

IDENTIFICATION DE NOUVEAUX COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PRÉSENTS DANS LES REJETS LIQUIDES D'HUILERIES D'OLIVE (MARGINES)

Chokri Belaid, Monem Kallel et Boubaker Elleuch*

*École nationale d'ingénieurs de Sfax (Tunisie)

Les margines constituent jusqu'à présent un problème environnemental majeur pour les pays producteurs d'huile d'olive. La plupart des processus de traitement biologique, physico-chimique ou de valorisation de margine ont montré leur limite à cause de la complexité de cet effluent très chargé en matière organique et minérale et particulièrement en composés phénoliques. Ces derniers sont toxiques pour la faune et la flore, difficilement biodégradable et inhibiteur de l'activité biologique. L'analyse par GC/MS des extraits de différents échantillons de margines, nous a permis d'identifier une grande variété de composés phénoliques dont plusieurs ont été identifiés pour la première fois. Dans le cadre de ce travail on s'est intéressé à l'étude de la variation et l'évolution des composés phénoliques en fonction de l'origine des margines.

Olive mill wastewaters (OMW) constitute a major environmental problem particularly in Mediterranean countries. Most of the biological treatment processes, physico-chemical treatment or valorisation methods of OMW showed some limitations. This could be partly due to the heavy load in organic compounds and to the high load in polyphenols of these sewages. The phenolic compounds are toxic for fauna and flora, inhibitory of the biological activity and their biodegradation is very difficult. The analysis by GC/MS of different samples of OMW, permitted to identify a big variety of phenolic compounds. Several of these have been identified for the first time. In this work we analysed a variety of phenolic compounds depending on the different processes of olive oil extraction and the influence of storage time.

INTRODUCTION

L'industrie oléicole génère en plus de l'huile d'olive, deux autres sous produits. Un rejet solide connu sous le nom de grignon et un autre liquide connu sous le nom de margine. Ce dernier effluent est caractérisé par une coloration noirâtre qui varie selon son état de dégradation^[1]. La fraction organique présente une composition complexe et très

variable, constituée essentiellement de sucres, de lipides, de polyphénols, de polyalcools, de protéines et des acides organiques^[2,3]. Les tentatives de traitements biologiques des margines sont restées limitées à cause de la présence de composés phénoliques toxiques qui sont difficilement biodégradables et inhibiteurs de l'activité biologique^[4, 5, 6]. La biométhanisation utilisée en particulier pour la dégradation des rejets très chargés en matière organique est inhibée par la présence de ces polyphénols^[7, 8, 9]. Cependant cette toxicité a été réduite par des levures et des champignons spécifiques^[10, 11, 12, 13] ou par pré-traitement physique sous l'effet d'un champ ultrasonore^[14]. D'un autre côté ces polyphénols présentent une valeur commerciale très importante surtout dans le domaine pharmaceutique et agroalimentaire. En effet, ces composés ont une forte capacité de piéger les radicaux libres qui constituent la plus importante source d'oxydation^[15, 16]. De même ces composés peuvent attacher les protéines qui engendrent une turbidité indésirable dans certains aliments et les faire précipiter^[17]. Ces margines sont valorisées aussi par leur effet plastifiant et utilisées comme adjuvant dans le béton permettant l'amélioration de sa résistance à la compression^[18]. Par ailleurs cette variété de composés phénoliques dans les margines est en fait en étroite relation avec l'état de maturation des olives et du système d'extraction d'huile d'olive. On distingue des composés phénoliques de faible poids moléculaire tels que les acides phénoliques, les phénols, les flavonoïdes, les glucosides phénoliques et d'autres qui ont des poids moléculaires élevés comme les tanins, les anthocyanins et les catechins^[12]. La distribution des poids moléculaires de polyphénols a été étudiée par différentes techniques parmi les quelles figurent l'ultrafiltration^[19], la filtration sur gel (sephacryl S-200) et la chromatographie d'exclusion stérique^[20]. La séparation et l'identification des composés phénoliques de faible poids moléculaire peuvent être assurées par différentes techniques analytiques (HPLC, CPG, UV, IR, SM), cette identification est plus performante par couplage de certaines techniques (HPLC/MS, GC/MS)^[20, 21, 22, 23, 24]. Les résultats des analyses des extraits de margines montrent une composition en monomère phénolique très variable selon la nature de l'échantillon de margines, les conditions opératoires d'extraction et les conditions d'analyses. Dans ce cadre nous nous sommes intéressés à étudier la variation des composés phénoliques dans différents types de

marges, en particulier les marges fraîches et vieilles provenant de différents systèmes de trituration soit par système classique soit par système continu.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Afin de mettre en évidence le caractère évolutif de cet effluent, plusieurs échantillons de marges ont fait l'objet d'une caractérisation globale et d'une étude particulière des monomères phénoliques.

- L'échantillon (1) est issu du système d'extraction classique campagne 2000/2001
- L'échantillon (2) est issu du système d'extraction classique campagne 1999/2000
- L'échantillon (3) est issu du système d'extraction classique campagne 1998/1999
- L'échantillon (4) est issu du système d'extraction continu campagne 2000/2001
- L'échantillon (5) est issu du système d'extraction continu campagne 1999/2000

Au cours de cette caractérisation nous avons mesuré, la demande chimique en oxygène (DCO), le carbone organique total (COT), la quantité de matière organique et minérale, la matière grasse, l'azote totale et le phosphore total. Le dosage de polyphénols totaux est réalisé suivant la méthode de Folin - Ciocalteu qui consiste à complexer ces composés avec le réactif de Folin et mesurer leur densité optique à 727 nm^[25]. L'identification des composés phénoliques est réalisée par chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Pour assurer une solubilisation maximale de ces composés dans le solvant d'extraction, on acidifie les échantillons de marges jusqu'à pH = 2. On extrait ces composés trois fois par le même volume d'acétate d'éthyle. La silylation de composés phénoliques permet de réduire les interactions électrostatiques inter et intramoléculaires ce qui diminue considérablement la température d'évaporation de ces molécules et facilite leur séparation par GC/MS. L'agent de silylation utilisé au cours de ces réactions est le N-O

bis(triméthylsilyl) acétamide (BSA). L'extrait silylé est analysé par chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), de marque HP 6980- HP 5973 MSD. Le spectromètre est programmé à une énergie d'ionisation 70 eV, une température de source 230°C, une tension du photomultiplicateur 2 500 V et un temps de balayage de l'échelle de masse de 2,9 s. L'appareil est équipé d'une colonne capillaire HP-5MS de longueur 30 m et de diamètre intérieur égale à 0,25 mm. On utilise l'hélium comme gaz

vecteur avec un débit de 1,7 ml/min. Le programme de température suivi au cours de ces analyses est le suivant :

- Palier 1 : 100°C pendant 2 min
- Gradient de température : 5°C/min
- Palier 2 : 290°C pendant 20 min

RÉSULTAT ET DISCUSSION

L'ensemble de ces analyses montre que les caractéristiques globales des marges sont largement influencées par le procédé de trituration des olives ainsi que le temps du stockage (tableau I). Ainsi on constate que les échantillons (1, 2, 3) issus du système classique d'extraction d'huile d'olive sont plus concentrés en matière polluante (DCO varie entre 130 et 180 g/l et le COT varie entre 30 et 50 g/l), alors que les échantillons issus du système continu sont relativement moins pollués (DCO varie entre 40 et 50 g/l et le COT varie entre 13 et 15 g/l). En effet, dans les chaînes continues l'extraction de l'huile d'olive nécessite l'ajout de grande quantité d'eau pour faciliter la séparation de différentes phases (huile, margine et grignon). Les teneurs en eau de ces échantillons varient entre 96 et 97 % tandis que pour les chaînes classiques cette teneur en eau varie entre 90 et 94 %. Concernant la charge minérale, tous les échantillons de marges présentent une charge élevée qui varie entre 10 et 25 g/l, qui doit être prise en considération dans les essais de traitement ou de valorisation. On note aussi que l'échantillon de margine le plus ancien (chaîne classique campagne 1998/1999) est le plus concentré. Cette concentration est due éventuellement à l'évaporation naturelle suite à l'exposition prolongée aux conditions climatiques de la région. Par ailleurs, le dosage de polyphénols par la méthode de Folin - Ciocalteu montre que la concentration de ces composés varie entre 5 et 10 g/l. Cette concentration aussi importante pourrait être éventuellement à l'origine de la toxicité des marges vis à vis de l'activité biologique.

Analyse des extraits de marges par GC/MS

Tableau I : Caractérisation de différents échantillons de margine

Échantillons	(1) Chaîne classique 2000/2001	(2) Chaîne classique 1999/2001	(3) Chaîne classique 1998/1999	(4) Chaîne continue 2000/2001	(5) Chaîne continue
Paramètres 1999/2000					
pH	5,51	5,35	5,37	5,25	5,27
Conductivité ms/cm	17,5	17,5	25,5	15,1	15,0
DCO g/l	135	128	180	42	51
COT g/l	43	35	52	13	15
Teneur en eau %	92,7	93,7	90,2	96,9	96,6
Matière en suspension g/l	11,7	11,9	14,4	13,7	11,9
Matière sèche g/l	73	63	98	31	34
Matière minérale g/l	18,6	18,9	24	11	12
Matière volatile g/l	54,4	44,1	74	20	21,5
Matière grasse g/l	0,35	0,20	0,68	0,08	0,11
Polyphénols g/l	9,01	9,1	10,41	5,6	6,37
Azote total g (N)/l	0,43	0,33	0,48	0,42	0,11
Phosphore total (P ₂ O ₅) g/l	0,82	0,70	1,48	0,36	0,54

Identification de nouveaux composés phénoliques

L'analyse de la fraction phénolique aussi complexe des margines nous a permis d'évaluer la variation et l'évolution de ces polyphénols en fonction du temps et de la nature des margines. L'analyse par GC/MS de cinq extraits silylés de margines montre une variation très importante en monomères phénoliques. Ceci confirme une autre fois l'influence de la nature de l'échantillon et le système de trituration sur les caractéristiques des margines. La synthèse des résultats d'identification de ces composés phénoliques est représentée dans le tableau 2 et les spectres de masse de ces mêmes composés sont présentés dans le tableau 3. En effet, ces résultats ont permis de distinguer une variation très importante en composés phénoliques d'un extrait de margine à un autre. De même, on remarque que seulement le 1,4 dihydroxy 2,5 diméthylbenzene (C₇), le tyrosol (C₉),

l'acide para hydroxyphenyl propionique (C₁₄), l'hydroxytyrosol (C₁₅) et le 3,4 dihydroxyphenyl glycol (C₂₀) ont été identifiés dans les différents échantillons de margines étudiés. Par ailleurs d'autres composés sont identifiés uniquement dans les échantillons de margine fraîche tel que le 3 méthylcatéchol (C₃), l'acide hydrocinnamique (C₅), le vanillylalcool (C₁₂), l'homovanillylalcool (C₁₃), l'acide para coumarique (C₁₆), l'acide protocatechique (C₁₇), l'acide ferrulique (C₂₃) et l'acide caféique (C₂₄). La présence de ces composés uniquement dans les margines fraîches nous incite à dire que ces composés sont facilement oxydables et par conséquent leur transformation est éventuellement rapide.

Certaines études consacrées au suivi des composés phénoliques présents dans les margines moyennant différentes techniques d'extraction et d'analyse ^[20, 23, 24, 26] confirment ces

Tableau 2 : Liste des composés phénoliques identifiés par GC/MS dans les margines

Échantillons	(1) Chaîne classique 2000/2001	(2) Chaîne classique 1999/2001	(3) Chaîne classique 1998/1999	(4) Chaîne continue 2000/2001	(5) Chaîne continue 1999/2000
Composés phénoliques identifiés dans chaque extrait de margine					
(C ₁) 3,5 diméthylphénol	●			●	●
(C ₂) 1,2 benzène diol (catéchol)				●	●
(C ₃) 1,3 dihydroxybenzène (resorcinol)					●
(C ₄) 3 méthylcatéchol				●	
(C ₅) benzène propanoïque acide (acide hydrocinnamique)				●	
(C ₆) 3,5 dihydroxy 1 méthylbenzene (orcinol)					●
(C ₇) 1,4 dihydroxy 2,5 diméthylbenzene	●	●	●	●	●
(C ₈) 2 hydroxybenzoïque acide (acide salicylique)			●		
(C ₉) 4 hydroxyphenyl éthanol (tyrosol)	●	●	●	●	●
(C ₁₀) 4 hydroxybenzoïque acide	●	●	●	●	
(C ₁₁) 4 hydroxyphenyl acétique acide (PHPA)				●	●
(C ₁₂) 1 hydroxy 2 méthoxy 4 benzylalcool (vanillyl alcool)	●				
(C ₁₃) 2(4 hydroxy 3 methoxyphenethyl) ethanol (homovanillyl alcool)	●			●	
(C ₁₄) 4 hydroxyphenyl propionique acide (acide 4hydroxyhydrocinnamique)	●	●	●	●	●
(C ₁₅) 3,4 dihydroxyphenethyl éthanol (hydroxytyrosol)	●	●	●	●	●
(C ₁₆) 4 hydroxycinnamique acide (acide para coumarique)	●			●	
(C ₁₇) 3,4 dihydroxybenzoïque acide (acide protocatechique)	●			●	
(C ₁₈) 3,4 dihydroxyphenyl acétique acide				●	●
(C ₁₉) 4 hydroxy 3 methoxyphenethyl glycol (vanilethane diol)	●	●	●		
(C ₂₀) 3,4 dihydroxyphenyl glycol	●	●	●	●	●
(C ₂₁) 3,4 dihydroxyphenylpropanoïque acide (3,4 dihydroxyhydrocinnamique acide)		●	●		
(C ₂₂) 4 hydroxy 3 methoxy mandelique éthyle ester		●	●		
(C ₂₃) 4 hydroxy 3 methoxycinnamique acide (acide ferrulique)				●	
(C ₂₄) 3,4 dihydroxycinnamique acide (acide caféique)				●	

● : Composé phénolique identifié dans l'extrait de margines.

Tableau 3 : Spectre de masse de composés aromatiques silylés identifiés dans les margines

Composés silylés	Spectre de masse (m/z)
C ₁	194 (M+), 179 (100%), 163, 149, 119, 105, 73
C ₂	254 (M+), 239, 166, 151, 136, 73(100%)
C ₃	254 (M+), 239 (100%), 217, 147, 133, 117, 101, 73
C ₄	268 (M+), 253, 180, 165, 147, 93, 73 (100%)
C ₅	222 (M+), 207, 132, 104 (100%), 91, 75
C ₆	268 (M+), 253 (100%), 147, 133, 119, 73
C ₇	282 (M+), 267, 252, 193, 179, 91, 73 (100%)
C ₈	267 (M+ ; 100%), 209, 193, 147, 135, 91, 73
C ₉	282 (M+), 267, 193, 179 (100%), 103, 73
C ₁₀	282 (M+), 267 (100%), 223, 193, 177, 126, 73
C ₁₁	296 (M+), 281, 252, 179 (100%), 164, 147, 133, 73
C ₁₂	298 (M+), 283, 268, 253, 209, 179, 147, 109, 95, 73 (100%)
C ₁₃	312 (M+), 297, 282, 209 (100%), 179, 134, 103, 73
C ₁₄	310 (M+), 295, 193, 179 (100%), 163, 73
C ₁₅	370 (M+), 355, 267 (100%), 193, 179, 73
C ₁₆	308 (M+), 293, 249, 219, 197, 185, 147, 123, 73 (100%)
C ₁₇	370 (M+), 355, 311, 280, 267, 223, 193 (100%), 179, 165, 73
C ₁₈	384 (M+), 369, 347, 297, 273, 217, 179, 147, 73 (100%)
C ₁₉	400 (M+), 385, 297 (100%), 281, 267, 147, 117, 73
C ₂₀	458 (M+), 443, 355 (100%), 281, 147, 73
C ₂₁	398 (M+, 100%), 383, 280, 267, 179, 127, 73
C ₂₂	370 (M+), 297 (100%), 268, 217, 167, 147, 103, 73
C ₂₃	338 (M+), 323, 308, 293, 269, 249, 219, 147, 117, 73 (100%)
C ₂₄	396 (M+, 100%), 381, 307, 239, 219, 191, 73

variations en monomères phénoliques (tableau 4). Par comparaison aux résultats analytiques existants on constate que les spectres d'identification que nous avons obtenus ont mis en évidence l'existence de nouveaux composés phénoliques. Les structures de ces composés nouvellement identifiés sont présentées dans le tableau 5. En examinant les formules semi-développées de ces composés on remarque qu'ils ont tous un poids moléculaire relativement faible. Il semble que la dégradation de certains polyphénols

Tableau 5 : Structure des nouveaux composés phénoliques identifiés dans les margines

(C ₁) 3,5 diméthylphénol 	(C ₁₂) 1 hydroxy 2 méthoxy 4 benzylalcool (vanillyl alcool)
(C ₂) 1,2 benzène diol (catéchol) 	(C ₁₃) 4 hydroxy 3 méthoxyphényl alcool (homovanillyl alcool)
(C ₄) 3 méthylcatéchol 	(C ₁₉) 3,4 dihydroxyphényl acétique acide
(C ₅) acide hydrocinnamique 	(C ₁₉) 4 hydroxy 3 méthoxy phényl glycol (vanilethane diol)
(C ₆) 3,5 dihydroxy 1 méthylbenzène (orcinol) 	(C ₂₁) 3,4 dihydroxy hydrocinnamique acide
(C ₇) 1,4 dihydroxy 2,5 diméthylbenzène 	(C ₂₂) 4 hydroxy 3 méthoxy mandélique éthyle ester

de haut poids moléculaire ainsi que diverses réactions d'oxydation naturelle peuvent être à l'origine de ces nouveaux composés. Par ailleurs, certains composés phénoliques fréquemment répandus dans les margines, n'ont pas été détectés dans nos extraits de margines comme l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gallique et la vanilline. Ces composés sont facilement oxydables et leur transformation est possible.

CONCLUSION

La caractérisation des margines nous a permis de mettre en évidence l'effet du système de trituration et la durée du stockage sur les paramètres indicateurs de pollution (DCO, COT). En effet, les échantillons de margines issus du systè-

Tableau 4 : Variation des monomères phénoliques présents dans les margines [20, 23, 24, 26]

Condition opératoire	Composés phénoliques identifiés
- Extrait : acétate d'éthyle - Analyse : GC/MS - Référence : [20]	Tyrosol, hydroxytyrosol, Ac. protocatechique, Ac. syringique, Ac. gallique Ac. para coumarique, Ac. caféique, Ac. ferulique, vanillin, Ac. vanillique
- Fractionnement : par gel - Séparation et Analyse : HPLC/UV, HPLC/MS, HPLC/TLC, GC/MS - Référence : [20]	Tyrosol, hydroxytyrosol, 4 O glucoside 3 hydroxyphényl ethanol, Ac. caféique, hydroxyquinon, Ac. para coumarique, Ac. protocatechique, apigenin, luteolin 4. hydroxyphénylethyl glycol
- Extrait : n- butanol - Analyse : HPLC/TLC - Référence : [23]	Ac. protocatechique, Ac. para hydroxybenzoïque, para hydroxybenzaldehyde, Ac. vanillique, vanillin, syringaldehyde, Ac. para coumarique
- Extrait : acétate d'éthyle - Analyse : HPLC - Référence : [24]	Ac. gallique, Ac. protocatechique, Ac. para hydroxybenzoïque, Ac. vanillique Ac. caféique, Ac. ferulique
- Extrait : éther - Analyse : HPLC/TLC - Référence : [26]	syringaldehyde, para vanillin, protocatechiquealdehyde, tyrosol, Ac. p, hydroxyphényl propionique, Ac. Ferulique, Ac. para coumarique, Ac. para hydroxybenzoïque, Ac. vanillique, Ac. syringique

me d'extraction classique de l'huile d'olive présentent les indices de pollution les plus élevés et une toxicité plus marquée dû à la présence de quantité relativement élevée de polyphénols. Les analyses des extraits de différents échantillons de margines par chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse, ont mis en évidence la présence d'une grande variété de monomères phénoliques. La répartition de ces composés varie d'un échantillon à un autre. En effet, plusieurs facteurs conditionnent l'existence de ces composés dans les margines tel que l'état de maturation des olives, les conditions d'extraction de l'huile d'olive et l'état des margines. Les margines collectées dans des bassins de stockage peuvent subir différentes réactions (d'hydrolyse, d'oxydation et de bio transformation) ce qui modifie continuellement leur composition notamment en composés phénoliques. Au cours de cette étude nous avons pu identifier de nouveaux composés phénoliques qui ne sont pas rapportés dans la littérature. L'analyse par GC/MS constitue un avantage majeur relatif aux autres techniques d'analyse et présente une méthode très efficace pour contrôler l'évolution des margines traitées ou transformées. L'élimination des composés phénoliques soit par récupération et valorisation dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique soit par oxydation physico-chimique ou biologique facilite la résolution des problèmes des margines particulièrement présentes dans les pays riverains de la mer méditerranéenne.

***Chokri Belaid, Monem Kallel, Boubaker Elleuch**
 Laboratoire de recherche eau énergie environnement - École nationale d'ingénieurs de Sfax - BP W 3038 - Sfax, Tunisie
 E-mail : chokribel@yahoo.fr

Bibliographie

- [1] Hamdi M, (1993). *Thermoacidic precipitation of drakly coloured polyphenols of olive mill wastewaters*. Environmental Technology, Vol. 14, p 495-500
- [2] Hamdi M, (1993). *Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment*. Bioprocess Engineering, N° 8, p 209-214
- [3] Vlyssides A.G, Loizidou M, Gimouhopoulos K, Zorpas A, (1998). *Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods*. Fresenius Environmental Bulletin, N° 7, p 308-313
- [4] Fiestas J.A, Padilla R.B, (1992). *Use and treatment of mill wastewater : current situation and prospects in Spain*. Grasas y Aceites Vol. 43 Fasc. 2, p 101-106
- [5] Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis M.A, Cristinzio G, (1995). *Antibacterial polyphenols from olive oil mill wastewaters*. Journal of Applied Bacteriology, Vol.79, p 393-398
- [6] Gharsallah N, Labat M, Aloui F, Sayadi S, (1999). *The effect of phanerochaete chrysosporium pretreatment of olive mill wastewater on anaerobic digestion*. Resources, Conservation and Recycling, Vol. 9, N° 10 :19: 06
- [7] Borja R, Banks C.J, Maestro-Duran R, Alba J, (1996). *The effects of the most important phenolic constituents of olive mill wastewater on batch anaerobic methanogenesis*. Environmental Technology, Vol.17, p 167-174
- [8] Beccari M, Carucci G, Majone M, Torrisi L, (1999). *Role of lipids and phenolic compounds in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents*. Environmental Technology, Vol. 20, p 105-110
- [9] Gharsallah N, Labat M, Aloui F, Labat M, Jaoua M, Sayadi S. *Effet of pre-treatment by phanerochaete chrysosporium on anaerobic digestion of crude olive mill wastewater and of isolated polyphenolic and phenolic fractions*. Bioresource Technology, (sous presse)
- [10] Martirani L, Giardina P, Marzullo L, Sanna G, (1996). *Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill was-*

- tewaters with the ligninolytic fungus Pleurotus Ostreatus*. Wat. Res., Vol.30, No.8, p 1914-1918
- [11] Scioli C, De Felice B, (1993). *Use of yeast strains to purify effluents from olive mills (vegetable waters)*. Ann. Microbiol.,Vol.43, 61
- [12] Sayadi S, Ellouz R, (1995). *Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from phanerochaete chrysosporium in the decolorization of olive mill wastewaters*. Applied and Environmental Microbiology, Vol.61, No.3, p 1098-1103
- [13] Sayadi S, Zorgani F, Ellouz R, (1996). *Decolorization of olive mill wastewaters by free and immobilized phanerochaete chrysosporium cultures : Effect of the high molecular weight polyphenols*. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 56, p 265-276
- [14] Kallel M, Shabou R, Bouzid J, Belaid C, Elleuch B, (2000). *Contraintes techniques et économiques du traitement des effluents d'huileries d'olive (margine) et perspective*. Proc. Intern'l Conf. on wastewater treatment and reuse adapted to Mediterranean area, 25-28 October 2000, Tunisia (WATRAMA' 2000), p 81-84
- [15] Gutfinger T, *polyphenols in olive oils, (1981)*. Jaocs, Vol. 58, p 966-968
- [16] Claude L, (1996). *Oxydation, substances à fonctions antioxydantes et stress oxydatif : relation avec le vieillissement - revue critique*. OCL, Vol.3, No.3, p 182-193
- [17] Bartolomé B, Estrella I, Hernandez B.T, (2000). *Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA)*. Journal of food science. Vol.65, No.4, p 617-621
- [18] Fourati C F, Rouis J, Elleuch B, (2001), *Utilisation de la margine en tant qu'adjuvant dans le béton*. Déchets Sciences et Techniques - Revue francophone d'écologie industrielle, No. 21, 1^{er} trimestre 2001, p 16-19
- [19] Sayadi S, Allouche N, Jaoua M, Aloui F, (1999). *Detrimental effects of high molecular mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment*. Process Biochemistry, Vol. 8, No. 15: 30: 59, p 1-11
- [20] Allouche N, Damak M, Ellouz R, Sayadi S. *Isolations and characterizations of valuable aromatic compounds from olive mill wastewater by-product*. (sous presse)
- [21] Romani A, Pinelli P, Mulinacci N, Vincieri F.F, Tattini M, (1999). *Identification and quantitation of polyphenols in leaves of Myrtus communis L*. Chromatographia, Vol 49, No. 1 / 2, p 17-20
- [22] Capasso R, Cristinzio G, Evidente A, Scognamiglio F, (1992). *Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable wastewaters*. Phytochemistry, Vol.31, No.12, p 4125-4128
- [23] Saez L, Perez J, Martinez J, (1992). *Low molecular weight phenolics attenuation during simulated treatment of wastewaters from olive oil mills in evaporation ponds*. Wat. Res. Vol.26, No.9, p 1261-1266
- [24] Kemal Unal M, (1994). *Polyphénols, O-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et les margines*. Oliv AE, No.51, p 34-35
- [25] Folin O, Ciocalteu V, (1927). *On tyrosine and tryptophan determination in protein*. Journal of Biological Chemistry, Vol.73
- [26] Pérez J, Cormenzana R, Martinez J, (1990). *Bacteria degrading phenolic acids isolated on a polymeric phenolic pigment*, Journal of Applied Bacteriology, Vol 69, p 38-42

Nomenclature

- OMW : olive mill wastewater (margine)
- GC/MS : chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse
- DCO : demande chimique en oxygène
- COT : carbone organique total
- BSA : N,O bis(triméthylsilyl) acetamide (agent de silylation)
- MSD : masse selective detector (détecteur de masse)