



International Journal of Natural Resources and Environment

Journal home page: <https://ijnre.univ-adrar.dz>

ISSN 2710-8724



I
J
N
R
E

Caractérisation du contenu glucidique des margines de l'huile d'olive

Fatima El Batoul Teniou^{1,2}, Moufida Aggoun^{1,2,3*}, Chahinez Benelouezzane¹, Nourhane Labdai¹, Sara Medjedoub⁴ et Rabah Arhab³

¹Département de Biotechnologie, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri-Constantine 1 (UFMC1), 7^{ème} Km, Route de Setif, 25000, Constantine, Algérie.

²Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments, BIOQUAL, INATAA, UFMC 1, Algérie.

³Laboratoire des Substances Naturelles, Molécules Bioactives et Applications Biotechnologiques, Université Larbi Ben M'Hidi, Oum El Bouaghi, Route de Constantine, 04000, Algérie.

⁴Centre de Recherche en Biotechnologie, CRBT, Constantine.

* Corresponding author: aggoun.moufida@umc.edu.dz (M. Aggoun)

Article details : Received: 24 March 2022, Revised: 11 Mai 2022, Accepted: 19 Mai 2022

Résumé :

Dans le cadre d'exploitation des sous-produits oléicoles et le développement de la biotechnologie en Algérie, l'intérêt s'est porté sur la valorisation des margines en vue d'en extraire et étudier les polysaccharides utilisables comme molécules bioactives. La partie expérimentale a porté sur un screening des sucres des margines, leur extraction et purification. Parallèlement à cela, une analyse chromatographique sur couche mince (CCM) a été réalisée.

Le screening du contenu polysaccharidiques des margines, effectué par différents tests, a révélé la présence des teneurs élevés en sucres réducteurs de type aldopentoses et aldohexoses avec absence totale d'amidon. La précipitation des margines dans l'éthanol 95% a dévoilé la présence de 23,63g de sucres dans 100g de MS, ce qui correspond à 1,6g dans 100g de margines brutes. Les résultats de la CCM ont révélé la présence de monosaccharides de type xylose, arabinose, mannose, glucose et galactose.

Etant considéré comme fibres diététiques fermentescibles, le résidu insoluble dans les alcools (RIA) obtenu dans notre étude pourrait être un produit prébiotique prometteur pour le secteur de la biotechnologie. Il serait donc intéressant d'étudier son effet prébiotique, ainsi que d'autres activités biologiques comme les activités antioxydante, anti-inflammatoire et antitumorale.

Mots clés : Margine, quantification, polysaccharides, screening, CCM, prébiotique.

Abstract:

In the context of the valorization of olive by-products and the development of biotechnology in Algeria, we intended to develop olive mill wastewater (OMWW) with a view to extracting and studying the polysaccharides that can be used as bioactive molecules.

The experimental part focused on screening polysaccharide content of OMWW, their extraction and purification. At the same time, a thin layer chromatographic (TLC) analysis was performed.

The screening of the polysaccharidic content of OMWW, carried out by various tests revealed the presence of high levels of reducing sugars, aldopentose and aldohexose type with total absence of starch. The precipitation of OMWW in 95% ethanol revealed the presence of 23.63 g of polysaccharides in 100 g of DM, which corresponds to 1.6 g in 100 g of raw OMWW. The characterization of the polysaccharidic content by TLC revealed the presence of monosaccharides such as xylose, arabinose, mannose, glucose and galactose.

Being considered as fermentable dietary fiber, the alcohol-insoluble residues (AIR) obtained during our study could be a promising prebiotic product for the biotechnology sector. In addition, it would be interesting to carry out other biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities.

Keywords: Olive mill waste water, quantification, polysaccharides, screening, TLC, prebiotic

1. Introduction

Depuis que le génome humain est décodé, les scientifiques se sont particulièrement intéressés à la nouvelle frontière que constitue la protéomique. Cependant la glycomique fonctionnelle a pris de l'intérêt et constitue le nouveau challenge des décennies à venir dans le domaine de l'identification de la variété moléculaire des polysaccharides et la compréhension de leurs rôles dans des fonctions biologiques [1].

Les polysaccharides sont très répandus dans la nature. Ils peuvent provenir de plantes supérieures, de champignons, d'algues et de bactéries. Ces dernières années, l'utilisation des polysaccharides comme agents bioactifs a suscité un intérêt accru du point de vue de leur application industrielle. Cet intérêt s'explique par la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'innocuité qu'ils présentent [2].

L'olivier est l'une de ces plantes supérieures dicotylédones servant de matière première aux industries oléicoles en raison de sa richesse en lipides. D'un autre côté, ce fruit contient des teneurs non-négligeables en composés organiques issus de l'extraction de l'huile d'olive qui sont rejetés dans les effluents.

Les margines sont l'un des effluents les plus nocifs produits par les industries agro-alimentaires. Elles sont caractérisées par une forte concentration en composés organiques, dont les glucides, les protéines, les acides gras et en particulier les polyphénols [3]. Par conséquent, ces déchets pourraient être considérés comme une source prometteuse de bioactifs à haute valeur ajoutée [4]. De ce fait, plusieurs études visent le traitement et la valorisation des margines [5]. Cependant il est noté que les différentes voies de valorisation souffrent encore d'un faible degré de connaissances des margines concernant notamment leur composition chimique complexe et leur variabilité [5]. De plus, la présence de polysaccharides à des taux significatifs dans les margines a ouvert aux chercheurs en biotechnologies la voie à leur valorisation et à la récupération de molécules bioactives qu'elles contiennent, pouvant constituer une alternative naturelle aux produits synthétiques particulièrement dans le domaine de la santé [6]. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont l'objectif était de caractériser les polysaccharides des margines, leur extraction et quantification.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les margines ont été fraîchement collectées à partir d'une unité de production d'huile d'olives fonctionnant avec le système de centrifugation à 3 phases au début de la campagne oléicole 2020-2021 (novembre 2020) au moment de la chaîne. Le prélèvement a été effectué dans un bidon en polyéthylène, opaque de 5 litres. Ce dernier a été bien rempli et fermé hermétiquement, de manière à éviter les échanges entre les margines et l'oxygène. Le volume précité a été réparti en aliquotes de 500 ml et réfrigéré à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2. Caractérisation chimique des margines

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre de type HANNA HI 9321 sur un aliquote de 100 ml. La matière sèche (MS) a été déterminée après évaporation de 4 ml de margines à 105°C dans une étuve ventilée de type MEMMERT jusqu'à poids constant.

2.3. Screening des sucres présents dans les margines par dosage colorimétrique

Les glucides sont identifiables par des réactions caractéristiques colorées (MOLISH, Iode, FEHLING, SELIVANOFF, test de pentoses). Le but étant la mise en évidence de la présence des sucres parmi d'autres composés (lipides, protéines, ...).

2.4. Extraction des polysaccharides à partir des margines

L'extraction du résidu insoluble dans les alcools (RIA) des margines a été réalisée selon le protocole décrit par Galanakis *et al.* [7].

2.4.1. Préparation des margines brutes

Les margines sont d'abord partiellement délipidées par centrifugation d'un alicot de 500 ml à 3000 g à 20°C pendant 30 min. La phase apolaire est alors éliminée, le culot est mis en suspension dans la phase aqueuse (surnageant) par agitation au vortex. Les margines délipidées sont ensuite concentrées au rotavapeur à 60°C pendant 2h, jusqu'à la réduction du volume initial d'un facteur 3,5.

2.4.2. Extraction du RIA

L'extraction du RIA est réalisée en mélangeant 100 ml de margines concentrées à 5 ml d'éthanol absolu et 1g d'acide citrique, sous agitation continue pendant 25 min dans un bain marie à 80°C. Le mélange est ensuite dispersé dans de l'éthanol à 95% (v/v) pour une concentration finale de 85% (v/v). Le tout est porté à ébullition dans un bain marie pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est centrifugé. Le précipité formé est lavé 3 fois avec du chloroforme ou dichlorométhane (3 fois le volume initial) pendant 30 min sous agitation puis centrifugé. Le précipité résiduel est lavé une dernière fois avec de l'acétone avant d'être centrifugé puis séché à température ambiante. La poudre obtenue est le RIA.

2.5. Hydrolyse des liaisons glycosidiques

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse [8]. L'hydrolyse est effectuée selon le protocole décrit par Boual *et al.* [9]. Les monosaccharides libérés sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM).

2.6. Chromatographie sur couche mince des résidus glycosidiques

2.6.1. Préparation des solutions étalons

Plusieurs étalons d'oses ont été utilisés : galactose, arabinose, glucose, xylose, mannose et fructose. 50 mg de chaque ose ont été dissous dans 25 ml d'eau distillée.

2.6.2. Préparation de la phase mobile

La phase mobile choisie était le système butan-2-one (méthyléthylcétone), méthanol, acide acétique (3/1/1).

2.6.3. Préparation du révélateur

Le réactif de révélation des spots était le réactif de MOLISH (α -naphtol sulfurique en solution alcoolique) qui est un révélateur non spécifique aux polysaccharides. En quantité, il est constitué de 0,25 g d' α -naphtol, 50 ml d'éthanol et 50 ml d'acide sulfurique (20%).

2.6.4. Préparation des plaques chromatographiques

Les plaques chromatographiques utilisées étaient de type gel de silice 60F254 de 0,25mm d'épaisseur étalées sur une feuille d'aluminium prêtes à l'emploi. Une ligne de dépôt est tracée à 1 cm du bord inférieur de la plaque. Celle-ci a été activée dans une étuve à 100°C pendant 10 min, aussitôt, le dépôt des échantillons a été effectué [10].

2.6.5. Préparation des cuves et suivi de la CCM

Après l'hydrolyse acide, le RIA a été déposé avec les étalons sous forme de spots en bas des plaques à l'aide d'un applicateur (quelques gouttelettes). Les plaques ont été placées verticalement dans des cuves contenant la phase mobile de façon à ce qu'elles trempent sur une hauteur d'environ 1cm. Le solvant est laissé monter le long des plaques par capillarité, entraînant les différents constituants du mélange déposé au bas des plaques. Les constituants les moins retenus par l'adsorbant étant entraînés le plus facilement. Le solvant migre jusqu'au front. Les plaques sont séchées et pulvérisées par le révélateur α -naphtol sous hotte et placées dans une étuve à 100 °C pendant 5 min.

2.6.6. Calcul du rapport frontal des spots

Le rapport frontal (R_f) est calculé pour chaque spot obtenu d'hydrolysats et d'étalons. Il avait pour but de comparer les rapports frontaux (R_{fs}) afin de déterminer les différents types d'oses constituant les extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles obtenus.

$$R_f = D \text{ échantillon} / D \text{ phase mobile}$$

- D échantillon : Distance parcourue par l'échantillon (témoin).
- D phase mobile : Distance parcourue par le solvant (phase mobile).

3. Résultats et Discussions

3.1. Caractérisation chimique

Les margines étudiées ont un pH acide (4,00). L'acidité des margines est une caractéristique commune de cet effluent liquide, elle est comprise entre 3,6 et 5. Notre résultat concorde avec ceux retrouvés par Galanakis *et al.*; El-Abassi *et al.*, ; Aggoun *et al.*, et Hamimed *et al.* [7], [11]–[13].

La teneur en MS obtenue après séchage des margines est de l'ordre de 55g/L de margine brute. Cette valeur concorde à celles de la littérature (Achak *et al.* [14]; El-Abassi *et al.* [11]).

3.2. Screening des sucres présents dans les margines par dosage colorimétrique

Les tests colorimétriques effectués sur nos margines pour identifier leur contenu polysaccharidique ont révélé les résultats mentionnés dans le tableau 1.

Tableau 1. Résultats du dosage colorimétrique des margines.

Test	Résultats	Notes
Réaction de MOLISH	+/anneau rouge violacé (positif)	Présence des sucres totaux
Réaction d'O-tholuidine	+/ couleur jaune orange (positif)	Présence d'aldopentoses
Réaction de SELIVANOFF	+/ couleur rose (positif)	Présence d'aldohexoses
Test de FEHLING	+/ précipité rouge brique (positif)	Présence des sucres réducteurs
Test d'iode	-/ couleur bleue (négatif)	Absence d'amidon

3.3. Rendement de l'extrait polysaccharidique (RIA)

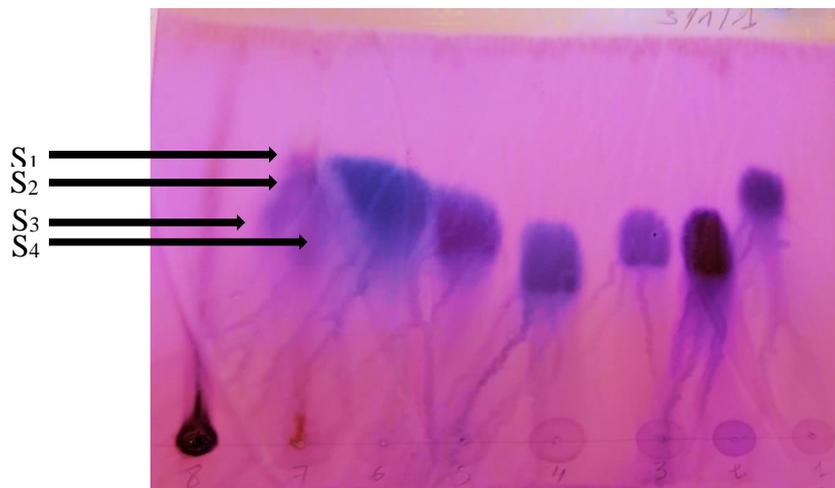
L'isolement et la purification des polysaccharides nous a permis d'obtenir un rendement moyen en RIA de 23,63g/100g de matière sèche (MS) et de 1,6g/100g de margines brutes. Ce rendement diffère de celui obtenu par Galanakis *et al.* [7] et Nadour *et al.* [5] qui sont de 64,8g/100g de MS, et de 6,3g/100g de margines brutes et 20,51g/100g de MS, respectivement. Cette différence est expliquée, selon ces mêmes auteurs, par l'influence de multiples facteurs dont principalement la nature des margines, la variété et la composition de l'olive, son stade de maturation et surtout par les procédés d'extraction.

3.4. Composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique par CCM

La lecture de la composition du RIA sur le chromatogramme après application du révélateur α -naphthol a démontré la présence de 4 spots de monosaccharides. Selon leur R_f , ses spots semblent être le xylose (R_f : 0,69), l'arabinose (R_f : 0,67), le mannose et/ou Glucose (R_f : 0,60) et le galactose (R_f : 0,56), en les comparant avec les R_{fs} des étalons (Tableau 2 et Figure 1).

Tableau 2. Rapports frontaux (R_{fs}) des oses étalons et du RIA dans le système (3/1/1) de CCM.

Oses	Rapports frontaux (R_f)
Xylose	0,69
Fructose	0,59
Glucose	0,60
Galactose	0,55
Mannose	0,56
Arabinose	0,68
RIA	S_1 0,69 ; S_2 0,67 ; S_3 0,60 ; S_4 0,56 / (S : spot)

**Figure 1.** Chromatogramme des oses étalons et du RIA dans le système (3/1/1).

1 : xylose, 2 : fructose, 3 : glucose, 4 : galactose, 5 : mannose, 6 : arabinose, 7 : RIA, 8 : marge brute.

D'après l'étude réalisée par Galanakis *et al.* [7] le RIA était riche en rhamnose, glucose, acide galacturonique et xylose et pauvre en galactose, arabinose et mannose. Tandis que le RIA obtenu par Nadour *et al.* [5] était composé majoritairement de glucose en présence d'autres oses neutres et acides entre autres le rhamnose, le galactose, l'arabinose, le mannose, le xylose et l'acide galacturonique. L'acide glucuronique et le fructose apparaissent comme des monosaccharides mineurs. Ces deux compositions hétérogènes du RIA trouvées par HPLC pourraient être en accord qualitativement avec notre lecture de CCM. Par ailleurs, l'absence de l'acide galacturonique, glucuronique et le fructose dans notre échantillon pourrait être expliquée par la différence de polarité des éluants et l'affinité de chaque échantillon aux solvants [15], ou bien par l'absence d'étalons pour la comparaisons des R_{fs} .

D'autres part, notre contenu polysaccharidique de marge ne peut être confirmé, car l' α -naphthol n'est pas un révélateur spécifique aux monosaccharides. Cela nous conduit à supposer que les spots sont de nature non-glucidique parce que notre RIA n'est pas un extrait pur malgré la dominance des polysaccharides. Par conséquent, il est essentiel en chromatographie de détecter la présence de protéines, de polyphénols ou d'autres composants de la paroi cellulaire [16].

4. Conclusion

La caractérisation du contenu polysaccharidique par CCM a révélé la présence de monosaccharides de type xylose, arabinose, mannose, glucose et galactose. Selon la littérature, si l'on considère que notre CCM est fiable, nous serons dans la possibilité de conclure que la composition hétérogène de notre RIA est qualitativement en accord avec les études déjà faites.

Etant considéré comme fibres diététiques fermentescibles, le RIA obtenu durant notre étude pourrait être un produit prébiotique prometteur pour le secteur de la biotechnologie. Il serait intéressant d'optimiser la caractérisation des polysaccharides par leur dosage par chromatographique échangeuse d'ions. En outre, il serait souhaitable d'accomplir l'étude de l'effet prébiotique de notre RIA sur les bactéries lactiques.

Références

- [1] F. Benaoun, « Caractérisation structurale et potentiel biologique des polysaccharides issus de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora* Batt.Trab (Liliaceae) », p. 231.
- [2] J.-H. Xie, W. Tang, M.-L. Jin, J.-E. Li, et M.-Y. Xie, « Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: Structures and functionalities », *Food Hydrocolloids*, vol. C, n° 60, p. 148-160, 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.03.030.
- [3] G. la Scalia, R. Micale, L. Cannizzaro, et F. P. Marra, « A sustainable phenolic compound extraction system from olive oil mill wastewater. », *Journal of Cleaner Production*, vol. 142, n° Part 4, p. 3782-3788, 2017.
- [4] W. Yakhlef, R. Arhab, C. Romero, M. Brenes, A. de Castro, et E. Medina, « Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products », *LWT*, vol. 93, p. 323-328, juill. 2018, doi: 10.1016/j.lwt.2018.03.044.
- [5] M. Nadour, C. Laroche, G. Pierre, C. Delattre, F. Moulti-Mati, et P. Michaud, « Structural Characterization and Biological Activities of Polysaccharides from Olive Mill Wastewater », *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 177, n° 2, p. 431-445, sept. 2015, doi: 10.1007/s12010-015-1753-5.
- [6] B. A. Cheba, « Olive Waste Valorization for Food Biotechnological Applications (Mini-Review) », vol. 1, p. 14-20, avr. 2020.
- [7] C. M. Galanakis, E. Tornberg, et V. Gekas, « A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction », *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, n° 7, p. 1009-1017, 2010, doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.005.
- [8] G. Ruiz, « Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges », Université de Limoges, France, 2005.
- [9] Z. Boual, T. Chouana, A. Kemassi, A. Hamid Oudjana, M. Daddi Bouhoun, P. Michaud, M.D. Ould El Hadj, « Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) », *Phytothérapie*, vol. 6, n° 13, p. 396-402, 2015, doi: 10.1007/s10298-015-0985-4.
- [10] Z. Boual, A. Kemassi, A. Hamid Oudjana, P. Michaud, et O. Elhmd, « Caractérisation physicochimique et biochimique des bulbes d'*Urginea noctiflora* (Liliaceae) récoltée dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie): Activités antioxydantes et antimicrobiennes », *Phyto Chem et Bio Sub Journal*, 2013.

- [11] A. El-Abbassi, H. Kiai, et A. Hafidi, « Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater », *Food Chem*, vol. 132, n° 1, p. 406-412, mai 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.013.
- [12] M. Aggoun, R. Arhab, A. Cornu, J. Portelli, M. Barkat, et B. Graulet, « Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process », *Food Chemistry*, vol. 209, p. 72-80, oct. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.034.
- [13] S. Hamimed, N. Jebli, H. Sellami, A. Landoulsi, et A. Chatti, « Dual Valorization of Olive Mill Wastewater by Bio-Nanosynthesis of Magnesium Oxide and *Yarrowia lipolytica* Biomass Production », *C&B*, vol. 17, n° 3, mars 2020, doi: 10.1002/cbdv.201900608.
- [14] M. Achak, N. Ouazzani, A. Yaacoubi, et L. Mandi, « Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essais de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. », *rseau*, vol. 21, n° 1, p. 53-67, avr. 2008, doi: 10.7202/017930ar.
- [15] C. Audigié, J. Figarella, F. Zonszain, et P. P. Fritsch, *Manipulations d'analyse biochimique*. Paris, France: Doin, 1982.
- [16] X. Xing, S. W. Cui, S. Nie, G. O. Phillips, H. D. Goff, et Q. Wang, « A review of isolation process, structural characteristics, and bioactivities of water-soluble polysaccharides from *Dendrobium* plants », *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, vol. 2, n° 1, p. 131-147, 2013, doi: 10.1016/j.bcdf.2013.04.001.