,05 à 0,3 kg/m<sup>3</sup>) [47].

**Tableau II.2:** Composition chimique général des margines [42].

Composant	Teneur %
Eau	83 – 88
Matière organique	10,5 – 15
Matière minérale	1,5 - 2
Matières azotées totales	1,25 - 2,4
Matières grasses	0,03 - 1
Polyphénols	1 - 1,5

**Tableau II.3:** Caractéristiques physico chimiques des margines [47].

Paramètres	Valeurs
pH	4,5 - 5,5
Conductivité	$10^{-6}$ S/cm <sup>2</sup>
Salinité	8 à 10g/L
Densité	1,02 à 1,09
DCO	100 - 220 kg/m <sup>3</sup>
DCO max	600 kg/m <sup>3</sup>
DBO <sub>5</sub>	45 - 55 kg/m <sup>3</sup>
DBO <sub>5</sub> max	100 kg/m <sup>3</sup>

### II.3 Valorisation des margines :

Les margines peuvent faire l'objet de plusieurs types de valorisation, On peut citer :

- Transformation des substances organiques des margines en biogaz (80% des substances organiques se transforment en biogaz pour donner 65-70% de méthane) par une série de réactions biochimiques effectuées par deux types de bactéries acidogènes et méthanogènes [48].
- Récupération des composés phénoliques qui peuvent être utilisées en industrie pharmaceutique et cosmétique [49].

- Les margines peuvent être utilisées pour obtenir un compost fertilisant pour les sols [50]. L'avantage du compost formé à partir des margines est l'absence des micro-organismes pathogènes avec des concentrations élevés en phosphore et en potassium [51].
- Grâce à leur richesse en matières organiques, les margines représentent un substrat nutritif pour la production des protéines unicellulaires (POU) qui peuvent être transformées en fourrage [52].

Les polyphénols sont considérés comme des composés quasi universels des végétaux. Structuellement, ils se répartissent en plusieurs classes allant de composés présentant un simple noyau phénolique (ex.: acide gallique) à des composés polymériques complexes comme les tanins. Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit. In vitro, les polyphénols présentent des activités antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (HO<sup>•</sup>) et superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes [53].

## **I. Définition :**

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production [54,55].

L'appellation polyphénols ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (OH) [56].

## **II. Classification des polyphénols :**

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> 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). Macheix *et al* (2006) divisent les composés phénoliques selon leur forme [57]:

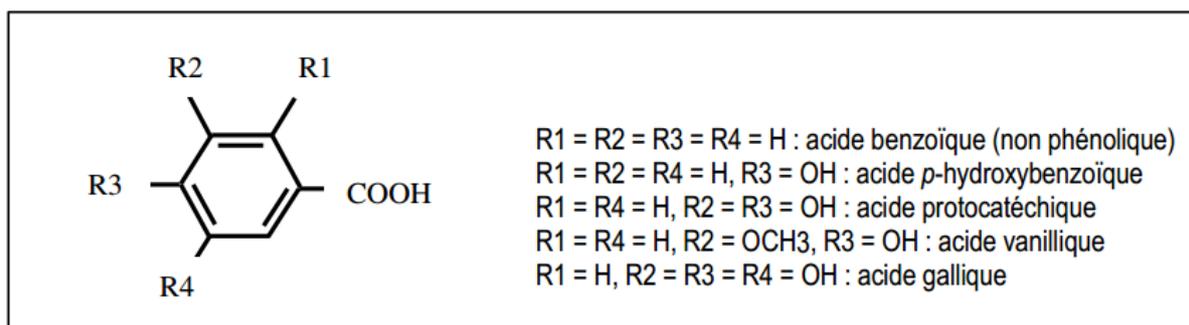
## II.1 Les formes les plus simples :

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C<sub>6</sub> (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C<sub>15</sub> et à des molécules proches. Sauf exceptions, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole [57].

### II.1.1 Les acides phénoliques :

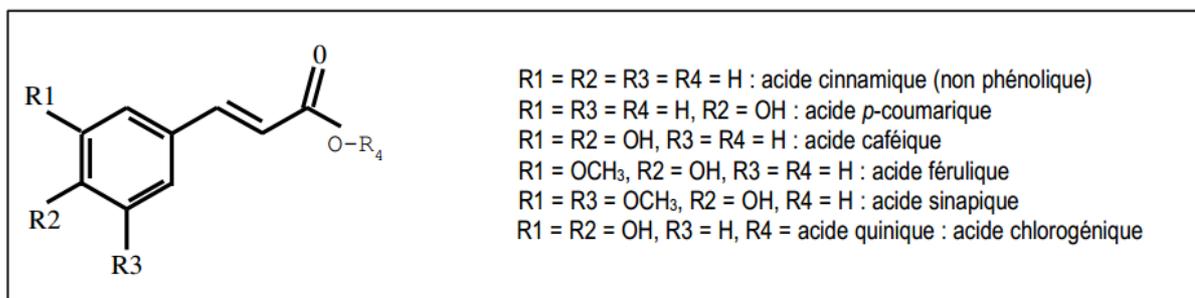
Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique [58].

Les dérivés de l'acide benzoïque ont une formule de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tannins [57]. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque les plus répandus sont illustrés dans la figure suivante :



**Figure III.1:** Structure chimique des acides hydroxybenzoïques [58].

Les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxycinnamiques), représentent une classe très importante dont la structure de base (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) dérive de celle de l'acide cinnamique. Ces composés peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (Fig III.2) [58].



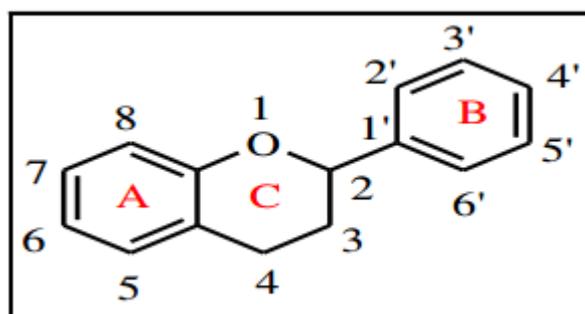
**Figure III.2:** Structure chimique des acides hydroxycinnamiques [58].

### II.1.2 Les Flavonoïdes :

Les flavanoïdes, de structure générale en  $C_{15}$  ( $C_6-C_3-C_6$ ) (figure II.3), comprennent à eux seuls plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes, dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique comme :

- les **anthocyanes**, pigments rouges ou bleus des fleurs et des fruits,
- les **flavonols** comme le kaempférol et la quercétine dont la répartition est très large)
- les **flavanes** qui sont à l'origine des tannins condensés.

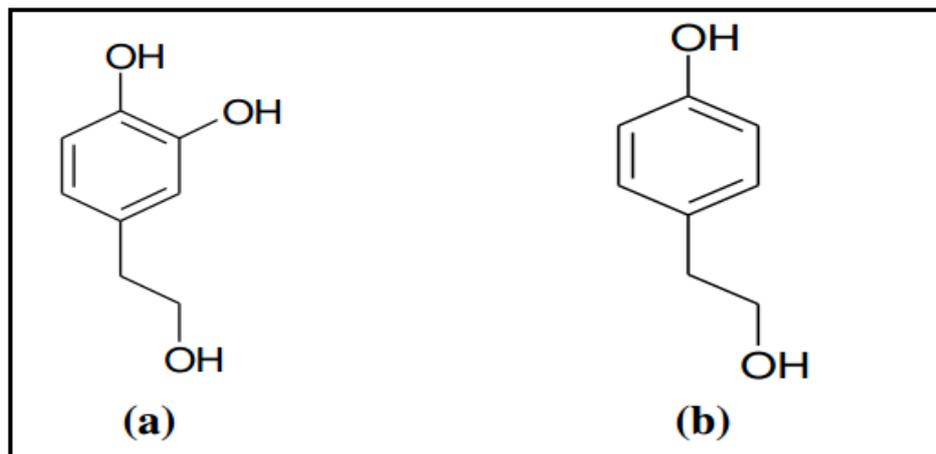
Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...) [57].



**Figure III.3:** Squelette de base des flavonoïdes [59].

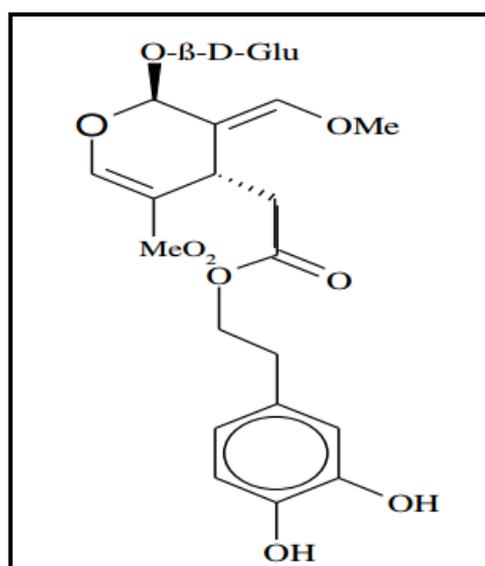
### II.1.3 Alcools phénoliques :

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) (Figure III.4) sont les principales molécules de cette classe. Ces composés sont très abondants dans l'olive (fruit et feuille), libres ou associés à l'acide élénolique [60,61].



**Figure III.4 :** Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b) [62].

Le principal alcool phénolique de l'olive (responsable de l'amertume du fruit) est l'oleuropéine (Fig. 10) (60 à 90 mg/g matière sèche) [10].



**Figure III.5:** Structures de l'oleuropéine [63].

## II.2 Les formes condensées :

Ces composés résultent principalement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées [57] :

### II.2.1 Les Tannins : (C<sub>15</sub>)<sub>n</sub>

Sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter.

## II.2.2 Lignines : $(C_6 - C_3)_n$

Les lignines résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques de base dénommées monolignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique, dérivant respectivement des acides p-coumarique, férulique et sinapique.

## II.3 Formes liées à des macromolécules non phénoliques :

Certains acides hydroxycinnamiques peuvent être liés à des macromolécules non phénoliques telles que les composants glucidiques de la paroi pectocellulosique comme les hémicelluloses.

## III .Les composés phénoliques de l'huile d'olive et des sous-produits :

### III.1 L'huile d'olive :

Le tyrosol, l'hydroxytyrosol et leurs dérivés sont les principaux représentants de la fraction monomérique dans l'huile d'olive [64].

Les monomères phénoliques de l'huile d'olive, qui regroupent les acides et les alcools phénoliques sont (en ordre alphabétique): le 4-acétoxy-éthyle-1, le 2-dihydroxybenzène, le 1-acétoxy-pinorosinol, l'apigénine, l'acide caféique, l'acide cinnamique (pas un phénol), l'acides o- et p-coumarique, l'acide férulique, l'acide gallique, l'acide homovanillique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'hydroxytyrosol, le lutéoline, l'oleuropéine, le pinorésinol, l'acide protocatéchique, l'acide sinapique, l'acide syringique, le tyrosol, l'acide vanillique et la vanilline [64].

Historiquement, les acides caféique, syringique, vanillique, protocatéchique, p-coumarique et o-coumarique, 4 hydroxybenzoïques représentent le premier groupe de phénols simples observés dans l'huile d'olive vierge (Montedoro, 1972; Vasquez Roncero, 1978) [65].

Les sécoiridoïdes (oleuropéine, déméthyl oleuropéine, ligstroside et nuzhenide) sont les principaux phénols complexes dans l'huile d'olive vierge (Bianco et Uccella, 2000) [65].

### III.2 La Margine :

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées. Dans les margines, ces composés ont une structure variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. [66].

Les acides et les alcools phénoliques sont le groupe le plus vaste et le plus répandu dans les margines. Les composés phénoliques à haut poids moléculaire sont essentiellement des tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l [67]. Le catécholmélaminique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines [68] (tableau III.1).

En ce qui concerne la lignine, aucun auteur n'a cité la présence de ce polymère dans les margines, bien que les pulpes d'olives contiennent au moins 3% de composés lignocellulosiques [68].

**Tableau III. 1 :** Principaux composés phénoliques des margines [69].

Les différents types des polyphénols			
Monomères aromatiques		Composés phénoliques à haut poids moléculaires principalement les Tanins	
Acides phénoliques	Alcools phénoliques	Tanins hydrolysables	Tanins condensés (flavotanin)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acide caféique</li> <li>- Acide p-coumarique</li> <li>- Acide protocatéchique</li> <li>- Acide vanillique</li> <li>- Acide 4-hydroxyphénylacétique</li> <li>- Acide syringique</li> <li>- Acide phydroxybenzoïque</li> <li>- Acide vératrique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4- Hydroxyphényléthanol (tyrosol).</li> <li>- 3,4-dihydroxyphényléthanol (hydroxytyrosol).</li> <li>- Syringaldéhyde</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Esters d'acides phénoliques</li> <li>- Esters d'acides phénoliques et sucres</li> <li>- Glucosides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le catécholmélaminique</li> </ul>

## IV. Les antioxydants phénoliques :

### IV.1 Stress oxydant- Espèces oxygénées réactives :

En conditions physiologiques, le dioxygène, élément indispensable à la vie, produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOR, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose, ...). Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaires, il est actuellement admis que les EOR sont de véritables messagers secondaires impliqués dans l'expression et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies neurodégénératives ou vasculaires telles que l'athérosclérose ou l'hypertension [70].

Les EOR sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, la pollution (ex.: oxydes d'azote), l'absorption d'alcool ou de certains médicaments (ex.: catécholamines), l'exposition prolongée au soleil et le tabagisme sont d'autant de situations qui provoquent une surproduction d'EOR dans notre organisme [53].

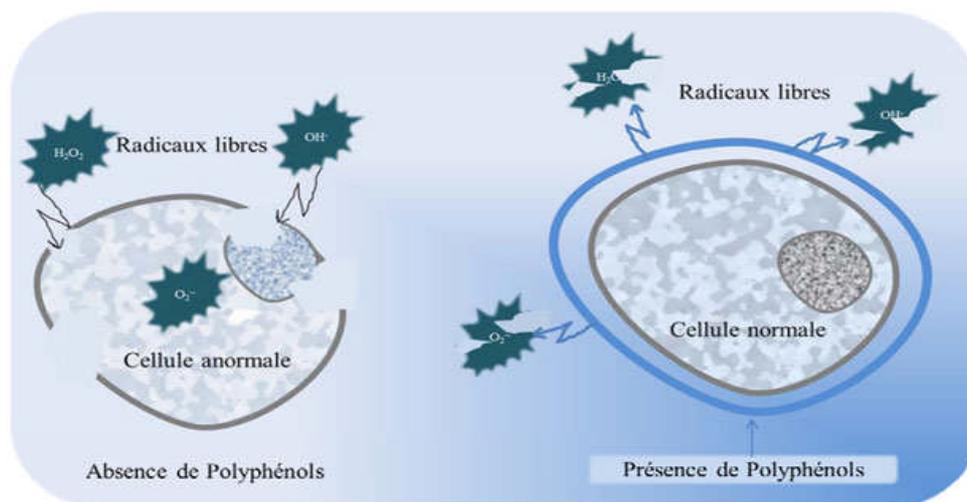
### IV.2 Activité antioxydante des polyphénols :

Parmi les antioxydants naturels, les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant. Ce sont des composés, naturels, qui permet de ralentir le phénomène d'oxydation qui favorisent le vieillissement cellulaire en interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le « message » de l'apoptose (mort cellulaire programmé). Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres (EOR) si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé [71].

Les principaux mécanismes d'activité antioxydante sont [72] :

- Le piégeage direct des EOR.
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR.
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

Les polyphénols peuvent agir selon ces divers mécanismes.



**Figure III.6:** Schéma explicatif de l'effet protectif des polyphénols de l'huile d'olive contre les radicaux libres [64].

## V. Effets des polyphénols sur la santé :

L'huile d'olive est riche en antioxydants, comme les polyphénols, et en particulier, l'hydroxytyrosol et le tyrosol. Ils permettent de prévenir et de traiter les maladies cardiovasculaires, les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le vieillissement. Ils sont antimicrobiens et jouent aussi un rôle important dans le renforcement du système immunitaire et la protection de certains tissus et organes contre les dommages oxydatifs : cerveau, foie, globules sanguins, muscles et artères [64].

## VI. Valorisation des composés phénoliques :

### ➤ En cosmétologie :

L'intérêt des composés phénoliques est lié aux propriétés suivantes : propriété anti oxydante, pouvoir anti inflammatoire, effet antimicrobien et la capacité de chélater les métaux. Ces composés luttent contre le vieillissement cutané en tant que molécules anti radicalaire et en tant que protecteur des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène [73].

➤ **En agroalimentaire :**

Berset et Bondini (2000) posent le problème de la place des polyphénols dans l'alimentation et soulignent leurs différentes fonctionnalités :

- Action sur la qualité sensorielle des aliments, flaveur et saveur ;
- Action dans le domaine de la sécurité des aliments, rôle antibactérien et anti radicaux libres ;
- les colorants phénoliques :

La contribution des polyphénols dans la coloration des végétaux et leur abondance a suscité l'intérêt des industries agroalimentaire, surtout après l'interdiction de certains colorants synthétiques. Parmi les principaux colorants de nature phénoliques, on peut citer :

- La curcumine (E100) extrait de curcuma responsable de la couleur jaune.
- La Bétacyanine extrait principalement de la betterave et responsable de la coloration violette.

Les anthocyanines (E163) sont responsables de la coloration rouge, bleu et violette [74].

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme végétal selon diverses techniques. Dans les domaines de la chimie des substances naturelles et de la chimie thérapeutique, L'extraction des métabolites secondaires (polyphénols) est une phase primordiale. Le choix de la méthode d'extraction est basé sur des données préalables sur les caractéristiques physicochimiques des métabolites à extraire [75].

## **I. Extraction Liquide-Liquide :**

### ***I.1 Définition et mécanisme :***

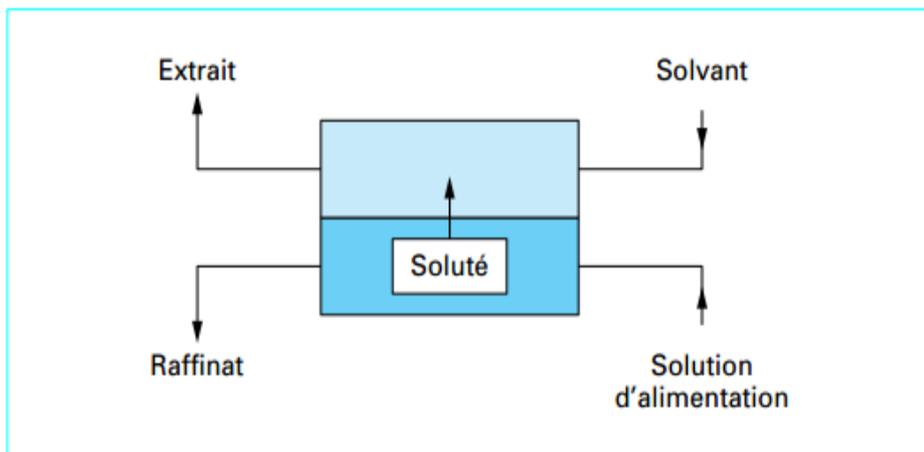
Généralement, on met en contact intime une solution d'alimentation, contenant les constituants à séparer (solutés) avec une seconde phase liquide appelée solvant qui extrait préférentiellement un ou plusieurs des solutés. Le solvant qui contient alors le ou les solutés est désigné sous le terme d'extrait, la solution d'alimentation ayant perdu la majeure partie de ces mêmes constituants est appelée raffinat (figure IV.1).

En pratique, l'utilisation d'un procédé d'extraction liquide-liquide requiert deux opérations successives :

- une mise en contact intime des deux phases liquides durant un temps suffisant à l'obtention de l'équilibre ou d'un état proche de l'équilibre et pendant lequel le ou les solutés sont transférés de la phase d'alimentation dans le solvant. À l'équilibre, le rapport des concentrations du soluté dans l'extrait et le raffinat, appelé rapport (ou coefficient) de distribution, donne une mesure de l'affinité relative du soluté pour les deux phases ;
- après leur contact, une séparation ultérieure des deux liquides (extrait et raffinat) sous l'effet de la gravité naturelle auquel peut s'ajouter dans certains cas la mise en œuvre d'autres forces: force centrifuge, champ électrique, etc... [76].

Concernant la récupération des composés de l'extrait (solvant et soluté purs), En chimie organique, le solvant est le plus souvent séparé par distillation ou évaporation. Ce solvant régénéré est recyclé vers l'extraction, mais transite au préalable par une unité de

reconditionnement qui le ramène aux spécifications physico-chimiques optimales avant la réutilisation [76].



**Figure IV.1** : schéma de principe de l'extraction liquide-liquide [76].

Depuis maintenant plus d'un demi-siècle, l'extraction liquide-liquide est largement utilisée dans l'industrie au même titre que d'autres techniques de séparation dont la distillation, l'échange d'ions, la précipitation et plus récemment les techniques membranaires. Ce sont les industries nucléaire et pharmaceutique qui permirent ses premiers développements industriels au cours des années 1940-1950, puis l'industrie pétrolière et pétrochimique au cours des années 1955-1965 [76].

Actuellement, ce procédé de séparation des constituants d'un mélange et/ou de concentration est tout particulièrement utilisé lorsque les conditions technologiques ou physico-chimiques lui sont favorables, comme c'est le cas pour :

- la séparation des composés à températures d'ébullition voisines (séparation de certains hydrocarbures aromatiques et aliphatiques).
- la séparation d'azéotropes eau-acides minéraux.
- la séparation de composés thermosensibles ou instables (obtention des antibiotiques).
- la concentration et la purification de solutions diluées, opérations souvent plus économiques que la distillation (cas des solutions diluées de sels métalliques tels que cuivre, uranium, vanadium).
- la substitution à la cristallisation fractionnée (séparation tantale-niobium).
- la séparation d'éléments ayant des propriétés chimiques voisines (séparation uranium-vanadium et hafnium-zirconium).

- l'obtention de produits de haute pureté (sels d'uranium de pureté nucléaire, sels de terres rares destinés à l'industrie optique ou électronique) [76].

### ***1.2 Les bases du choix du solvant : (les propriétés du solvant) :***

Le choix de l'extractant pour un procédé d'extraction liquide-liquide constitue une étape cruciale pour réaliser une extraction efficace. Le solvant idéal devra présenter plusieurs des propriétés suivantes (lorsque toutes ces propriétés ne peuvent pas être réunies, il faut choisir le meilleur compromis du point de vue économique) :

- une forte capacité d'extraction pour les solutés recherchés, associée à des valeurs élevées des rapports de distribution  $D$ .
- une grande sélectivité de l'extraction du soluté A vis-à-vis d'un autre soluté B, caractérisée par le facteur de séparation
- des caractéristiques physico-chimiques permettant une récupération facile :
- soit du soluté: dés-extraction par changement de pH, précipitation ou cristallisation d'un sel métallique
- soit du solvant: grande volatilité ou capacité thermique faible pour une distillation économique, comme dans presque tous les procédés de la chimie organique
- une solubilité négligeable dans le raffinat : quelques ppm à quelques dizaines de ppm, qui éviteront une récupération coûteuse, imposée pour des raisons économiques ou de sécurité de l'environnement.
- une bonne stabilité chimique vis-à-vis des milieux réactionnels rencontrés au cours des différentes opérations d'extraction, de lavage et de dés-extraction.
- des propriétés favorables :
- du point de vue de la cinétique du transfert de masse (mise en équilibre après un contact inférieur à quelques minutes)
- du point de vue économique : produit bon marché et disponible commercialement.
- du point de vue de la sécurité d'emploi : produit à faible toxicité, point d'éclair élevé (supérieur à 55 °C), donc peu inflammable ou peu volatil, et peu corrosif vis-à-vis des matériaux de construction courants [76].

### ***1.3 Domaines de l'application de l'extraction liquide -liquide :***

L'extraction liquide-liquide est une technique de séparation largement utilisée à l'échelle industrielle, dans des domaines aussi variés que l'hydrométallurgie classique, l'industrie nucléaire, la pétrochimie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'industrie agroalimentaire [76]. Le Tableau 1 donne une vue schématique des différentes applications dans les industries mentionnées ainsi que l'état d'avancement en matière d'incorporation de cette technique.

**Tableau IV.1 : Application de l'Extraction Liquide-Liquide [77].**

<b>Applications de L'Extraction Liquide-Liquide</b>	
<b>Industrie</b>	<b>Applications</b>
Pétrochimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Production d'aromatiques</i></li> <li>• <i>Purification du Pétrole</i></li> <li>• <i>Alkylation</i></li> </ul>
Chimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Synthèse de polymères Fibres, Pesticides, Herbicides...</i></li> </ul>
Alimentaire et Pharmaceutique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Récupération des antibiotiques et Vitamines</i></li> <li>• <i>Purification des produits génétiques</i></li> </ul>
Métallurgique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Récupération et purification des métaux</i></li> </ul>
Nucléaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Traitement des déchets</i></li> </ul>
Environnementale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Traitement des eaux polluées</i></li> <li>• <i>Récupération et recyclage de sous-produits.</i></li> </ul>

## II. Extraction Solide-Liquide :

### II.1 Définition :

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant [75].

### II.2 Méthodes d'extraction classiques :

#### II.2.1 Hydrodistillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult). Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules qui y sont contenues [78].

Ces molécules forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et ces molécules désirés se séparent de l'eau par différence de densité [78].

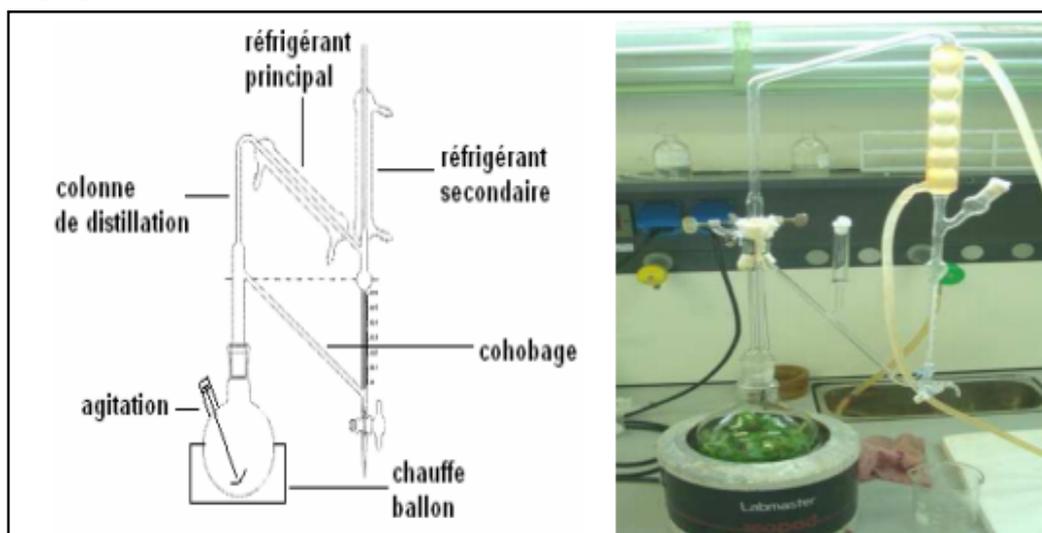


Figure IV.2: Montage de l'hydrodistillation [78].

### II.2.2 Extraction par Soxhlet :

L'extraction de type Soxhlet constitue l'une des techniques d'extraction d'échantillons solides les plus anciennes. Le Soxhlet permet le traitement de solides de toutes tailles avec des solvants en phase liquide. La matrice solide est introduite dans une cartouche de cellulose fixée sur un réservoir de solvant surmonté d'un réfrigérant. Le solvant chauffé est vaporisé puis condensé au niveau du réservoir et reste en contact avec le solide. Quand le volume de solvant condensé dans le réservoir atteint un certain niveau, le solvant repart dans le chauffé ballon par un phénomène de siphon pour être à nouveau recondensé tout en entraînant les composés d'intérêt dans le ballon où ils seront finalement concentrés après plusieurs cycles d'extraction. Cette technique permet l'obtention de rendements satisfaisants pour de nombreux composés et a été normalisée par l'agence américaine de protection de l'environnement [79].

L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche cela se traduit lorsque le liquide entourant la cartouche devient clair.

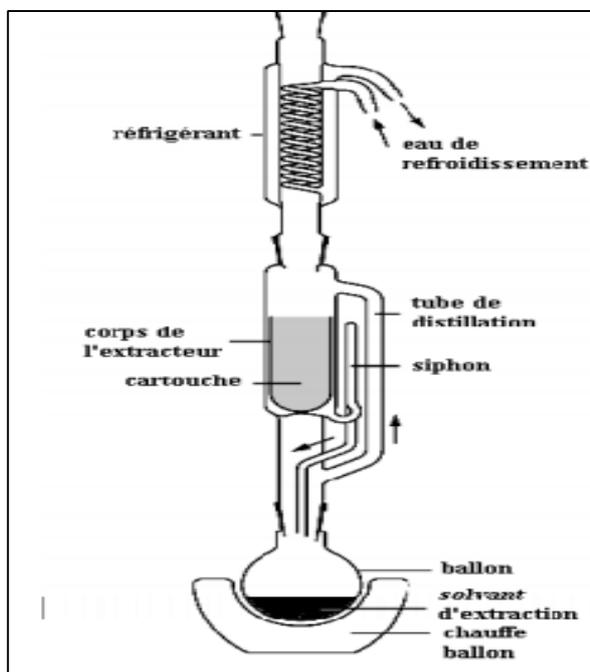


Figure IV.3 : Extracteur de Soxhlet.

### **II.2.3 Extraction Assistée par Ultrasons :**

Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement [78].

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'obtenir un bon rendement d'extrait. [78].

Ces méthodes d'extraction classique présentent quelques inconvénients. Elles sont particulièrement laborieuses et donc prédisposés à des erreurs systématiques et aléatoires. De plus, elle consomment une grande quantité de solvants organiques.

Par conséquent, c'est ainsi que de nouvelles méthodes ont vu le jour comme l'extraction par un fluide supercritique, l'extraction sous champ micro-ondes et l'extraction en solvant chaud pressurisé. Leur similitude essentielle est l'utilisation de conditions qui permettent d'accélérer le processus d'extraction. Ces techniques présentent également l'avantage de minimiser le volume de solvant d'extraction et d'être automatisable [80].

## **II.3 Méthodes récentes d'extraction de matrices solides :**

### **II.3.1 Extraction par des fluides supercritiques :**

L'extraction par les fluides supercritiques a été développée au début des années 1980. Ce type d'extraction s'effectue en présence d'un fluide supercritique qui possède des propriétés intermédiaire entre celles des liquides et celles des gaz. L'extraction par fluide supercritique (SFE) utilise un fluide qui va être porté à une température ou pression supérieure à son point critique. En SFE, le fluide sous pression est introduit dans une cellule, contenant l'échantillon, chauffé à la température définie de manière à être dans l'état supercritique. Le fluide supercritique est alors délivré dans la cellule d'extraction. La récupération des solutés peut s'effectuer après détente du fluide supercritique de deux façons différentes : soit le fluide après détente barbote dans un solvant, soit il traverse une phase solide qui piège les solutés qui seront par la suite élués par un faible volume de solvant. Les paramètres influents en SFE sont la nature du fluide, son débit et les consignes de températures et de pressions [79].

Les fluides supercritiques ont une faible viscosité et un coefficient de diffusion élevé comparés aux liquides. Ils peuvent par conséquent pénétrer dans les pores d'une matrice solide de manière plus efficace qu'un solvant liquide. Les transferts de masse et donc les extractions sont plus rapides [79].

### **II.3.2 Extraction assistée par champ micro-onde :**

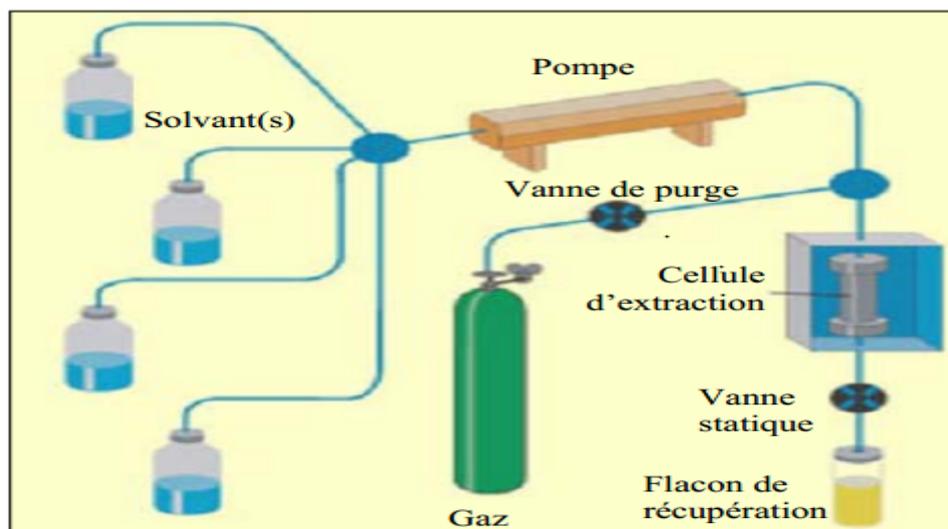
Cette technique consiste à chauffer rapidement le solvant d'extraction qui est au contact de l'échantillon par un champ micro-ondes (MAE) [81]. Contrairement aux techniques classiques de chauffage par convection, l'utilisation des micro-ondes implique une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matière. Le champ micro-ondes utilisé en MAE entraîne une augmentation de la température du solvant et de l'échantillon par mise en rotation des dipôles électriques des molécules de solvant. Le chauffage est plus rapide qu'un chauffage par convection. Il existe deux types d'appareillage permettant la mise en œuvre de la MAE : le système fermé et le système ouvert [79].

En MAE en système ouvert, l'extraction s'effectue à pression atmosphérique dans un récipient surmonté d'un réfrigérant comme pour le Soxhlet. L'amélioration du système repose sur l'ajout du champ micro-ondes. L'échantillon peut être placé dans une cartouche de cellulose. En revanche, la MAE en système fermé est effectuée dans une cellule d'extraction fermée et étanche avec un matériau transparent aux micro-ondes. Certains systèmes permettent le contrôle de la température et de la pression. toutefois, des étapes de centrifugation et de filtration sont nécessaires avant l'analyse [79].

### **II.3.3 Extraction accélérée en solvant chaud sous pression :**

La réduction du volume de solvant nécessaire à l'extraction, l'efficacité de l'extraction sont les principaux avantages de cette technique, L'un de ces inconvénients majeur est son coût élevé. L'utilisation combinée de pressions et de températures élevées fournit un procédé d'extraction plus rapide qui nécessite de plus petites quantités de solvants par rapport au Soxhlet, ce qui permet également l'obtention d'extraits plus concentrés [80].

Les programmes de température et de pression paramétrés sont maintenus à leur valeur spécifique à l'aide d'une pompe et d'un four (figure 1-20). Il existe deux modes d'extraction : le mode statique et mode dynamique [80].



**Figure IV.4:** Schéma d'un système d'extraction en solvant chaud pressurisé (Dionex).

Les étapes de cette méthode d'extraction sont :

- *Chargement de l'échantillon dans la cellule d'extraction.*
- *Remplissage de la cellule avec le solvant d'extraction (solvant unique ou mélange).*
- *Chauffage et pressurisation de la cellule aux valeurs choisies.*
- *Extraction de l'échantillon pendant un temps donné (extraction statique).*
- *Transfert du solvant vers le flacon de récupération et renouvellement du solvant au contact de l'échantillon.*
- *Purge des résidus de solvant dans l'échantillon vers le flacon de récupération à l'aide d'un gaz approprié [8].*

#### **II.4 Mécanisme de l'extraction solide-liquide par solvants [82] :**

Dans le cas typique de l'extraction des matières végétales, le soluté est localisé dans des cellules végétales à parois très peu perméables. L'extraction de ces matières par solvants, est un processus assez complexe, basé sur le phénomène de transfert de matière où le solvant pénètre en premier dans la cellule (solide), son rôle est de dissoudre le soluté s'y trouvant. Après la dissolution du soluté dans le solvant, ce dernier se trouve saturé en soluté ce qui va provoquer par diffusion un transfert de matière du soluté vers le solvant non saturé.

Ce processus peut être résumé en quatre étapes :

- *Pénétration du solvant dans le solide ;*
- *Dissolution du soluté dans le solvant ;*
- *Transfert de matière extraite à travers les membranes cellulaires ;*
- *Diffusion de la matière extraite de la surface du végétal vers le solvant non saturé.*

### **II.5 Facteurs intervenant dans l'extraction solide-liquide [83] :**

L'extraction par solvant peut être influencée par plusieurs facteurs :

➤ **La température :**

L'élévation de la température permet généralement l'accroissement de la solubilité, de la diffusion du soluté et la diminution de la viscosité de la solution. Elle est limitée par le risque d'extraire des composés nuisibles, par le risque de dégradation thermique de soluté.

➤ **L'agitation du fluide :**

L'agitation du solvant en contact du solide permet le maintien des particules en suspension et l'homogénéité du milieu, a un effet toujours favorable sur l'opération.

➤ **Le taux de l'humidité :**

L'humidité influe négativement sur le rendement dans le cas d'utilisation des solvants hydrophobes qui peuvent pénétrer dans la cellule pour extraire les produits.

➤ **La nature du solvant :**

Le choix du solvant repose sur plusieurs paramètres : Sélectivité, température d'ébullition peu élevée. Grande capacité de dissolution. Faible viscosité. Sécurité de manipulation (point d'éclair, inflammabilité, toxicité). Prix du solvant et possibilité de recyclage.

➤ **La durée d'extraction :**

Il est conseillé d'arrêter l'extraction à l'instant où le rendement en produit de meilleure qualité soit maximum.

➤ **Nature et état du solide et du soluté :**

Plus la matière est divisée et plus la surface d'échange est grande et plus le parcours moyen du soluté est petit. La fragmentation fine s'impose lorsque le soluté est occlus dans un réseau d'inerte, mais une grande finesse du solide peut devenir un inconvénient quoique la division n'est pas toujours une règle générale.

Les rejets d'huileries d'olive présentent une composition plus au moins variable. Elle dépend de la qualité des olives, de leur degré de maturité, du système d'extraction et de la qualité d'eau rajoutée lors de la phase d'extraction de l'huile

Les matières végétales utilisées lors de notre étude sont le grignon d'olive et la margine. Ces derniers ont été récupérés en janvier 2015, provenant d'une Maâsra traditionnelle située dans la région d'AKBOU dans la Wilaya de Béjaia, Algérie.



**Figure V.1:** le grignon d'olive.



**Figure V.2:** la margine

## **I. Caractérisation physicochimique du grignon d'olive et de la margine :**

### ***I.1 L'humidité :***

L'humidité ou encore la teneur en eau est déterminée en calculant le pourcentage d'eau contenue dans l'échantillon.

### ***I.2 Les cendres :***

L'extrait sec est introduit dans un four à moufle dont la température est portée à 550-600°C pendant 2h.

### ***I.3 pH :***

Après étalonnage du pH-mètre de marque HANNA, l'électrode de mesure est plongé dans un bécher contenant un volume de 20 à 30 ml de margine ou l'on note le pH.

### I.4 Conductivité :

La conductivité caractérise la résistance au passage du courant électrique ou de la chaleur dans un matériau. La conductivité électrique est mesurée à l'aide d'un conductimètre de type HANNA HI8733. La sonde du conductimètre, une fois rincée, est plongée dans un bécher contenant 20 ml de margine à analyser, ceci en prenant soin à ce que les électrodes soient complètement immergées.

### I.5 Teneur en polyphénols :

Pour déterminer la teneur en polyphénols totaux dans les différents rejets d'huilerie, nous avons opté pour le protocole suivant:

- Dans deux ballons de distillation à reflux, nous avons introduit 10 g de grignon d'olive et 10 ml de margine respectivement
- Nous avons rajouté 200ml d'éthanol
- Nous avons chauffé à température de 100°C pendant 24h.
- Après filtration, nous avons analysé les deux échantillons par la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) (Annexe 4).

## II. Réactifs et solvants employés :

1. Réactif de FOLIN-CIOCALTEU:
2. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4.25%.
3. Les solvants : Les solvants utilisés dans ce travail sont donnés dans le tableau V.1

**Tableau V. 1 :** Propriétés physico-chimiques des solvants utilisés.

Solvant	Eau	Ethanol	Méthanol	Acétone	Acétate d'éthyle	Ethér diéthélique
Formule brute	H <sub>2</sub> O	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	CH <sub>4</sub> O	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O
M. Moléculaire (g/mole)	18,01	46,06	32,04	58,08	88,11	74,12
T. d'ébullition (°C)	100	78,37	64,7	56	77,1	34,6
T. de fusion (°C)	0	-114	-97,6	-95	-83,6	-116,3
Densité (Kg/m <sup>3</sup> )	999,97	789	791,80	791,00	897,00	/
Indice de réfraction à 20°C	1,333	1,361	1,329	1,358	1,3723	/
Pureté (‰)	100	97	96	98	95	/

### III. Procédés d'extraction des polyphénols :

L'extraction des polyphénols s'effectue généralement au moyen de solvants appropriés tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le N,N-diméthylformamide (Turkmen *et al.*, 2007), l'éther diéthylique (Moussaoui, 2007; El Hadrami *et al.*, 2004), l'acétate d'éthyle (Nassif, 2004; Ghattas, 2004; Kosar *et al.*, 2003; De Leonardis *et al.*, 2008; De Marco *et al.*, 2007; Fki *et al.*, 2005a). l'éther de pétrole, le n-butanol, l'eau (Kosar *et al.*, 2003), le méthyléthylcétone, méthylisobutylcétone (Fki *et al.*, 2005a) et l'acétonitrile, soit à partir d'un solide (ex: matière première végétale) dont l'objectif est de libérer les polyphénols présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion, ou à partir d'un liquide tel que le plasma, les urines, les eaux usées, les margines. Ces dernières subissent une délipidation préalable, pour éliminer la totalité des lipides et faciliter l'extraction.

L'efficacité de l'extraction au solvant est influencée par la nature du solvant, le pH du milieu d'extraction qui détermine le degré de solubilité des substances solubles, la température, le nombre d'extraction et le volume du solvant utilisé ainsi que la taille et la forme des particules. [84]

### IV. Extraction Solide-liquide :

Dans notre présent travail, nous avons étudié l'extraction solide-liquide qui consiste à extraire des composés phénoliques à partir de la matière végétale (grignon d'olive). Les paramètres que nous avons étudiés sont le procédé d'extraction, la nature du solvant, la durée d'extraction, la température d'extraction et la masse du grignon.

#### IV.1 Extraction par distillation :

Le protocole expérimental suivi pour la réalisation de cette extraction est le suivant:

- Mettre en marche le bain thermostat à la température indiquée.
- Peser exactement à l'aide d'une balance électronique, environ 10 grammes de grignon.
- Introduire le grignon d'olive dans le ballon.
- Verser 20 ml de solvant dans le ballon.
- Assembler le montage, les vapeurs du solvant se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le ballon.
- A l'aide d'une pipette graduée, prélever une quantité désirée de la solution à chaque temps.

## V.Extraction Liquide-liquide :

Dans ce travail, nous avons étudié également l'extraction liquide-liquide qui consiste à extraire les polyphénols à partir des effluents d'huilerie (la margine). l'extraction été faite par distillation et les paramètres étudiés sont les suivants la nature du solvant, la durée de l'extraction et la température d'extraction.

### V.1 Extraction par distillation :

Nous avons extrait par distillation les polyphénols à partir de la margine en suivant pratiquement le même protocole expérimental:

- Mettre en marche le bain thermostat à la température selon les conditions opératoires.
- Verser un volume de 10 ml de margine dans le ballon.
- Verser le solvant dans le ballon (200ml).
- Assembler le montage, les vapeurs du solvant se condensent dans le réfrigérant puis les gouttelettes de solvants retombent dans le ballon.
- Avec une pipette graduée, prélever une quantité désirée de la solution en un laps de temps précis ensuite filtrer à l'aide d'un papier filtre.



**Figure V.4 :** *Dispositif de l'extraction (au milieu).*

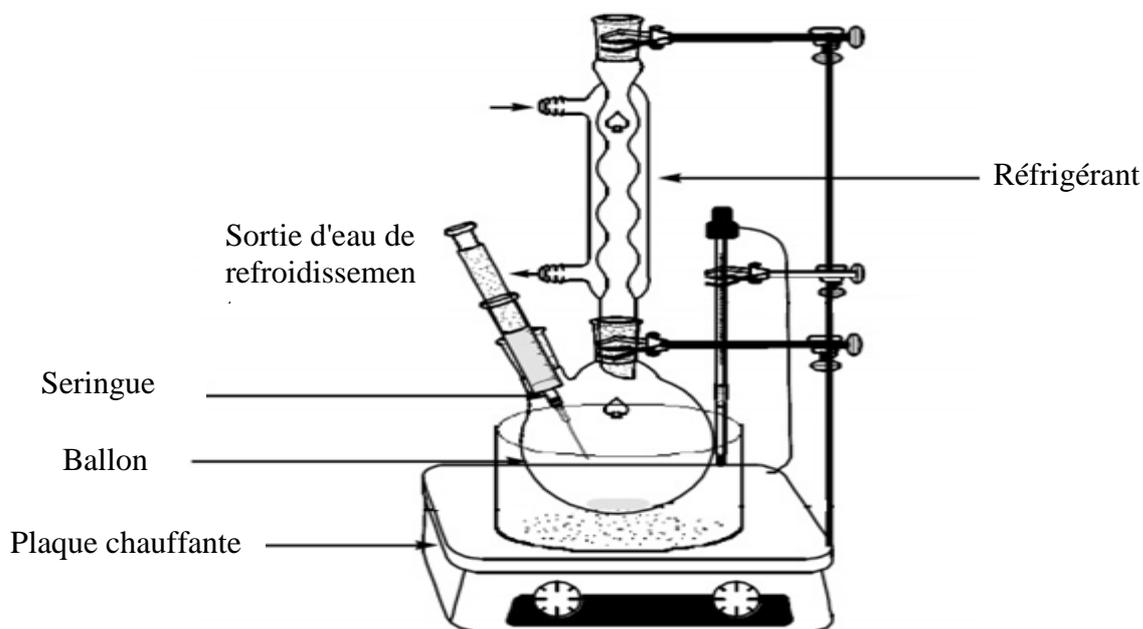


Figure V.5 : Extraction par distillation.

## VI. Conditions opératoires :

Nous avons utilisé plusieurs solvants à savoir l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle et l'acétone afin de déterminer le plus adéquat pour l'extraction des composés phénoliques. Nous avons également optimisé la température et la durée pour lesquelles nous obtenons les meilleurs rendements.

Pour le grignon d'olive, nous avons utilisé 10g de la matière végétale et 200 ml du solvant. Pour la margine, nous avons utilisé 10ml pour 200ml de solvant.

## VII. Techniques d'analyse des composés phénoliques :

### VII.1 Folin-Ciocalteu (FC) :

L'analyse des polyphénols se fait généralement par la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) qui est décrite par SRISUWAN [85] (annexe 4), à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu, L'essai FC repose sur le transfert d'électrons dans un milieu alcalin à partir des composés phénoliques et autres espèces réductrices au molybdène, formant des complexes bleus qui peuvent être détectés par spectrophotométrie à 750-765 nm. Généralement, l'acide gallique est utilisé

comme composé de référence standard et les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique (mg/l) [86].

L'analyse colorimétrique, par le réactif de FOLIN-CIOCALTEU s'est faite au niveau de laboratoire recherche du département Génie de l'Environnement (*E.N.P.*).

Nous avons utilisé le spectromètre de marque PRIMLIGHT, SECOMAM® (figure V.6) avec les caractéristiques suivantes :

- Marque : PRIMLIGHT, SECOMAM®.
- Affichage : Alphanumérique.
- Gamme spectrale : 330 à 900 nm.
- Bande passante : 8 nm.
- Précision spectrale : +/- 1,5nm.
- Source lumineuse : Lampe tungstène halogène préalignée.
- Monochromateur : Réseau protégé.
- Détecteur : Cellule silicium.
- Dimensions (L x H x P) : 280 x 180 x 220 mm.
- Masse : 2,5 kg.



**Figure V.6 :** Spectrophotomètre PRIMLIGHT, SECOMAM®.

## **VII.2 Identification et quantification par HPLC:**

### **VII.2.1 Principe :**

La chromatographie liquide à haute performance est un moyen très flexible et simple pour isoler et identifier les différents composés d'un mélange.

La HPLC a été développée en 1968 par Giddings. Le principe de séparation repose sur l'interaction des solutés entre deux phases non miscibles: la phase stationnaire qui est fixe et

la phase mobile. Plusieurs modes d'HPLC ont été développées afin de couvrir un large domaine d'application :

- **Chromatographie d'exclusion:** séparation en fonction de la taille, applicable aux grosses molécules (10 000 g/mol).
- **Chromatographie d'adsorption:** utilisée principalement pour la séparation des espèces apolaires. Les analytes sont en compétition avec la phase mobile et s'adsorbent sur un solide.
- **Chromatographie par échange d'ions:** séparation des composés ioniques par une phase stationnaire constituée d'une résine échangeuse d'ions.
- **Chromatographie de partage:** séparation des espèces non ioniques et polaires par une phase stationnaire qui peut être liquide (solvant immobilisé par adsorption physique sur la surface d'un support) ou solide (billes de silice greffées). De par la stabilité des billes de silice greffée, la chromatographie liquide-phase greffée est la plus utilisée.

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

La séparation des composés dépend de deux paramètres principaux: la nature de la phase stationnaire et celle de la phase mobile. La phase mobile, dite éluant, est constituée d'un solvant ou d'un mélange de solvants de grande pureté. Les molécules sont à la fois retenues par la phase stationnaire et éluées par la phase mobile [87].

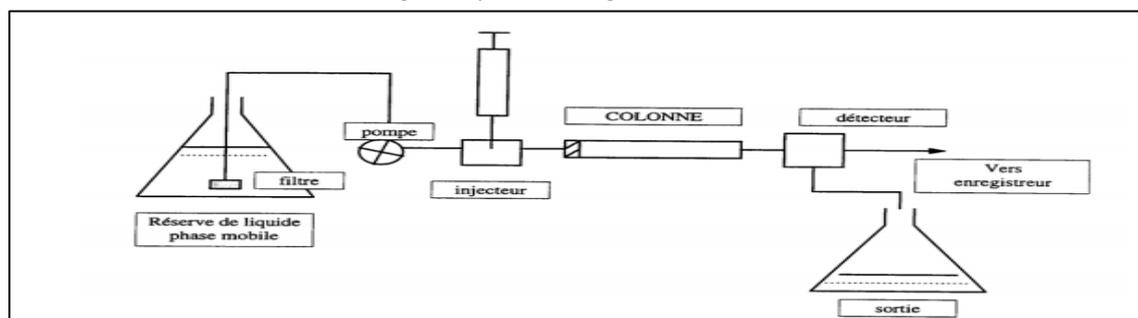
Deux types de chromatographie peuvent être distingués selon la nature chimique de la silice :

- l'HPLC en phase directe si la silice est greffée avec des groupements fonctionnels polaires (CN, NH<sub>2</sub>...). Les molécules les plus polaires ont une grande affinité avec la phase stationnaire et une faible interaction avec l'éluant.
- l'HPLC en phase inverse si la silice est constituée de longues chaînes alkyles de type C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>. Dans ce cas, les composés les moins polaires seront les plus retenus de par leurs interactions avec la phase de la colonne [87].

## VII.2.2 Appareillage :

Dans notre étude, nous avons réussi à réaliser une analyse qualitative et quantitative de certains composés phénoliques se trouvant dans nos différents extraits en utilisant une HPLC de type Agilent 1100, cette analyse a été effectuée au laboratoire privé BEKER de Dar-El-Beida. Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous:

- **Un réservoir de solvant (éluant):** contenant la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.
- **La pompe:** Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler en mode isocratique, ou 100% d'un même éluant est utilisé tout au long de l'analyse et en mode gradient, où les constituants de la phase mobile varient. Dans notre étude, nous avons utilisé une pompe en mode gradient. Dans notre cas nous avons travaillé en mode gradient.
- **Vanne d'injection:** Nous avons utilisé une boucle de 5 $\mu$ l. Le choix du volume de la boucle s'est fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.
- **Colonne:** Nous avons utilisé une colonne de type C<sub>18</sub>
- **Détecteur:** Nous avons utilisé un détecteur à barrettes de diodes (DAD) à trois dimensions permettant de mesurer directement l'absorbance sur plusieurs longueurs d'onde à la fois, ce qui nous permet de nous donner à chaque temps, le spectre correspondant.
- L'ordinateur est muni d'un logiciel spécialisé Agilent ChemStation.



**Figure V.7:** Principe de fonctionnement de l'HPLC.

### VII.2.3 Les conditions chromatographiques utilisées sont:

- **Colonne :** C<sub>18</sub> de 15cm x 150 mm x 4,6 mm de marque KNAUER.
- **Phase mobile :** Méthanol / Eau / Acetonitrile (60 / 20 / 20).
- **Débit :** 1ml/min.
- **Volume d'injection:** 5µl.
- **Longueur d'onde :** 254 nm.
- **Temps d'injection:** 20min.
- **Température:** 22°C.
- **Pression :** 118 bars.

### VIII.Teneur en polyphénols :

La teneur en polyphénols est calculée par la formule suivante :

$$\text{teneur (\%)} = 100 \times \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}}$$

Où : -  $M_{\text{ext}}$  est la masse des polyphénols dans l'extrait (en mg)

-  $M_{\text{éch}}$  est la masse sèche de l'échantillon végétal (en mg).

### XI.Le rendement d'extraction :

Le rendement est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Rendement (\%)} = 100 \times \frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{Pt}}}$$

Où : -  $M_{\text{ext}}$  est la masse des polyphénols dans l'extrait (en mg)

-  $M_{\text{Pt}}$  est la masse des polyphénols totaux présents dans l'échantillon végétal (en mg).

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physicochimique des grignons d'olives. Nous avons également effectué une étude cinétique et paramétrique de l'extraction par distillateur des polyphénols à partir de deux rejets d'huilerie (les grignons d'olive et la margine) dans le but de déterminer les conditions opératoires requises pour une extraction maximale des polyphénols.

## I. Caractérisation physicochimique du grignon d'olive :

### ➤ Humidité :

La teneur en eau est l'un des paramètres les plus importants à déterminer. L'humidité a été calculée en utilisant la relation suivante (voir Annexe 4) :

$$\text{Humidité (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} * 100 = \frac{72,9666 - 70,30}{10} * 100 = 25,6 \%$$

Où :  $m_1$  : masse du creuset et la prise de grignons d'olives avant séchage = 72,9 g.

$m_2$  : masse du creuset et la prise de grignons d'olives après séchage = 70,30 g.

$m_3$  : masse de la prise de grignon d'olive avant séchage = 10 g.

### ➤ Les cendres :

La teneur en cendres, exprimée en pourcentage:

$$\text{Cendre (\%)} = \frac{(m_1 - m_{cr})}{(m_2 - m_{cr})} * 100 = \frac{(62,9666 - 62,8631)}{(70,30 - 62,8631)} * 100 = 1,39 \%$$

Où :  $m_{cr}$  : la masse du creuset vide = 62,8631 g.

$m_1$  : la masse du creuset et des cendres = 62,9666 g.

$m_2$  : la masse du creuset et la prise de grignons d'olives sèche = 70,30 g.

Le tableau suivant donne les principales caractérisations du grignon d'olive utilisé :

**Tableau VI.1:** Caractéristiques physicochimiques du grignon d'olive brut

Paramètres	Valeur expérimentale	Valeurs relevées dans la bibliographie [34])
<b>Couleur</b>	Marron foncé-noir	Marron foncé-noir
<b>Humidité (%)</b>	25,6	27,2
<b>Cendre (%)</b>	1,36	2,36
<b>Teneur en polyphénols (%)</b>	1,5	1,14-2,34

La composition phénolique de l'huile et des rejets d'huilerie dépend non seulement de la variété, de la maturité du fruit et des conditions climatiques, mais également des procédés technologiques utilisés pour séparer la phase aqueuse de la phase huileuse.

Dans notre étude, le taux de polyphénols se situe au voisinage de 1,5%, sachant que la teneur en polyphénols dans le grignon d'olive citée par le Dr Ahmed TRIGUI (2008) [34] se situe dans l'intervalle de 1,1 à 2,3%.

La teneur en eau est pratiquement modeste (25,6%), ce qui confirme que notre grignon est issu d'une huilerie traditionnelle (Maasra). Ce résultat est relativement proche de celui cité dans la littérature [34].

La faible teneur en cendres (1,39 %) reflète la faible quantité des minéraux dans notre grignon d'olive.

## II Résultats de l'étude physico-chimique des margines :

Les principaux résultats physico-chimiques des margines issus de la région d'AKBOU sont consignés dans le tableau 19:

**Tableau VI.2 :** *Caractéristiques physicochimiques de la margine.*

Paramètres	Valeur expérimentale	Valeur relevées dans la bibliographie [42,47]
Couleur	Marron foncé-noir	Marron foncé-noir
pH	4.7	4,5 - 5,5
DCO	190	100 - 220 kg/m <sup>3</sup>
Humidité (%)	79,65	83 - 88
Cendre (%)	0,1369	1,5 - 2
Teneur en polyphénols (%)	1,3	1,0 - 1,5

La concentration en MS a été calculée en utilisant la relation suivante :

$$MS = \frac{m_1 - m_2}{V} * 1000 = \frac{60,4140 - 58,44}{10} * 1000 = 197,4 \text{ g/L.}$$

Où :  $m_1$ : masse du creuset remplie de margine séchée à 105°C = 60,4140 g.

$m_2$ : masse du creuset vide = 58,44 g.

$V$ : volume de l'échantillon à analyser = 10m

La quantité en cendres a été calculée en utilisant la relation suivante :

$$\text{Cendre} = \frac{(m_1 - m_{cr})}{V} * 1000 = \frac{(90,77 - 90,7565)}{10} * 1000 = 1,35 \text{ g/L}$$

- Où :
- m<sub>1</sub>**: Masse du creuset et des cendres = 90,77 g.
  - m<sub>cr</sub>**: Masse du creuset vide = 90,7565 g.
  - V**: Volume de l'échantillon à analyser = 10ml.

La teneur en cendres est donnée par la relation suivante :

$$\text{Cendre (\%)} = \frac{1,35 * V}{m_0} = \frac{1,35 * 0,01}{9,68} = 0,139\%$$

- Où :
- m<sub>0</sub>**: Masse correspondante au 10ml de l'échantillon = 9,68 g.
  - V**: Volume de l'échantillon à analyser = 10ml.

- Le tableau V.1 montre que les margines sont des effluents moyennement acides (pH=4.7). Ces résultats sont relativement identiques à ceux trouvés par Ranalli. G *et al* (2003) [47].
- La teneur en eau est importante (79,65%). La teneur citée par Benyahia Nadia et Zein Karim [42] se situe au voisinage de (83-88 %).
- La teneur en cendre est très faible par rapport à celle citée par la littérature.
- La teneur en polyphénols (≈1,3%), se situe dans l'intervalle (1-1,5 %) cité par Benyahia Nadia et Zein Karim (2003) [42].

### III Méthode de travail :

Pour le grignon, nous avons suivi les cinétiques d'extractions des polyphénols par distillation en variant différents solvants (eau, méthanol, éthanol, acétate d'éthyle et acétone) par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (FC). La quantité de grignon d'olive et la durée d'extraction ainsi que le volume du solvant ont été fixées respectivement à 10 g, 220 minutes et 200 ml. L'analyse des échantillons prélevés au cours du temps a permis de tracer les rendements des cinétiques d'extractions pour chaque solvant.

Une fois que nous avons déterminé le solvant adéquat, nous sommes passé à l'étape suivante qui consiste à optimiser la durée, la température et la masse pour lesquelles nous obtenons les meilleurs rendements.

Pour la margine, la même démarche a été adoptée en variant plusieurs solvants (eau, éthanol, acétate d'éthyle, éther diéthylique). Le volume de la margine et la durée d'extraction ainsi que le volume du solvant ont été fixés respectivement à 10ml, 220 minutes et 200 ml de solvant. Pratiquement les mêmes paramètres ont été optimisés (durée, température, volume du solvant).

En ce qui concerne la méthode instrumentale par HPLC, nous avons suivi la cinétique d'extraction (à partir des margines et du grignon) de certains composés phénoliques (acide gallique, phénol) en se référant à des étalons (standards).

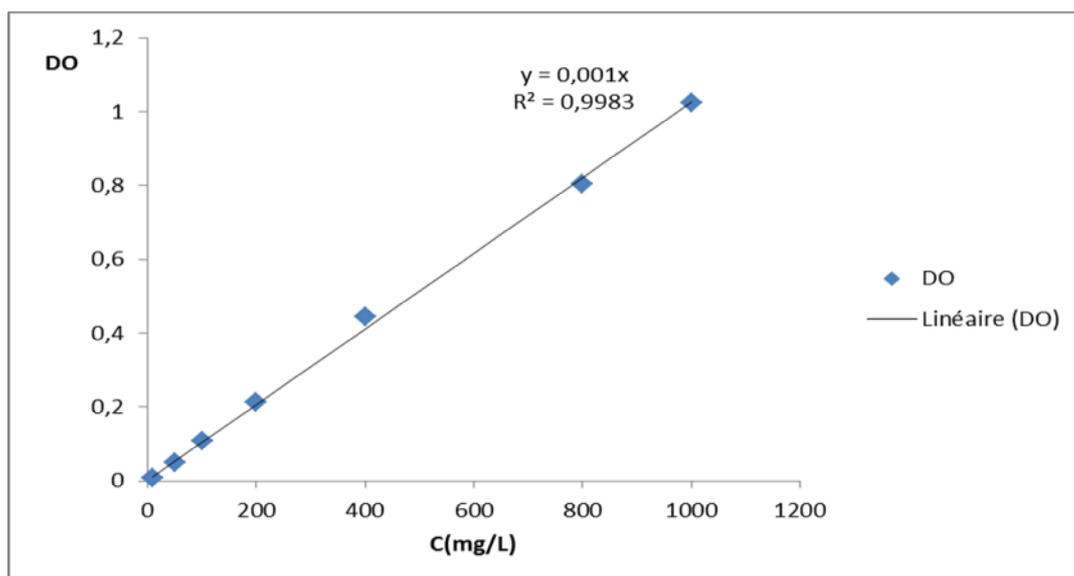
## IV Dosage des polyphénols par la méthode colorimétrique :

### IV.1 Détermination de la courbe d'étalonnage :

Des solutions très diluées et de différentes concentrations de l'acide gallique sont préparées, Nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu, et nous avons déterminé la densité optique des différentes solutions, la lecture a été réalisée plusieurs fois pour vérifier la reproductibilité des mesures, les résultats sont représentés dans le tableau VI.3.

**Tableau VI.3 :** Résultats de la densité optique.

C (mg/L)	10	50	100	200	400	800	1000
DO	0,008	0,049	0,108	0,213	0,445	0,804	1,023



**Figure VI.1 :** Courbe d'étalonnage exprimant les absorbances en fonction des concentrations de l'acide gallique (mg/l).



**Figure VI.2 :** Solutions diluées de l'acide gallique préparées à partir d'une solution mère (1g/L) selon la méthode de Folin-Ciocalteu.

## **IV.2 Analyse des échantillons extraits :**

La détermination de la concentration en polyphénols totaux (en équivalent acide gallique) a été effectuée selon la méthode FC (Annexe 4) et à partir de la courbe d'étalonnage illustrée ci-dessus.

Ces concentrations nous ont permis de calculer la teneur en polyphénols ainsi que le rendement d'extraction.

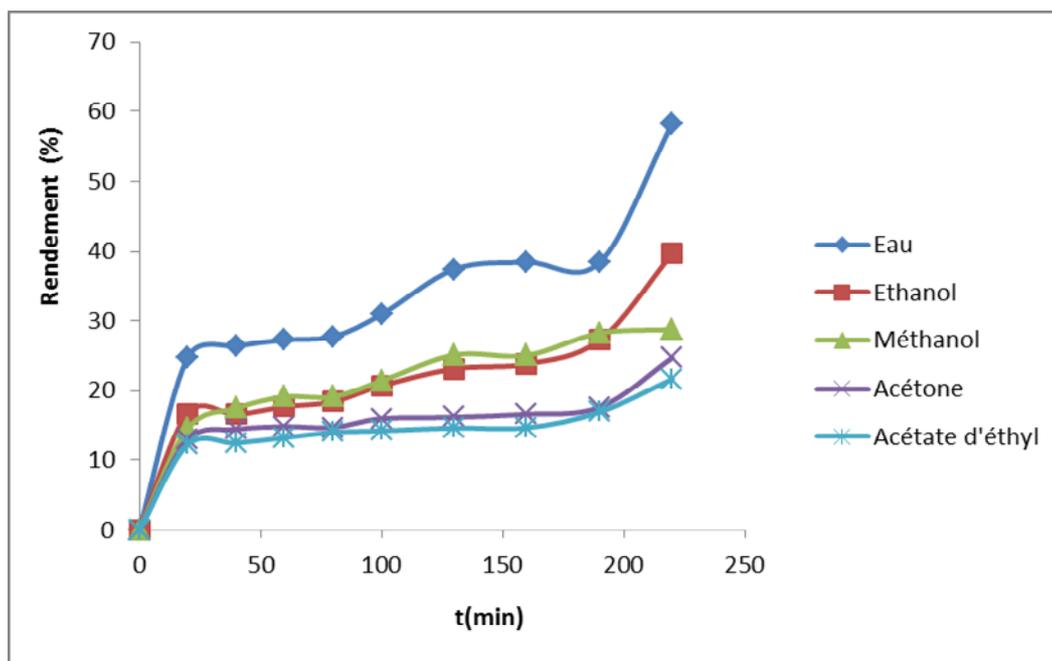
### **IV.2.1 Grignon d'olive :**

#### **IV.2.1.1 Etude de la cinétique d'extraction par distillation :**

Les rendements d'extraction des polyphénols à partir du grignon d'olive obtenus pour chaque solvant utilisé sont représentés dans le tableau 4 et les figures VI.3 sachant que pour chaque solvant, la température d'extraction appliquée correspond à sa température d'ébullition.

Tableau VI.4: La cinétique d'extraction par distillation moyennant plusieurs solvants.

Eau										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
DO	0	0,136	0,145	0,151	0,154	0,172	0,21	0,216	0,216	0,328
C (mg/L)	0	136	145	151	154	172	210	216	216	328
m (mg)	0	27,2	28,97	29,94	30,47	34	41,16	42,29	42,24	64,09
teneur %	0	0,366	0,389	0,402	0,4095	0,457	0,553	0,568	0,5677	0,861
R %	0	24,73	26,34	27,22	27,7	30,91	37,42	38,45	38,4	<b>58,26</b>
Acétate d'éthyle										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
DO	0	0,067	0,069	0,074	0,079	0,081	0,084	0,085	0,099	0,128
C (mg/L)	0	67	69	74	79	81	84	85	99	128
m (mg)	0	13,4	13,68	14,54	15,39	15,64	16,08	16,13	18,62	23,85
teneur %	0	0,18	0,184	0,195	0,2069	0,21	0,216	0,217	0,2503	0,321
R %	0	12,18	12,44	13,22	13,991	14,22	14,62	14,66	16,927	<b>21,68</b>
Ethanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
DO	0	0,092	0,092	0,099	0,104	0,118	0,133	0,138	0,159	0,234
C (mg/L)	0	92	92	99	104	118	133	138	159	234
m (mg)	0	18,4	18,24	19,46	20,26	22,79	25,46	26,19	29,9	43,61
teneur %	0	0,247	0,245	0,262	0,2723	0,306	0,342	0,352	0,4019	0,586
R %	0	16,73	16,58	17,69	18,418	20,72	23,15	23,81	27,182	<b>39,65</b>
Acétone										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
DO	0	0,071	0,08	0,083	0,083	0,091	0,093	0,096	0,103	0,145
C (mg/L)	0	71	80	83	83	91	93	96	103	145
m (mg)	0	14,2	15,86	16,32	16,177	17,58	17,81	18,28	19,374	27,12
teneur %	0	0,191	0,213	0,219	0,2174	0,236	0,239	0,246	0,2604	0,364
R %	0	12,91	14,42	14,83	14,706	15,98	16,19	16,62	17,613	<b>24,65</b>
Méthanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
DO	0	0,08	0,097	0,107	0,108	0,122	0,144	0,145	0,165	0,169
C (mg/L)	0	80	97	107	108	122	144	145	165	169
m (mg)	0	16	19,24	21,04	21,049	23,57	27,58	27,52	31,037	31,6
teneur %	0	0,215	0,259	0,283	0,2829	0,317	0,371	0,37	0,4172	0,425
R %	0	14,55	17,49	19,12	19,136	21,43	25,07	25,02	28,215	<b>28,73</b>



**Figure VI.3 :** Évolution au cours du temps des rendements d'extraction des polyphénols à partir du grignon d'olive par distillation.

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, de la figure VI.3 que l'eau et l'éthanol donnent les meilleurs rendements d'extraction qui sont de l'ordre de 58,36% et de 39,6% respectivement, alors que l'acétate d'éthyle donne le plus faible rendement (21,68 %). L'éthanol et l'eau sont préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol.

L'eau est responsable d'un pouvoir extracteur élevé par rapport à d'autres solvants et permet une meilleure extraction des polyphénols. D'après les travaux de Sripad et Prakash, l'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols. Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons hydrogène dans les solutions aqueuses. Elle pourrait également être due à l'augmentation de l'alcalinité et de l'ionisation des polyphénols dans de telles solutions [88].

Les travaux conduits par Katalinic *et al.* [89], confirment nos résultats en indiquant que l'éthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux.

En ce qui concerne l'extraction sélective des polyphénols, Counet et Collin (2003) ont montré qu'un mélange acétone/eau/acide acétique (70/28/2) était optimal pour l'extraction des flavoïdes. Callemien *et al.* (2005) ont constaté que le resvératrol est mieux extrait par un mélange éthanol/eau (80/20 à 60°C) [90].

D'après les travaux de Tian (2009), les solvants apolaires sont recommandés pour récupérer les acides tanniques de haut poids moléculaire [90].

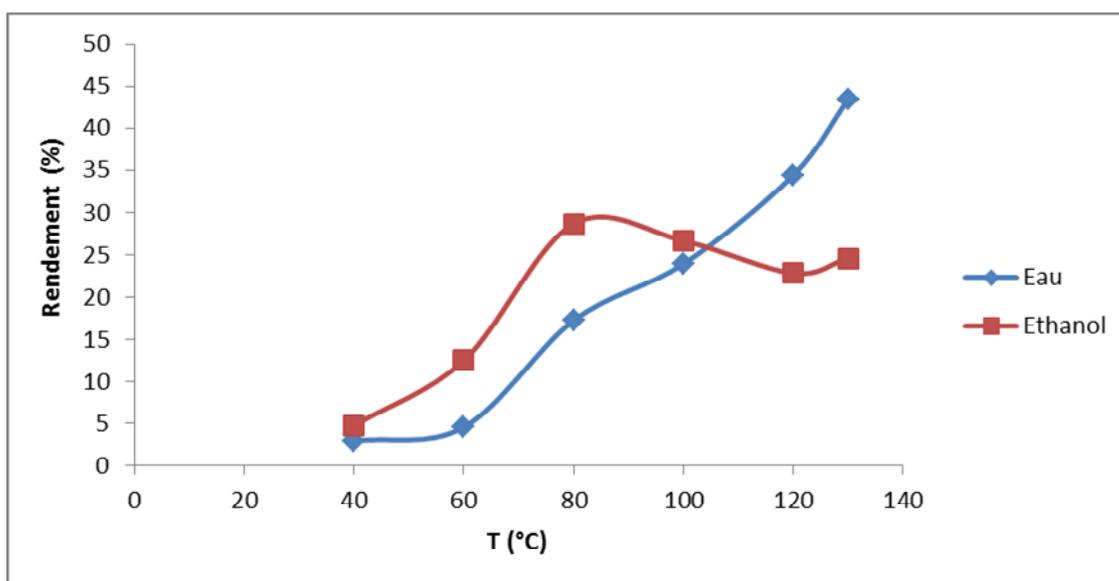
En vue de développer une extraction efficace (qualitativement et quantitativement), nous avons choisi les deux meilleurs solvants (éthanol et eau) pour effectuer l'optimisation des paramètres opératoire.

#### IV.2.1.2 Etude de l'influence de la température sur la cinétique d'extraction :

Pour étudier l'influence de la température, nous avons effectué une série de prélèvement d'une durée de 20 minutes en variant à chaque fois la température, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.5 et la figure VI.4.

**Tableau VI.5 :** Effet de la température sur le rendement d'extraction.

<b>Eau</b>						
<b>T (°C)</b>	40	60	80	100	120	130
<b>DO</b>	0,016	0,025	0,095	0,132	0,19	0,24
<b>C (mg/L)</b>	16	25	95	132	190	240
<b>m (mg)</b>	3,2	4,995	18,981	26,3208	37,848	47,76
<b>teneur %</b>	0,043	0,0671371	0,255	0,35377419	0,50870968	0,641
<b>R %</b>	2,9	4,5	17,3	23,9	34,4	<b>43,4</b>
<b>Ethanol</b>						
<b>T (°C)</b>	40	60	80	100	120	130
<b>DO</b>	0,026	0,069	0,158	0,147	0,126	0,136
<b>C (mg/L)</b>	26	69	158	147	126	136
<b>m (mg)</b>	5,2	13,7862	31,5368	29,3118	25,0992	27,064
<b>teneur %</b>	0,069	0,185	0,423	0,393	0,337	0,363
<b>R %</b>	4,7	12,5	<b>28,7</b>	26,6	22,8	24,6



**Figure VI.4:** Evolution du rendement en fonction de la température d'extraction.

En examinant les courbes ci-dessus, nous avons remarqué que dans le cas de l'éthanol, le rendement est très élevé au voisinage de (70°C - 90°C), mais au-delà de cette température, nous avons observé une diminution qui serait due à une altération des polyphénols sous l'effet de la température.

En utilisant l'eau et d'après les résultats obtenus, le rendement croît de manière linéaire avec l'augmentation de la température mais nous n'avons pas pu atteindre l'optimum mais nous estimons qu'il est au voisinage de 130°C car les polyphénols sont fragiles aux très hautes températures.

L'augmentation de la température favorise d'une part la diffusion et la solubilité des substances extraites, d'autre part elle détruit certaines substances fragiles [91]. Mais le problème selon Rosales [92] et Jokić *et al* [93] est que l'eau et l'acétone, spécialement à hautes températures, extraient aussi des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques.

#### IV.2.1.3 Etude de l'influence de la durée sur la cinétique d'extraction:

Pour étudier l'influence de la durée d'extraction, nous avons suivi le rendement d'extraction pendant 9 heures en faisant un prélèvement tous les 60 minutes, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.6 et la figure VI.5.

Eau (130°C)										
t (h)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DO	0	0,244	0,302	0,332	0,382	0,396	0,442	0,448	0,464	0,465
C (mg/L)	0	244	302	332	382	396	442	448	464	465
m (mg)	0	48,8	60,3396	66,267	76,171	78,8832	87,958	89,062	92,15	92,256
teneur %	0	0,6559	0,81102	0,8907	1,0238	1,06026	1,1822	1,1971	1,2386	1,24
R %	0	44,4	54,9	60,2	69,2	71,7	80,0	81,0	83,8	<b>83,9</b>

Ethanol (130°C)										
t (h)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DO	0	0,097	0,121	0,149	0,159	0,178	0,19	0,209	0,225	0,23
C (mg/L)	0	97	121	149	159	178	190	209	225	230
m (mg)	0	19,4	24,1758	29,74	31,705	35,4576	37,81	41,549	44,685	45,632
teneur %	0	0,2608	0,32494	0,3997	0,4261	0,47658	0,5082	0,5585	0,6006	0,6133
R %	0	17,7	22,0	27,0	28,8	32,2	34,4	37,8	40,6	<b>41,5</b>

Tableau VI.6 : Effet de la durée sur le rendement d'extraction.

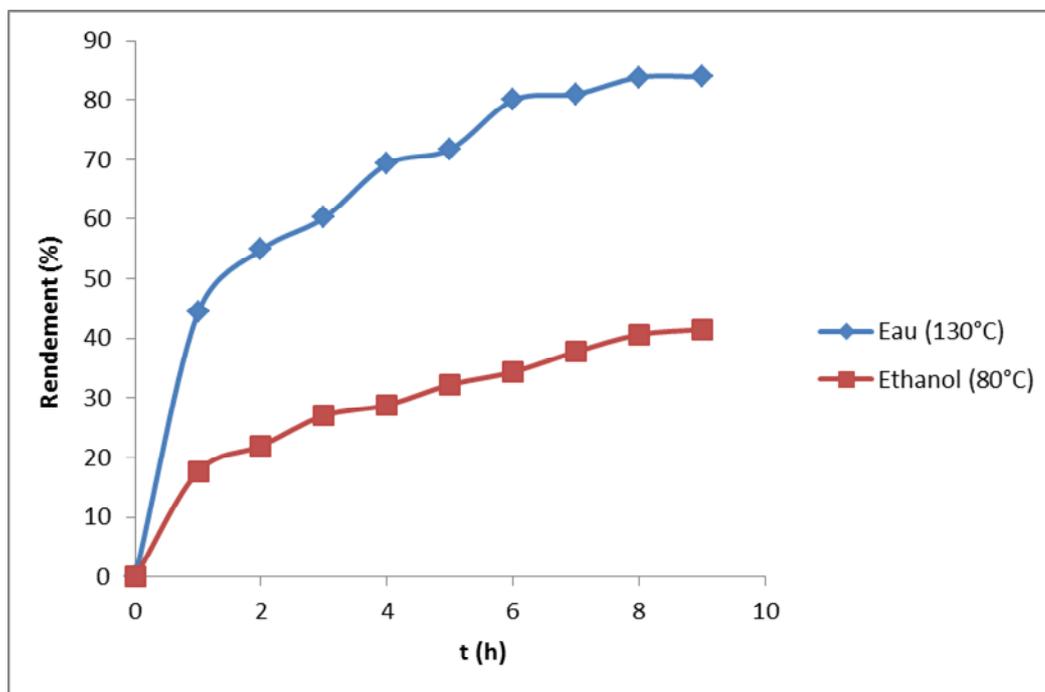


Figure VI. 5 : Evolution du rendement en fonction du temps d'extraction.

L'analyse de la figure précédente révèle qu'après une durée d'extraction de 7 h, les deux courbes de l'eau et de l'éthanol commencent à se stabiliser à un rendement au voisinage de 84 et 40% respectivement.

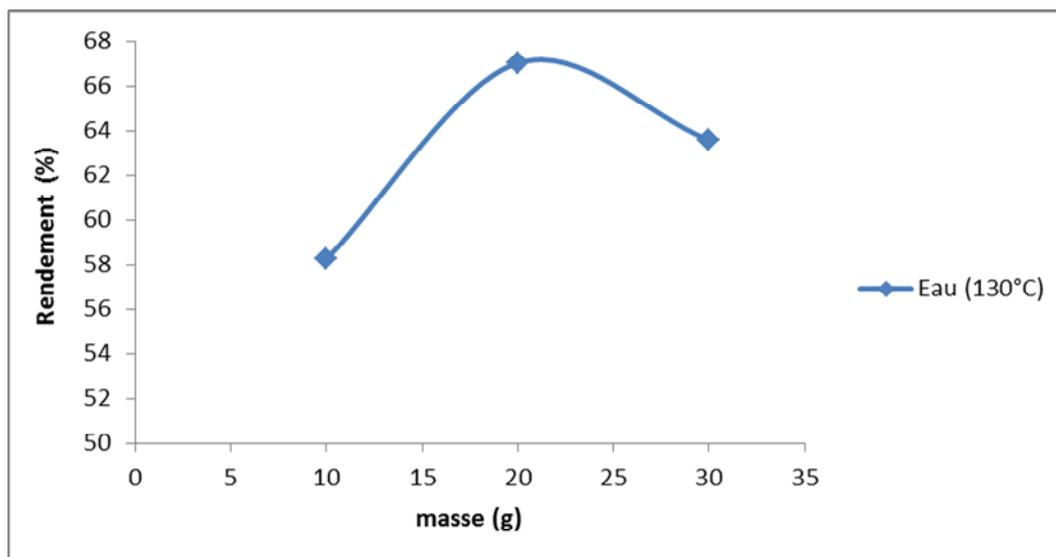
Nous avons constaté que l'augmentation du temps d'extraction augmente avec la quantité des polyphénols extraits. Une augmentation supplémentaire de la période d'extraction optimale (7h dans notre cas) consomme beaucoup de temps et n'est donc pas économique. Lafka *et al*, (2007) [94] ne signalent aucune augmentation significative de la quantité d'extrait phénolique suite à l'augmentation de la période d'extraction qui conduit à une diminution de leur activité antioxydante en raison de sa longue exposition aux facteurs environnementaux (température, lumière, oxygène), qui ont un effet négatif sur l'activité antioxydante.

#### IV.2.1.4 Etude de l'influence de la masse du grignon d'olive sur la cinétique d'extraction :

Nous avons fait varier la masse de la matière végétale (le grignon d'olive) en fonction du temps. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.7 et la figure VI.6. L'optimisation du paramètre masse a été réalisé en utilisant un seul solvant (l'eau).

**Tableau VI.7 :** Effet de la masse végétale sur le rendement d'extraction.

<b>m (g)</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
<b>DO</b>	0,328	0,737	1,049
<b>C (mg/L)</b>	328	737	1049
<b>m (mg)</b>	64,09	147,4	209,8
<b>teneur %</b>	0,8614	3,962	8,4597
<b>R %</b>	58	<b>67</b>	64



**Figure VI. 6 :** Evolution du rendement en fonction de la masse du grignon d'olive.

La figure V.6 illustre l'évolution du rendement d'extraction avec l'augmentation de la masse du grignon d'olive. Nous remarquons qu'au-delà d'une certaine masse (20g) le rendement d'extraction est plus faible. Nous pouvons conclure que la détermination du rapport masse de la matière végétale–volume du solvant est une étape cruciale dans le procédé d'extraction par solvant, la libération des polyphénols présents dans le tissu végétal exige la rupture de ces tissus suite à la pénétration du solvant à l'intérieur de la matrice végétale, donc chaque masse a un volume du solvant correspondant pour enregistrer les meilleurs rendements d'extraction.

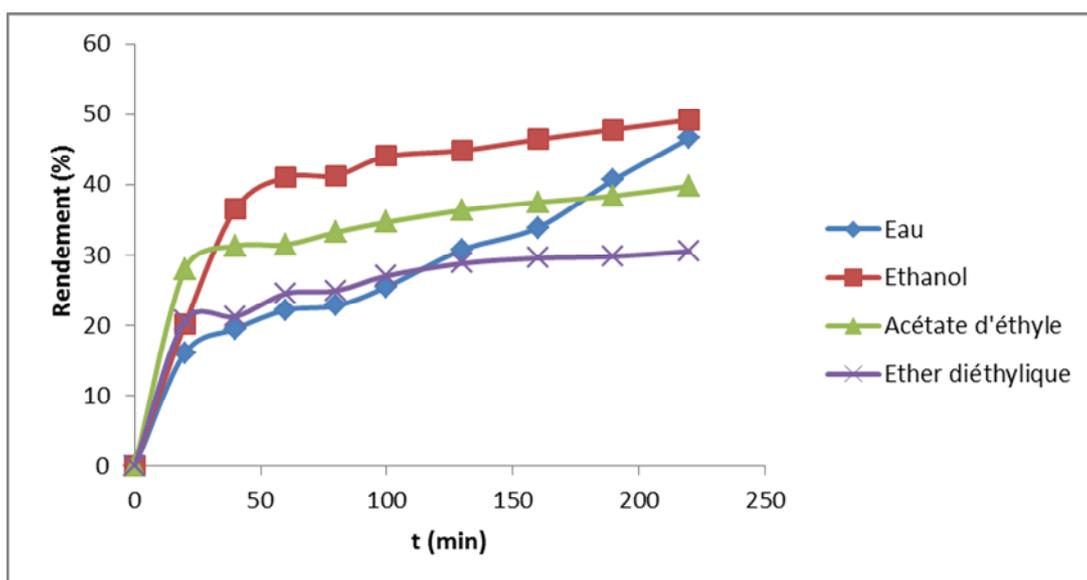
## IV.2.2 Margine :

### IV.2.2.1 Etude de la cinétique d'extraction par distillation :

Le tableau VI.8 et la figure VI.7 regroupent les valeurs des rendements d'extraction des polyphénols à partir de la margine en utilisant plusieurs solvants, sachant que pour chaque solvant, la température d'extraction appliquée correspond à sa température d'ébullition.

**Tableau VI.8 :** Cinétique d'extraction par distillation moyennant plusieurs solvants.

<b>Eau</b>										
<b>t(min)</b>	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
<b>DO</b>	0	0,1	0,122	0,139	0,143	0,16	0,193	0,213	0,256	0,294
<b>C (mg/L)</b>	0	100	122	139	143	160	193	213	256	294
<b>m (mg)</b>	0	20	24,38	27,744	28,514	31,872	38,407	42,344	50,842	58,271
<b>teneur %</b>	0	0,207	0,252	0,2866	0,2946	0,3293	0,3968	0,4374	0,5252	0,602
<b>R %</b>	0	16	19,5	22,2	22,8	25,5	30,7	33,9	40,7	<b>46,6</b>
<b>Ethanol</b>										
<b>t (min)</b>	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
<b>DO</b>	0	0,126	0,23	0,261	0,265	0,285	0,293	0,305	0,318	0,329
<b>C (mg/L)</b>	0	126	230	261	265	285	293	305	318	329
<b>m (mg)</b>	0	25,2	45,61	51,313	51,649	55,062	56,11	58,072	59,816	61,523
<b>teneur %</b>	0	0,26	0,471	0,5301	0,5336	0,5688	0,5796	0,5999	0,6179	0,6356
<b>R %</b>	0	20,2	36,5	41,1	41,3	44,1	44,9	46,5	47,9	<b>49,2</b>
<b>Acétate d'éthyle</b>										
<b>t(min)</b>	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
<b>DO</b>	0	0,175	0,197	0,2	0,213	0,224	0,237	0,246	0,255	0,266
<b>C (mg/L)</b>	0	175	197	200	213	224	237	246	255	266
<b>m (mg)</b>	0	35	39,07	39,32	41,514	43,277	45,386	46,838	47,966	49,742
<b>teneur %</b>	0	0,362	0,404	0,4062	0,4289	0,4471	0,4689	0,4839	0,4955	0,5139
<b>R %</b>	0	28	31,3	31,5	33,2	34,6	36,3	37,5	38,4	<b>39,8</b>
<b>l'éther diéthylique</b>										
<b>t(min)</b>	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
<b>DO</b>	0	0,129	0,134	0,156	0,16	0,175	0,188	0,194	0,198	0,204
<b>C (mg/L)</b>	0	129	134	156	160	175	188	194	198	204
<b>m (mg)</b>	0	25,8	26,57	30,67	31,184	33,81	36,002	36,938	37,244	38,148
<b>teneur %</b>	0	0,267	0,275	0,3168	0,3221	0,3493	0,3719	0,3816	0,3848	0,3941
<b>R %</b>	0	20,6	21,3	24,5	24,9	27,0	28,8	29,6	30,0	<b>30,5</b>



**Figure VI.7 :** Évolution au cours du temps des rendements d'extraction des polyphénols à partir de la margine par distillation.

Les rendements d'extraction diffèrent significativement en fonction de la nature du solvant utilisé. Les résultats obtenus donnés par le tableau VI.8 et la figure VI.7 montrent que l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction (49 %) suivi par l'eau, l'acétate d'éthyle et l'éther diéthylique, soit des rendements de 47, 42 et 40% respectivement.

Le choix du solvant a été conditionné par le caractère polaire des composés phénoliques identifiés dans notre matière végétale. Il est à noter aussi que d'après les travaux de Bonnaillie. C *et al* (2012), l'éthanol (solvant moyennement polaire, constant diélectrique  $\epsilon' = 24,3$ ) solubilise correctement des composés phénoliques moyennement polaires (les catéchines monomères...) et peut entraîner aussi des substances lipophiles résiduelles. Par contre, les flavonoïdes polymères et les non-flavonoïdes étant plus polaires sont plus solubles dans l'eau (solvant fortement polaire, constante diélectrique  $\epsilon' = 78,3$ ) [95].

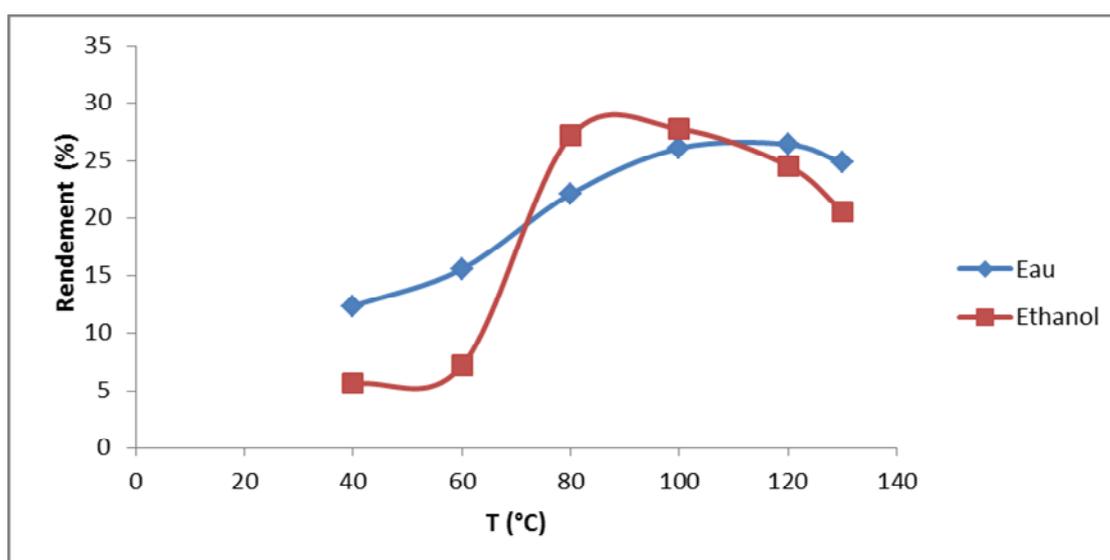
L'acidification des margines est responsable de l'hydrolyse du complexe des composés phénoliques avec libération des monomères (De Marco *et al.*, 2007), et l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans le solvant organique (Obied *et al.*, 2005a ; Fki *et al.*, 2005a) [84].

#### IV.2.2.2 Etude de l'influence de la température sur la cinétique d'extraction :

Pour étudier l'influence de la température, nous avons effectué une série de prélèvement toutes les 20 minutes en variant la température, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.9 et la figure VI.8.

**Tableau V.9:** Effet de la température sur le rendement d'extraction.

Eau						
T (°C)	40	60	80	100	120	130
DO	0,077	0,097	0,138	0,163	0,165	0,155
C (mg/L)	77	97	138	163	165	155
m (mg)	15,4	19,4	27,6	32,6	33	31
teneur %	0,159	0,2	0,285	0,337	0,341	0,32
R %	12,3	15,5	22,1	26,1	<b>26,4</b>	24,8
Ethanol						
T (°C)	40	60	80	100	120	130
DO	0,039	0,045	0,171	0,175	0,155	0,13
C (mg)	39	45	171	175	155	130
m (mg)	7,8	8,991	34,13	34,9	30,88	25,87
teneur (%)	0,078	0,093	0,353	0,36	0,319	0,267
R (%)	5,6	7,1	27,1	<b>27,7</b>	24,5	20,6



**Figure V.8 :** Evolution du rendement en fonction de la température d'extraction.

Nous remarquons que le rendement d'extraction croit en fonction de la température pour atteindre un optimum. Au-delà de celle-ci, l'efficacité de l'extraction diminue.

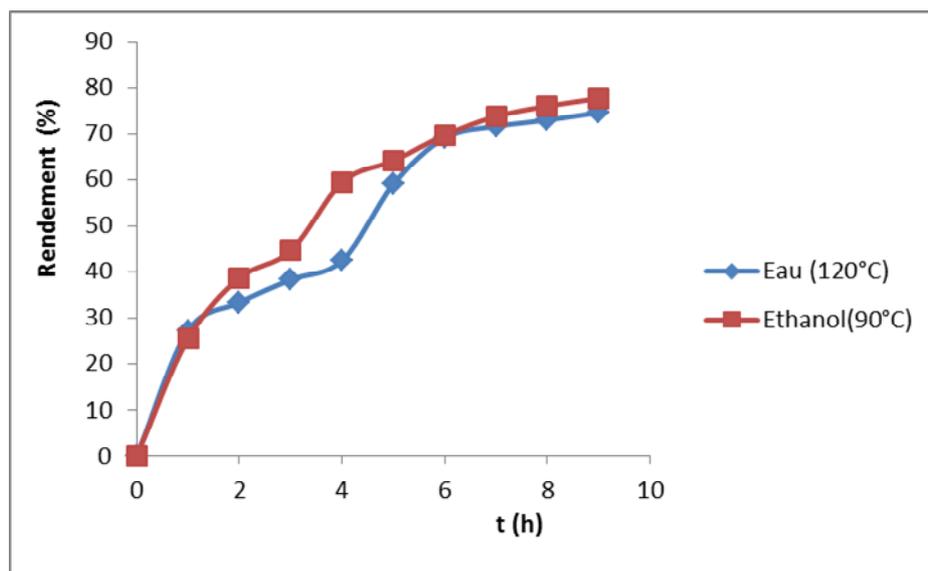
Pour l'éthanol, la température optimale se situe dans l'intervalle de 80 à 100°C alors que pour l'eau, la température optimale est obtenue à 120°C.

#### IV.2.2.3 Etude de l'influence de la durée sur la cinétique d'extraction :

Pour étudier l'influence de la durée d'extraction, nous avons suivi le rendement d'extraction pendant 9 heures en faisant un prélèvement tous les 60 minutes, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.10 et la figure VI.9

**Tableau VI.10 :** Effet de la durée sur le rendement d'extraction.

Eau										
t (h)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DO	0	0,17	0,21	0,243	0,272	0,382	0,451	0,47	0,485	0,499
C (mg/L)	0	170	210	243	272	382	451	470	485	499
m (mg)	0	34	41,643	47,774	53,013	73,802	86,367	89,488	91,229	93,313
Teneur (%)	0	0,351	0,4302	0,4935	0,5477	0,7624	0,8922	0,9245	0,9424	0,964
R %	0	27,2	33,3	38,2	42,4	59,0	69,1	71,6	73,0	<b>74,7</b>
Ethanol										
t(h)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DO	0	0,16	0,243	0,281	0,375	0,405	0,441	0,467	0,482	0,493
C (mg)	0	160	243	281	375	405	441	467	482	493
m (g)	0	32	48,551	56,088	74,775	80,676	87,759	92,84	95,725	97,811
teneur (%)	0	0,331	0,5016	0,5794	0,7725	0,8334	0,9066	0,9591	0,9889	1,0104
R (%)	0	25,4	38,6	44,6	59,4	64,1	69,7	73,8	76,1	<b>77,7</b>

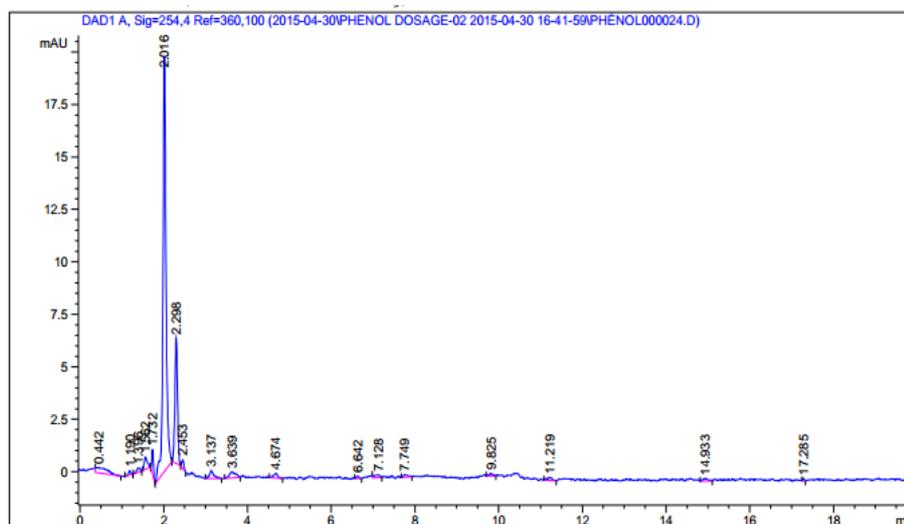


**Figure VI.9 :** Evolution du rendement en fonction du temps d'extraction.

A partir des résultats expérimentaux obtenus, nous remarquons que le rendement d'extraction évolue d'une façon significative pour se stabiliser aux environs de 5h au voisinage de 74% avec l'éthanol et 77% avec l'eau.

## V Profil phénolique par HPLC :

Nous avons procédé à l'identification et à la quantification de l'acide gallique et du phénol dans nos échantillons par HPLC. Nous avons préparés les standards dans du méthanol avec des concentrations de 16 mg/l. Les chromatogrammes obtenus sont illustrés sur les figures VI.10. Les rapports chromatographique sont reportés dans l'annexe 5.



**Figure VI.10-a :** Profils chromatographiques de l'acide gallique.

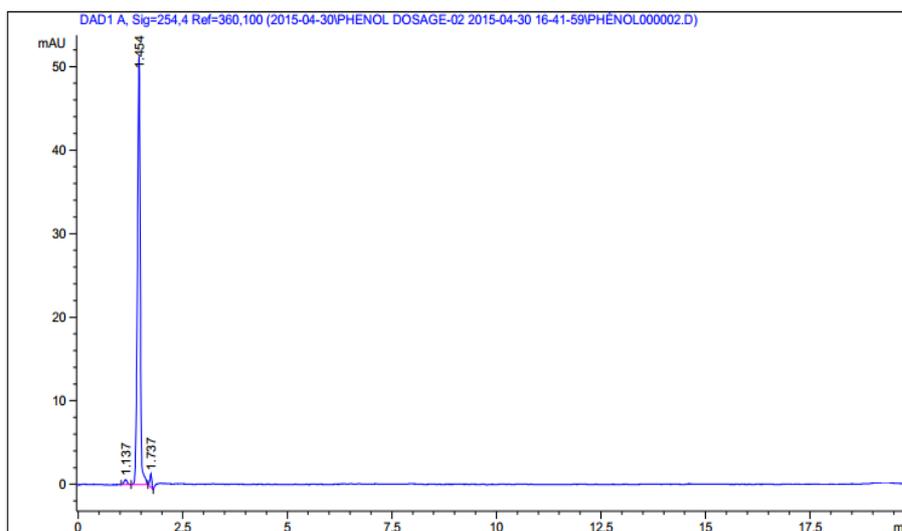


Figure VI.10-b : Profils chromatographiques du phénol.

Tableau VI.11 : données chromatographiques des standards.

Les monomères phénoliques	Temps de rétention (min)	Aire [mAU*s]	Aire %
Acide gallique	1.454	241.40	96.82
Phénol	2.016	102.27	65.64

Les profils phénoliques des extraits du grignon d'olive et de la margine issues du procédé d'extraction par distillation montre plusieurs pics correspondant aux différents polyphénols, parmi lesquels deux composés ont été identifiés: l'acide gallique et le phénol. Les autres pics correspondant aux autres composés phénoliques qui absorbent à la même longueur d'onde (254 nm) n'ont pas été identifiés en raison de l'absence de standards.

Selon De Marco *et al.* (2007) [96], le composé phénolique le plus abondant dans les extraits de margines est l'hydroxytyrosol, qui est formé de l'hydrolyse de l'oleuropéine durant l'extraction d'huile. Dans ses travaux, Marco *et al* (2007) a enregistré des valeurs de 1225mg/l.

Cette partie a été consacré dans le complément de Master pour l'étude des chromatogrammes correspondants aux extraits de la margine et du grignon, nous avons également effectué une étude cinétique d'extraction de l'acide gallique et du phénol.

Dans notre partie expérimentale nous avons effectué une extraction des polyphénols par distillation à partir de deux rejets d'huilerie (grignon et margine), la teneur totale en *composés* phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

L'extraction des polyphénols à partir du grignons d'olive a été faite par plusieurs solvants eau, acétone, méthanol éthanol et acétate d'éthyle, nous avons recherché les conditions opératoires optimales d'extraction et pour cela, nous avons procédé à une série d'expérience où nous avons fait varier les paramètres opératoires pour le choix de la valeur optimale.

Les meilleurs rendements ont été obtenus avec l'eau comme solvant d'extraction et avec les conditions opératoires suivantes ( $V_{\text{solvant}}=200\text{ml}$ , température =130°C, temps d'extraction = 7h, masse végétale = 20 g).

En ce qui concerne l'extraction des composés phénoliques à partir de la margine, l'extraction a été faite par les solvants suivants: eau, acétate d'éthyle, éthanol et éther diéthylique. Bien que les rendements obtenus ne varient pas trop avec ces solvants, l'éthanol est considéré comme le meilleur solvant extracteur des polyphénols avec les conditions opératoires optimales suivantes ( $V_{\text{solvant}}=200\text{ml}$ , température = [80-100] °C, temps d'extraction = 5 h, volume de la margine = 10 ml).

La méthode chromatographique liquide à haute performance (HPLC) reste la méthode la plus appropriée car elle permet une analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques.

Le rendement d'extraction est conditionné par plusieurs facteurs: la nature du solvant, la température, la durée d'extraction et le rapport masse/volume qui affecte de façon significative le rendement.

L'extraction des polyphénols par distillation, bien que généralement longue et exige des solvants organiques, est considérée comme étant très rapide, simple à mettre en œuvre, très sensible, très reproductible et ne nécessitent pas de matériels spécifiques.

En ce qui concerne le solvant d'extraction, quel que soit la matière végétale (grignon ou margine), l'éthanol et l'eau sont les meilleurs extracteurs des polyphénols, nous pouvons les considérer comme des solvants écologiques car ils ont l'avantage d'être non polluants, et non toxiques.

Plusieurs chercheurs ont mis en évidence l'effet considérable de l'utilisation d'un mélange de solvants de différentes polarités sur l'efficacité de l'extraction.

Ce travail ouvre la voie à d'autres travaux de recherche dans le domaine de l'extraction des polyphénols, en utilisant, à titre d'exemple, un mélange de solvants dans l'espoir d'améliorer le rendement. Nous proposons également d'étudier l'influence d'autres paramètres comme le pH dans le cas de l'extraction à partir de la margine.

Nous proposons également d'évaluer l'effet antioxydant de ces composés phénoliques.

- 
- [1]. Jean-Louis Barjol. (mars 2014). L'économie mondiale de l'huile d'olive. OCL , 21(5) D502. [http://www.ocljournal.org/articles/oclj/full\\_html/2014/05/oclj140010/oclj140010.html](http://www.ocljournal.org/articles/oclj/full_html/2014/05/oclj140010/oclj140010.html).
- [2]. Spichiger Rodolphe-Edouard et all. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs. Edition Presses Polytechnique et universitaires romandes .2eme édition. 418 pages.
- [3]. Dupont.F-J.-L. Guignard. (2007). Botanique systématique moléculaire. Edition Elsevier Masson.14eme édition, 285 pages.
- [4]. Moussaoui R., (2007). Valorisation des sous-produits de l'huilerie d'olive : grignons et margines. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammri, Tizi Ouzou, Algérie, 133 pp
- [5]. Hannachi H., M'sallem M., Benalhadj S., El-Gazzah M. (2007). Influence du site géographique sur les potentialités agronomiques et technologiques de l'olivier (*Olea europaea*) en Tunisie. C.R. Biologies 330, p 135-142.
- [6]. <http://www.maison-huile.com/fr/fleurs.php>
- [7]. Yvette. L. (2009). L'olivier en Méditerranée. Les défis de la mondialisation pour l'oléiculture méditerranéenne. Conférence, Centre Culturel Français de Tlemcen - Algérie- .Novembre 2009, pp 2-3.
- [8]. Conseil Oléicole International (COI)  
[http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=fr\\_FR](http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=fr_FR). Novembre 2014.
- [9]. <http://www.planetoscope.com/Commerce/1244-production-d-huile-d-olive-dans-le-monde.html>.
- [10]. Amouretti. M-C., Comet. G. (1985). Le de l'olivier. Edition Edisud.173 pages.
- [11]. Cuellar. R.L. (1990). Amélioration de la qualité de l'huile d'olive. Collection: Manel pratique (Conseil Oléicole International).
- [12]. Roger .F. (1974). Les industries des corps gras. Edition technique et documentation.
- [13]. Boskou .D. (2006). Olive oil chemistry and technology. 2<sup>e</sup> édition .AOCS.
- [14]. Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J. ( 2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. Appl Microbiol Biotechnol, 82, 25-39.
- [15]. Chimi H. (2006). Technologie d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. Transfert de Technologie en Agriculture, IAV Hassan II, Rabat, n°.141, 4.
- [16]. Benyahia N et Zein K., (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Busines Associates (Suisse) (SBA) à Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II), 1-8.
- [17]. El Hajouji.H.(2007), Evolution des caractéristiques physico-chimiques, spectroscopiques et écotoxicologiques des effluents d'huileries d'olives au cours de traitements biologique et chimique, thèse de doctorat, Institut Polytechnique de Toulouse, France.
- [18]. Hammadi Chimi.(2006). Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité .Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA. N<sup>0</sup> :141 .Maroc.
-

- 
- [19]. Technologie, T. D. E. (2006). Technologies d'extraction de l'huile d'olive, (037), 77–80.
- [20]. Naudet. M .(1992) .Manuel des corps gras,tome 1,Lavoisier,Paris.
- [21]. Hamdi. M. (1993).Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives : l'utilité de la microbiologie industrielle.Olivae,46,20-24.
- [22]. Conseil oléicole international .(2011). Normes commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive.
- [23]. Composition de l'huile d'olive. <http://www.pertorqueo.com/fr/apprendre/huile-d'olive/52-olive-oil-composition.html>.
- [24]. Karleskind. A . Manuel des corps gras, 1992, tome 1, Lavoisier, Paris.
- [25]. Tamburino V, Zimbone S M et Quottrone P. (1999). Accumulation et écoulement des margines sur le sol agricole. Olivae, 76 : 36-45.
- [26]. Amirante P, Direnzo L, Dgiovacchino, Brianchi B et Catalano P. (1993). Evolution technologique des installations d'extraction de l'huile d'olive, Olivae, 48
- [27]. Di-Giovacchino L. (1996). L'influence des systèmes d'extraction sur la qualité de l'huile d'oleve, Olivae, 63, 52-63.
- [28]. Mebrouk M.,(2002), Rejets des huileries, Développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans la margine, CMPP News, n°11
- [29]. Benyahia. N, Zein. K, (2003). Développées Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates. Suisse.
- [30]. Nefzaoui.A, (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits, Olivae IV Tunisie.
- [31]. Moussaoui R., (2007). Valorisation des sous-produits de l'huilerie d'olive : grignons et margines. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammri, Tizi Ouzou, Algérie, 133 pp.
- [32]. <http://www.fao.org>
- [33]. Nefzaoui A. (1991), «Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits » option méditerranéennes série séminaire N<sup>0</sup> 16, pp101-108, Ecole Supérieur d'horticulture, Sousse,Tunisie.
- [34]. TRIGUI A, (2008). «Etude en vue de l'élaboration d'un plan d'action pour l'utilisation énergétique des sous-produits de l'oliveraie tunisienne »,.
- [35]. Aboutayeb R. Extraction de l'huile brute. <http://www.azaquar.com/download>
- [36]. Valorisation énergétique des grignons.[http://www.afidoltek.org/index.php/Olea\\_2020](http://www.afidoltek.org/index.php/Olea_2020)
- [37]. Zaidi F.Hassissene N.Boubekeur N.Bouaiche A.youyou A. Etude in vitro de facteur limitant la valeur nutritive du grignon d'olive :effet des matières grasses et des métabolites secondaires .
- [38]. MennaneZ .Tada S .Aki I .Faid I .hassani S . salmaoui S .(2010).Caractérisation physico-chimique et microbiologique des grignons d'olive de 26 huileries traditionnelles de la région de Beni Mellel (Maroc).Volume 5,N<sup>0</sup>19 .
- [39]. Spahis N.Addoun A.Mmahmoudi H.Ghaffour N .(2008).Purification of water by activated carbon prepared from olive stones.Desalination 222,519-527.
-

- 
- [40]. R. T., (2009). Tizi-Ouzou: 148 huileries fermées. Le jour d'Algerie (Disponible sur: <http://www.lejourdalgerie.com/Editions/241109/Rubriques/evenement.htm#14>), Mars 2014.
- [41]. Hamdi M. (1993). Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives : l'utilité de la microbiologie industrielle .Olivae, 46,20-24.
- [42]. Benyahia N et Zein K., (2003). 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), 1-8
- [43]. Conseil oléicole international.(1997).Encyclopédie mondiale de l'olivier. Espagne.
- [44]. Khoufi S, Feki F, Sayadi S.(2007). Detoxification of olive millwastewater by electroagulation and sedimentation processes. Journal of Hazardous Materials 142,58-67.
- [45]. Tsagariki E.,Harris N.,Lazarides.,Konstantinos B.P.(2007). Olive mill waste water treatment .springerlink, 133-157.
- [46]. Fiestas Ros de Ursinos J.A., Borja R.( 1992). Use and treatment of olive mill waste water : Current situation and prospects in Spain .Grasas Aceites,2 : 101-106.
- [47]. Ranalli G, Alfano G, Bahammi M, Belli C, Lustrato G.(2003). Gestion des sous-produits de la filière oléicole au Maroc, pp 56-78.
- [48]. Loulan PY,Thelier Y.(1987). Procédé et dispositif de traitement par fermentation méthanique des eaux résiduaires lipidiques, Brevet français, 2620439.
- [49]. Knupp G, Rücker G,Ramos-Cormenzana A, Garrido Hoyos S, Neugebauer M, Ossenkop T.(1996). Problems of indentifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill waste water , International Biodeterioration and Biodegradation .38,277-282.
- [50]. Tomati U,Galli E, (1992), In Humus, its structure and role in agriculture and environment , Kubat J. Ed, Elsevier, London . 117-126 .
- [51] Galli E, Pasetti L, Volterra E, Tomati U.(1994). Compost from olive processing industry waste waters , Congresso Internazionale , L'apporto Integrato della Moderna Biologia : Uomo, Territorio, Ambiente, 1,22-25, Vieste (FG), 22- 25 Settembre , Italia.
- [52]. Yazcioglu T. Celikkol F ;(1978). Some trials on the utilization of why, black water of olive, and vinase for production of SCP. In turkey .Cento seminar on biological conversion of agriculture waste and by products into food and animal feeds-stuffs.
- [53]. NKHILLE.(2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. thèse de doctorat. Département génie de l'environnement. UNIVERSITÉ CADI AYYAD .MARRAKECH
- [54] Fleuriet A., (1982). Thèse Doc. Etat, Montpellier.
- [55] Yusuf Y.,( 2006). Trends Food Sci. Tech.,17, 64-71.
- [56] Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F., (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, 1 , 3-6.
- [57] Macheix J-J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006. Composés phénoliques dans les plantes. Structure, biosynthèse, répartition et rôles, 1-28 .
-

- [58] Bruneton J. (2008). Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp 198-260.
- [59] Crozier A. (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants' Diet and Health*. Ed. Goldberg. pp: 27- 48.
- [60] Micol V., Caturia N., Perez-Fons L., Mas V., Perez L. et Estepa A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia Rhadovirus (VHSV). *Antiviral Research*. 66: 129-136.
- [61] Silva S., Gomes L., Leitao F., Bronse M., Caelho A.V. et Boas V. (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grassasy Aceites*. 61 (02): 157-164.
- [62] Long H.S., Tilney P.M. et Van Wyk B.-E. (2010). The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae). *South African Journal of Botany*. 76 (02): 167-420.
- [63] Briante R., Patumib M., Febbrion F. et Nuccia R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed hyperthermophilic *Bglucosidase*. *Journal of Biotechnology*. 111(01): 67-77.
- [64]. Benlemlih .M,Ghanam .J .(2012). Polyphénols d'huile d'olive trésors santé! France. pp: <http://www.olivie.ma/fr/oil-health-info.html#cont020102>
- [65]. Elisa Tripoli.( 2005).The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*,Palermo ,Italie .
- [66]. Ranalli A.(1991). The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37 : 30-39.
- [67]. Seraphim P., Maria G.P., Stylianos F., Michael K., George A. (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, 99 : 2419–2428.
- [68]. Aissam H. (2003). Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidi mohamed ben abdellah. Fes. 156p.
- [69].LEULMI Nassima. (2011). La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Mémoire Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Microbiologie appliquée. Département de Biochimie et de Microbiologie.Constantine. p5.
- [70] Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T., (2000) . *J. Hypertens*,18, 655-73.
- [71]. Macheix, J.J., Fleriet, A et Christian, A .(2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne.
- [72] Halliwell B.(1994). *Nutr. Rev.*, 52, 253- 265.
- [73]. Macheix J.J,Fleuriet Aet Jay –Allemand C.(2005).Les composés phénoliques des végétaux (Unexemple de métabolites secondaire d'importances économique).Edition technique et documentation , Lavoisier

- [74]. Yahiaoui. N (2012). Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonte de calcium ,hydroxyapatite et charbon actif .mémoire de Majister . université de Mouloud Mameri Tizi ousou .
- [75]. CHEMAT F., (2011). Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris.
- [76]. Gérard COTE. (1998). Directeur de recherche au CNRS, Professeur à l'ENSCP (École nationale supérieure de chimie de Paris. Extraction liquide-liquide Présentation générale. Technique de l'ingénieur .Paris .France.
- [77]. CUSACK RW, GLATZ DJ. (1996). Apply liquid-liquid Extraction to today's Problems. Chem Eng; July: 94-103.
- [78]. EL HAIB.A. (2011). valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE.France.
- [79]. Khadija EL MRABET. Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud pressurisé .Thèse doctorat de l'université de PIERRE ET MARIE CURIE.Paris.France.
- [80]. Björklund E., Nilsson T., Bowadt S. (2000). Trend in Anal.Chem., 19, 434-445.
- [81]. Ganzler K., Salgo A., Valko K., J.Chrom .A, 371 (1986) 299-306.
- [82]. Busc, G; Berardinelli, S ; Resini, C ; Arrighi, L. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. Journal of Hazardous Materials 160, 265-288.
- [83]. TRAMBOUZ.P et WAUQUIER.J.P. (1975) « Le développement des procédés de raffinage et pétrochimie ». Ed technip,
- [84]. MBOURMAD.S. (2011). Extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales. thèse de Magister en sciences agronomiques ; ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH – ALGER , p41.
- [85]: SRISUWAN. G. (1988). « Extraction solide-liquide en colonne puisée à disque et couronnes : Modélisation et application au cas des tanins ». Thèse doctorat. INP, Toulouse..
- [86]. Magalhães L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. F. C., (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Analytica Chimica Acta, 613, 1-19
- [87]. HADDOU.M. (2010). Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse.thèse de doctorat de l'université de toulouse . France. p82.
- [88] Sripad .G, Prakash.V and Narasinga Rao. M. (1982). Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. J. Biosci. Vol. 4.. pp. 145-152.
- [89]. Katalinic.V, Mozina. S, Skroza .D, Generalic .I, Abramovic. H, Milos. M, I. Ljubenkov, Piskernik.S , Pezo. I, Terpinc .P and Boban M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant

- properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *J. Food. Chem.* Vol. 119. pp. 715-723.
- [90]. Sonia .C et Jean. C .(2011).polyphénols et procédés .Edition Lavoisier .p33-34.
- [91]. MAHMOUDIS, KHALI .M, et MAHMOUDI. N.(2012). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie* .
- [92].S. Jokić, D. Velić, M. Bilić, A. Bucić-Kojić, M. Plan inić and S. Tomas. (2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci.* vol. 28. pp. 206- 212.
- [93]. Rosales.R (1999). Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. Thèse de doctorat. Kansas State University. pp. 400.
- [94] .Lafka T-I., Sinanoglou V., Lazos E. S., 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104, 1206-1214.
- [95]. Bonnaillie. C , Salacs.M , Vassiliova.E , Ilonka .S .(2012).Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.).*Revue de génie industrielle*.
- [96]. De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R.,(2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104, 858-867.
- [97].Haborne, J.B. (1980). Plant phenolics in *Encyclopedia of plant physiology*, vol 8, Bell EA, Charlwood BV, eds Spinger-Verlag, Berlin; Pp 329-402. In: *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de metabolites secondaire d'importance économique*. Macheix, J.J., Fleuriet, A., and Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne.
- [98].Macheix, J.J., Fleuriet, A et Billot, J .(1990). Fruit phenolics, CRC press, Boca Roton. In : *les polyphenols en agroalimentaire* Sarni-Manchado P, Cheynier V.2006., Tec et Doc Lavoisier-Paris.

## *Annexes*

---

### Annexe 1:

Les principales classes de composés phénoliques [97,98].

Squelette carboné	Classe	Exemple	origine
<b>C6</b>	Phénols simples	Catéchol	
<b>C6 - C1</b>	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
<b>C6 - C3</b>	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique, Scopolétine, esculétine	Citrus
<b>C6 – C4</b>	Naphtoquinones	Juglone	Noix
<b>C6 –C2 – C6</b>	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
<b>C6 –C3 – C6</b>	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"><li>• Flavonols</li><li>• Anthocyanes</li><li>• Flavanols</li><li>• Flavanones</li></ul> Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine, Cyanidine, pélargonidine, Catéchine, épicatechine, Naringénine, Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
<b>(C6 – C3) 2</b>	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
<b>(C6 – C3) n</b>	Lignines		Bois, noyau des fruits
<b>(C15) n</b>	Tannins		Raisin rouge, Kaki

## Annexe 2: caractérisation du grignon d'olive

### 1. l'humidité initiale :

Le principe de la détermination de l'humidité initiale du grignon d'olive consiste à prendre une masse d'échantillon et la porter à une température de **105°C** dans une étuve pendant 2 heures.

L'humidité est calculée en utilisant la relation suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} * 100$$

$m_1$  : masse du creuset et la prise de grignons d'olives avant séchage (g).

$m_2$  : masse du creuset et la prise de grignons d'olives après séchage (g).

$m_3$  : masse de la prise de grignon d'olive avant séchage (g).

### 2. Les cendres :

Le résidu séché à 105°C est introduit dans un four moufle où la température est portée à 550-600°C. Le résidu est laissé au four pendant 2h, ensuite refroidie dans un dessiccateur puis pesé.

La teneur en cendres, exprimée en pourcentage, est donnée par l'équation

Où :

**m cr** : la masse du creuset vide (g).

**m1** : la masse du creuset et des cendres (g).

**m2** : la masse du creuset et la prise de grignons d'olives sèche (g).

$$\text{Cendre (\%)} = \frac{(m_1 - m_{cr})}{(m_2 - m_{cr})} * 100$$

**Annexe 3 : caractérisation des margines**

**1. Détermination de la teneur des matières sèches MS :**

On peut utiliser la méthode de filtration sur papier mais dans notre expérience on a procédé à extraire un volume de 10 ml qui contient des matières en suspensions dans un creuset et on le place dans un four à 105°C pendant 2 heures et on obtient un résidu séché c'est les matières sèches (MS).

La concentration en MS est exprimée en g/l, est donnée par la relation suivante :

$$MS = \frac{m_1 - m_2}{V} * 1000$$

Où :  $m_1$  : masse du creuset remplie de margine séchée à 105°C (g).

$m_2$  : masse du creuset vide (g).

V : volume de l'échantillon à analyser = 10mL

**2. cendres :**

Le résidu séché à 105°C est introduit dans un four moufle dans la température est portée à 550-600°C. Le résidu est laissé au four pendant 2h.

La teneur en cendres, exprimée en g/L, est donnée par l'équation :

$$\text{Cendre} = \frac{(m_1 - m_{cr})}{V} * 1000$$

Où :

$m_1$  : la masse du creuset et des cendres (g).

$m_{cr}$  : la masse du creuset vide (g).

V : volume de l'échantillon à analyser = 10mL

**Annexe 4 : Méthodes colorimétrique de FOLIN-CIOCALTEU pour le dosage des polyphénols.**

**Réactifs employés :**

1. Réactif de FOLIN-CIOCALTEU.
2. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4.25%.

**Mode opératoire :**

1. On verse dans un erlenmeyer :
  - 0.2 mL d'échantillon dilué autant de fois qu'il est nécessaire.
  - 1 mL de réactif de FOLIN-CIOCALTEU.
  - 20 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4.25%.
2. Agiter, verser dans un tube à essais.
3. Porter au bain-marie à 70°C pendant 20 mn.
4. Refroidir sous un courant d'eau froide.
5. Analyser au spectromètre à 760 nm par rapport à une solution témoin (eau distillée)

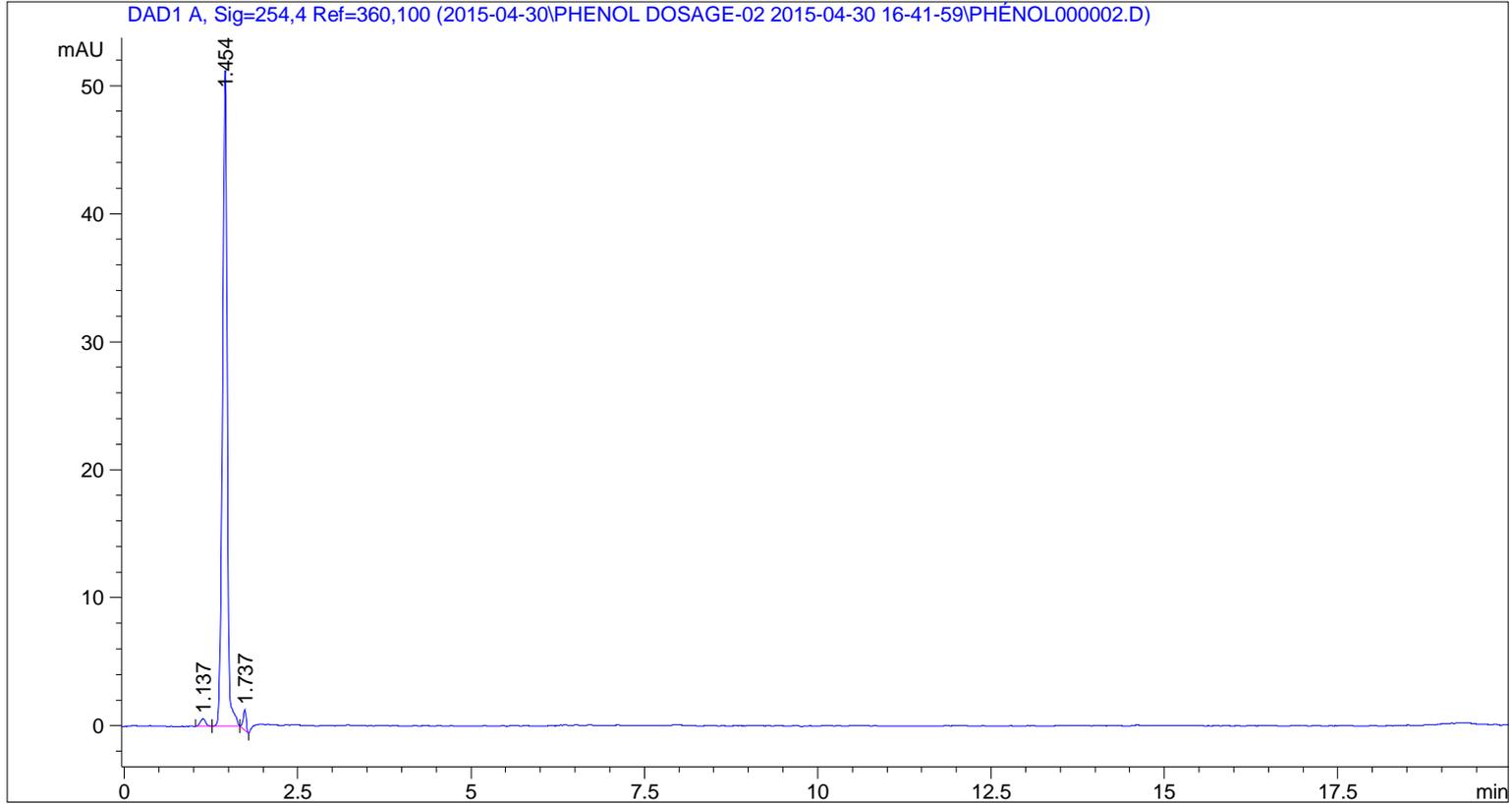
**Annexe 5 :**

Les rapports chromatographiques des étalons (acide gallique et phénol).

```

=====
Acq. Operator   : DS                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : HPLC07380              Location  : Vial 2
Injection Date  : 30/04/2015 17:04:31    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 5.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\2015-04-30\PHENOL DOSAGE-02 2015-04-30 16-41-59\POLYPH.M
Last changed    : 30/04/2015 16:19:35 by DS
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\POLYPH.M
Last changed    : 04/05/2015 11:02:38 by DS
                 (modified after loading)
  
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.137	BB	0.0861	3.08312	5.78813e-1	1.2366
2	1.454	BB	0.0708	241.40453	51.36352	96.8239
3	1.737	BB	0.0474	4.83551	1.59283	1.9395

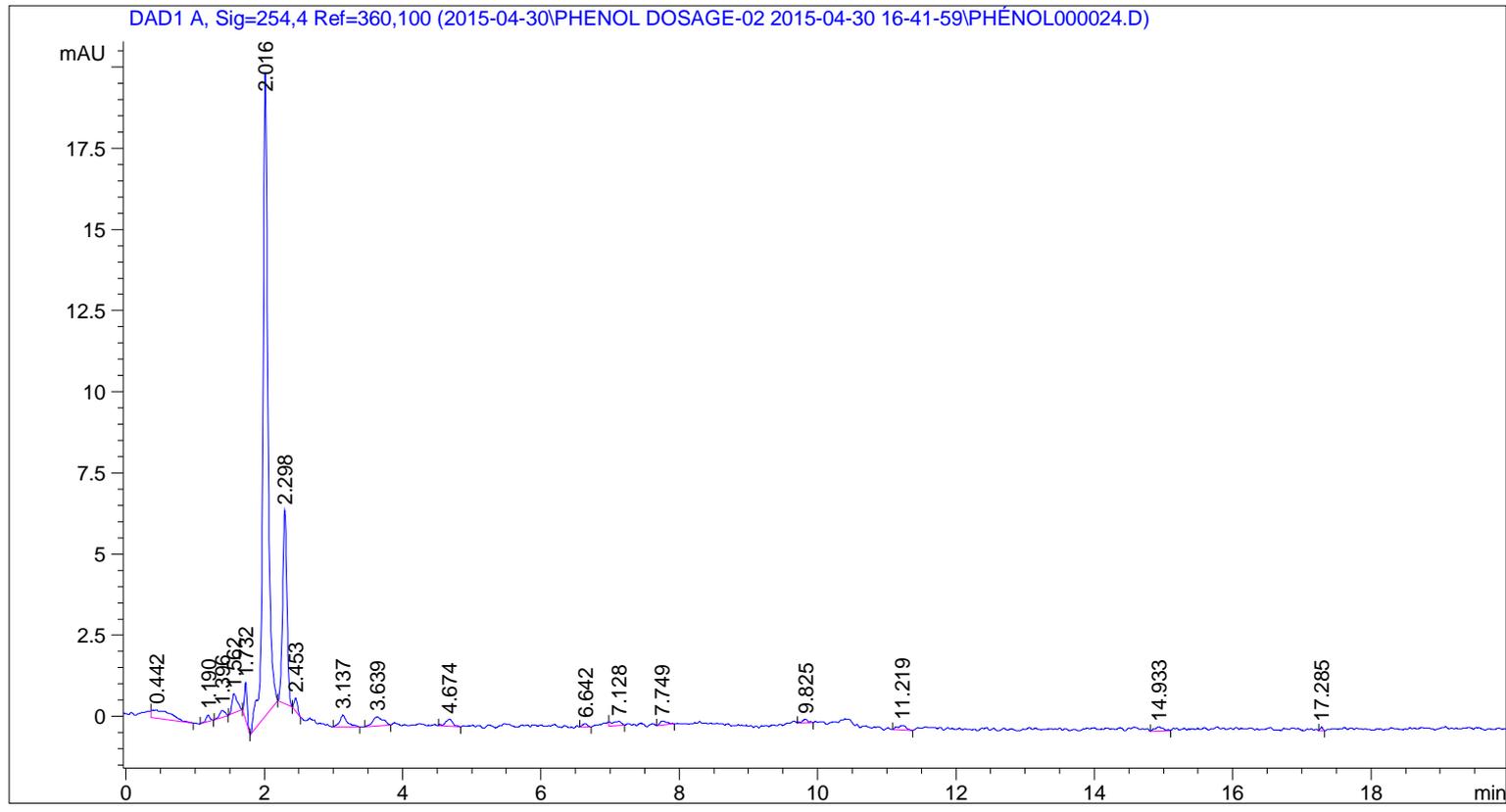
Totals :                                    249.32315    53.53516

```

=====
Acq. Operator   : DS                      Seq. Line :   24
Acq. Instrument : HPLC07380              Location  : Vial 24
Injection Date  : 01/05/2015 00:52:11    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 5.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\2015-04-30\PHENOL DOSAGE-02 2015-04-30 16-41-59\POLYPH.M
Last changed    : 30/04/2015 16:19:35 by DS
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\POLYPH.M
Last changed    : 04/05/2015 11:33:24 by DS
                 (modified after loading)
=====

```



=====  
Area Percent Report  
=====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.442	BB	0.2477	5.24544	2.55336e-1	3.3666
2	1.190	BB	0.0615	7.88248e-1	1.93466e-1	0.5059
3	1.396	BB	0.0887	1.14686	2.06862e-1	0.7361
4	1.562	BB	0.0792	3.11476	5.93631e-1	1.9991
5	1.732	BB	0.0451	3.34074	1.17719	2.1441
6	2.016	BB	0.0761	102.27415	19.84251	65.6404
7	2.298	BB	0.0664	25.72482	5.94894	16.5104
8	2.453	BB	0.0579	1.38390	4.04867e-1	0.8882

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
9	3.137	BB	0.1034	2.73425	3.56999e-1	1.7549
10	3.639	BB	0.1309	2.89841	2.75164e-1	1.8602
11	4.674	BB	0.0985	1.52405	2.15615e-1	0.9781
12	6.642	BB	0.0743	4.78796e-1	1.06820e-1	0.3073
13	7.128	BB	0.1239	1.25868	1.28980e-1	0.8078
14	7.749	BB	0.0972	8.48222e-1	1.18949e-1	0.5444
15	9.825	BB	0.0874	5.76422e-1	1.02768e-1	0.3700
16	11.219	BB	0.1166	1.22155	1.36196e-1	0.7840
17	14.933	BB	0.1119	9.76045e-1	1.18697e-1	0.6264
18	17.285	BB	0.0426	2.74499e-1	1.04820e-1	0.1762

Totals : 155.80985 30.28781

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*