

## **Conservation des résidus de l'agro-industrie oléicole par ensilage : de l'isolement de bactéries lactiques endogènes à l'étude de faisabilité**

Isabelle Perraud-Gaime, Y. Labrousse, S. Roussos

### **Résumé**

Pour envisager une valorisation annuelle (production de champignons comestibles, lombriculture) des sous produits saisonniers de l'industrie oléicole (grignons, margines, margions), il faut pouvoir les conserver. Cette conférence propose d'exposer les avancées et les résultats sur la faisabilité de la conservation des résidus par ensilage, ensilage naturel ou ensilage contrôlé par l'inoculation par des bactéries lactiques endogènes sélectionnées.

**Mots clés :** résidus oléicoles, conservation, ensilage, inoculation, bactéries lactiques.

### **Presrvation of the residus of olive agro-industry by silaging: from lactic endogenous bacteria isolation to feasibility study**

#### **Abstract**

To consider an annual valorization (edible fungi production, lombriculture) of seasonal under-products of olive industry (pomace, margins, margion), we should be able to preserve them. This conference suggests to expose the advances and results on the feasibility of residus preservation by silaging, natural silage or controlled by the inoculation through selected endogenous lactic bacteria.

**Key words:** olive residus, preservation, silaging, inoculation, lactic bacteria.

#### **1. Introduction**

La superficie oléicole mondiale est estimée à 8 600 000 hectares, dont 95% se situent dans le bassin méditerranéen. La production moyenne en olive est de 10 millions de tonnes par an dont 92% sont utilisés pour l'extraction d'huile, le reste étant consommé en tant qu'olives de table (Roussos et al., 2006).

L'industrie oléicole, dont le produit final est l'huile d'olive, laisse par le système classique de pressage deux résidus, l'un liquide: les margines (eaux contenus dans l'olive, eaux de lavage, eaux liés au processus de traitement), l'autre solide: les grignons (peaux, résidus de la pulpe, fragments de noyaux). Un nouveau type de résidu apparaît, les margions (terme né de la contraction de margines et de grignons) avec l'essor d'un nouveau système continu utilisant la centrifugation Ces déchets polluants de l'industrie oléicole sont produits en très grande quantité (Mulinacci et al. (2005), Chimi, 2006).

La transformation des olives et la production de l'huile d'olive sont des activités saisonnières de Novembre à Mars suivant les régions. Le stockage des sous produits, en vu d'une valorisation annuelle, est un problème à résoudre.

Des recherches en cours au sein du laboratoire EMB-IMEP montrent que l'on pourrait utiliser ces résidus pour la production de champignons supérieurs (Lakhtar (2009)), une autre utilisation pourrait être la production de lombricompost. Mais pour cela il faut, avant tout, conserver ces déchets pour avoir une disponibilité annuelle. Une technique de conservation serait l'ensilage. Cette méthode fait intervenir des microorganismes les bactéries lactiques.

Des travaux antérieurs réalisés sur un autre résidu agro-industriel (la pulpe de café) au cours d'un projet européen Biopulca ont démontrés qu'il était possible de conserver ce type de résidus par la technique de l'ensilage (Perraud-Gaime (1995)) et permettre ainsi une possible utilisation annuelle de ce résidu devenu ainsi substrat potentiel à diverses valorisations tels que la lombriculture, la production de champignons supérieurs (Biopulca (2001)).

D'où l'idée d'appliquer cette technologie simple et peu coûteuse aux résidus saisonniers de l'agro-industrie oléicole pour une valorisation annuelle soit par lombriculture, soit par production de champignons supérieurs comestibles et/ou médicinaux, soit pour l'alimentation animale (suivi de la désamérisation), soit pour la production de molécules à haute valeur ajoutée (enzymes et autres molécules).

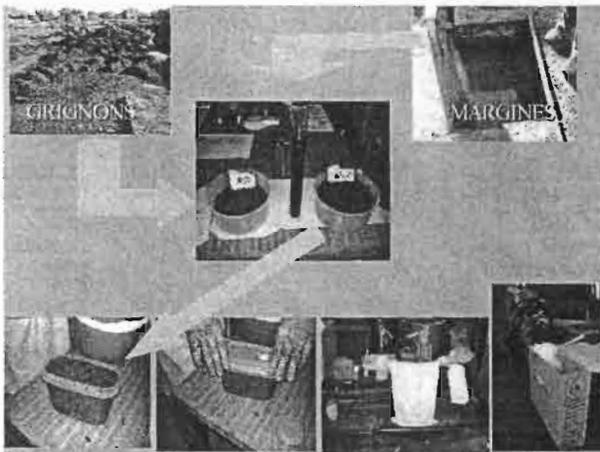
La finalité de ce travail sera de déterminer la faisabilité de la conservation par ensilage de ces résidus par l'isolement et la caractérisation de la microflore endogène à partir d'ensilages naturels puis la réalisation d'un ensilage contrôlé.

## 2. Matériels et methods

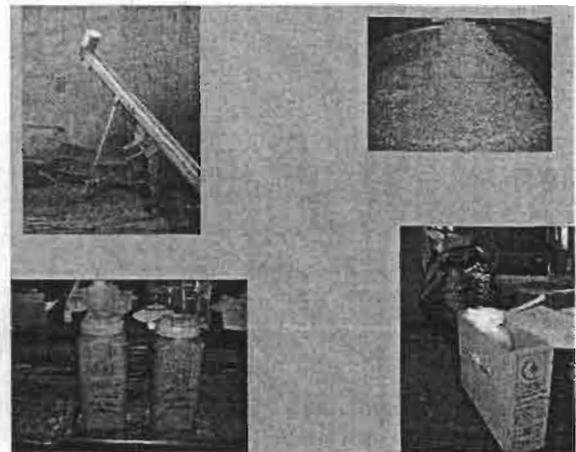
Cette étude porte sur 2 types de sous produits issus de 2 systèmes d'extraction d'huile d'olive du Maroc : le système traditionnel par pressage de Beni Mellal-Maroc qui permet d'obtenir les margines et les grignons séparés et le système moderne par centrifugation de Sidi Bou Othman-Maroc qui permet d'obtenir les margions (margine et grignons mélangés).

Les grignons (35% d'humidité) et les margines issues du système par pressage ont été mélangés pour arriver à une humidité de 63% puis sont mis en microsilos et stockés à l'obscurité (Figure I). Les margions (humidité supérieure à 80 %) ont été directement mis en microsilos (Figure II).

Les micro-silos ont été réalisés entre Décembre 2007 et Février 2008 en fonction des différents sous produits (Tableau I)



**Figure 1:** Montage des micro-silos (naturels) des sous produits issues du système par presse.



**Figure 2:** Montage des micro-silos (naturels) des margions.

**Tableau I:** Récapitulatif des microsilos réalisés au Maroc.

Microsilos n°	Système	Type sous produit	Origine	Date	T° Stockage
D1BM - D2BM	Tri-Phasique Pressage	Grignon + Margine	Beni-Mellal	12/2007	T° ambiante
BM1 - BM3 - BM5	Tri-Phasique Pressage	Grignon + Margine	Beni-Mellal	02/2008	25°C
BM2 - BM4 - BM6	Tri-Phasique Pressage	Grignon + Margine	Beni-Mellal	02/2008	T° ambiante
C1SBO - C2SBO - C3SBO	Tri-Phasique Centrigugation	Margion	Sidi Bou Othmane	12/2007	T° ambiante
OTH1 - OTH3 - OTH5	Tri-Phasique Centrigugation	Margion	Sidi Bou Othmane	02/2008	25°C
OTH2 - OTH4 - OTH6	Tri-Phasique Centrigugation	Margion	Sidi Bou Othmane	02/2008	T° ambiante

Après ouverture, des observations sur l'aspect, l'odeur et la couleur ont été réalisées pour chaque micro-silo. Le pH, l'humidité ont été déterminés.

Un isolement de la microflore endogène anaérobie a été réalisé sur milieu MRS à 30°C. Les souches pures ont été caractérisées par description morphologique et biochimique, par identification sur Galeries API 50CH et par profil fermentaire par analyse par HPLC des surnageant de culture après 24h à 30°C.

Les ensilages contrôlés par inoculation d'un ferment d'ensilage ont été réalisés dans des micro-silos de laboratoire dont la capacité est de 1300g de matière humide. En utilisant des grignons séchés et des margines congelées obtenus sur le site de Beni Mellal (structure traditionnelle par pressage) en janvier 2008 (A partir d'un lot homogène de 600 kg d'olives, il a été obtenu : 253 kg de grignon ; 220 litres de margines ; 123 litres d'huile)

Le ferment d'ensilage a été mis en culture 24 heures à 30°C dans des flacons de 150ml contenant 90ml du milieu MRS liquide. La culture a été centrifugée pendant 15 min à 14500 rpm ensuite le culot est récupéré et mélangé avec les margines.

Les grignons (conservés sec) ont été réhydratés avec les margines contenant le ferment d'ensilage à une concentration de  $2 \cdot 10^8$  bactéries par gramme MS.

Les pots d'ensilage sont remplis en tassant la pulpe afin de limiter la quantité d'air. Ils sont fermés puis scellés. Les microsilos sont incubés à l'obscurité et à l'étuve à une température de 25°C.

### 3. Résultats et discussion

Après un an de conservation, les ensilages naturels présentent des caractéristiques acceptables : pH inférieur à 5, humidité entre 50 et 60 %, (Figure III), pas d'odeur de putréfaction.

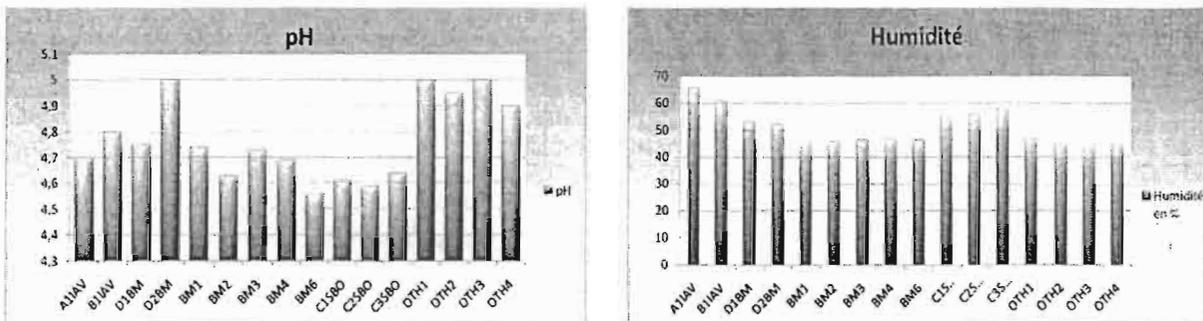


Figure 3: pH et Humidité des ensilages naturels.

L'analyse des jus d'ensilages, après centrifugation et filtration, par l'HPLC permettra d'apporter des informations complémentaires sur la concentration en sucres résiduels et sur la concentration en acide lactique et acétique. Une différence entre les ensilages à partir desquels on a pu isoler les bactéries lactiques avec ceux contenant majoritairement des levures pourra être ainsi faite et apporter des réponses plus précises sur la faisabilité des ensilages.

Ce travail a permis d'isoler 66 souches à partir des différents ensilages, 25 souches ont été identifiées comme des bactéries. Elles sont toutes Gram (+) et Catalase (-). L'analyse par HPLC des surnageants de cultures des 25 souches bactériennes isolées, a mis en évidence le métabolisme fermentaire de chaque souche, il en résulte la présence de 3 souches homofermentaires (IF 0.96/0.97) dont la production d'acide lactique est nettement supérieure à ceux des autres acides, 5 souches hétérofermentaires facultatives produisant moins d'acide lactique et plus d'acide propionique et acétique (IF 0.84/0.85), une seule souche est hétérofermentaire stricte (IF 0.68). On note l'absence de production de l'éthanol pour toutes les souches. (Tableau II).

L'isolement et la caractérisation a permis de mettre en évidence la présence des bactéries lactiques dans des ensilages des sous produit de l'olivier. Il ressort de ce travail que la présence des bactéries lactiques semble dépendre de la technique d'extraction de l'huile d'olive utilisé. En effet, les résultats d'analyses montrent que les bactéries qui produisent le plus d'acide lactique proviennent du site de

Beni Mellal où l'on utilise la méthode de pressage sur des olives non lavées pour obtenir des grignons et des margines.

Les ensilages conservés à 25°C ont permis d'isoler le plus de bactéries lactiques tandis que les levures ont été récupérées principalement sur les ensilages conservés à température ambiante. L'isolement des levures n'est pas caractéristique d'un type de résidu comme les bactéries puisqu'on les retrouve sur les grignons/margines et sur les margions.

Au vu des regroupements faits en fonction de la production d'acides organiques, de la taille des colonies, de leur aspect et de leur profil sur les galeries API, on peut supposer que l'on a 9 souches de bactéries différentes. Ces souches appartiennent aux genres : *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus pentosus*.

Après une caractérisation des bactéries lactiques, la mise en place d'un ensilage a été réalisée avec une souche préalablement isolée des ensilages naturels. Après 18 jours, le processus de fermentation n'a pas été réalisé au sein des ensilages inoculés et témoin, cela a été mis en évidence par le suivi de la microflore qui a montré la prédominance des levures et les champignons (Tableau III). Les bactéries dénombrées dans l'ensilage 2 ne sont pas des bactéries lactiques.

La mise en place des ensilages inoculés avec la souche NE022 n'a pas abouti aux résultats souhaités, cela est dû à plusieurs raisons tels que l'homogénéité du mélange, la capacité et la résistance de la souche et la nature du substrat.

**Tableau II:** Détermination du métabolisme de différentes bactéries lactiques.

Groupe	Souches	Glucose résiduel	Acide lactique g/L	Acide acétique g/L	Acide propionique g/L	Indice fermentaire	Genre et espèce	Origine
1	NE031	0,98	25,00	0,55	0,29	0,68	<i>L. plantarum</i>	BM1
2	NE055	0,62	61,96	10,28	1,26	0,84	<i>L. plantarum</i>	OTH1
	NE058	0,59	61,53	10,34	1,26	0,84	<i>L. plantarum</i>	OTH1
	NE059	0,70	61,05	10,51	1,30	0,84	<i>L. plantarum</i>	OTH1
	NE053	0,65	61,25	10,46	1,26	0,84	<i>L. plantarum</i>	OTH1
3	NE052	1,21	61,18	10,50	1,24	0,84	<i>L. plantarum</i>	BM4
	NE037	1,11	61,16	10,59	1,26	0,84	<i>L. plantarum</i>	BM3
	NE034	1,01	61,01	10,40	1,26	0,84	<i>L. plantarum</i>	BM3
	NE033	0,88	59,82	10,09	1,25	0,84	<i>L. plantarum</i>	BM3
	NE036	0,63	58,82	9,87	1,22	0,84	<i>L. plantarum</i>	BM3
4	NE039	6,03	57,67	10,45	0,00	0,85	<i>L. pentosus</i>	BM3
5	NE038	1,50	61,30	10,52	1,28	0,84	<i>L. pentosus</i>	BM3
6	NE030	3,29	58,84	10,46	0,98	0,84	<i>L. pentosus</i>	BM1
	NE032	3,00	60,09	10,62	0,86	0,84	<i>L. pentosus</i>	BM1
	NE035	6,83	56,82	10,26	0,90	0,84	<i>L. pentosus</i>	BM3
7	NE015	0,64	25,17	0,43	0,48	0,96	<i>L. plantarum</i>	D1BM
	NE022	0,44	24,87	0,39	0,52	0,96	<i>L. plantarum</i>	D2BM
	NE018	0,91	24,73	0,49	0,50	0,96	<i>L. plantarum</i>	D1BM
8	NE013	0,51	25,03	0,15	0,60	0,97	<i>L. plantarum</i>	D1BM
9	NE016	1,20	24,73	0,69	0,50	0,95	<i>L. pentosus</i>	D1BM
	NE017	3,22	23,38	0,47	0,44	0,96	<i>L. pentosus</i>	D1BM
	NE014	0,54	25,06	0,65	0,41	0,96	<i>L. pentosus</i>	D1BM
	NE029	3,85	22,70	0,55	0,45	0,96	<i>L. pentosus</i>	BM1
	NE019	3,92	22,63	0,27	0,46	0,97	<i>L. pentosus</i>	D1BM
	NE020	3,42	22,93	0,32	0,45	0,97	<i>L. pentosus</i>	D1BM

**Tableau III:** Analyse de la microflore totale, du pH et de l'humidité dans les ensilages inoculés.

Paramètres	Témoïn		Ensilage Inoculé 1		Ensilage Inoculé 2	
	T0	T18	T0	T18	T0	T18
Bactéries totales (ufc/g PMS)	1,35 10 <sup>4</sup>	<3,31 10 <sup>2</sup>	2,54 10 <sup>4</sup>	<3,3210 <sup>2</sup>	2,54 10 <sup>4</sup>	<3,92 10 <sup>2</sup>
Champignons (ufc/g PMS)	2,11 10 <sup>2</sup>	<3,31 10 <sup>2</sup>	5,97 10 <sup>3</sup>	<2,3210 <sup>2</sup>	5,97 10 <sup>3</sup>	<2,36 10 <sup>3</sup>
Levures (ufc/g PMS)	<2,11 10 <sup>2</sup>	1,73 10 <sup>5</sup>	<2,13 10 <sup>1</sup>	1,5510 <sup>5</sup>	<2,1310 <sup>1</sup>	<2,62 10 <sup>3</sup>
Bactéries MRS (ufc/g PMS)	<2,11 10 <sup>2</sup>	<3,31 10 <sup>3</sup>	3,26 10 <sup>3</sup>	<3,310 <sup>2</sup>	3,26 10 <sup>3</sup>	1,86 10 <sup>6</sup>
Levures MRS (ufc/g PMS)	<2,11 10 <sup>2</sup>	1,57 10 <sup>6</sup>	<2,13 10 <sup>1</sup>	2,4310 <sup>5</sup>	<2,13 10 <sup>1</sup>	<3,93 10 <sup>3</sup>
pH	5,10	4,96	5,10	5,04	5,04	5,01
Humidité %	40,81	35,53	41,35	37,59	41,35	36,34

Cependant, ces travaux préliminaires ouvrent de nouvelles perspectives quant à la valorisation des sous-produits de l'industrie oléicole par voie microbienne. En effet, ces « déchets » de l'olivier posent des problèmes de pollution car ils sont déversés dans l'environnement sans moyen de ré-utilisation et/ou de stockage adapté. L'ensilage des ces résidus saisonniers permettrait d'envisager une utilisation annuelle pour diverses valorisations tels que la lombriculture, la production de champignons supérieurs ou encore alimentation animale. L'ajout de bactéries lactiques endogènes sélectionnées permettra d'obtenir des ensilages contrôlés.

La suite de ce travail sera de continuer les essais pour arriver à avoir un ensilage correct qui répond aux critères biologiques et biochimiques d'un bon ensilage, par exemple en utilisant un ferment mixte, des substrats frais.

### Références bibliographiques

- BIOPULCA, 2001. Development of bioprocesses for the conservation, detoxification and valorisation of coffee pulp and coffee husk. . In: Final Report. EU Project INCO DC N° IC18\*CT970185, pp 202.
- Chimi H. 2006. Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. In : Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA n°141, Département des Sciences Alimentaires et Nutritionnelles IAV Hassan II, Rabat pp. 1-4.
- Lakhtar H. 2009. Culture de shiitake sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : transformation des polyphénols des margines. Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne. Marseille. pp 176.
- Mulinacci N., Innocenti M., La Marca G., Mercalli E., Giaccherini C., Romani A., Erica S., Vincieri F.F. 2005. Solid olive residues: Insight into their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8963-8969.
- Perraud-Gaime I. 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, pp 209
- Roussos S., Zaouia N., Tantaoui-Elaraki A., Lamrani K., Cheheb M., Hassouni H., Verhé F., Perraud-Gaime I., Augur C., Ismaili-Alaoui M., 2006. Mycoflore naturelle des olives dans les maâsra et pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* sur céréales. In: Ismaili-Alaoui M, Roussos S, Perraud-Gaime I (eds) *Biotechnology and Quality of Olive tree Products around the Mediterranean basin*. Actes Editions, Rabat, Maroc, pp 175-192.

Perraud-Gaime Isabelle, Labrousse Y., Roussos Sevastianos.  
(2009)

Conservation des résidus de l'agro-industrie oléicole par  
ensilage : de l'isolement de bactéries lactiques endogènes à  
l'étude de faisabilité

In : Karray B. (ed.), Khecharem J. (ed.), Roussos Sevastianos  
(ed.). Pour un secteur oléicole rénové, rentable et compétitif  
en Méditerranée = For a renovated, profitable and  
competitive Mediterranean olive growing sector :  
proceedings Olivebioteq 2009. Sfax : Institut de l'Olivier, 308-  
312

Séminaire Olivebioteq 2009 : Pour un Secteur Oléicole  
Rénové, Rentable et Compétitif en Méditerranée = Seminar  
Olivebioteq 2009 : For a Renovated, Profitable and  
Competitive Mediterranean Olive Growing Sector, 3  
Sfax (TUN), 2009/09/15-19. ISBN 978-9938-9513-0-1