

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABDERAHMANE MIRA- Béjaïa
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie

Mémoire

Présenté par

M^{elle} **KERNOU Ourdia dite Nouara**

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Science biologique

Option : Microbiologie

Thème

Bioamélioration du grignon d'olive par culture submergée d'une souche locale de Streptomyces.

Soutenue le

Devant le jury composé de

Noms et prénoms

Grade

M ^r . TAMENDJARI A.	Maitre de conférences A	Président
M ^r . KECHA M.	Professeur	Rapporteur
M ^r . AISSAT K.	Professeur	Examineur
M ^r . OUCHEMOUKH S.	Maitre de conférences A	Examineur
Mme. BOUCHERBA N.	Maitre de conférences B	Invitée

Année universitaire 2014 - 2015



Remerciements

Je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donné la santé, la force et la volonté d'accomplir ce travail.

Je tiens tous particulièrement à adresser mes remerciements les plus vifs au directeur de mémoire KECHA Mouloud, professeur à l'université de Bejaia, pour sa disponibilité, son esprit critique et sa compréhension, et je lui suis très reconnaissante pour ses conseils, et son sérieux dans le travail.

Mes vifs remerciement s'adressent également aux membres du jury : M^r AISSAT K., M^r TAMENDJARI A., M^r OUCHMOUKH S. et M^{me} BOUCHERBA N., d'avoir bien voulu prendre le temps d'évaluer et de juger ce travail.

Enfin je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicace



J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

***A** l'homme qui me redonne confiance en moi et me soutient dans toutes les épreuves, Mon cher mari Fares.
La plus chère partie de moi, le plus beau garçon sur terre, mon très cher bébé Mohand Sghir, source de ma volonté et de mon courage, à qui je dois beaucoup d'amour, que Dieu le garde pour moi.*

A ceux qui sont mon exemple de la réussite, qui m'ont donnés de l'amour, de la tendresse, du soutien et de la force, symbole de courage et de la volonté, mes très chers parents que j'ai tant aimés, eux qui ont guidé mes pas, et là aujourd'hui, je leurs doit d'être la personne que je suis devenue, que dieu les garde pour moi.

A mes très chères sœurs Yasmina et Sabah et mes très chers frères Abdelkader, Abdelghani et Abdelmoumène de m'avoir compris et soutenus dans mes moments difficiles, ainsi que leurs femmes.

Mes oncles et leurs femmes, mes tantes, mes cousins et toute ma famille.

A ma belle-famille, en particulier, mon beau père à qui je dois beaucoup de reconnaissance, je dis que c'est bien grâce a Dieu en premier lieu et à lui en seconde lieu que j'ai pu réaliser ce travail, merci pour tout.

Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères amies et collègues, Kamelia, Akila, Rahma en particulier Lamia pour sa générosité. Ainsi que, tous mes amis (es) pour leur soutien, leur aide et leur présence.

Tableau N°	Titres	Page
I	Composition physique des différents types de grignon	7
II	Composition chimique indicative des différents types de grignons	8
III	Résultat de l'analyse microbiologique de 16 échantillons de grignon d'olive brut	10
IV	Production et caractéristiques physicochimiques de xylanases chez différentes espèces du genre <i>Streptomyces</i>	44
V	Composition chimique en NDF (Neutre detergent fiber), ADF (Acid detergent fiber) et ADL (Acid detergent lignin) de grignon d'olive avant et après biotraitement	49

Figure N°	Titre	Page
1	Diagramme des procédés d'extraction de l'huile d'olive	5
2	Composition typique de la lignocellulose	13
3	Structure chimique partielle de la cellulose	14
4	Schéma structural de la lignine	15
5	Structure du xylane et les différents sites de coupures des xylanases	17
6	Oxydation des sous-unités phénoliques de la lignine par la laccase	18
7	a : Cycle de <i>Streptomyces</i> sur milieu solide. b : Représentation schématique du cycle de vie de <i>Streptomyces</i>	24
8	Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides	25
9	Grignon d'olive tamisé	26
10	Disques d'agar obtenus à partir d'une culture de <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu de conservation	27
11	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS	29
12	Croissance mycélienne de <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu solide à base de grignon d'olive après 5 jours d'incubation	37
13	Croissance mycélienne de <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu submergé à base de grignon d'olive après (a) 4jours, (b) 5jours, (c) 9jours et (d) 19jours d'incubation 40°C.	38
14	Micromorphologie de la souche et le milieu vu au microscope optique sous le grossissement X40	39
15	Evolution de pH du substrat fermenté au cours de 30 jours de culture de <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu submergé à 40°C	41

Liste des figures

16	Evolution de la production de la xylanase par <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu submergé à base de grignon d'olive	42
17	: Evolution de la production de la cellulase par <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu submergé à base de grignon d'olive	45
18	Evolution de la production de la laccase par <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu submergé à base de grignon d'olive	46
19	Teneurs en fibres dans les constitutions pariétales de grignon d'olive avant et après biotraitement	50
20	Effet de <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur la réduction de polyphénols totaux cultivée sur milieu à base de grignon d'olive	54
21	Effet de biotraitement avec <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur la composition en protéine de grignon d'olive	56
22	Evolution de sucres totaux au cours de la culture de <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur milieu submergé à base de grignon d'olive	58
23	Effet de biotraitement par <i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I sur la composition en matière grasse du grignon d'olive	60

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Synthèse Bibliographique

I-Production oléicole en Algérie 3

II-Procédés d'extraction d'huile d'olive 3

1-Procédé classique ou traditionnel..... 3

2-Procédé discontinu ou système à super presse..... 4

3-Procédé continu..... 4

a- Système d'extraction par centrifugation à trois phases..... 4

b- Système d'extraction par centrifugation à deux phases 4

III-Grignon d'olive 6

1-Types de grignon d'olive..... 6

2-Caractéristiques physiques..... 7

3-Caractéristiques chimiques 7

a- Teneur en cellulose brute 8

b- Teneur en matières minérales (cendres) 8

c-Teneur en matières grasses (lipides) 8

d- Teneur en matières azotées totales..... 9

e- Polyphénols 9

4 –Caractéristiques microbiologiques du grignon d'olive 9

5- Différentes filières de valorisation des grignons d'olives..... 10

6-Valeur alimentaire des grignons d'olive..... 11

7-Possibilités d'amélioration de la valeur alimentaire des grignons 13

IV-Composition de la lignocellulose 13

1-Cellulose 13

2-Hémicellulose	14
3-Lignine	14
V-Biodégradation de la lignocellulose	16
1-Biodégradation de la cellulose	16
1-a-Cellulases	16
1-b-Applications industrielles des cellulases	16
2-Biodégradation de l'hémicellulose	16
2-a-Xylanases	17
2-b- Applications des xylanases	18
3-Biodégradation de la lignine	18
3-a- Laccases	18
3-b-Applications des laccases	19
V-Les actinomycètes	20
1-Généralités	20
2-Écologie et distribution dans la nature.....	20
3- Physiologie et métabolisme des actinomycètes	21
4-Critères actuels d'identification	21
a-Critères morphologiques	21
b-Critères chimiotaxonomiques	22
c-Critères physiologiques	22
d- Critères moléculaires	23
VI- Le genre Streptomyces.....	23
1-Classification et caractéristiques générales.....	23
2-Cycle de croissance sur milieu solide	24
3-Cycle de croissance sur milieu liquide.....	24
4- Production de biomolécules d'intérêt biotechnologique et thérapeutique	25

Matériels et méthodes

I- Le substrat (Grignon d'olive)	26
II-Le microorganisme (Streptomyces sp. S1M3I).....	26
III-Fermentation submergée à base de grignon d'olive	27
IV- Méthodes analytiques	28
1 –Suivi macro et microscopie de la culture	28
2- Mesure du pH.....	28
3-Dosage des activités enzymatiques	28
3-a-Activité xylanase.....	28
3-b-Activité CMC ase	29
3-c-Activité laccase	30
4-Détermination de la teneur en constituants pariétaux	31
4-a-Détermination de la fraction insoluble dans un réactif détergent neutre : le NDF(Neutral detergent fiber).....	31
4-b-Détermination de la fraction insoluble dans un réactif détergent acide: l'ADF (acid detergent fiber).	32
4-c-Dosage de la lignine avec un détergent acide (ADL selon Van Soest).	33
5-Préparation des extraits	34
5-a-Dosage des sucres totaux	34
5-b-Dosage des phénols totaux	34
5-c-Dosage de protéines	35
5-d- Dosage de lipide	35
V- Analyses statistique.....	36

Résultats et discussion

1-Suivi macro et microscopique de la culture	37
1-a-Examen macroscopique	37
-Sur milieu solide	37

-Sur milieu submergé.	37
1-b-Examen microscopique.....	39
2-Evolution du pH de la culture.	40
3-Dosage des activités enzymatiques	41
3-a- Activité xylanase.....	42
3-b-Activité CMCase	45
3-c-Activité laccasique.....	46
4-Détermination de la teneur en constituants pariétaux	48
5-Teneur en polyphénols	53
6-Teneur en protéines.....	55
7-Teneur en sucres totaux	58
8-Teneur en matière grasse.....	59
Conclusion	62
Références bibliographiques	64
Annexes	

Introduction

L'Algérie est l'un des pays méditerranéen dont la culture oléicole compte parmi l'une des plus importantes activités agricoles. En effet, un nouveau plan de développement de l'agriculture (PNDA) a été adopté par le ministère de l'agriculture dont l'objectif primordial était d'encourager la culture de l'olivier.

Ce secteur agricole engendre sans cesse des quantités appréciables de coproduits représentés par les margines et le grignon, qui sont pour la plupart peu ou pas valorisés et dont le rejet dans la nature constitue une grande menace pour l'environnement. Toutefois, la valorisation de ces coproduits contribuerait à limiter l'impact de cette industrie sur l'environnement.

Parmi les voies de valorisation envisageables, la transformation biologique par des microorganismes permettrait d'une part la production de protéines d'organismes unicellulaires, et d'autre part, l'amélioration en constituant pariétaux de la biomasse lignocellulosique de grignon d'olive et la production d'enzymes.

Plusieurs auteurs ont focalisé leur recherches sur le traitement biologique de grignon d'olive par les champignons, comme Saradouni *et al.*(1999) ; Salhi (2004); Neifar *et al.*(2013); Abid *et al.* (2014)..., mais, les études sur le traitement biologique de grignon d'olive par les actinomycètes sont rares.

L'objectif de ce travail est donc, de valoriser ce coproduit agricole par l'utilisation d'une souche d'actinobacteria locale.

Ce document se divise en trois parties ; dans la première partie, bibliographique, nous sommes attachés à décrire le grignon d'olive et sa composition en biomasse lignocellulosique, ainsi que sur les microorganismes impliqués dans le processus de biotransformation.

Dans la seconde partie, expérimentale, nous avons développé la fermentation en milieu liquide d'une souche d'actinomycète avec une double finalité:

I - La production d'enzymes lignoncellulotiques,

II- La dégradation du composés cellulaires pariétaux du grignon d'olive pour une application en alimentation animal.

Et enfin, dans la dernière partie, les résultats trouvés, leurs explications et leurs discussions seront montrés.

I- Production oléicole en Algérie

L'Algérie est considérée comme l'un des premiers producteurs mondiaux d'huile d'olive, elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce, la Tunisie, le Maroc et la Turquie (**Bensemmane, 2009**), mais la mauvaise prise en charge du potentiel national oléicole par les pouvoirs publics a limité le développement de cette filière.

Durant la campagne 2009/2010, la production oléicole algérienne était de 50 000 tonnes d'huile soit 1,7% de la production mondiale (**C.O.I., 2009**). Alors que, la production d'huile d'olive durant la campagne 2014-2015, atteignait 200 000 tonnes (**C.O.I., 2015**).

II-Procédés d'extraction d'huile d'olive

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile d'olive comme produit principal, deux coproduits: solide (grignon d'olive) et liquide (margines d'olive).

En Algérie, trois procédés d'extraction d'huile d'olive sont utilisés (Figure 1) :

1- Procédé discontinu classique ou traditionnel

Dans les unités d'extraction classique (traditionnelle), le processus d'extraction d'huile se déroule en plusieurs étapes :

- **Broyage** : Il est réalisé par des meules en pierre de granit qui tournent dans un bac dont le sol est également en pierre. Cette étape permet d'obtenir une pâte qui contient de la matière solide (débris de noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires, etc.) et des fluides (huile et eau de végétation, c'est-à-dire l'eau contenue dans les cellules de l'olive).

- **Séparation des phases** : La pâte produite est mise dans des scourtins (des disques en fibres végétales). Ensuite, une extraction de l'huile est réalisée par une pression issue des poids des scourtins, ce pressage génère alors un sous-produit solide appelé grignon d'olive (constitués par les résidus de la peau, de la pulpe, l'amandon et les fragments des noyaux d'olives) et liquide constitué d'huile et d'eau de végétation.

- Une séparation par décantation des phases liquides est effectuée. Cette séparation se fait à l'air libre dans des bacs en béton, en faïence ou en argile. Un sous-produit liquide est généré à la fin de cette étape, appelé margines séparé de l'huile par sédimentation après le pressage ou centrifugation (**Chouchene, 2010**).

2-Procédé discontinu ou système à super presse

Ce système commence par un broyage des olives suivi du malaxage et du pressage (la pâte est placée en couche de 2 cm d'épaisseur environ sur des disques en fibre de nylon, eux-mêmes empilés les uns sur les autres, l'ensemble est placé sur un piston de presse hydraulique qui permet de faire subir à la pâte une pression de l'ordre de 200 kg.cm^{-2}). Les sous-produits de cette opération sont le grignon brut et la phase liquide constituée de deux fluides. La séparation de ces deux fluides se fait par décantation. Les effluents d'huileries d'olive sont généralement rejetés dans le milieu naturel sans aucun traitement (**Chouchene, 2010**).

3- Procédé continu

Il existe deux types de procédé d'extraction continu :

a- Système d'extraction par centrifugation à trois phases

L'extraction de l'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec de l'eau chaude et malaxées pour former la pâte d'olive qui est ensuite diluée. 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.

b- Système d'extraction par centrifugation à deux phases

Les olives subissent les mêmes étapes que celles du système précédent à trois phases. Cependant, ce présent procédé d'extraction d'huile d'olive fonctionne avec un nouveau décanteur avec centrifugation à deux phases (huile et grignons d'olives humides) qui ne nécessite pas l'adjonction d'eau pour la séparation des phases huileuses et solides contenant des grignons et les margines.

Ce décanteur à deux phases permet l'obtention de rendements en huile légèrement plus élevés que ceux obtenus par le décanteur conventionnel à trois phases et le système de presse. En outre, il ne procède pas à l'augmentation du volume des margines. En effet, les grignons résultant de ce procédé contiennent 8 à 10% plus d'eau que ceux du procédé à trois phases

D'après le réseau des entreprises maghrébines pour l'environnement (2011), le système le plus répandu et qui occupe une place de choix en Algérie est celui d'extraction continue par centrifugation à trois phases.

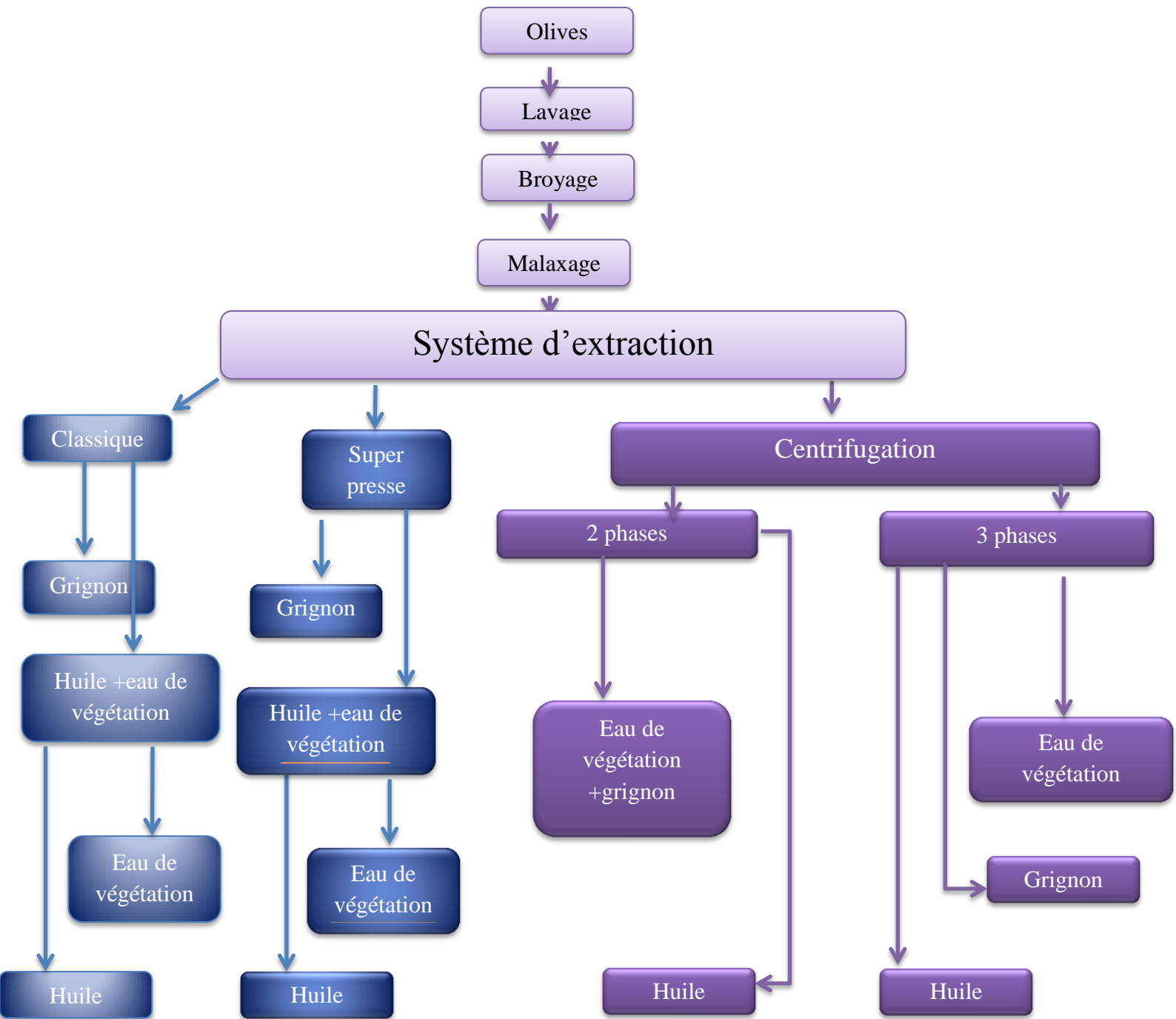


Figure 1 : Diagramme des procédés d'extraction de l'huile d'olive (Chouchene, 2010).

III- Grignon d'olive

Le grignon d'olive est un résidu solide de couleur brune, résultant du processus de production d'huile d'olive, par pressage mécanique des fruits d'oliviers, sans aucun traitement chimique. Il se compose de la coque du noyau réduit en morceaux, de la peau et de la pulpe de l'olive ; il contient encore une certaine quantité de matières grasses et une importante quantité d'eau variable selon la variété des olives et surtout du procédé d'extraction utilisé **(La Rubia-Garcia et al., 2012; Meziane, 2013; Ferhat et al., 2014)**.

En moyenne, la trituration de 100kg d'olive produit 20kg d'huile, selon les cas et en fonction des systèmes d'extraction. Il produit également les quantités suivantes :

- 40kg de grignon (taux d'humidité d'environ 50%) et plus de 40kg d'eau de végétation, si l'on utilise le système traditionnel **(Amirante et al., 1993)**.
- 55kg de grignon (taux d'humidité de 50%) et plus de 100kg d'eau de végétation, si l'on utilise le système continu à trois phases **(Tamburino et al., 1999)**.
- 70kg de grignon (avec une teneur en humidité de l'ordre de 60%) et jusqu'à 3,5kg de margine, si l'extraction est effectuée par les système en continu à deux phases **(Di-Giovacchino , 1996)**.

1-Types de grignon d'olive

Les grignons d'olives sont disponibles en quantités importantes dans de nombreux pays méditerranéens. En fonction du procédé d'extraction et l'équipement des huileries, il est possible de distinguer trois types de grignons :

-Les grignons bruts, issus des huileries utilisant le système traditionnel de presses hydrauliques et les scourtins, ses teneurs relativement élevés en eau (24%) et en huile (9%) favorisent son altération rapide lorsqu'ils sont laissés à l'air libre.

-les grignons épuisés, obtenus après traitement des grignons bruts aux solvants qui est généralement de l'hexane pour l'obtention d'huile utilisée en savonnerie.

-les grignons issus des huileries modernes utilisant le procédé d'extraction en chaîne continue ou super presses. **(El hachemi, 2010)**

2- Caractéristiques physiques

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 d'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 (Alibes *et al.*, 1984).

Le tableau I montre la composition physique des différents types de grignon.

Tableau I: Composition physique des différents types de grignon
(Nefzaoui, 1987)

Composition Produit	M.S(%)	Pourcentage(%) en matière sèche.			
		Matière grasse	Noyau sec	Amandon Sec	Mésocarpe +épicarpe
Olive	51,4	27	14,1	1,3	9
Grignon brut	75,9	9,1	42,1	3	21,2
Grignon épuisé	72,3	4,2	-	5,6	39,3
Grignon tamisé	95,5	18,6	-	11,1	80,2

- : test non effectué

3- Caractéristiques chimiques

La composition chimique du grignon d'olive varie dans de très larges limites. Elle dépend des facteurs intrinsèques du fruit (variété, stade de maturité), du procédé d'extraction de l'huile et de l'épuisement par solvant.

Les grignons d'olives sont assez riches en eau, en cellulose et en matière grasse. Ils sont caractérisés par leur faible teneur en protéines, en minéraux et en carbohydrates solubles.

La composition chimique est résumée dans le tableau suivant :

Tableau II: Composition chimique indicative des différents types de grignons (D.P.V., 2009).

Type de grignon	Matière Sèche	Matières minérales (%)	Matière Azotées Totales (%)	Cellulose brute (%)	Matières Grasses (%)
Grignon brut	75–80	3–5	5–10	35–50	8–15
Grignon gras partiellement dénoyauté	80–95	6–7	9–12	20–30	15–30
Grignon épuisé	85–90	7–10	8–10	35–40	4–6
Grignon épuisé partiellement dénoyauté	85–90	6–8	9–14	15–35	4–6

(%) : Pourcentage de la matière Sèche

a- Teneur en cellulose brute :

En moyenne, les grignons contiennent 10% d’hémicellulose, 15% de cellulose et 27% de lignine. Ces paramètres permettent de classer ce produit en un substrat hautement lignifié et à paroi de très faible digestibilité. La digestibilité de l’hémicellulose (50-60%) est presque le double de celle de la cellulose (26-43%).

L'analyse des fibres par la méthode de **Van Soest** et collaborateurs (1975) a révélé que les teneurs en constituants pariétaux de grignon d’olive : la lignine ADL, la cellulose (ADF – ADL), et l’hémicellulose (NDF – ADF) sont très élevées (**Mennane, 2010**).

b- Teneur en matières minérales (cendres)

Elle est normalement faible (3-5%), et l’excédent est généralement dû à la contamination au contact du sol (**Perrin, 1992**).

c-Teneur en matières grasses (lipides)

La teneur en matière grasse est relativement élevée et demeure tributaire du mode d’extraction de l’huile. Selon **Sansoucy, 1984**; elle représente de 8 à 15% de la matière sèche.

La matière grasse des grignons est très riche en acides gras en C16 et C18 insaturés et qui constituent 96% du total des acides gras. Les grignons sont très vulnérables à l'oxygène atmosphérique responsable en grande partie de l'altération des propriétés organoleptiques.

Les matières grasses du grignon brut peuvent constituer un apport d'énergie important, mais dans le cas des grignons épuisés, cet apport est limité (**Alibes *et al.*, 1984**).

d-Teneur en matières azotées totales

La teneur en matière azotée varie selon le type de grignon. Les teneurs moyennes sont de l'ordre de 10% de la matière sèche et la plus grande partie se trouve liée à l'endocarpe (**Nefzaoui, 1984**).

e-Polyphénols

Le grignon d'olive contient des composés phénoliques comptant parmi les facteurs inhibant la croissance des microorganismes. Ils proviennent de l'olive dont les composés phénoliques représentent 0,3% à 5%, mais également de la dégradation de la lignine en fonction du traitement subi (**Vasquez-Roncero *et al.*, 1974**).

L'utilisation de grignons d'olive comme aliment pour le bétail est limitée par sa nature faible en contenu protéique (protéines brutes) et par la présence de composés anti-nutritionnels tels que les phénols (**Brozzoli *et al.*, 2010**). Les effets nocifs de grignon d'olive sont dus en grande partie à leur contenu en polyphénols difficilement biodégradables (**Milanese *et al.*, 2014**). Ainsi, les tannins diminuent relativement la digestion de la matière sèche dans le rumen, par un mécanisme de rétrocontrôle, l'ingestion serait diminuée. Les tannins augmentent les niveaux de certaines hormones peptidiques connues pour diminuer l'ingestion, en particulier la cholécytokinine et la bombésine (**Martirani *et al.*, 1996**).

4 –Caractéristiques microbiologiques du grignon d'olive

Dans les effluents d'huileries d'olive, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer. Ce sont essentiellement des levures et des moisissures. Dans la plupart des cas, il y a absence de microorganismes pathogènes et ils ne posent alors aucun problème de point de vue sanitaire. Le pouvoir antimicrobien des effluents d'huileries d'olive est lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns ou catécholmélaniq (**Hamdi et Ellouz, 1993**). Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (**Ranalli, 1991**). Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en inhibant l'activité

des enzymes digestives et/ou en précipitant les protéines nutritionnelles (**Hattenschwiler et Vitousek, 2000**).

Les résultats de l'analyse microbiologique du grignon d'olive brut montre une charge importante en microorganismes d'intérêt technologique (Tableau III) (les levures et la flore lactique (**Mennane et al., 2010**)).

Tableau III : Résultat de l'analyse microbiologique de 16 échantillons de grignon d'olive brut (**Mennane et al., 2010**).

Type de micro-organismes	Flore Mésophile Aérobie Totale	Levures	Bactéries lactiques
Charge UFC/ml	2.10^4 à 1.10^7	2.10^4 à 3.10^6	10^5 à 7.10^6
Nombre des souches sélectionnées	-	12	11
Genre identifié	-	-	Leuconostoc (une)
			Pediococcus (deux)
			Lactobacillus (huit)

5- Différentes filières de valorisation des grignons d'olives

Les données de la littérature qui décrivent toutes les possibilités de valorisation des grignons sont nombreuses, à savoir :

- L'extraction de l'huile résiduelle par solvant : la première étape de valorisation des grignons bruts, quand ils ne sont pas destinés à la fermentation. Cette technique permet la récupération d'au moins 6% d'huile appelée souvent « huile de grignons » (**Yacoub, 1997**).
- Son utilisation comme fertilisant (**Topal et al., 2003**).
- La production de composés d'arômes d'intérêt dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et même pharmaceutique; en effet, la fermentation des grignons d'olives en milieu solide par des champignons thermophiles et filamenteux produit une panoplie de composés (**Kademi et al., 2003**). Tandis que la fermentation anaérobie des lisiers de

vaches avec des grignons d'olives produit du méthane (57 - 65% du biogaz produit). Ce méthane est utilisé comme une source d'énergie pour le chauffage de l'eau (direct) et en production d'électricité à usage domestique (indirect) (**Hammad et al., 1999**).

- Le traitement des eaux usées et de margine : La biosorption des métaux lourds et de phénols par les grignons d'olives est une technologie alternative aux méthodes conventionnelles qui sont très chères et peu efficaces (**Stasinakis et al., 2008**).
- L'obtention d'un matériau de construction léger avec de bonnes caractéristiques d'isolation : Le grignon peut être utilisé comme additif de formation de pores dans la fabrication de briques d'argile (**La Rubia-García, 2012**).
- L'extraction de peptides bioactifs (**Esteve et al., 2015**).
- les grignons peuvent être transformés par fermentation, pour produire une biomasse probiotique (**Mennane et al., 2010**).
- Le grignon d'olive pourrait être appliqué non seulement comme un agent de sorption physique d'huile, mais aussi à des fins de bioaugmentation comme source biologique pour les bactéries hydrocarbonoclastiques (**Dashti et al., 2015**).

Enfin ce sous-produit de l'industrie oléicole peut être utilisé en tant qu'aliment pour bétail. Les grignons épuisés tamisés (sans noyaux), sont de conservation facile et ont une meilleure valeur alimentaire. Ils constituent des réserves alimentaires disponibles pendant les périodes de disette (**Nefzaoui, 1984 ; Perraud-Gaime et al., 2010**).

6-Valeur alimentaire des grignons d'olive

Digestibilité

La digestibilité d'un aliment est le pourcentage de ses constituants absorbés dans le tube digestif de l'animal en cours de la digestion sous-l'effet des sucs digestifs et de l'attaque de la population microbienne.

D'une manière générale : la digestibilité de la matière sèche et de la matière organique reste faible (20 à 50%) quel que soit le type de grignons, les matières grasses ont toujours une digestibilité élevée (60 à 90%), les matières azotées ont en moyenne une faible digestibilité de l'ordre de 20 à 25% mais très variable et la cellulose brute a une digestibilité estimée variant de 0 à 40%.

Ingestion

On appelle ingestibilité d'un fourrage la qualité de matière sèche qui peut être ingérée lorsqu'il est offert à volonté. Elle est déterminée par sa dépense énergétique; mais chez les

ruminants, elle peut être limitée par la place disponible dans le rumen et l'effet d'encombrement qu'y exerce l'aliment (**Fonty et al., 1995**).

Dégradabilité

Très hautement ligno-cellulosiques, les grignons d'olive ont, selon **Nefzaoui et al.(1983)**, une dégradabilité très lente et les valeurs maximales atteintes sont très modestes (32% de la MS est dégradée après une durée de séjour de 72 h dans le rumen pour le grignon tamisé épuisé). La dégradabilité des protéines est aussi très faible, et cela peut s'expliquer par le fait que 75 à 90% de l'azote est lié à la fraction ligno-cellulosique entraînant ainsi une très faible solubilité de l'azote qui n'est que de 2,3% (N soluble/ % N total) pour le grignon brut, et de l'ordre de 0,2 à 0,4% pour les grignons tamisés.

De nombreuses expériences ont rapporté une “mauvaise utilisation digestive” des grignons d'olive. Celle-ci pourrait avoir pour cause une réduction de l'activité de la flore du rumen qui (mesurée par le dégagement gazeux) peut être réduite de 40% suite à l'ingestion de grignon brut (**Theriez et Boule, 1970**).

Trois hypothèses ont été mises au point sur cette mauvaise digestibilité :

Influence des matières grasses

Surtout pour les grignons non épuisés, les concentrations élevées en acides gras libres dans le rumen peuvent altérer la digestion et l'appétit.

Facteurs inhibiteurs

Ceux-ci pourraient être des composés simples de type phénols qui inhiberaient les fermentations ou plus complexes de type tannins qui insolubiliseraient les protéines de la ration ou du grignon lui-même (**Theriez et Boule, 1970**).

Les analyses effectuées sur grignons par **Nefzaoui en 1980** ont révélé des taux de tannins inférieurs à 1%, insuffisants pour exercer une influence négative sur la microflore du rumen et la digestibilité des protéines et des taux de polyphénols compris entre 0,15 et 0,75% de la matière sèche, insuffisants pour inhiber les fermentations.

Influence de la lignine

Les grignons d'olive sont particulièrement riches en lignine. En effet, lorsque les grignons ont été traités aux alcalis, leur digestibilité in-vitro a été presque quadruplée (**Nefzaoui, 1983**).

7- Possibilités d'amélioration de la valeur alimentaire des grignons:

Plusieurs travaux ont été effectués sur l'amélioration du grignon d'olive, à savoir : traitement à la soude (Nefzaoui *et al.*, 1981), ensilage avec des alcalis (Nefzaoui *et al.*, 1982), traitement à l'ammoniac (Nefzaoui *et al.*, 1983), ensilage de grignons tamisés avec des fientes de volaille (Nefzaoui et Deswysen, 1982), traitement au Na_2CO_3 (Vaccarino *et al.*, 1982), Traitement mécanique (Nefzaoui *et al.*, 1983) et enfin, traitement biologique ou cette étude est faite par Salhi, 2004 ; Saradouni *et al.*, 1999 ; Neifar *et al.*, 2013 ; Abid *et al.*, 2014...

IV-Composition de la lignocellulose

La lignocellulose, est constituée de trois composants majeurs: la cellulose (polysaccharide linéaire de glucose), les hémicelluloses (polysaccharides branchés de sucres à 5 et 6 atomes de carbone) et la lignine (un polymère complexe aromatique) (Figure 2).

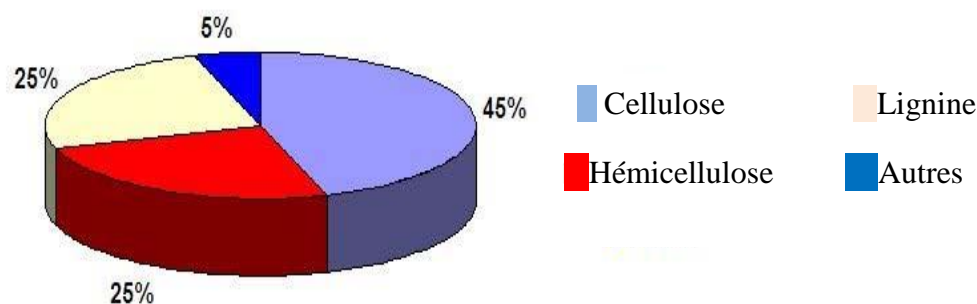


Figure 2 : Composition typique de la lignocellulose (Wertz, 2010).

1- Cellulose

La cellulose est un polymère linéaire, constitué d'unités de D-glucopyranose reliées par des liaisons β (1-4) (Figure 3). Elle présente une configuration chaise, permettant aux groupements hydroxyles de se trouver en position équatoriale avec une stabilité du polymère. Le motif de répétition est le dimère cellobiose (Sugiyama *et al.*1991). L'orientation de ses liaisons ainsi que les liaisons hydrogènes intermoléculaires rendent le polymère rigide et difficile à se déstructurer (Delmer et Amor, 1995).

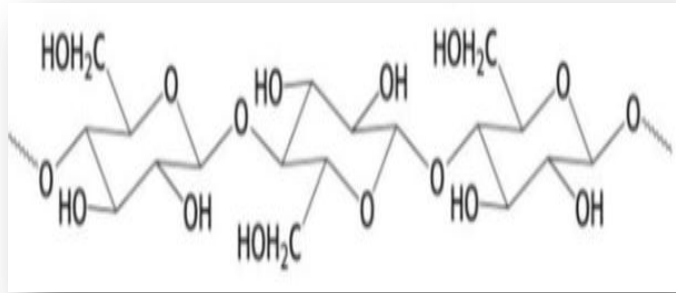


Figure 3 : Structure chimique partielle de la cellulose (**Eriksson et Wood, 1985**)

Cette chaîne de cellulose est constituée de deux types de structures (**Baumgartier, 1949**) :

- Des structures cristallines de chaînes associées, par des liaisons hydrogènes difficiles à rompre
- Des structures amorphes, sans cohésion et plus faciles à hydrolyser.

2- Hémicellulose

Les hémicelluloses sont des hétéro ou homopolymère composés d'unités pentoses(D-xylose, L-arabinose) et d'unité hexoses (D- glucose, D-galactose, D-mannose) liées par des liaisons glucosidiques de types $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 1 \rightarrow 6$ et $\beta 1 \rightarrow 4$. Elle se localise au niveau de la paroi primaire des cellules végétales où elle s'insère avec la cellulose, la pectine et les glycoprotéines, elle se retrouve également dans les parois secondaires, chez les cellules âgées (**Mc Cann et Roberts, 1991**). C'est un hétéropolysaccharide avec un degré de polymérisation relativement faible de 80 à 200 (**Palmvist et al., 2000; Hamelinck et al., 2005**).

Les xylanes sont les hémicelluloses les plus abondantes dans les parois cellulaires secondaires des végétaux (**Saha et al., 2002**), ils peuvent constituer plus de 30% de la matière sèche (**Joseleau et al., 1992**).

3-Lignine

La lignine représente 10-25% de la biomasse lignocellulosique sèche. C'est un polymère aromatique tridimensionnel complexe, composé d'unités p-hydroxyphénylpropanoïdes liées par des liaisons C-C et C-O-C (Figure 4). C'est une substance polyphénolique (formé d'alcools) qui s'incruste dans la paroi cellulaire pour

V-Biodégradation de la lignocellulose

1- Biodégradation de la cellulose

1-a-Les cellulases

Les cellulases sont des enzymes extracellulaires inductibles synthétisés par les microorganismes durant leur croissance sur le matériel cellulosique (**Kim et al., 2009 ; Liu et al., 2006**), elles sont les seules enzymes qui peuvent hydrolyser les liaisons β -(1, 4) des polysaccharides de cellulose en glucose. Elles donnent un grand rendement de saccharification (90 - 98 %) et leur utilisation peuvent produire des effluents favorables pour l'environnement (**Aftab et Vermette, 2008**).

Elles sont classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres (**Ballerini et Alazard-Toux, 2006**). Toutes ces enzymes travaillent synergiquement pour hydrolyser la cellulose (**Zhou et al., 2009**), on trouve: les endoglucanases (EG), appelées aussi 1,4- β -D-glucanases ou carboxyméthylcellulases (sont capables d'hydrolyser au hasard les liaisons internes β (1-4) de la chaîne cellulosique au niveau des régions amorphes, en créant de nouvelles extrémités non réductrices qui deviennent à leur tour des sites réactifs pour les cellobiohydrolases); les exoglucanases également connues sous le nom de cellobiohydrolases (sont des enzymes qui attaquent les deux extrémités de chaque chaîne courte de polysaccharide de la région cristalline de la cellulose, le produit final serait encore hydrolysé en cellobiose (un dimère de glucose)) et les β -glucosidases appelées également 1,4- β -D-glucanases ou β -D-glucoside glucohydrolases (hydrolysent la liaison β - glucosidique du cellobiose et libèrent deux molécules de glucose) (**Hasper et al., 2002**).

1-b-Applications industrielles des cellulases

L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ses vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui, une fois fermenté, permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques d'où l'importance écologique et industrielle considérable des cellulases (**Receveur et al., 2002**).

2-Bidégradation de l'hémicellulose

Les enzymes qui dégradent l'hémicellulose incluent : les enzymes dégradant la chaîne principale dont les endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8), jouent le rôle principal par l'initiation de la conversion du xylane en xylooligosaccharides (**Biely et al., 1985**), puis les β -xylosidases

(EC 3.2.1.37) viennent compléter l'action de celle-ci en dégradant cet oligosaccharide en résidus de xylose et les enzymes dites débranchantes qui hydrolysent les ramifications du polymère, on citera les α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.2.55), α -D-glucuronosidases (EC 3.2.1.139), acétyl esterases (EC 3.1.1.6), ferulolyse esterase (EC 3.1.12) (**Kluepfel et al., 1986**).

2-a-Les xylanases

Probablement le groupe d'hémicellulase le plus largement étudié chez les bactéries et les mycètes; ce sont des glycosidases ou des glycosides hydrolases (EC.3.2.1.8) qui hydrolysent le xylane.

La majorité des endoxylanases produites par les actinomycètes, particulièrement le genre *Streptomyces*, possèdent des poids moléculaires qui varient de 15 à 59 kDa, des activités optimales à des pH variant de 4,0 à 8,6 et des températures qui oscillent autour de 50°C et 80°C (**Corral et Villaseñor-Ortega, 2006**).

Les différents sites de coupure des xylanases sont montrés dans la figure 5.

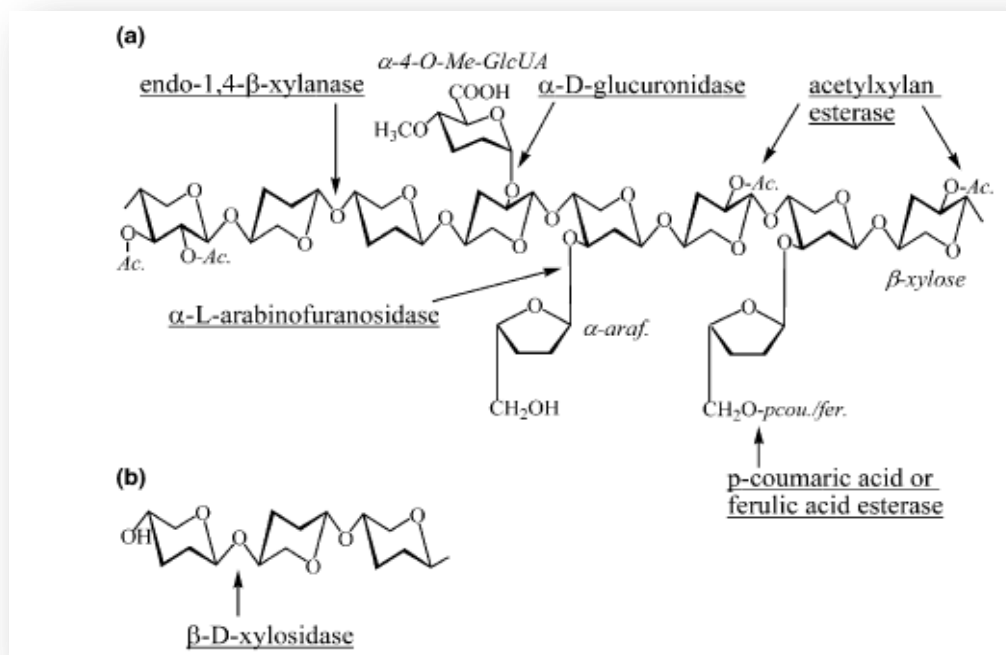


Figure 5 : Structure du xylane et les différents sites de coupures des xylanases (**Sunna et al., 1998**).

(a) sites de coupure du xylane par une enzyme xylanolytique. (b) Hydrolyse du xylo-oligosaccharide par la β -xylosidase.

2-b-Applications des xylanases

Les applications des xylanases dans différentes industries se sont largement diversifiées, les plus répondues sont : Industrie papetière (Ali et Sreerkrishnan, 2001), industrie du textile (Dhiman *et al.*, 2008), production d'éthanol (Girio *et al.*, 2010), clarification des jus de fruits et des vins (Biely, 1985), amélioration de la biodigestibilité, en diminuant la viscosité, et augmentation de la valeur nutritionnelle des aliments destinés à l'alimentation animale (Bedford et Classen, 1992)... etc.

3-Biodégradation de la lignine

Les enzymes les plus remarquables dans le processus de dégradation de la lignine sont la lignine peroxydase (LiP) et la peroxydase Mn-dépendante (MnP) ainsi que les laccases et oxydases produisant H₂O₂ (Hammel, 1997).

3-a-Les laccases

Les laccases (E.C 1.10.3.2) sont des enzymes à cuivre (metalloenzyme) qui oxydent les polyphénols, les amines aromatiques et d'autres substrats riches en électrons, en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, cette réaction génère un radical libre. Les laccases sont présentes dans les plantes, chez de nombreux champignons ainsi, chez quelques bactéries(Claus, 2004). .

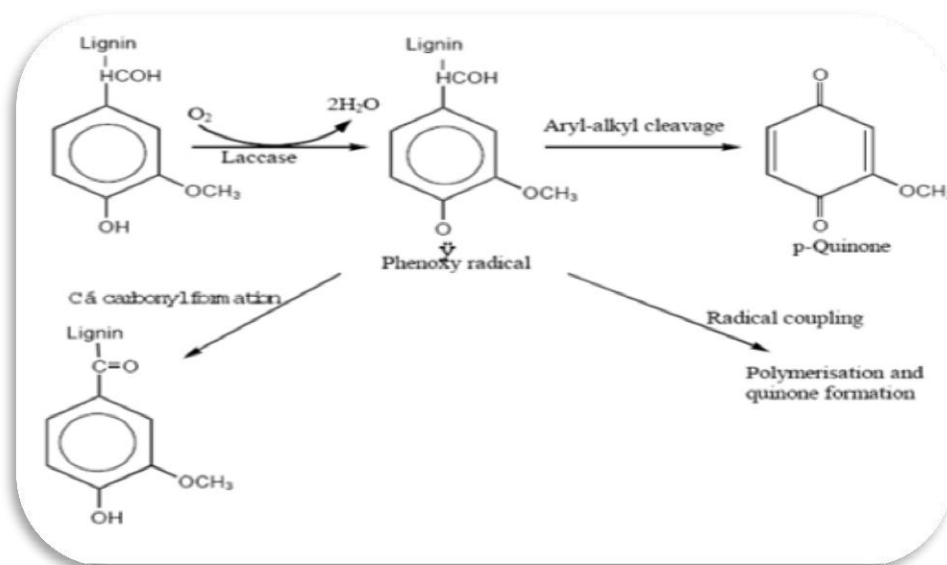


Figure 6 : Oxydation des sous-unités phénoliques de la lignine par la laccase (Archibald *et al.*, 1998)

3-b-Applications des laccases

les laccases sont importantes car elles oxydent à la fois les substrats toxiques et non toxiques (**Shraddha et al., 2011**). Elles sont utilisées dans l'industrie de décoloration (**Roriz et al., 2009 ; Domínguez et al., 2005 ; Romero et al., 2006**), la bioremédiation et la biodégradation (**Riva, 2006 ; Bastos et al., 2009**), l'industrie papetière (**Kunamneni et al., 2007**), l'industrie agroalimentaire (**Couto et al., 2006 ; Madhavi et Lele, 2009 ; Ribeiro et al., 2010**). Elles peuvent être utilisées en tant que biocatalyseur pour la synthèse de substances organiques, dans la conception de biocarburant cellulaire (**Kunamneni et al., 2007**) et elles sont également utilisées dans la synthèse de nanoparticules d'or (**El-Batal et al., 2015**).

V-Les actinomycètes

1-Généralités

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées, à coloration de Gram positive et à GC% élevé (supérieur 55 %) (**Nanjwad et al., 2010**). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable, elle a des formes peu évoluées (*Mycobacterium* avec un GC% de 50), des formes très évoluées (*Streptomyces*) qui forment un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (**Smaoui, 2010**).

Les actinomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons primitifs, du fait de leur mycélium (souvent à la fois aérien et pénétrant dans le substrat nutritif) et de la fructification par sporanges libérant des spores chez un nombre d'entre eux (**Hasley et Leclerc, 1993 ; Horinouchi, 2002**).

Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les rangent parmi le règne des procaryotes et du Phylum XXVI des Actinobacteria (phyl.nov.) (**Bergey's manual, 2012**). Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries (**Mariat et Sebald, 1990**). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitage par des bactériophages, leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens) ne permettent pas de les classer parmi les mycètes (**Hasley et Leclerc, 1993**).

2-Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols. Ils ont été trouvés également dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans des divers substrats.

Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint, d'après **Goodfellow et Williams en 1983**, généralement les 10^6 germes par gramme de sol séché.

Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Goodfellow et Williams 1983**).

La majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau est très basse (Davies et Williams, 1970 ; Goodfellow et Williams, 1983).

3- Physiologie et métabolisme des actinomycètes

a- Physiologie

Au niveau du sol, les actinomycètes représentent l'une des principales communautés microbiennes. Leur présence est significativement influencée par les conditions environnantes : l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, les faibles taux d'humidité, la nature et l'abondance de la matière organique et la végétation du sol (Sykes et Skinner, 1973 ; Basilio *et al.*, 2003).

b-Métabolisme

En général, les actinomycètes sont des bactéries chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebald, 1990).

4-Critères actuels d'identification

a- Critères morphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux. Parmi ces caractères culturels importants :

La production d'un mycélium aérien (MA) ou non (ex *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus*) :

- La présence ou non de mycélium du substrat (MS) et la couleur du MA et du MS ;
- La production et la couleur de pigments diffusibles dans le milieu de culture ;
- La fragmentation ou non des mycélia ;
- La présence des spores (forme, mobilité, surface, disposition sur les hyphes, nombre) ;
- L'origine exogène ou endogène des spores (sporangies, des porophores, des sclérotés ou de synnemata).

b-Critères chimiotaxonomiques

La chimiotaxonomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de grouper et de distinguer des microorganismes. Ces déterminations chimiques se montrent surtout efficaces pour délimiter des groupes et des genres. (**O'Donnell *et al.*, 1982**).

Les acides aminés pariétaux taxonomiquement importants sont : l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous deux formes isomériques, LL ou DL (*méso*), et la glycine qui est présente ou absente (**Lechevalier *et Lechevalier*, 1970a**). Cependant, chez quelques genres d'actinomycètes, le DAP peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (DAB) (**Becker *et al.*, 1965 ; Yamagushi, 1965**).

L'étude de la composition des parois cellulaires en glucides permet la séparation des actinomycètes en différents groupes. Les sucres diagnostiqués d'après **Lechevalier *et Lechevalier*, (1970)** sont principalement les couples arabinose – galactose, arabinose – xylose, rhamnose galactose, ainsi que le madurose (ou 3-0-méthylgalactose).

Chez certains genres d'actinomycètes, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. Pour cette raison, il est indispensable d'utiliser d'autres critères chimiques, essentiels pour la reconnaissance des genres, notamment la composition en lipides cellulaires. Les plus importants chez les actinomycètes sont les phospholipides, leur analyse a permis de distinguer plusieurs genres ayant entre eux même morphologie et le même type pariétal (**Lechevalier *et al.*, 1977**). Les acides mycoliques, les ménaquinones et les acides gras ont permis de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides et ainsi de distinguer de plusieurs genres entre eux (**Lechevalier *et al.*, 1986**).

c-Critères physiologiques

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces se base sur les caractères physiologiques. Ces derniers consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc...) (**Athalye *et al.*, 1985**).

Ces caractères physiologiques discriminants permettent de différencier les espèces appartenant à un même genre. Cependant, ils ne sont pas suffisants pour l'identification des espèces, car ils doivent être complétés par des études moléculaires (**Goodfellow, 1971**).

d- Critères moléculaires

Les analyses moléculaires sont très importantes pour retracer les parentés phylogénétiques des souches et pour la détermination des espèces. Ces analyses ont permis de regrouper ou de séparer ces espèces entre elles, et de proposer la création de nouvelles espèces. Les principales techniques utilisées sont, le séquençage de l'ADN ribosomique 16S (**Stackebrandt et al., 1983**) l'hybridation ADN-ADN (**Euzeby, 2002**), et le pourcentage en guanine-cytosine.

VI- Le genre *Streptomyces*

1-Classification et caractéristiques générales

Le genre *Streptomyces* appartient au phylum des Actinobacteria (phyl. nov.), à la classe des Actinobacteria, à l'ordre des Streptomycetales (nov. ord.) et à la famille des Streptomycetaceae. Il est représenté par un grand nombre d'espèces (**Bergey's manual, 2012**). C'est le genre d'actinomycète le plus étudié en termes de métabolisme, du fait de son intérêt biotechnologique vu sa production potentiel en enzymes.

Les *Streptomyces* donnent lieu à une coloration GRAM+ et sont des bactéries immobiles, aérobies strictes, chimio-hétérotrophes qui ont la particularité d'être sporulantes (**Brock et Madigan, 1979**), possèdent un fort taux en acides nucléiques guanine et cytosine (66%-78%) (**Bergey's manual, 2012**). Ils se caractérisent par un chromosome linéaire sur lequel les gènes sont sujet à une grande instabilité où de nombreuses régions d'amplification et de délétion ont été découvertes (**Dary et al., 1992**). Leur niche écologique naturelle est principalement tellurique, cependant quelques espèces ont été observées en milieu aquatique. De part leurs hyphes ramifiés et un équipement enzymatique hydrolytique extracellulaire important (cellulases, amylases, protéases et lipases), ils sont relativement bien adaptés à l'utilisation des débris organiques et à la structure interstitielle du sol. En outre, certains dégradent activement les pesticides (**Benimeli et al., 2003**), d'autres sont capables de dégrader l'amidon (**Kuo et Hartman, 1966**), ou la cellulose par *Streptomyces cellulolyticus* (**Li, 1997**) et le xylane par *Streptomyces mexicanus* (**Petrosyan et al., 2003**).

Dans certaines régions des colonies, des excréments massives de ces enzymes ont pu être mises en évidence. Le transport des nutriments a lieu dans certains cas de l'extrémité des hyphes vers le cœur de la colonie (**Chater et Hopwood, 1989**).

2- Cycle de croissance sur milieu solide

Le cycle biologique de *Streptomyces* est comparable à celui de nombreux micromycètes eucaryotes. La germination d'une spore à partir de laquelle croît un tube germinatif constitue le point de départ de ce cycle. Depuis ce dernier se développe un réseau constitué d'hyphes qui se ramifient, le résultat étant la formation d'un mycélium primaire (basal) qui s'étend en direction radiale sur le milieu substrat et en profondeur de ce dernier. A partir de ce mycélium s'élève par croissance apicale un mycélium secondaire aérien dont les extrémités s'enroulent pour former des spirales. Il s'ensuit un cloisonnement des hyphes aériens et un épaississement des cloisons pour délimiter finalement des spores haploïdes. Ces formes cellulaires contribuent à la propagation de l'espèce et permettent la survie dans des conditions défavorables à la croissance végétative (**Chater et Merrick, 1979**).

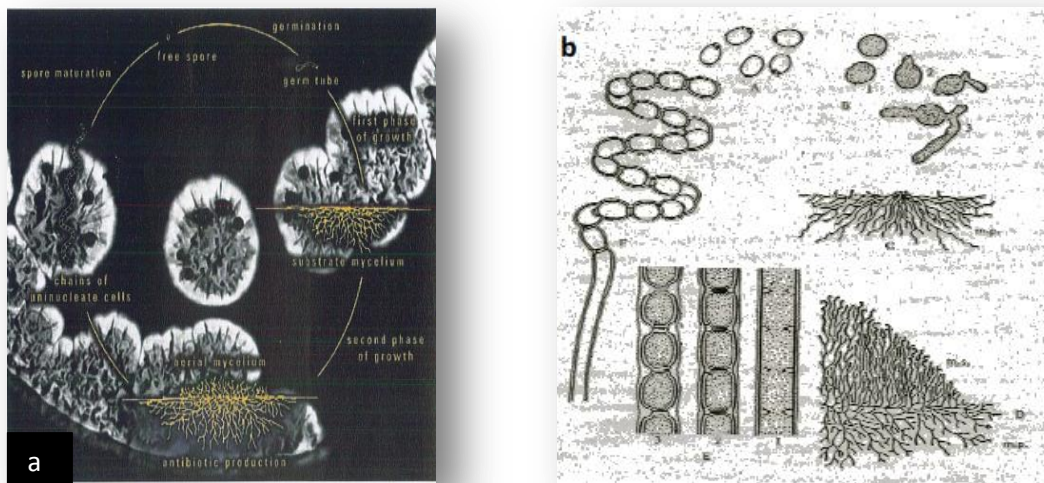


Figure 7 :a : Cycle de Streptomyces sur milieu solide. b : Représentation schématique du cycle de vie de Streptomyces (Larpent et Sanglier, 1989)

3- Cycle de croissance sur milieu liquide

En conditions de culture immergée, le genre *Streptomyces* se présente sous diverses morphologies: filaments mycéliens libres et plus ou moins ramifiés, enchevêtrements de filaments et pelotes de mycélium d'aspects divers (**Whitaker, 1992**).

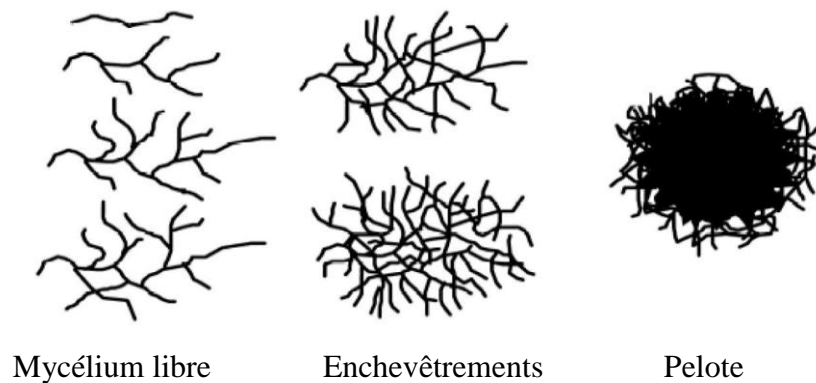


Figure 8: Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (**Amanullah et al., 2000**).

Le type de morphologie est fonction de nombre de paramètres tels que la charge de l'inoculum, l'oxygénation du milieu, le milieu de culture, le type de récipient de culture, ... etc. La sporulation est un phénomène plus rarement observé en milieu liquide, mais on note cependant des cas d'induction de sporulation chez *Streptomyces griseus* dans des conditions nutritionnelles carencées en phosphore ou en azote (**Kendrick et Ensign, 1983**).

4- Production de biomolécules d'intérêt biotechnologique et thérapeutique

Le genre *Streptomyces* a révélé un potentiel biotechnologique intéressant pour la production d'enzymes (par exemple la xylose isomérase issue d'un *Streptomyces* thermophile (Hodgson (2000)) ou la biodégradation de biopolymères (par exemple le chitosane (**Fukamizo et Brzezinski, 1997**) ou de polluants organiques (par exemple l'acide phénylacétique (**Niraula et al., 2010**)).

De plus, *Streptomyces* est la source la plus importante de métabolites secondaires présentant une activité biologique d'intérêt pour la santé humaine et animale : antibactérienne (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), antifongique (nystatine), antivirale (tunicamycine), antiparasitaire (ivermectine), immunosuppressive (rapamycine), antitumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur d'enzyme (acide clavulanique) (**Demain, 2000**). En particulier, ce genre est remarquable pour le nombre et la diversité chimique des antibiotiques qu'il produit (**Watve et al., 2001**).

Ce présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie appliquée (LMA), de l'Université A.MIRA de la wilaya de Bejaia.

I- Le substrat (Grignon d'olive)

Le matériel végétal est représenté par du grignon d'olive de plusieurs variétés (saison 2012/2013), issu d'une extraction à système continu au niveau de la wilaya de Tizi Ouazou (Algérie). Celui-ci, a été séché à une température ambiante pendant trois semaines, puis tamisé à travers un tamis de 1mm de diamètre (Figure 9).

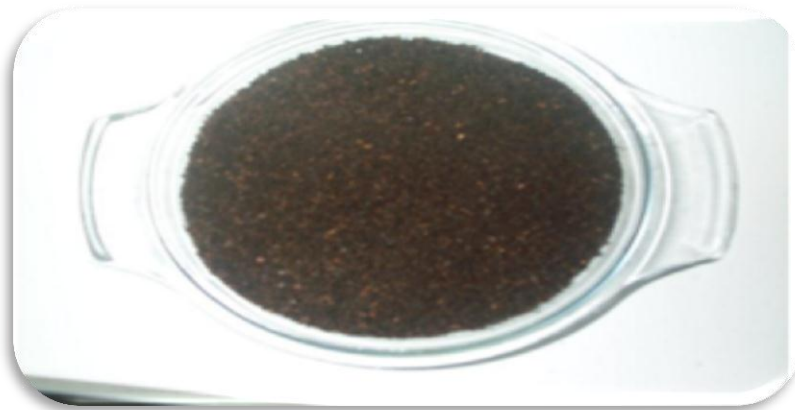


Figure 9 : Grignon d'olive tamisé

II-Le microorganisme (*Streptomyces sp. S₁M₃I*)

La souche utilisée dans le présent travail fait partie de la collection de laboratoire de microbiologie appliquée (LMA), dans le cadre d'une thèse de doctorat de M^{lle} MEDOUNI Lamia, elle est isolée à partir d'un sol forestier la région de la wilaya de Bejaia. Elle a été identifiée comme étant un actinomycète appartenant au genre *Streptomyces*. sous le code *Streptomyces sp. S₁M₃I*. Elle est caractérisée par une chaîne de spores droites à flexueuses, elle pousse à une température optimale de 40°C et à un pH de 7,4.

La durée d'incubation sur milieu solide est de 5jours, alors que sur milieu liquide elle est de 7 jours.

III-Fermentation submergée à base de grignon d'olive

Selon la méthode de **El-Ahmady El-Naggar et al. (2011)**, Six disques d'agar de 9 mm de diamètre obtenus à partir d'une culture sur milieu de conservation (préculture (annexe I)) de six jours de la souche *Streptomyces sp. S1M₃I* sont inoculés dans 100 ml de milieu submergé à base de grignon d'olive (composition donnée en annexe I) dans des erlenmeyers de 500ml (Figure 10), bouchés avec du coton cardé pour permettre à la fois l'aération et la stérilité, puis incubés à 40°C pour une période maximale de 30 jours sous agitation (150 rpm).

Après fermentation, les erlenmeyers sont récupérés, une petite quantité est prélevée dans des falcons et destinée à une centrifugation à froid (4°C) à une vitesse de 5000rpm pendant 15min.

Les surnageants subiront un dosage des activités enzymatiques (laccasique, xylanolytique, cellulosique), Alors que les culots (grignon d'olive) seront soumis au « rota vapor » jusqu'à évaporation totale, puis la récupération du grignon va avoir lieu. Celui-là sera destiné au dosage de la cellulose, de l'hémicellulose, de la lignine, des polyphénols, des protéines, des sucres totaux et des lipides.



Figure 10 : Disques d'agar obtenus à partir d'une culture de *Streptomyces sp. S1M₃I* sur milieu de conservation.

IV-Méthodes analytiques

1-Suivi macro et microscopique de la culture

L'observation macroscopique de la souche *Streptomyces sp.* S₁M₃I dans le milieu submergé à base de grignon d'olive, ainsi que l'observation microscopique à l'objectif X40 après coloration au bleu de méthylène, ont été réalisés chaque jour d'incubation.

2- Mesure du pH

La mesure des valeurs du pH du substrat fermenté est effectuée à l'aide d'un pH-mètre HANNA.

L'étalonnage de l'appareil a été obtenu avec des solutions tampon pH 4,0 - 7,0 et 10,0 (HACH).

3-Dosage des activités enzymatiques

3-a-Activité xylanase

L'activité xylanasiq est déterminée en présence du xylane de bouleau (Fluka) préparé dans une solution tampon. Le xylane de Bouleau est mis en suspension à raison de 1% (m/v) dans du tampon citrate (50 mM, pH 5,5). Le mélange réactionnel est composé de 250 µl d'extrait brut auxquels sont ajoutés 250 µl de xylane à 1% à pH 5,5. Ce mélange est chauffé à 50°C pendant 10 mn (**Tuncer et al., 1999**).

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de **Miller (1959)**. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1,5 ml d'une solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe II), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 mn.

Le témoin correspond à la solution de xylane incubée sans l'extrait brut à 50°C pendant 10mn, puis on ajoute 1,5 ml de DNS et 0,1 ml de l'extrait brut.

Après refroidissement dans la glace, la lecture des absorbances est effectuée à 540 nm (Shimadzu UVmin-1240V).

Une unité d'activité xylanase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une µmole de sucres réducteurs (équivalent en xylose), par minute, dans un ml de l'extrait brut et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus. (1U= 1 µmole de sucres réducteurs libérés par min).

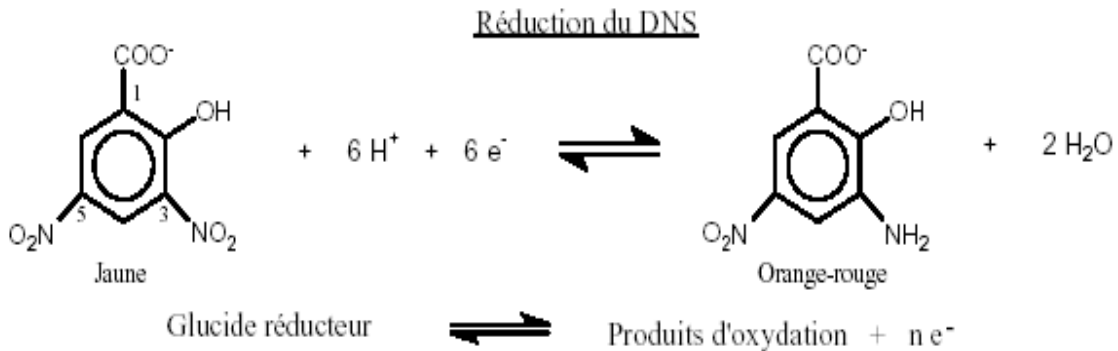


Figure 11 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (**Bailey *et al.*, 1992**).

La courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de xylose à des concentrations respectives de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mg/ml (annexe III).

L'activité xylanase est calculée selon **Bailey *et al.*, 1992** :

$$\text{Activité xylanase (U/ml)} = \frac{(C_x - C_t)D}{t}$$

Ou :

C_x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (µmole/ml).

C_t : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (µmole/ml).

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

3-b-Activité CMC_{Case}

Le mélange réactionnel, constitué de 0,25 ml de carboxyméthylcellulose (Alfa aesar) 1% (p/v) dans un tampon citrate de sodium (50 mM, pH 5,5) et de 0,25 ml du filtrat de culture, a été incubé à 50°C pendant 10 min. Après incubation, l'activité enzymatique a été stoppée par addition de 1,5ml de réactif DNS, les tubes ont été placés dans un bain d'eau bouillante pendant 5 min, puis refroidi dans la glace (**El-Ahmady El-Naggar et Abdelwahed, 2012**).

Le témoin correspond à la solution de cellulose incubée sans l'extrait brut à 50°C pendant 10 mn, puis on ajoute 1.5 ml de DNS et 1 ml de l'extrait brut.

Après refroidissement dans la glace, la lecture des absorbances est effectuée à 540 nm (spectrophotomètre Shimadzu UVmin-1240V).

Une unité d'activité cellulasique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une μ mole de sucre réducteur (équivalent en glucose), par minute, par un ml d'extrait brut ou de l'enzyme pure, et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus

La courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de glucose à des concentrations respectives de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mg/ml (annexe III).

L'activité CMCCase est calculée comme suit :

$$\text{Activité CMCCase (U/ml)} = \frac{(C_x - C_t)D}{t}$$

Ou :

C_x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (μ mole/ml).

C_t : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (μ mole/ml).

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

3-c- Activité laccase

L'activité des laccases a été déterminée selon la méthode de **Criquet et al.(1999)**. Le milieu réactionnel est constitué de 250 μ l d'extrait enzymatique, 750 μ l de tampon citrate de sodium (50mM, pH 5,5) et de 10 μ L de syringaldazine (sigma) (6 mg/ml de méthanol). L'oxydation de syringaldazine en quinone a été déterminée en mesurant la densité optique à 525 nm ($\epsilon = 65\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). L'activité des laccases a été exprimée en μ mole de quinone formée par minute (U) et par ml.

La pente de la courbe donne la vitesse initiale de disparition du substrat, exprimée en U/ml d'extrait.

4-Détermination de la teneur en constituants pariétaux

Les méthodes d'analyses des fibres sont basées sur des traitements (chimiques) de l'échantillon afin de solubiliser les composants non fibreux et à la fin, l'obtention d'un résidu qui détermine la teneur en fibre.

La méthode utilisée pour déterminer la teneur en fibres dans le grignon d'olive est celle de **Van-soest *et al.* (1975)** qui est une méthode qui permet la détermination des trois fractions de fibres insolubles (hémicellulose, cellulose et lignine) en utilisant des détergents.

4-a-Détermination de la fraction insoluble dans un réactif détergent neutre : le NDF

(Neutral detergent fiber)

Principe

Il s'agit d'un résidu obtenu après un traitement par une solution neutre (pH7), elle inclue la cellulose, l'hémicellulose, et la lignine ainsi que les cendres et les matières azotées. A la présence de la solution détergente tout ce qui n'est pas fibres est solubilisé (hydrates de carbone solubles, protéines, lipides, hémicelluloses, substances minérales solubles).

Méthode

Après broyage de grignon d'olive, le séchage et la peser de 1 g de cet échantillon, avec une précision de 1 mg, sont réalisés. Le poids de la prise d'essai est (P_0).

Une quantité de 100 ml de solution de détergent neutre (annexe II) est ajoutée à 1g d'échantillon avec 0,5 g de sulfite de sodium anhydre (Na_2SO_3); après Chauffage à ébullition sous reflux pendant 60 minutes, la filtration est réalisée dans des verres frittés N°3, suivi par des lavages avec de l'eau bouillante (3fois) et de l'acétone froid (2fois). Ensuite, un séchage pendant 8 heures à 105°C est réalisé, suivi d'un refroidissement dans un dessiccateur.

Le poids après étuvage est pris en considération (P_2).

Le pourcentage des NDF (Neutral detergent fiber) est calculé comme suit:

$$\text{NDF\%} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_0} \times 100$$

P₀: prise d'essai initial.

P₁: poids du verre fritté vide, après étuvage.

P₂: poids du verre fritté et d grignon d'olive après étuvage.

4-b-Détermination de la fraction insoluble dans un réactif détergent acide : l'ADF

(acid detergent fiber)

Principe

Cette fraction représente le résidu insoluble dans une solution détergente acide, elle contient la lignine et la cellulose.

Méthode

Après broyage de grignon d'olive, le séchage et la peser de 1 g de cet échantillon, avec une précision de 1 mg, sont réalisés. Le poids de la prise d'essai est (P₀).

Dans ce cas, une quantité de 100 ml de solution de détergent acide (annexe II) est ajoutée à 1g d'échantillon; après Chauffage à ébullition sous reflux pendant 60 minutes, la filtration est réalisée dans des verres frittés N°3, suivi par des lavages avec de l'eau bouillante (3fois) et de l'acétone froid (2fois). Ensuite, un séchage pendant 8 heures à 105°C est réalisé, suivi d'un refroidissement dans un dessiccateur. Le poids après étuvage est pris en considération (P₃).

Le pourcentage des ADF (Acid detergent fiber) est calculé comme suit:

$$\text{ADF}\% = \frac{(P_3 - P_1)}{P_0} \times 100.$$

Où

P_0 : prise d'essai initial.

P_1 : poids du verre fritté vide, après étuvage.

P_3 : poids du verre fritté et d grignon d'olive après étuvage.

4-c-Dosage de la lignine avec un détergent acide (ADL selon Van Soest)

Principe

Cette méthode est basée sur la solubilisation de la cellulose dans l'acide sulfurique à 72% et donne la "lignine brute" pouvant contenir également la cutine (excrétée à l'extérieur des membranes des cellules végétales avec une structure lipidique complexe).

Méthode

Mettre les verres frittés contenant le résidu ADF dans des bacs en verre et verser une quantité d'acide sulfurique à 72% de façon à couvrir le résidu, et à l'aide des baguettes en verre l'homogénéisation est réalisée ; ajouter encore de l'acide jusque presque la moitié du creuset, le volume doit être constant pendant les trois heures (3h) de traitement.

Après les trois heures de l'attaque acide, un rinçage abondant à l'eau distillée chaude est effectué. Les verres frittés sont mis ensuite dans l'étuve réglée à 105°C pendant 8 heure. Le poids après étuvage est pris en considération (P_4).

$$\text{ADL}\% = \frac{(P_4 - P_1)}{P_0} \times 100$$

Où :

P_0 : prise d'essai initial.

P_1 : poids du verre fritté vide, après étuvage.

P₄ : poids du verre fritté et de grignon d'olive après étuvage.

5-Préparation des extraits

Des échantillons de grignon d'olive (1 g) ont été mélangés avec 100 ml (**Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2013**) de méthanol-eau (80:20) (**Pagnanelli *et al.*, 2010**) et maintenu sous agitation magnétique pendant 30 min. La suspension est ensuite filtrée à travers des filtres d'acétate de cellulose pour éliminer les particules de grignons d'olive. Les échantillons solides ont été lavés deux fois avec la même solution de méthanol-eau et les phases liquides sont ensuite mises ensemble pour les analyses ultérieures.

5-a-Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est réalisé selon la méthode de **Bachelier et Gavinelli (1966)**. La réaction à l'anthrone constitue la base d'une méthode rapide pour la détermination des hexoses, acides hexouroniques et aldopentoses.

Pour la préparation du réactif, 1 g d'anthrone est dissous dans ½ litre d'acide sulfurique à 95% (donne une couleur jaune). Ce réactif peut être conservé au frais pendant 4 mois.

Le mélange réactionnel est constitué de 500 µl de la solution sucrée à analyser et 1 ml du réactif sulfurique à l'anthrone.

Après une homogénéisation, les tubes sont placés pendant 10 mn à une température de 50°C. La lecture des absorbances est effectuée à 620nm (spectrophotomètre Shimadzu UVmin-1240V).

La concentration des sucres totaux est obtenue après projection sur la courbe d'étalonnage réalisée avec une solution de glucose à des concentrations respectives de 0, 0,04, 0,08 et 0,12 et 0,16 mg/ml (annexe III).

5-b-Dosage des phénols totaux

La détermination de la concentration des phénols totaux dans les différents échantillons a été réalisée par la technique de Folin-Ciocalteu décrite par **Graça et Bärlocher (2005)**.

Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). L'oxydation en milieu alcalin du réactif Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques conduit à la

formation d'un mélange d'oxyde bleu. L'intensité de la coloration produite, qui a une absorbance maximale à 760nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait analysé (**Georgé *et al.*, 2005**).

La concentration des phénols totaux a été déterminée sur 0,1ml d'échantillon (convenablement dilué dans de l'eau distillée) aux quels sont rajoutés 5 ml du réactif A (2% de Na_2CO_3 dans NaOH 0,1N). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 0,5 ml de réactif de folin Ciocalteu a été ajouté. Le milieu a été placé 2h à l'obscurité. L'absorbance a été lue à 760 nm contre un tube témoin.

La gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions en présence de l'acide gallique (annexe III).

5-c-Dosage de protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de **lowry (1951)**, qui consiste à mélanger 100 ml de l'échantillon avec 2 ml de la solution (D), puis laisser reposer pendant 10 min, en suite ce mélange a été additionné à 200 μl de la solution (E) , puis laissé 30min à l'obscurité. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 700nm.

* *Solution (A)* : 2% Na_2CO_3 dans NaOH (0,1N)

* *Solution (B)* : 2% double tartrate de sodium et de potassium

* *Solution (C)*: 1% CuSO_4 dans de l'eau distillée

* *Solution (D)* : =40ml (A)+0,4ml(B)+0,4ml(C).

**Solution (E)* : Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à $\frac{1}{2}$

Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire à partir d'une gamme étalon contenant de la BSA (bovine serum albumin) (annexe III).

5-d-Dosage des lipides

La teneur en matière grasse est obtenue par extraction épuisante à l'hexane dans un appareil de type Soxhlet qui comprend trois parties :

-Un ballon contenant le solvant (l'hexane)

-Une partie intermédiaire renfermant une cartouche en cellulose contenant 3g de grignon d'olive

-Un réfrigérant

L'hexane placé dans le ballon est porté à ébullition, sa vapeur passe dans la partie supérieure ou elle se condense grâce à un réfrigérant. Le liquide obtenu tombe dans la cartouche contenant le grignon épuisé. Lorsque la partie intermédiaire est suffisamment remplie de solvant, le siphonage s'amorce et le solvant contenant de l'huile retourne dans le ballon.

$$MG\% = (m_1/m_2) \times 100$$

m_1 : masse de la matière grasse extraite (g)

m_2 : masse de la prise d'essai (g)

V- Analyses statistique

Les résultats d'analyse (trois répétitions) ont fait l'objet d'une analyse statistique (ANNOVA/MANNOVA) avec le logiciel « Statistica».

Le test de Newman-Keuls (SNK) est utilisé pour comparer entre les échantillons. Le niveau de signification est pris à $P < 0,05\%$.

Après ensemencement du milieu liquide à base de grignon d'olive par des disques, pris à partir d'une culture solide à base de grignon d'olive, ensemencé par *Streptomyces sp.* S₁M₃I, et leur incubation à 40°C, un suivi macro et microscopie de la culture, un dosage des activités enzymatiques, un dosage des fibres ainsi qu'un dosage en quelques composés chimiques ont été réalisés.

1-Suivi macro et microscopique de la culture

1-a-Examen macroscopique

-Sur milieu solide

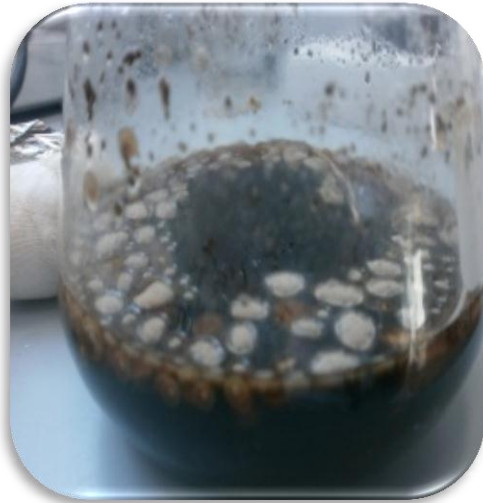
Une croissance rapide et importante de *Streptomyces sp.* S₁M₃I a été observée après 5 jours d'incubation sur milieu solide à base de grignon d'olive (Figure 12). Le mycélium de substrat et le mycélium aérien sont formés, des colonies rondes d'une couleur beige sont apparues.



Figure 12: Croissance mycélienne de *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur milieu solide à base de grignon d'olive après 5 jours d'incubation

-Sur milieu submergé

Un développement notable de *Streptomyces sp.* S₁M₃I a été observé sur milieu submergé à base de grignon d'olive durant le premier tiers du temps d'incubation. En suite une diminution de la charge commence à apparaître, et vers les dix derniers jours, la souche a complètement disparu (Figure 13).



(a)



(b)



(c)

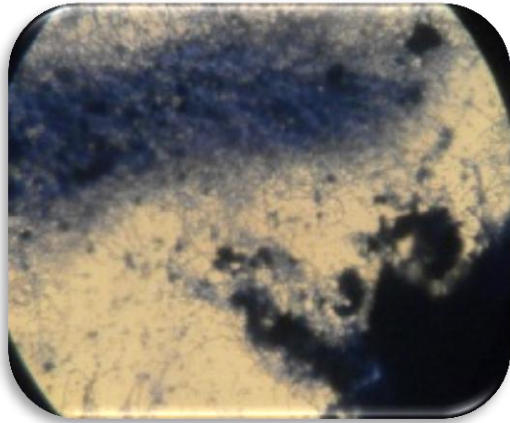


(d)

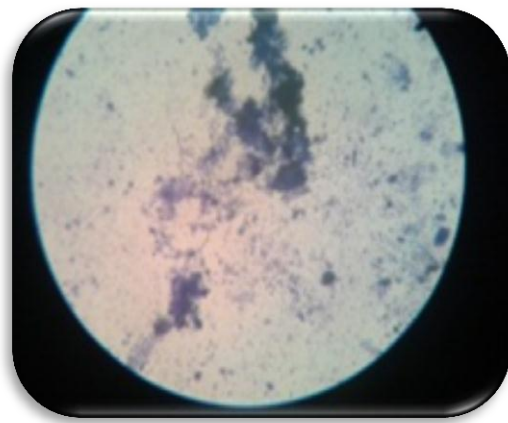
Figure 13: Croissance mycélienne de *Streptomyces sp. S₁M₃I* sur milieu submergé à base de grignon d'olive après (a) 4jours, (b) 5jours, (c) 9jours et (d) 19jours d'incubation 40°C.

1-b-Examen microscopique

Après observation de la souche *Streptomyces sp.* S₁M₃I sous microscope optique (Figure 14), au grossissement X40, avec coloration au bleu de méthylène, on remarque qu'elle adhère bien au grignon d'olive et sa séparation du grignon est très difficile.



4^{ème} jours



13^{ème} jours



18^{ème} jours

Figure 14: Micromorphologie de la souche dans le milieu vu au microscope optique au grossissement X40

Dashti et al. (2015) ont rapporté que le grignon d'olive peut être utilisé comme source biologique pour les bactéries hydrocarbonoclastiques, ce qui est en accord avec nos observations durant les 10 premiers jours où la masse mycélienne s'est formée tout autour des grains de grignon d'olive (Figure 14 - 4^{ème} jour).

La disparition de la biomasse mycélienne est peut être due, à la quantité de polyphénols libérés dans le milieu qui jouent un rôle antimicrobien, et/ou à l'épuisement du milieu de culture en substances facilement biodégradables par *Streptomyces sp. S₁M₃I*.

Aussi, la disparition de la souche dans le milieu est peut être due aux espaces réduits d'air présent dans le grignon d'olive qui peuvent ralentir l'échange de gaz de l'intérieur du substrat vers la surface (**Royse et SanchezVazquez, 2001**). Toutefois, *Streptomyces sp. S₁M₃I* peut convenablement pousser sur milieu submergé à base de grignon d'olive. En plus, les sucres d'hémicellulose peuvent être dégradés en acides faibles et des dérivés furfurals qui agissent comme des inhibiteurs microbiens durant l'étape de fermentation. Les dérivés de la lignine peuvent aussi interférer dans le procédé.

2-Evolution du pH de la culture

Le maintien du pH stable au cours de la fermentation est une tâche très difficile mais l'utilisation des tampons, qui confèrent au milieu de culture un pouvoir tampon et permet donc de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance des micro-organismes, permet de résoudre ce problème (**Raimbault et al., 1980**).

Les valeurs du pH du substrat fermenté restent très stables tout au long des premiers 15 jours. En effet, les pH de la fermentation submergé de *Streptomyces sp. S₁M₃I* sur grignon d'olive fluctuaient entre 6,46 et 7 (Figure 15).

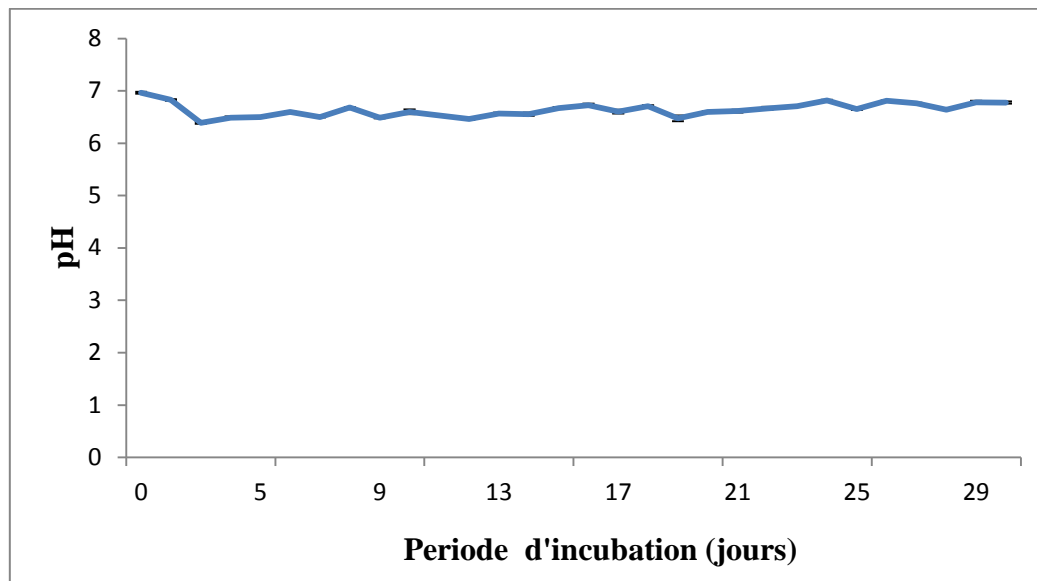


Figure 15 : Evolution de pH du substrat fermenté au cours de 30 jours de culture de *Streptomyces sp. S₁M₃I* sur milieu submergé à 40°C.

En général, pour les actinomycètes, un pH initial neutre ou proche de l'alcalinité est nécessaire pour une production xylanolytique élevée (**Bajaj et Singh, 2010 ; Boucherba et al., 2011**).

3-Dosage des activités enzymatiques

Après ensemencement du milieu liquide à base de grignon d'olive par des disques, pris à partir d'une culture solide à base de grignon d'olive ensemencé par *Streptomyces sp. S₁M₃I*, et leur incubation à 37°C, les activités xylanasiqes, CMCase et laccasiqes ont été déterminées durant la croissance de la souche chaque jour durant un mois.

La décomposition d'un résidu lignocellulosique comprend au moins deux étapes selon **Chaloux (1993)** ; tout d'abord, les sucres solubles et une partie de la cellulose et des hémicelluloses sont dégradés; ensuite, la dégradation des composés lignifiés est réalisée.

Selon ce modèle, la vitesse de transformation des résidus lignocellulosiques est essentiellement conditionnée par la composition des substrats. Cependant, d'autres facteurs affectent la décomposition de ces matériaux, en l'occurrence la température, l'humidité, et la qualité du matériel.

La production de ces enzymes par *Streptomyces sp.* S₁M₃I est testée par fermentation dans un milieu submergé à base de grignon d'olive pour la première fois, d'où l'originalité de notre travail.

3-a-Activité xylanasiq

Durant la première semaine d'incubation, qui représente la phase de croissance, *Streptomyces sp.* S₁M₃I marque une utilisation préférentielle des composés solubles et rapidement biodégradable du milieu, tel que les oligosaccharides, les composés phénoliques et l'huile résiduelle du substrat comme source de carbone, c'est pour cela que la souche n'a produit l'enzyme qu'après 7 jours d'incubation.

Ainsi que le montre la figure 16, nous constatons que l'activité xylanasiq atteint une valeur significative ($P < 0,05$) maximale de $5,6 \pm 0,006$ U/ml après les 7 jours de fermentation et reste par la suite aux alentours de cette valeur.

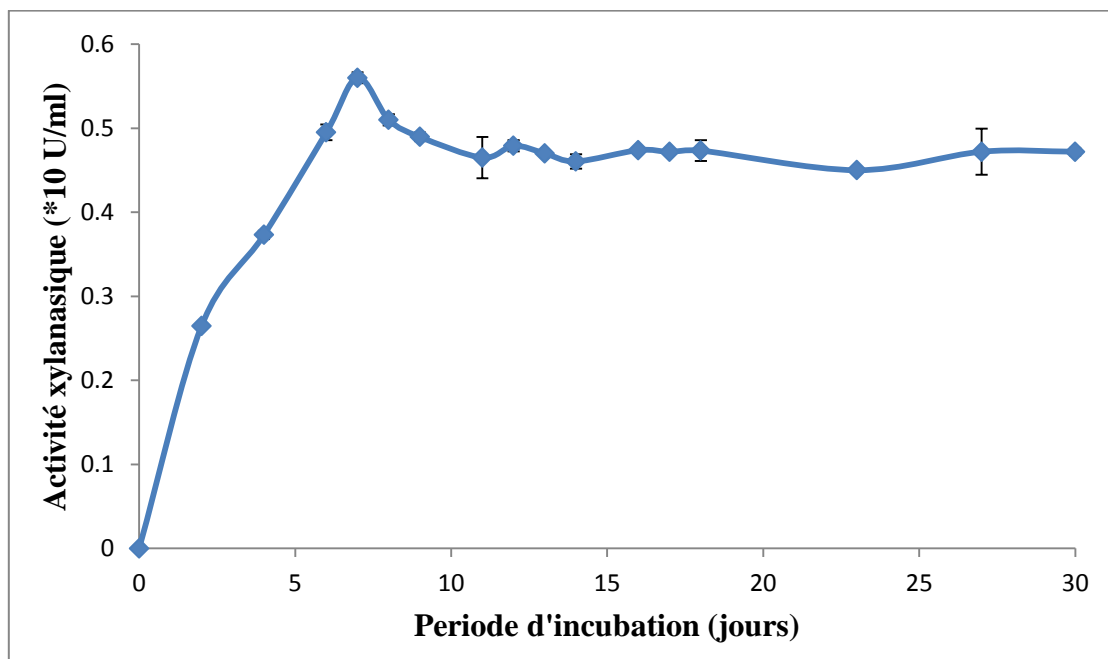


Figure 16: Evolution de la production de la xylanase par *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur milieu submergé à base de grignon d'olive

Cette production enzymatique élevée est mise en place dès les premiers jours d'incubation, afin que *Streptomyces sp.* S₁M₃I puisse se développer dans son stade végétatif. Donc, le grignon d'olive peut être utilisé comme substrat (source de carbone) pour la croissance microbienne et la production de xylanases.

Des résultats proches des nôtres ont été obtenus avec la souche *Streptomyces sp.* QG113 qui produit 7,5U/ml de xylanases sur milieu à base de paille de blé après 5 jours d'incubation à une température de 37°C et à un pH de 8 (Beg *et al.*, 2000).

Néanmoins, une production maximale de xylanase de 0,260 U/ml après 22 jours d'incubation a été obtenue avec un champignon *Fomes fomentarius* (MUCL 35117) en fermentation solide sur milieu à base de grignon d'olive brut tamisé (Neifer *et al.*, 2013). Une autre étude réalisée par Abid *et al.* (2014) sur *F.fomentarius* cultivé sur milieu contenant 10 g de grignon brut (non tamisé), humidifié avec 40 ml de tampon d'acétate de sodium (20 mM, pH 5) contenant 0,5% d'extrait de malt (w/v), ont révélé une activité xylanasiqne faible de l'ordre de 0,26 U/ml.

Des activités xylanasiqnes de 3,5U/ml, 3,4U/ml et 0,3U/ml ont été rapportées par Salhi **en 2004** sur milieu liquide avec 2% de grignon d'olive, déshuilé et broyé, par *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* et *Trichoderma reesei* respectivement, à une température de 28°C, et une activité de 32U/ml chez *Aspergillus fumigatus* à une température de 42°C.

La production de xylanase par *Streptomyces sp.* (strain Ib 24D) sur milieu à base de pulpe de tomate était de 1447U/ml à pH 6, 5 et à une température de 60°C (Rawashdeh *et al.*, 2005). Une activité de 33U/ml est rapportée par Saradouni *et al.* (1999) sur milieu submergé à base de paille d'avoine avec *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) *albino* mutée dans les conditions optimales de température (70°C) et de pH (5), et une activité de 11,6U/ml a été détectée sur milieu à base de son de riz (50g/l) produite par *Streptomyces actuosus* à un pH de 5 et à une température de 37°C après 4 jours d'incubation (Wang *et al.*, 2003). Cette différence dans les résultats est notamment due aux différentes méthodes de dosage des sucres réducteurs soit par la méthode au DNS qui donne des activités apparentes faibles par rapport à la méthode de Somogyi-Nelson (Royer **et Nakas**, 1989) ou au caractère lignocellulosique du grignon d'olive.

Plusieurs travaux ont testé la production de xylanases sur milieu à base de xylane pur tel que le xylane de bouleau, à titre d'exemple, Nascimento *et al.* (2002) ont rapporté une activité de 10,3 U/ml dans une culture de *Streptomyces sp.* AMT-3 incubée pendant 10 jours, Techapun *et al.* (2002) ont également rapporté une activité de 8 U/ml dans une culture de *Streptomyces sp.* Ab 106 (55°C, pH 7,5) contenant du pur xylane à 1% (m/v).

Tableau IV : Production et caractéristiques physicochimiques de xylanases chez différentes espèces du genre *Streptomyces*.

Microorganismes	Substrats	Conditions de culture	Xylanases (U/ml)	Températures optimales	Temps de demi-vie (h)	Références
<i>Streptomyces sp.</i> S ₁ M ₃ I	Grignon d'olive brut tamisé	40°C-pH 7,4-7 jours	5,6	40	-	Présent travail
<i>Streptomyces actuosus</i>	Son de riz	37°C-pH 5 4jours	11,6	37	-	Wang et al., 2003
<i>Streptomyces sp.</i> QG113	Paille de blé	37°C-pH 8-5jours	7,5	50	1,0(50°C, pH 9,0)	Beg et al., 2000
<i>Streptomyces albus</i> ATCC 3005	Xylane (1%)	37°C-pH 7,5- 5jours	12	60	-	Antonopoulos et al., 2001
<i>Streptomyces cuspidosporus</i>	Xylane (1%)	37°C-pH 7,5- 5jours	22	65	5,0 (55°C, pH 5,5)	Maheswari et Chandra, 2000
<i>Streptomyces roseiscleriticum</i>	Xylane (1%)	37°C-pH 7,5- 5jours	16	60	-	Grabski et Jeffries, 1991

3-b-Activité CMCase

A l'opposé de l'activité xylanasiqne, l'activité carboxyméthylcellulases est faible. Une augmentation a pu avoir lieu, et atteindre la valeur maximale de $1,445 \pm 0,016$ U/ml au bout du 7^{ème} jour d'incubation (Figure 17).

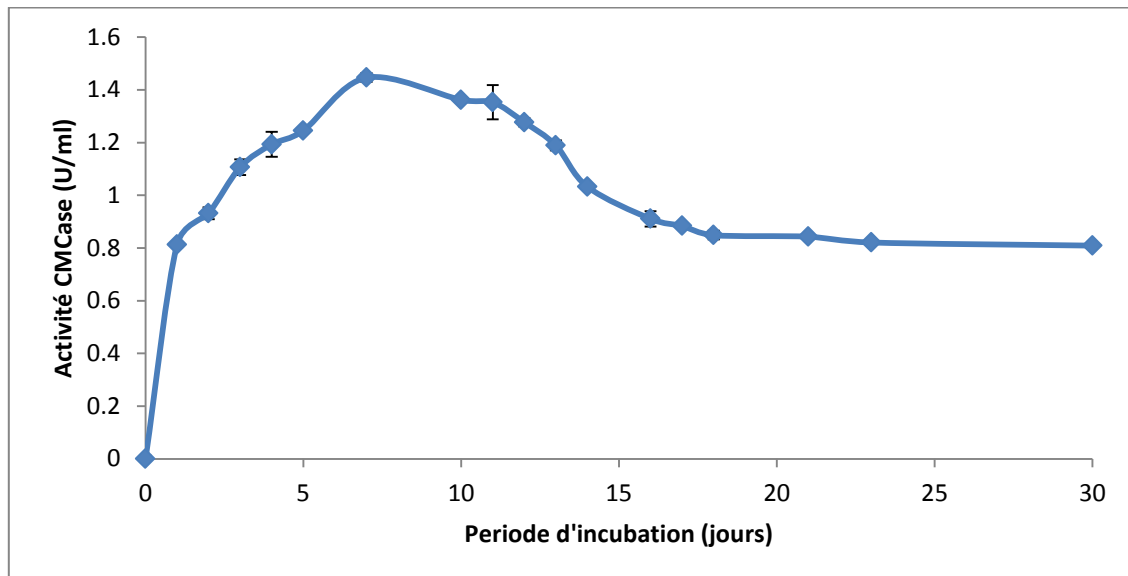


Figure 17 : Evolution de la production de la cellulase par *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur milieu submergé à base de grignon d'olive

L'absence d'une production élevée et notable de la carboxyméthylcellulase serait liée d'une part au caractère lignocellulosique du grignon et d'autre part, à la présence de composés phénoliques, qui intervient dans la privation du substrat, dont une fraction serait solubilisée dans le milieu d'incubation.

Toutefois, cette valeur relativement faible doit être interprétée en relation avec les objectifs globaux. En effet, si l'utilisation de cette enzyme doit être dirigée vers l'amélioration de la valeur nutritive de grignon d'olive en fibre, nous visons à atteindre la dégradation maximale de lignine, mais pas une utilisation étendue de la cellulose comme substrat de l'enzyme qui doit rester comme source d'énergie pour les ruminants.

Comparé aux autres études, tel celle d'**Abid et al. (2014)** ont trouvé une activité carboxyméthylcellulases plus faible, ou la valeur optimale a été obtenue à la fin de la 3^{ème} semaine avec une souche de pourriture blanche qui est connu par ces activités lignocellulosiques élevées.

De même, l'activité carboxyméthylcellulase atteint une valeur maximale de 0,52U/ml après 30 jours d'incubation par *Fomes fomentarius* cultivé sur milieu à base de grignon d'olive en fermentation solide (Neifar *et al.*, 2013).

Des activités carboxyméthylcellulases de 1,8U/ml, 0,9U/ml et 0,1U/ml ont été rapporté par Salhi en 2004 sur milieu liquide avec 2% de grignon d'olive déshuilé et broyé par *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* et *Trichoderma reesei* respectivement à une température de 28°C, et une activité de 15U/ml chez *Aspergillus fumigatus* à une température de 42°C.

L'activité carboxyméthylcellulase présentée dans cette étude n'est pas dans la gamme de valeurs élevée par rapport aux champignons producteurs d'enzymes à haute activité cellulolytique (Persson *et al.*, 1991).

3-c-Activité laccasique

Une augmentation de la production de la laccase a été obtenue au bout de 13jours, et une diminution significative dans les 17 jours qui s'ensuivent a été observée (Figure 18).

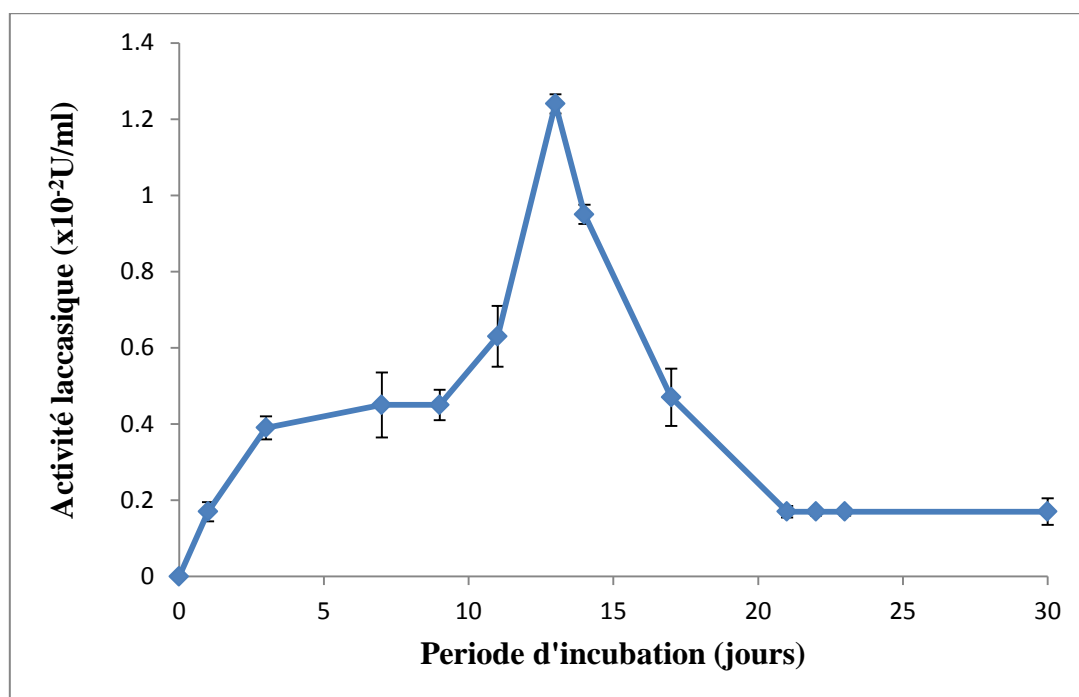


Figure 18 : Evolution de la production de la laccase par *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur milieu submergé à base de grignon d'olive

L'activité laccase a culminé après 13 jours avec une moyenne de $1,21 \times 10^{-2}$ UI/ml, puis elle est tombé à $0,17 \times 10^{-2}$ UI/ml aux 30^{ème} jours.

Tout aussi important a été la perte drastique de l'activité en fonction de temps, il se peut que l'oxydation des groupements chimiques spécifiques aux sites actifs (**Agosin et al., 1985**) ou le blocage du site par les composés dans la suspension (**Jeffries et al., 1981**) ont été impliqués dans cette perte .

En revanche, l'agitation abaisse la détérioration de la lignine, probablement, parce que le taux de transfert d'oxygène dans le mycélium était pauvre, car l'aération est un critère important dans la dégradation de la lignine (**Leilosa et al., 1983**), ou bien la présence de protéases dans le milieu capable d'hydrolyser la laccase peut être la cause de cette faible activité. Ce résultat peut être aussi expliqué par le fait que le grignon d'olive contient 48,4% de lignine (**Demirabas, 2004**) qui est difficilement biodégradable.

Le grignon d'olive représente donc un résidu agricole peu intéressant pour la production de laccase par *Streptomyces sp.* S₁M₃I. Ceci a été également noté par **Lakhtar et al. (2010)**, qui ont trouvé une activité laccasique maximale faible atteinte par la souche *Lentinula edodes* Le119 après 15 jours d'incubation sur milieu SPS (20% bois de taille, 30% de grignon d'olive, 50% de margine).

L'activité laccasique dans cette présente étude est meilleure que celle rapportée par **Haddadine et al. (2009)** qui a travaillé sur les basidiomycètes cultivées sur milieu à base de grignon d'olive traité auparavant par la soude, à un pH de 5,5, et les activités laccasiques rapportées sont les suivantes :

- Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 19343) avec une activité de $2,9 \times 10^{-3}$ U/ml ;
- Oxysporus sp.* avec une activité de $16,3 \times 10^{-3}$ U/ml ;
- Schizophyllum commune* avec une activité de $8,2 \times 10^{-3}$ U/ml ;
- *Hyphoderma sp.* avec une activité de $1,1 \times 10^{-3}$ U/ml ;
- *Ganoderma sp.* avec une activité de 8,2U/ml.

Abid et al. (2014) ont rapporté une activité laccasique faible de l'ordre de 0,398U/ml mais qui reste toujours supérieure à l'activité obtenu dans notre étude. **Salmones et Mata, (2002) et Salmones et al. (2005)** ont démontré que les activités enzymatiques ont non seulement contribué à la nutrition de la souche *Streptomyces sp.* lors des stades végétatifs, mais aussi que la laccase a participé activement à la détoxification de la pulpe de café.

En effet, une étude sur la composition du milieu SPS par RMN montre une diminution des C_{Alkyle} , ce qui semble que *Lentinula edodes* Le119 utilise, dans la première semaine de sa croissance, préférentiellement les constituants les plus facilement métabolisables (Lakhtar, 2009). Après épuisement de ceux-ci, *Streptomyces sp.* oriente alors son métabolisme vers la production d'enzymes nécessaires à la dégradation du substrat lignifié (Moumene *et al.*, 2008).

L'addition de grignon d'olive lapidé (C'est à dire la suppression de l'endocarpe de la drupe) au son de blé inoculés par *Pleurotus ostreatus* 3004 donne une activité laccasique de $2,1 \pm 0,6 \text{ UI/g}$, au trèfle incarnat $6,1 \pm 1,8 \text{ UI/g}$, et au grain d'orge $0,9 \pm 0,1 \text{ UI/g}$. et l'addition de grignon d'olive lapidé au son de blé inoculés par *Pleurotus pulomonarius* CBS 666497 donne une activité laccasique de $12,5 \pm 4 \text{ UI/g}$, au trèfle incarnat $2,6 \pm 0,1 \text{ UI/g}$, et au grain d'orge $2,7 \pm 0,1 \text{ UI/g}$ (Brozzoli *et al.*, 2010).

La disponibilité des nutriments dans un aliment est essentiellement déterminée par sa composition chimique, par rapport aux composants disponibles et non disponibles et à des facteurs qui peuvent limiter la disponibilité des composants avec lesquels ils sont associés (Shabtay *et al.*, 2009).

4-Détermination de la teneur en constituants pariétaux

Le grignon d'olive, utilisé dans cette étude, est riche en fibres avec des taux de $47,81 \pm 1,31\%$, $36,31 \pm 1,24\%$ et $19,47 \pm 1,78\%$ pour le NDF, l'ADF et l'ADL respectivement (Tableau V), et puisque ce grignon est riche en fibres, donc, il a une faible dégradabilité dans le rumen.

En effet, le grignon d'olive fermenté, après 13 jours d'incubation, a montré une diminution significative ($P < 0,05\%$) dans la composition de la paroi cellulaire par rapport au grignon témoins à raison de 30,95%, 22,88% et 21,16% pour le NDF, l'ADF et l'ADL respectivement suivi d'une diminution non significative ($P > 0,05\%$).

Tableau V: Composition chimique en NDF (Neutre detergent fiber), ADF (Acid detergent fiber) et ADL (Acid detergent lignin) de grignon d'olive avant et après biotraitement

Fibres Jours	NDF%	ADF%	ADL%
Avant biotraitement	47,81±1,31	36,31±1,24	19,47±1,78
7^{ème} jour	37,75±2	31,26±1,94	17,40±2,03
13^{ème} jour	33,73±1,11	28,20±2,12	15,34±1,34
23^{ème} jour	33,03±1,45	28,08±2,15	15,33±2,1
30^{ème} jour	33,01±2,2	28,001±1,03	15,35±2,21

La réduction de la teneur en fibres de grignon d'olive par une culture submergée, en utilisant *Streptomyces sp. S₁M₃I*, est une étude pionnière.

Les proportions de fibres ADF et NDF d'un composé, sont des indices de sa valeur alimentaire. Donc, la teneur élevée du grignon d'olive en ces constituants, permet de classé ce type de grignon comme un composé fibreux et non pas ligneux.

l'ADF est généralement lié à la digestibilité et la valeur énergétique du fourrage: plus il y'a de fibre ADF dans le fourrage plus la digestibilité et le contenu énergétique sont faibles (Nefzaoui *et al.*, 1984), donc, une réduction de 21,16% demeure très importante.

Neifar *et al.* (2013) rapportent une quantité de fibres de 59%, 45% et 31%, pour le NDF, l'ADF et l'ADL respectivement pour un grignon d'olive brut. Une quantité en NDF de 50,44%, en ADF de 36% et en ADL de 32,19% est rapportée par Brozzoli *et al.*(2010) pour le grignon d'olive lapidé. Nefzaoui en 1979, rapporte une teneur en NDF de 72%, en ADF de 60%, et 31%en ADL de grignon d'olive épuisé de la Tunisie, et en 1979, une teneur de NDF de 55%, en ADF de 45%, et 29% en ADL en grignon épuisé partiellement dénoyauté. Alibes et Berge en 1983 rapportent une teneur en NDF de 70%, et 31% en ADL en grignon épuisé partiellement dénoyauté de l'Espagne, alors que, Ohlde et Becker en 1982, rapporte une teneur en NDF de 83%, en ADF de 64%, et 24% en ADL en grignon épuisé partiellement dénoyauté de Grèce. Cette différence entre les résultats est due à la procédure d'obtention du substrat (le grignon utilisé dans cette étude est tamisé).

Après biotraitement, par *Fomes fomentarius* (MUCL 35117), une réduction de 61,01%, 68,88%, 64,51% pour le NDF, ADF et ADL respectivement a été observé par **Neifar et al. (2013)**.

Après 28 jours d'incubation de *Pleurotus ostreatus* sur milieu à base de grignon d'olive, obtenu après extraction d'huile d'olive par le procédé à 3phases, et 10% (poids sec) de la paille de blé, une réduction de 22,91% en NDF et 14,02% en ADF a été obtenu par **Shabtay et al. (2009)**.

D'après **Cuevas et al. (2015)**, les pourcentages d'hémicellulose et cellulose ont été calculés en appliquant les expressions suivantes:

$$\text{Hémicellulose} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

$$\text{Cellulose} = \text{ADF} - \text{ADL}$$

Les pourcentages des fibres avant et après biotraitement sont montrés dans la figure 19.

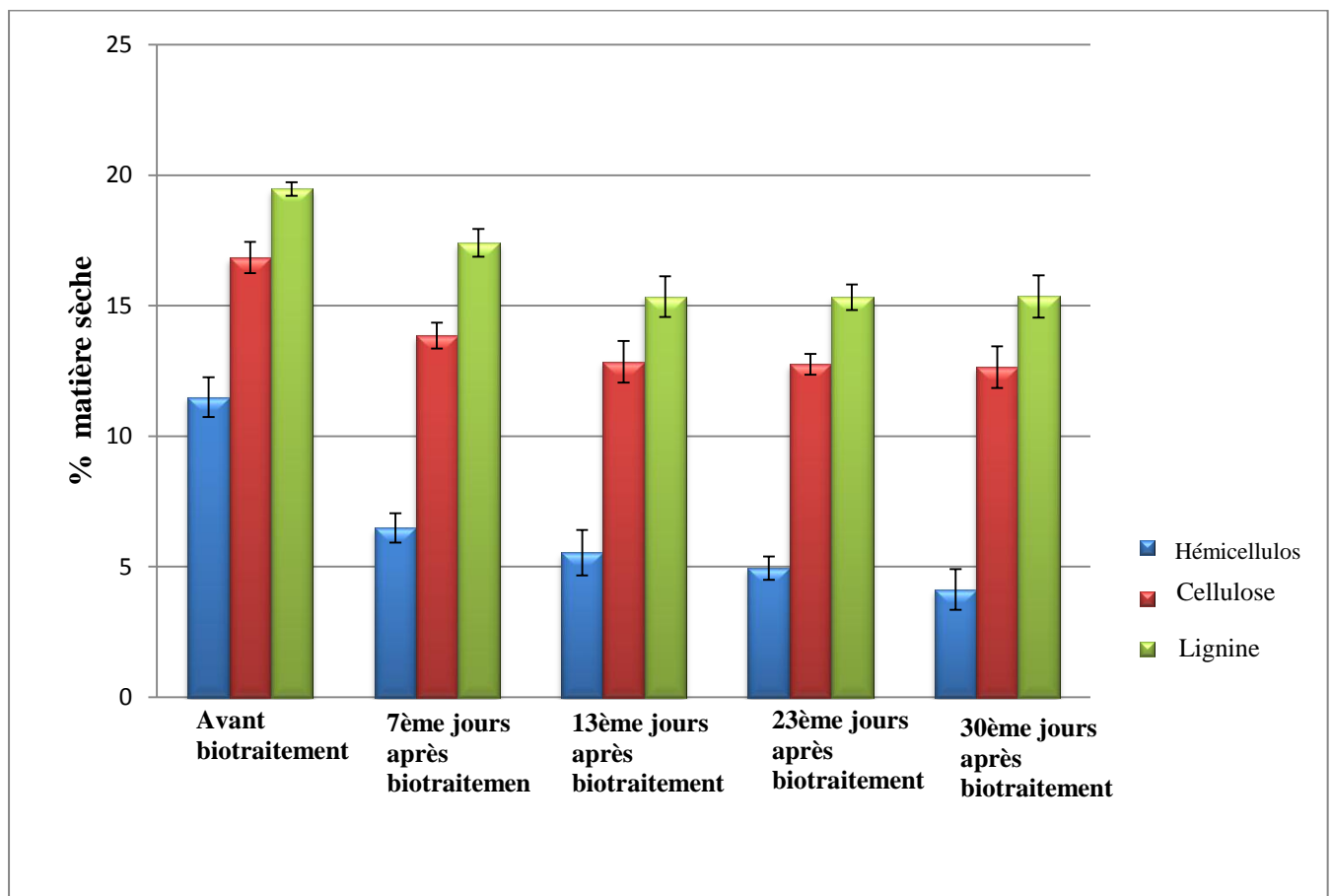


Figure 19: Teneurs en fibres dans les constitutions pariétales de grignon d'olive avant et après biotraitement.

Dans le grignon d'olive utilisé, la fraction lignocellulosique composé de la lignine (19,47%) est majoritaire, suivi de la cellulose (16,84%) et l'hémicellulose (11,49%).

Les fractions lignocellulosique du grignon d'olive diffèrent d'un type à un autre, on trouve un grignon d'olive brut avec les teneurs en hémicellulose de 23,6%, en cellulose de 24% et 48% en lignine (**Demirabas, 2004**), un grignon d'olive, broyé et déshuilé, montre une quantité en cellulose de $43,77 \pm 0,49\%$ suivie de la lignine ($25,42 \pm 1,06\%$) et de l'hémicellulose ($12,38\% \pm 0,36$) (**salhi, 2004**).

Jauhainen et al. (2005) rapportent une teneur en hémicellulose et cellulose de 44% et 45% en lignine. Alors que, **Garcia-Ibanez et al. (2006)** rapportent une teneur en hémicellulose de 21,5% et en cellulose de 24,3% et 38% en lignine.

Karapinar (1977) et **Worgan (1978)** ont rapporté que les tissus contenus dans les grignons d'olive sont résistants à la dégradation microbienne. En effet, le contenu en hémicellulose est significativement ($P < 0,001$) réduits par *Streptomyces sp. S₁M₃I* après le 7^{ème} jour d'incubation à 6,48%. Cela est dû à la nature amorphe de l'hémicellulose qui est sujette à l'hydrolyse par les complexes d'espèces hémicellulolytiques secrétés également après le 7^{ème} jour d'incubation. Cependant, **Moyson et Verachtert (1991)** ont démontré que la croissance de *Leudodes* est initialement associée à la teneur en hémicellulose de substrat, à partir d'hémicellulose soluble dans l'eau et d'autres sucres, ils sont principalement utilisées lors de la phase de croissance active, avant la rupture de la lignine et de la cellulose.

La composition en hémicellulose du grignon d'olive cultivé par *Fomes fomentarius* en fermentation solide est de 9% (poids sec) (**Neifer et al., 2013**).

De même, les teneurs en hémicellulose ont été considérablement réduits par deux espèces *Pleurotus ostreatus* 3004 et *Pleurotus pulmonarius* CBS 666497 (**Brozzoli et al., 2010**).

La culture de *Pleurotus ostreatus* 3004 fait réduire l'hémicellulose des mélanges suivants :

- Grignon d'olive –son de blé avec une réduction de 47,94%(poids sec),
- Grignon d'olive- grain d'orge avec une réduction de 7,27%,
- Grignon d'olive- trèfle incarnat avec une réduction de 29,33%,
- Grignon d'olive- farine de blé avec une réduction de 22,70%,
- Grignon d'olive –fèves avec une réduction de 7,28%),

Alors que chez *Pleurotus pulmonarius* CBS 666497, **Brozzoli et al. (2010)** ont rapporté les réductions suivantes :

- Grignon d'olive –son de blé avec une réduction de 36,99%(poids sec),
- Grignon d'olive- trèfle incarnat avec une réduction de 46,41%,
- Grignon d'olive- farine de blé avec une réduction de 26,72%.

En effet, les microorganismes qui produisent des cellulases sont généralement capables d'hydrolyser le xylane ; il existe peu d'exemple connus de microorganismes dégradant uniquement la cellulose ou les xylandes (**Gilbert et Harlewood, 1993**), donc, la cellulase produite intervient dans l'hydrolyse de l'hémicellulose.

Une réduction significative ($P<0,05$) de 17,75% en cellulose est obtenue après 7 jours d'incubation et de 23,69% après 13 jours puis elle restera stable (non significative). Cette diminution est inversement proportionnelle à la production cellulastique.

Barrington et al. (2002) ont constaté qu'une substance organique à forte teneur en lignine et en cellulose présente une faible dégradabilité microbienne.

Une culture de *Phanerochaete chrysosporium* sur milieu Mendels et Weber (MW) à raison de 2% de grignon d'olive broyé et déshuilé, montre une réduction de $29,8\pm 1,5\%$ de cellulose, et une culture de *Tinea versicolor* montre une réduction de $17,5\pm 0,9\%$ (Salhi, 2004).

Une réduction de 10,63% en lignine est obtenue après 7 jours d'incubation et de 21,21% après 13 jours puis elle restera stable au bout de 20 jours. Cette faible réduction est peut être due au poids moléculaire élevé des enzymes ligninolytique qui ne leur permet pas la pénétration complète dans le substrat (**Evans et al., 1994**), aussi, la dégradation de la lignine par les microorganismes est un processus du métabolisme secondaire, se produisant généralement sous de faibles teneurs en azote et nécessitant la présence d'une source de carbone telle que le glucose ou la cellulose (**lee, 1997**). De nombreux auteurs ont montré que la laccase intervient dans plusieurs réaction nécessaires à la dégradation de la lignine (**Kersten et al., 1990 ; Bourbonnais et Paice, 1990**). Cependant, d'autres études indiquent que chez certaine espèce qui dégradent bien la lignine, la laccase n'est pas synthétisée (**Tuor et al., 1995**) et que chez d'autre espèces telle que *Coriolus versicolor*, la dégradation de la lignine n'est pas affectée quand l'activité de la laccase est inhibée par un anticorps spécifique (**Evans, 1985**).

Haddadin et al. (2002) ont constaté qu'il a fallu 60 jours pour dégrader la lignine dans la fermentation de grignons d'olive par espèces fongiques suivants : *P.chrysosporium*, *Phlebia radiata* et *Pleurotus ostreatus*.

Une réduction de $3,3\pm 0,3\%$ en lignine est obtenue avec *Phanerochaete chrysosporium* et $5,5\pm 0,5\%$ est obtenu avec *T.versicolor* par rapport au substrat non traité, rapporte Salhi.

Une réduction de 12,70 % en lignine a été observé après 14jours d'incubation de *Pleurotus ostreatus* sur milieu à base de grignon d'olive obtenu après extraction d'huile d'olive par 3phases et 10% du poids sec de la paille de blé et 32,96% après 28 jours d'incubation (**Shabtay et al., 2009**).

Les résultats d'analyse des fibres au 30 ème jour d'incubation de *Fomes fomentarius* . montrent une diminution non significative du taux de cellulose et lignine du substrat traité par rapport au témoin abiotique (**Abid et al., 2014**).

Les quantités des fibres restantes dans le grignon d'olive seront utilisées comme source d'énergie pour les ruminants, le pouvoir calorifique des principaux constituants de la biomasse a été rapporté par **Sarlos G. (2003)**:

-La cellulose et l'hémicellulose ont un pouvoir calorifique massique de 17,46 MJ/kg

-La lignine a un pouvoir calorifique de 26,63 MJ/kg.

5-Teneur en polyphénols

Une quantité 0,0754mg/ml de polyphénols a été trouvé dans ce type de grignon d'olive, avant biotraitement, qui représente un taux de 1,5% de matière sèche (Figure 20).

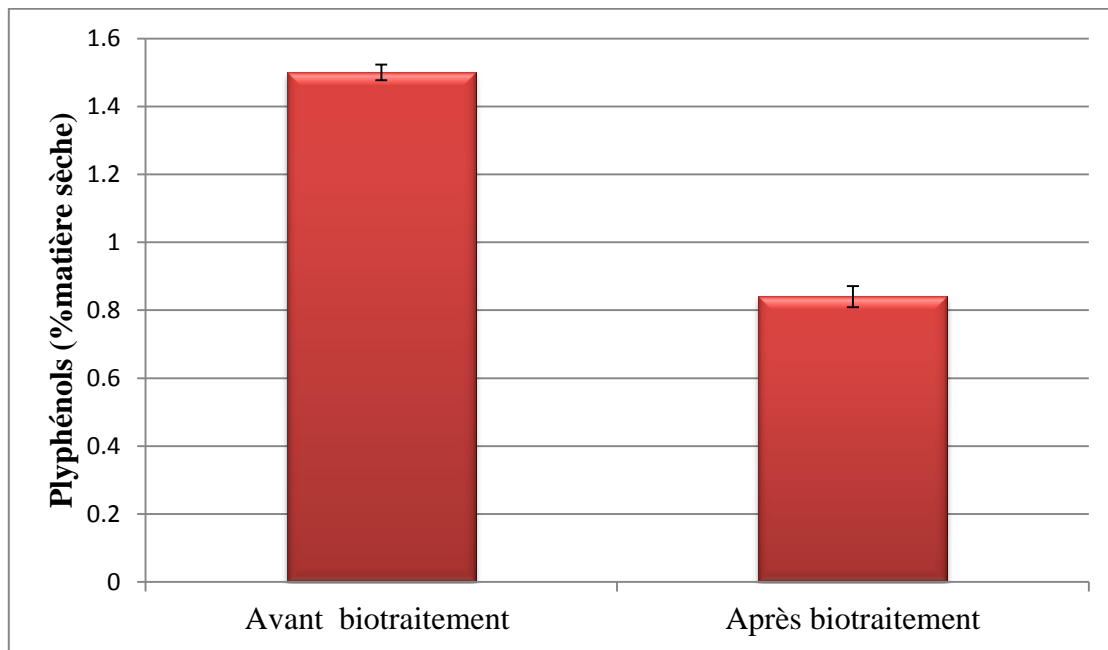


Figure 20 : Effet de *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur la réduction de polyphénols totaux cultivée sur milieu à base de grignon d'olive

Les quantités de polyphénols dans le grignon d'olive diffèrent selon les auteurs, à titre d'exemple **Alburquerque et al. (2004)** rapportent une quantité de 1,5%, alors que **Neifar et al. (2013)** apportent une quantité de 0,3% de polyphénols.

Les analyses effectuées sur les grignons d'olive par **Nefzaoui (1978, 1980)** ont révélés des taux de tannins inférieurs à 1% insuffisants pour exercer une influence négative sur la microflore du rumen et la digestibilité des protéines, et des taux de polyphénols compris entre 0,15 et 0,75% de la matière sèche insuffisants pour inhiber les fermentations

Alors, les polyphénols, qui sont contenus dans les grignons d'olives, inhibant le processus de la digestion, doivent être atténués (**Milanese et al., 2014; Camarillo et al., 2012 ; Filidei et al., 2003**).

En effet, une réduction significative ($P < 0,05$) de 44 % a eu lieu à l'aide de la souche *Streptomyces sp.* S₁M₃I au bout de 3jour d'incubation, dans la présente étude (Figure 21), puis non significative le reste des jours.

La réduction des matières phénoliques dans le grignon d'olive lors de de la culture est un aspect important dans l'adaptation de *Streptomyces sp.* S₁M₃I, d'autant plus que la capacité d'un substrat à résister à la dégradation a été partiellement attribué à sa gamme de composés phénoliques (**Fermor et Macauley, 1991**), en plus, ce matériaux (grignon d'olive)

est considéré un bon adsorbant de polyphénols (Athanasios *et al.*, 2008), aussi, l'hydrolyse enzymatique génère peu de composés phénoliques et d'effluents à traiter (Kumar *et al.*, 2008 ; Warzywoda *et al.*, 2011).

De même, Milanese *et al.* (2014) ont montré une réduction de 56% de polyphénol dans le grignon par système à digestion anaérobie, c'est un système assez compliqué qui nécessite des moyens onéreux comparant à l'étude. Neifar *et al.* (2013) ont démontré une réduction faible de polyphénols de grignon d'olive cultivé par *Fomes fomentarius*.

La toxicité des polyphénols de grignon d'olive a été montrée sur les bactéries et leur effet semble plus variable sur les champignons (Ruiz-Baba *et al.*, 1993). Alors, l'inhibition de la croissance de *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur milieu à base de grignon d'olive peut être expliquée par l'influence des polyphénols qui sont responsables d'effets antimicrobiens (Sayadi *et al.*, 2000 ; Zenjari *et al.*, 2006).

Une étude sur *Pleurotus ostreatus* Florida F6 (ATCC #58053) sur milieu grignon d'olive et paille de blé à 10%, montre que cette souche appartient aux champignons de la pourriture blanche peut croître de manière satisfaisante sur un substrat riche en polyphénols, en effet, une réduction intensive de polyphénols est observée et qui est de l'ordre de 59,47% (Shabtay *et al.*, 2009).

La valorisation de grignon d'olive par *Streptomyces sp.* est possible par le fait que cette souche est capable de produire des enzymes lignocellulosiques non spécifiques telle que la laccase impliquée dans la diminution de la toxicité de grignon par la dégradation de polyphénols (flavonoïde responsable de la perte de poids) (Nkhili, 2009).

6-Teneur en protéines

Avant biotraitement la quantité en protéines brutes dans le grignon d'olive est de 5,09±0,22% de matière sèche, et une augmentation significative (P<0,05%) de 34,18%, après 7 jours d'incubation, est constatée après addition de *Streptomyces sp.* S₁M₃I en comparaison avec les contrôles connexes non inoculés (Figure 21).

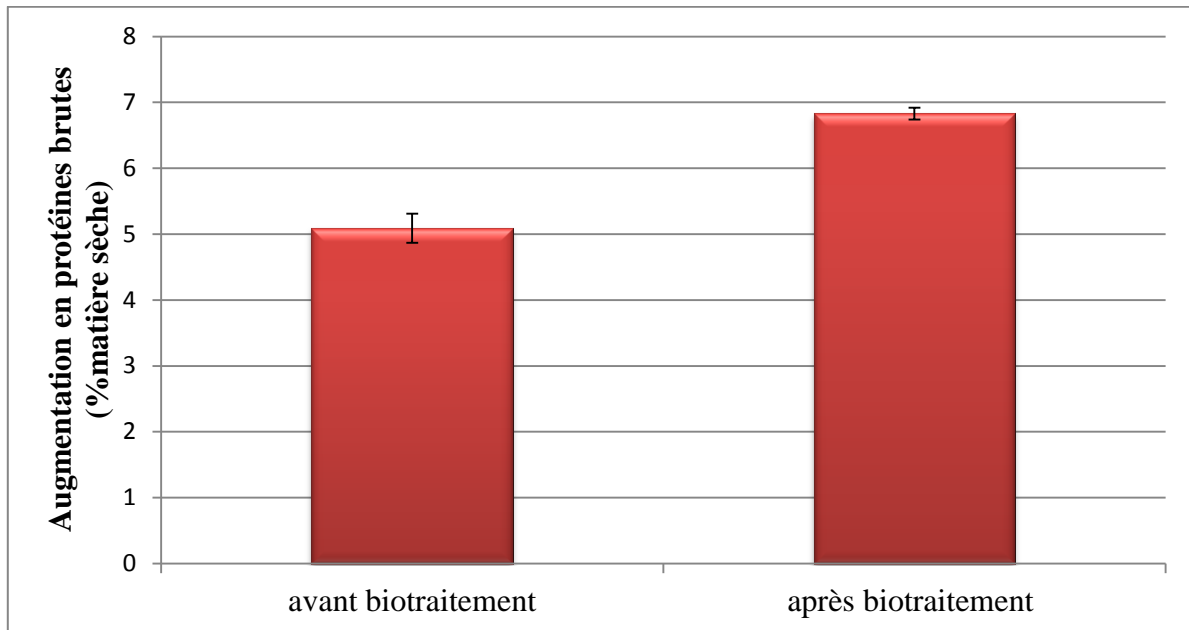


Figure 21: Effet de biotraitement avec *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur la composition en protéine de grignon d'olive.

L'augmentation de la teneur en protéines brutes pourrait être le résultat des potentialités offertes par la biomasse mycélienne pour l'enrichissement en protéines du résidu, suggérant que ce résidu traité est une bonne source de protéines pour le bétail (**Chen et al., 1995; Sobal, 2002 et Shabtay et al., 2009**).

Aussi, l'amélioration du contenu en protéine brutes pourrait être due à la sécrétion de certaines enzymes extracellulaires dans les déchets lignocellulosiques (**Kinfemi et al., 2009**).

La présence d'huile résiduelle dans le substrat améliore la croissance et la production de protéines et n'empêche pas l'activité lignocellulosique de la souche *Streptomyces sp.* S₁M₃I. Cependant, cette activité dépend de la nature de la lignocellulose présente qui est dans notre cas un grignon tamisé (composé essentiellement de la pulpe débarrassée en grande partie de la lignine (**Nefzaoui, 1987**)) qui favorise alors la croissance mycélienne et la production enzymatique.

Ce résultat concorde avec les conclusions faites par **Iyayi et Aderolu en 2004**, qui ont montré une augmentation de protéines brutes contenues dans les drèches de brasserie, son de riz, farine de palmiste et son de maïs traités par *Trichoderma viride*.

Une étude sur *P. ostreatus* Florida F6 (ATCC #58053) cultivé sur milieu au grignon d'olive et de paille de blé à 10% révèle une augmentation significative de la teneur en protéine brutes de l'ordre 6,13±0,47% (**Shabtay et al., 2009**).

En effet, une augmentation de la teneur en protéines n'est que de 22,3% a été observée sur grignon d'olive cultivé par *Fomes fomentarius* (Neifar *et al.*, 2013).

Brozzoli *et al.* (2010) ont rapportés des augmentations en protéines brutes élevées, en comparaison avec les échantillons témoins, avec *Pleurotus ostreatus* 3004 inoculé dans des mélanges suivant :

- Grignon d'olive lapidé -remoulage de blé avec une augmentation de 19,02 %,
- Grignon d'olive lapidé –fèverole avec une augmentation de 18,5%,
- Grignon d'olive lapidé – son de blé avec une augmentation de 14,06 %,
- Grignon d'olive lapidé - orge avec une augmentation de 18,23%,
- Grignon d'olive lapidé- trèfle incarnat avec une augmentation de 8%,
- Grignon d'olive lapidé-farine de blé avec une augmentation de 7,39%.

L'augmentation de la teneur en protéines brutes la plus élevée est celle observée dans le mélange du grignon d'olive lapidé – farine de blé ensemencé avec *Pleurotus pulmonarius* CBS 666497 et qui est de 29,6 %. Des augmentations de 14,75% dans le mélange grignon d'olive lapidé –orge, 15,74% dans le mélange grignon d'olive lapidé–trèfle incarnat, 16,23% dans le mélange grignon d'olive lapidé- son de blé, 17,95% dans le mélange grignon d'olive lapidé –remoulage de blé et 20,68% dans le mélange grignon d'olive lapidé –fèverole ont été observé (**Brozzoli *et al.*, 2010**).

Plusieurs auteurs déterminent la matière azotée totale, mais on peut convertir cette quantité exprimé en pourcentage en quantité de protéine brutes, est cela on admettant que toutes les protéines renferment 16% d'azote et on utilise le coefficient 6,25 pour passer de l'azote total aux protéines (**Salhi, 2004**).

$$P\% = 6,25 \times N\%$$

Avec :

6,25 = Facteur de conversion.

N % = Pourcentage d'azote.

P % = pourcentage de Protéines totales.

Karapinar (1977) et **Worgan (1978)** ont rapporté que la culture de *Sporotrichum pulverulentum* sur le résidu tamisé a augmenté la teneur en matières azotées. Une

augmentation en protéine de 31,25% a été obtenue, alors qu'une augmentation de 77,08% de protéine brutes est atteinte par cette espèce mais le grignon d'olive a subi un traitement alcalin avant cette culture.

7-Teneur en sucres totaux

La réaction à l'antrone constitue la base d'une méthode rapide pour la détermination des hexoses, acides hexouroniques et aldopentoses.

L'évolution des sucres totaux est illustrée dans la figure ci-dessous.

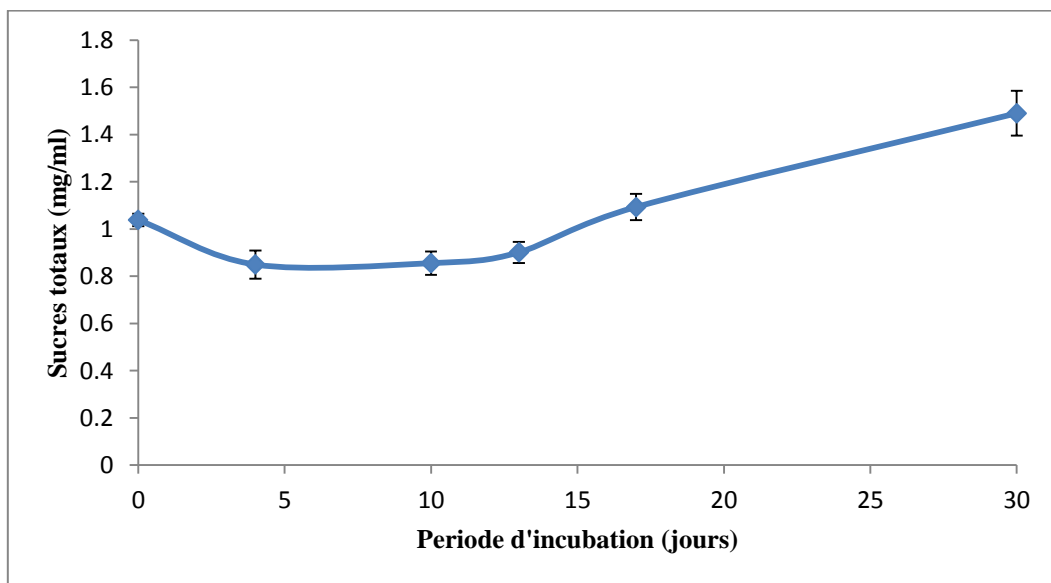


Figure 22 : Evolution du taux de sucres totaux au cours de la culture de *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur milieu submergé à base de grignon d'olive

On remarque une diminution de la teneur en sucres totaux dans le milieu après 12 jours d'incubation, suivie d'une augmentation pour arriver à $1,49 \pm 0,095$ mg/ml au 30^{ème} jour.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Lakhtar (2009)**, qui a remarqué une diminution de la teneur en sucres totaux dans le milieu suivie d'une augmentation graduelle. L'amélioration de la concentration de ces sucres est un avantage supplémentaire en plus de la réduction des lignocelluloses, dans l'amélioration de la qualité de la biomasse par le traitement biologique tel que décrit par **Jahromi et al. (2011)**.

L'étude des paramètres : sucres réducteurs, sucres totaux, a montré que la première phase de croissance a été attribuée à la minéralisation des matières facilement dégradables, suivie par la phase de dégradation des polysaccharides (hémicelluloses, cellulose) (Lakhtar, 2009).

8-Teneur en matière grasse

Les lipides présents dans les effluents d'huileries d'olive peuvent avoir un impact négatif sur les eaux. Ils forment un film impénétrable à la surface des rivières et ses bords empêchant ainsi la pénétration de la lumière et de l'oxygène (Nassif, 2004). Et sachant que des concentrations élevées en acides gras libres dans le rumen peuvent altérer la digestion et l'appétit d'où l'intérêt de s'en débarrasser.

Aussi, Ces déchets oléicoles humides abandonnées à l'air libre rancissent rapidement vu leur composition en acide gras élevé et deviennent inconsommables par les animaux, d'où l'intérêt de se débarrasser de cette matière grasse afin de conserver cet effluve (Orskov, 1977). Ces matières grasses peuvent agir par l'un ou l'ensemble des facteurs suivants:

La quantité: les ruminants sont sensibles à un apport de graisse dépassant 5% de la matière sèche de la ration (Vanschoubroek, 1966)

La nature de ces acides gras : un apport de 90 g par 24 heures d'un mélange d'acides gras C16 et C18 (dont la teneur est élevée dans les grignons) entraîne une réduction d'environ 5% du méthane dégagé (Zerawski *et al.*, 1965).

Les produits d'oxydation éventuels dont la toxicité peut être redoutables, mais les digestibilités in-vitro de grignons bruts frais et vieux d'un an sont identiques selon Theriez et Boule (1970).

En effet, la fraction lipidique, responsable en partie de la toxicité des déchets d'huileries d'olives a bien été débarrassée avec une réduction élevée.

Après biotraitement du grignon d'olive par la souche *Streptomyces sp.* S₁M₃I dans une culture submergée, et après dosage quotidien des lipides avec un intervalle de temps de 24 heures en utilisant le Soxhlet, les résultats nous montrent une réduction significative (P<0,05%), au cours des 30 jours d'incubation.

La figure 23 montre la différence entre la quantité de lipide dans le grignon d'olive avant qu'il subisse un biotraitement par la souche, et après ce traitement. Un taux de réduction de 82,23% a été observé.

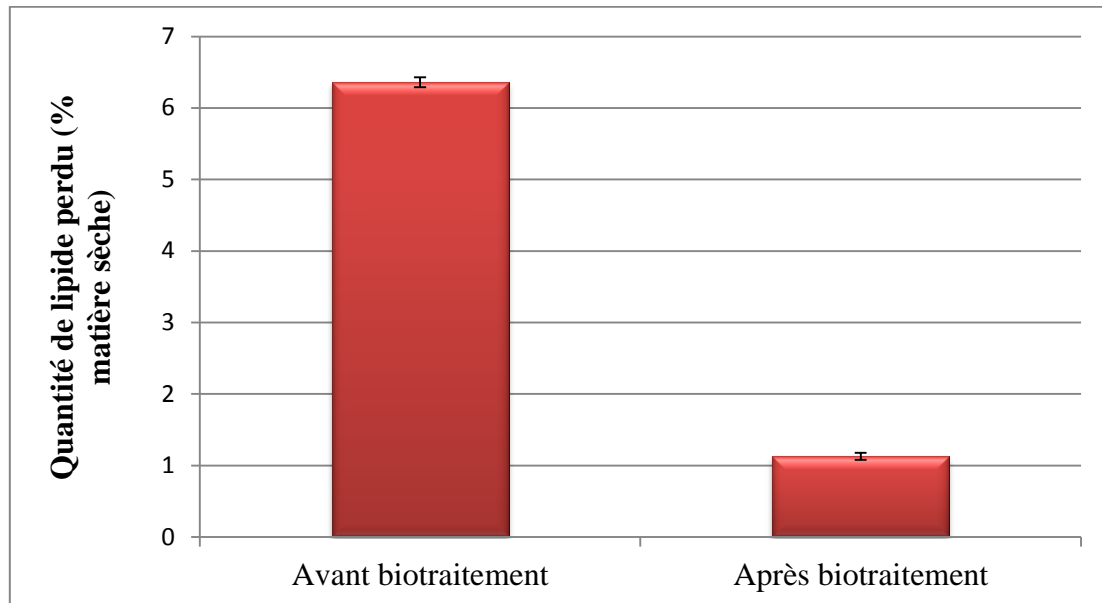


Figure 23: Effet de biotraitement par *Streptomyces sp.* S₁M₃I sur la composition en matière grasse du grignon d'olive

Vu que le grignon d'olive utilisé dans cette étude est brut, et contient une quantité importante de matières grasses $6,36 \pm 0,06\%$ (matière sèche) résiduelle, la production en biomasse et des enzymes comme les lipases sera importante (Cordova *et al.*, 1998). Cette enzyme est activée par la présence d'une interphase lipide-eau où la phase lipidique est constituée par des triglycérides contenant des acides gras de longue chaîne. Ce phénomène est appelé activation interfaciale.

On peut suggérer que les lipides constituent une source de carbone et d'énergie plus disponible, et peuvent ainsi décaler la dégradation de la lignocellulose par *Streptomyces sp.* S₁M₃I à un stade ultérieur, mais dans le cas où les niveaux d'huile seront faibles (Shabtay *et al.*, 2009).

En effet, Cordova *et al.* (1998) ont montré que la présence d'acide oléique dans le grignon d'olive est utilisé comme un inducteur et augmente la production de lipase et que ces enzymes sont stables pendant la culture. L'hydrolyse de la matière grasse de grignon d'olive est peut être due à la production des enzymes lipolytiques (lipase) par *Streptomyces sp.* S₁M₃I soit une hydrolyse enzymatique, ou bien une hydrolyse spontanée qui se produit au cours du stockage ou du traitement thermique (40°C), auto catalysé par les acides gras libres, et aussi favorisé à une activité d'eau élevé.

Les aliments riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne (LC) sont recommandés pour leurs effets bénéfiques sur la santé, mais, ils peuvent former des espèces

réactives toxiques comme le 4-hydroxy-hexéanal (4-HHE) par oxydation (**Awada, 2012**). Sachant que, la matière grasse des grignons est très riche en acides gras C16 et C18 (longue chaîne) insaturés qui constituent 96% du total des acides gras et qui s'oxydent facilement, donc, la formation de composé toxique, d'où la conclusion que notre souche convient pour délipider le grignon d'olive et pour ne garder qu'une petite quantité qui présente des avantages car les acides gras assurent un rôle fondamental dans la structure des cellules et le stockage de l'énergie. Parailleurs, les matières grasses du grignon brut peuvent constituer un apport d'énergie important (1 g de lipide donne environ 9,3 Kcal).

Néanmoins, les grignons sont très vulnérables à l'oxygène atmosphérique responsable en grande partie de l'altération des propriétés organoleptiques. **Theriez et Boule (1970)** ont noté que l'huile rancie des grignons ne semble pas être la cause de la chute de digestibilité qu'ils ont observé in-vitro, les résultats obtenus avec des grignons amassés pendant plus d'un an étant les mêmes que ceux de grignons frais.

Une étude a été faite sur *Rhizomucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermoascus aurantiacus*, et *Rhizomucor pusillus* cultivé en FMS à base de grignon d'olive, montre que ces souches produisent une quantité élevée de lipases (**Lamrani, 2009**).

Conclusion

L'objectif de ce travail était de toucher à la valorisation du sous-produit de l'industrie oléicole à savoir le grignon d'olive par la culture de *Streptomyces sp. S₁M₃I* en fermentation submergée, pour i) la production d'enzymes lignocellulosique pour des applications industrielles et ii) pour la biodégradation des constituants pariétaux difficilement dégradables pour l'alimentation animale.

La dégradation biologique de la lignocellulose, issue des déchets et sous-produits agricoles et industriels, est plus ou moins aisée ; cela dépend de son origine et du but recherché.

Le grignon d'olive peut être utilisé à des fins diverses de valorisation de la biomasse et pour la diminution de la pollution de l'environnement.

En effet, le grignon d'olive non inoculé avec *Streptomyces sp. S₁M₃I* s'est avéré pauvre en protéines brutes (5,09%), mais riche en polyphénols (1,5%), en matière grasse (6,36%) et en fibres. Toutefois, la biodégradation de ce grignon a entraîné une augmentation de 34,18% des protéines brutes et une réduction de 44% en polyphénols et 82,23% en matière grasse, ces paramètres permettent de mettre à niveau les valeurs nutritionnelles de grignon pour son utilisation comme aliment pour les ruminants.

Une production élevée d'enzymes lignocellulosiques, à savoir la xylanase en première lieu, avec une production de $5,599 \pm 0,006$ U/ml à un pH de 7,4 et à une température de 40°C, fait que le grignon d'olive peut être un bon substrat pour produire cette enzyme, suivi par la cellulase avec une production de $1,445 \pm 0,016$ U/ml et de la laccase avec une production de $0,17 \pm 10^{-2}$ U/ml.

La biodégradation de grignon d'olive par *Streptomyces sp. S₁M₃I* en culture submergée a entraîné une diminution notable des constituants suivants: NDF avec une réduction de 30,95%, ADF avec une réduction de 22,88% et ADL avec une réduction de 21,16%, ce qui suggère une digestibilité accrue du substrat résultant.

Donc, les cultures submergées pour la fermentation microbienne seraient une alternative au traitement chimique et physique, pour améliorer la qualité de grignon d'olive, en vue de son utilisation comme substrat de production enzymatique et comme aliment de bétails.

Cependant, d'autres recherches dans ce domaine sont nécessaires pour : vérifier l'efficacité de ce substrat plus au moins dégradé sur la performance des animaux vivants.

Un traitement alcalin du grignon d'olive avant fermentation submergée peut être une amélioration du substrat vis-à-vis du complexe enzymatique lignocellulosique de *Streptomyces sp. S₁M₃I*.

L'augmentation de la durée d'incubation peut également augmenter et améliorer l'accessibilité de substrat lignifié.

Aussi comme suite à ce modeste travail, d'autres perspectives peuvent être envisagées, à savoir :

- Co-culture de cette souche avec un champignon de la pourriture blanche.
- L'addition d'autres sous-produits au grignon d'olive tel que le lactosérum...pour en améliorer la valeur nutritionnelle.

A

- Abid O., Najar T., Ghorbel R., Ben romdhane A. (2014).** Effect of fungal treatment by solid state fermentation on the nutritive value of Olive Cake. *Renc. Rech. Ruminants*. 21: 169-170.
- Aftab A. et Vermette P. (2008).** Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochem. Eng. J.* 40: 399-407.
- Agosin E., Daudiji J., Odier E. (1985).** Screening of white-rot fungi on ¹⁴C lignin-labeled and ¹⁴C whole labeled wheat straw. *Appl. Microbial. Biot.* 22: 132-138.
- Alburquerque J.A., Gonzalez J., Garcia D., Cegarra J. (2004).** Agrochemical characterization of "alpurejo" a solid by-product of two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol.* 9: 195-200.
- Ali M., Sreekrishnan T.R. (2001).** Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents. *Adv. Environ. Res.* 5: 175-196.
- Alibés X., Berge P.H. (1983).** Valorización de los subproductos del olivar como alimentos para los rumiantes en España. División de la Production et la Santé Animale. FAO, Roma.
- Alibes X., Berge P., Martilotti F. Nefzaoui A., Zoiopoulos P. (1984).** Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. pp 43.
- Amanullah A., Justen P., Paul G.C., Nienow A. w. et Thomas C. R. (2000).** Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. eng. J.* 5 : 109-114.
- Amirante P., Direnzo L., Bianchi B. et Catalano P. (1993).** Evolution technologique des installations d'extraction de l'huile d'olive. *Olivae*. 48.
- Antonopoulos V.T., Hernandez M., Arias M.E., Mavrakos E. et Ball, A.S. (2001).** The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Appl. Microbio. Biot.* 57: 92-97.
- Archibald F.S., Bourbonnais R., Jurasek L., Paice M.G., Reid I.D. (1997).** Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.* 53, 215-236.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. et White R. P. (1985).** Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 86-98.
- Athanasios S.S., Elia I., Petalas A. V., Halvadakis P.C. (2008).** Removal of total phenols from olive-mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *J. Hazard. Mater.* 160 : 408-413.
- Awada M. (2012).** L'oxydation modifie les effets métaboliques d'acides gras polyinsaturés de la série n-3 incorporés par différents vecteurs dans des régimes hyperlipidiques : contribution

Références bibliographiques

de l'absorption intestinale et de la réactivité cellulaire du 4-hydroxy-hexéanal. Thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. p121.

B

- Bachelier G. et Gavinelli R. (1966).** Dosage global des glucides du sol par les méthodes colorimétriques à l'athrone à l'orcinol. Cah. Orstom. sér. Pédol. IV.
- Bajaj B.K., Singh N.P. (2010).** Production of xylanase from alkalitolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its Purification, and characterization. Appl. Biochem. Biotechnol. 162: 1804-1818.
- Bailey M.J., Biely P., Poutanen K. (1992).** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23: 257-270.
- Ballerini D. et Alazard-Toux N. (2006).** Les biocarburants : état des lieux, perspectives et enjeux du développement. Edts . Technip, Paris. p 264.
- Barrington S., Choiniere D., Trigui M., Knight W. (2002).** Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. Bioresource Technol. 83: 189–194.
- Basilio A., González I., Vicente M.F., Gorrochategui, J., Gabello A., González A., Genilloud O. (2003).** Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. J Appl. Microbiol. 95: 814–823.
- Bastos A. C. et Magan N. (2009).** *Trametes versicolor*: potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. Inter. Biodeter. Biodegr. 63: 389–394.
- Baumgartner J. G. (1949).** Canned foods: an introduction to their microbiology. J. and A. Churchill LTD London. Ed 278.
- Becker K. et Ohlde G. (1965).** Suitability of cell-wall constituents as predictors of organic matter digestibility in some tropical and subtropical by-products. Anim. Feed Sci. Tech. 7: 191–199.
- Bedford M.R. et Classen H.L. (1992).** The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In : Visser J, Beldman G, Vansomeren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases, Elsevier, Amsterdam. 361-370.
- Beg Q.K., Bhushan B., Kapoor M., Hoondal G.S. (2000).** Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. World J. Microb. Biot. 16: 211-213.
- Benimeli C.S., Amoroso M.J., Chaile A.P., et al. (2003).** Isolation four aquatic streptomycetes strains capable of growth on organochlorine pesticides. Bioresource Technol. 89 : 133-138.

Références bibliographiques

- Bensemmane A. (2009).** Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. revue filaha. 4.
- Biely P., Markovic O. et Mislovicova D. (1985).** Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. Anal. Biochem. 144: 147–151.
- Boucherba N., Benallaoua S., Copinet E., Hebal H., Duchiron F. (2011).** Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. Process. Biochem. 46: 519- 525.
- Boulekbache-Makhlouf L., Medouni L., Medouni-Adrar S., Arkoub L., Madani K. (2013).** Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. Ind. Crop. Prod. 49: 668-674.
- Bourbonnais R., Paice MG. (1990).** Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. Febs. Lett. 267: 99-102.
- Brock J. et Madigan M. (1979).** Biology of microorganisms 5 th edition. Filamentous Actinomycete. 766-769.
- Brozzoli V., Bartocci S., Terramoccia S., Contò G., Federici F, D'Annibale A., Petruccioli M. (2010).** Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed. Enz. Microb. Tech. 46: 223–228.

C

- Camarillo R., Rincón J. (2012).** Effect of inhibitory compounds on the two-phase anaerobic digestion performance of diluted wastewaters from the alimentary industry. Chem. Engine. J. 193–194:68–76.
- Chaloux N. (1993).** Approche expérimentale de la biodégradabilité des pailles de blé. Application à la quantification des matières premières et des composts pour la production de champignon de couche. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux I. p220.
- Chater K.F., et Merrick M.J. (1979).** Streptomyces. Developmental biology of procaryotes .Parish J.H. ed. University of California press. 93-114.
- Chater K.F. et Hopwood D.A. (1989).** Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. Genet. of Bacterial Diversity (HopwoodDA & ChaterKF).129–150.
- Chen C., Fales S.L., Varga G.A., Royce D.J. (1995).** Biodegradation of cell wall components of maize stover colonized by white-rot fungi and resulting impact on in vitro digestibility. J. Sci. Food Agric. 68 : 91–98.
- Chouchene A. (2010).** Etude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicole par voies thermique et physic-chimique. Thèse de Doctorat. Université de Haute Alsace – Mulhouse. p178.
- Claus H. (2004).** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35 (1-2): 93-96.

- C.O.I. : Conseil oléicole international. (2009).** Production mondiale d'huile d'olive. Tableau 1. Novembre 2009.
- Cordova J., Nemmaoui M., Ismaïli-Alaoui M., Morin A. C., Roussos S., Rimbault M. et Benjilal B. (1998).** Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Catal B-Enzym.* 5: 75-78.
- Corrall O. L., Villaseñor-Ortega F. (2006).** Xylanases Advances. *Agri. Food Biotechnol.* ISBN: 81-7736-269-0, Editors: Ramón Gerardo GuevaraGonzález and Irineo Torres-Pacheco. 305-322.
- Couto S. R., et Toca Herrera J. L. (2006).** Industrial and biotechnological applications of laccases. *Biotechnol. Advances.* 24: 500–513.
- Criquet S., Tagger S., Vogt G., Iacazio G., Le Petit J. (1999).** Laccase activity of forest litter. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1239-1244.
- Cuevas M., García F., Hodaifa G., Sánchez S. (2015).** Oligosaccharides and sugars production from olive stones by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. *Ind. Crop. Prod.* 70: 100–106.

D

- Dary A., Bourget N., Girard N., Simonet J-M., Decaris B. (1992).** The amplification of a particular DNA sequence reversibly prevents spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens* RP181110. *Res. Microbiol.* 143: 99–112.
- Dashti N., Ali N., Khanafer M., Al-Awadhi H., Sorkhoh N., Radwan S. (2015).** Olive-pomace harbors bacteria with the potential for hydrocarbon biodegradation, nitrogen-fixation and mercury-resistance: Promising material for waste-oil-bioremediation. *J. Environ. Manage.* 155: 49-57.
- Davies F.L. et Williams S.T. (1970).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 1/ The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* 2: 227-238.
- Delmer D.P., Amor Y. (1995).** Cellulose biosynthesis. *Plant Cell.* 7: 987-1000.
- Demain A.L. (2000).** Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.* 18(6): 499-514.
- Demirabas A. (2004).** Effects of temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 72: 243-251.
- Dhiman S.S., Sharma J. et Battan B. (2008).** Industrial applications and future prospects of microbial xylanases. *Biores.* 3(4): 1377-1402.

Références bibliographiques

- Di-Giovacchino L. (1996).** L'influence des systèmes d'extraction sur la qualité de l'huile d'olive. *Olivea*. 63: 52-63.
- Domínguez A., Couto S. R. et Sanromán M. A.(2005).**Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World. J. Microb. Biot.* 21 : 405–409.
- D.P.V. : direction de la production végétale. (2009).** Département lié au ministère de l'agriculture, Rabat, Maroc.

E

- El-Ahmady El-Naggar N., Sherief A. A. et Shawky Hamza S. (2011).** Bioconversion process of rice straw by thermotolerant cellulolytic *Streptomyces viridochromogenes* under solid-state fermentation conditions for bioethanol production. *Afr. J. Biotechnol.*10 (56): 11998-12011.
- El-Ahmady El-Naggar N. et Abdelwahed N.A.M. (2012).** Optimization of process parameters for the production of alkali-tolerant carboxymethyl cellulase by newly isolated *Streptomyces* sp. strain NEAE-D. *Afr. J. Biotechnol.* 11(5): 1185-1196.
- El-Batal I., ElKenawy M., Yassin Aymen S., Magdy A. A. (2015).** Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *biotechnol. rep.* 5: 31-39.
- El hachemi C. (2010).** Effet de différents modes de séchage sur la stabilité des qualités nutritionnelles et microbiologiques du grignon d'olive Durant 3 mois de stockage. Thèse de Doctorat. Université d'Oran Es-Senia .p118.
- Eriksson K.E., Wood T.M. (1985).** CHAPTER 17 - Biodegradation of Cellulose. *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components.* 469-503.
- Esteve C., Marina M.L., García M.C. (2015).** Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chem.* 167: 272-280.
- Evans C. S. (1985).** Laccase activity in lignin degradation by *Coriolus versicolor* in vivo and in vitro studies. *FEMS Microbiol. Lett.* 17(3): 339-343.
- Evans C. S., Dulton M. V, Guillen F. et Veness R. G. (1994).** Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 235–240.

F

- Ferhat R., Laroui S., Zitouni B., Lekbir A., Abdeddaim M., Smaili N., Mohammedi Y. (2014).** Experimental study of solid waste olive's mill: extraction modes optimization and physicochemical characterization. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 4: 16-23.

- Fermor T.R., Macauley B.J. (1991).** Microbiology factor contributing to selectivity and nutritional quality of mushroom compost. In: Nair, N.G.T. (Ed.), Proceedings of AMGA/ISMS International Workshop–Seminar on *Agaricus* Compost. AMGA Limited, Sidney. 26-45.
- Filidei S., Masciandaro G., Ceccanti B. (2003).** Anaerobic digestion of olive oil mill effluents: evaluation of wastewater organic load and phytotoxicity reduction. *Water Air Soil Poll.*45: 79-94.
- Fonty G., Jouany J.P., Forano E. et Gouet P. (1995).** L'écosystème microbien du réticulorumen. In : Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion. Editions INRA. 299-348.
- Fukamizo T., Brzezinski R. (1997).** Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174: a comparative review of its structure and function. *Biochem. Cell. Biol.*75: 687–696.
- G**
- Garcia-Ibanes P., Sánchez M., Cabanillas A. (2006).** Thermogravimetric analysis of olive-oil residue in air atmosphere. *Fuel Proc. Technol.* 87: 103-107.
- Girio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S. et Bogel-Lukasik R. (2010).** Hemicelluloses for fuel ethanol. *Biores. Technol.* 101 : 4775–4800.
- Gilbert H.J., Hazlewood G.P. (1993).** Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139: 187-194.
- Goodfellow M. (1971).** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 69: 33-90.
- Goodfellow M. et Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H-J., Trujillo M. E., Suzuki K., Ludwig W. et Whitman W. B. (2012).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition, Volume Five. The Actinobacteria, Part A and B.*
- Graça M.A.S., Bärlocher F. (2005).** Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide, Printed in The Netherlands. 177 – 184.
- Grabski A.C., Jeffries T.W. (1991).** Production, purification and characterization of 1,3-(1-4)-endoxy-lanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. *Appl. Environ Microbiol.* 57: 987-992.

H

- Haddadin M.S., Al-Natour R., Al-Qsous S., Robinson R.K. (2002).** Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresource Technol.* 82: 131–137.
- Haddadin S.Y., Haddadin J., Arabiyat O.I., Hattar B. (2009).** Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technol.* 100: 4773-4782.
- Hamdi M. et Ellouz R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed process. *Environ. Technol.* 19: 183-188.
- Hamelinck C. N., Hooijdonk G. V., Faaij A. P.C. (2005).** Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenerg.* 28: 384-410.
- Hammel K.E. (1997).** Fungal degradation of lignin. In *Driven by nature: Plant litter quality and decomposition*. Gadisch G. and Giller K.E. Eds, CAB International.
- Hammad M., Badarneh D., Tahboub K. (1999).** Evaluating variable organic waste to produce methane. *Energ. Convers. Manage.* 40 : 1463-1475.
- Hasley C., Leclerc H. (1993).** *Microbiologie des Eaux d'Alimentation*. Tec & Doc : Paris.
- Hasper A. A., Dekkers E., Mil M. V., Van de Vondervoort P. j. I. et De Graaff L. H. (2002).** Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4) : 1556-1560.
- Hattenschwiler S. et Vitousek P.M. (2000).** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *TREE.* 15: 238-243.
- Hourinouchi S. (2002).** A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci.* 7 : 2045-2057.

I

- INRA: Institut National de Recherche Agro-alimentaire. (2014).**
- Iyayi E.A., Aderolu Z.A. (2004).** Enhancement of the feeding value of some agro industrial by products for laying hens after their solid state fermentation with *Trichoderma viride*. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 182–185.

J

- Jahromi M.F., Liang J.B., Rosfarizan M., Goh, Y.M., Shokryazdan P., Ho Y.W. (2011).** Efficiency of rice straw lignocelluloses degradability by *Aspergillus terreus* ATCC 74135 in solid state fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 4428–4435.
- Jauhiainen J., Martín-Gullón I., Conesa Juan A., Font R. (2005).** Emissions from pyrolysis and combustion of olive oil solid waste. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 74: 512-517.
- Jeffries T.W., Choi S., Kirk T.K. (1981).** Nutrition regulation of lignin degradation by *Phanerocheate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 290-296.
- Joseleau J.P., Comtat J., Ruel K. (1992).** Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*. Elsevier, Amsterdam. 1-15.

K

- Kademi A., Ismaili-Alaoui M., Houde A. (2003).** Des arômes synthétiques...au naturel. Centre de Recherche et de Développement sur les aliments Saint Hyacinthe, Québec.
- Karapinar M. (1977).** An investigation on the production of high quality protein foods for livestock production from the waste product of olive oil extraction process. National College of Food Technology, Weybridge, UK.
- Kendrick K.E., Ensign J.C. (1983).** Sporulation from *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Bacteriol.* 155: 357-366.
- Kersten P. J., Kalyanaraman B., Hammel K. E., Reinhammar B. et Kirk T. K. (1990)** Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* 268: 475-480.
- Kim B. K., Lee B. H., LeeY. J., Jin I. H., Chung C. H. et Lee J. W. (2009).** Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53. *Enz. Microb. Technol.* 44: 411-416.
- Kinfemi A.A., Mohamed M.I., Ayoade J.A. (2009).** Biodegradation of cowpea shells by *Pleurotus* Specie for it use as ruminant feed. *World J. Agric. Sci.* 5: 639–645.
- Kluepfel D., Vats-Mehta S., Aumont F., Shareck F. et Morosoli S. (1986).** Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Appl. Biochem. Biotech.* 72: 629-639.
- Kumar R., Singh S. et Singh V.O. (2008).** Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives. *J. Ind. Microbio. Biot.*35: 377 – 391.

Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F. J. et Alcalde M. (2007). Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends. Appl. Microbio. Biot.* 1: 233–245.

Kuo M.J., Hartman P.A. (1966). Isolation of amylolytic strains of *Thermoactinomyces vulgaris* and production of thermophilic actinomycete amylases. *J. Bacteriol.* 92 (3) : 723–726.

ℒ

Lamrani K. (2009). Etude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maâsra du Maroc. Thèse de Doctorat. Université Mohamed V – AGDAL, Faculté des Rabat. p 149.

Ladisch M.R., Lin K.W., Voloch M. et Tsao G.T. (1983). Process consideration in the enzymatic hydrolysis of biomass to ethanol. *Enzyme Microb. Tech.* 5: 82-102.

Lakhtar H., Ismaili-Aiaoui M., Philippoussis A., Perraud Gaime I., Roussas S. (2010). Screening of *Lentinula edodes* strains cultivated on madel olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenols biodegradation. *Int. Biodeter. Biodeg.* 64: 167-172.

Lakhtar H. (2009). Culture du *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines. Thèse de Doctorat. Université Paul, AIX MARSEILLE III. p121.

La Rubia-García M., Yebra-Rodríguez Á., Eliche-Quesada D., Francisco A. Corpas-Iglesias, López-Galindo A. (2012). Assessment of olive mill solid residue (pomace) as an additive in lightweight brick production. *Constr. Build. Mater.* 36: 495–500.

Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques.* Ed. Masson. Paris. p 481.

Lee J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56: 1–24.

Lechevalier M.P. et Lechevalier H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 435-443.

Lechevalier. M.P. et Lechevalier. H.A. (1970a). Composition of whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes in: *The Actinomycetales.* Prauser. H; Fisher Verlag. G; Jena. 311-316.

Lechevalier M. P., De bievre C. et Lechevalier H. A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 5: 249-260.

Lechevalier M. P., Prauser H., Labeda D. P et Ruan J. S. (1986). Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36 : 29-3737.

Références bibliographiques

- Leilosa M., Ulmer D., Fiechter A. (1983).** Problem of oxygen transfer during degradation of liginin by *Phanerochaete chrysosporium*. Eur. J. Appl. Microbial Biotechnol. 17: 113-116.
- Li X. (1997).** *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new cellulolytic member of the genus *Streptomyces*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 443–445.
- Liu J., Yuan X., Zeng G., Shi J. et Chen S. (2006).** Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. Process Biochem. 41: 2347-2351.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem.193: 265–75.

M

- Madhavi V. et Lele S. S. (2009).** Laccase: properties and applications. Bioresources Technol. 4: 1694–1717.
- Maheswari U. et Chandra T. S. (2000).** Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. World J. Microbiol. Biotechnol. 16 : 257-263.
- Mariat F., Sebald M. (1990).** Les actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- Martirani L., Giardina P., Marzullo L., Sannia G. (1996).** Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Water Res. 30: 1914–1918.
- Mc Cann M.C., Roberts K. (1991).** Architecture of the primary cell wall in: C. W. Lloyd (ed.), the cytoskeletal basis of plant growth and form, Academic Press, New York, N. Y.109-111.
- Mennane Z., Tada S., Aki I., Faid M., Hassani S., Salmaoui S. (2010).** Caractérisation physico-chimique et microbiologique des grignons d'olive de 26 huileries traditionnelles de la région de Beni Mellal (Maroc).Technologies de laboratoire. 5, N°19.
- Meziane S. (2013).** Modélisation de la cinétique du séchage convectif du grignon d'olive. Energies Renouvelables.16: 379 – 387.
- Milanese M., Arturo D., Andrea R., DomenicoL. (2014).** Numerical study of anaerobic digestion system for olive pomace and mill wastewater. Energ. Proce. 45, 141-149.
- Miller G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar Anal. Chem. 31 : 426–428.
- Moumene M., Saidi M., Hassissene N., Zaidi F. (2008).** Effet de la culture de *Phanerochaete chrysosporium* sur la composition chimique et la digestibilité à la cellulase du grignon d'olive. Premières Journées Algéro-Tunisiennes de Microbiologie.

Moyson E. et Verachtert H. (1991). Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *J. Applied Microbiol. Biotechnol.* 36: 421-424.

N

Nanjwade B.K., Chandrashekhara S., Shamarez A.M., Goudanavar P.K. et Manvi F.V. (2010). Isolation and Morphological Characterization of Antibiotic Producing Actinomycetes. *Trop. J. Pharm. Res.* 9: 231-236.

Nascimento R.P., Coelho R.R.R., Marques S. Alves L., Girio F.M., Bon E.P.S., et al. (2002). Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces sp.* Strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microbial Technol.*

Nassif D. (2004). Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Libanaise, Liban. p 41.

Nefzaoui A., Abdouli H., Ksair H. (1981). Séminaire international sur la valorisation des sous produits de l'olivier. FAOPNUD, Monastir, Tunisie. 67-72.

Nefzaoui A., Marchaud S. et vandebelle M. (1982). Valorisation de la pulpe d'olive dans l'alimentation des ruminants. In :Tropical animal production for the benefit of man. International colloquium, Antwerp, Belgium. 309-314.

Nefzaoui A., Hellings P. et Vanbelle M. (1983). Ensiling olive pulp with ammonia: Effects on voluntary intake and digestibility measured by sheep. 34th. Annual Meeting of the study commission EAAP Madrid.

Nefzaoui A. (1984). Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. In : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude FAO production et santé animales. 43.

Nefzaoui A. (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. *Olivae.* 19 : 17-21.

Neifar M., Jaouani A., Ayari A., Abid O., Ben Salem H., Boudabous A., Najjar T., Ellouze Ghorbel R. (2013). Improving the nutritive value of Olive Cake by solid state cultivation of the medicinal mushroom *Fomes fomentarius*.. *Chemosphere* .91: 110–114.

Niraula N.P., Shrestha P., Oh T.J., Sohng J.K. (2010). Identification and characterization of a NADH oxidoreductase involved in phenylacetic acid degradation pathway from *Streptomyces peucetius*. *Microbiol. Re.*165 : 649–656.

Nkhili E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Université d'avignon et des pays de vaucluse. p328.

O

- O'Donnell A. G., Goodfellow M. et Minnikin D. E. (1982).** The analysis of actinomycete wall amino acids by gas chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 75-78.
- Ohlde G., Becker K. (1982).** Suitability of cell-wall constituents as predictors of organic matter digestibility in some tropical and subtropical by-products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 7: 191-199.
- Orskov E.R. (1977).** Nutritionam principals and evaluation of by-products, waste products, and new feeds for ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 4: 165-175.

P

- Pagnanelli F., Viggi C.C., Toro L. (2010).** Development of new composite biosorbents from olive pomace wastes. *Appl. Surf. Surf.* 256: 5492-5497.
- Palmvist E. et Hahn-Hägerdal B. (2000).** Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhinibitors and mecanismes of inhibition. *Biores. Technol.*74: 25-53.
- Perraud-Gaime I., Labrousse S., Roussos S. (2010).** Conservation des résidus de l'agro-industrie oléicole par ensilage : de l'isolement de bactéries lactiques endogènes à l'étude de faisabilité. Ln Karray B., Kecharem J. Roussas S. (Eds) Actes Olivebioteq-2009, Sfax, Tunisia.
- Perrin J. (1992).** Minor Components and Natural antioxidants of olives and olive oils .*Rev. Franc.*
- Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C., Flores, M. E. (2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(1): 269–273.

R

- Raimbault M. et Alazard D. (1980).** Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9 : 199-209.
- Ranalli A. (1991).** L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. *Références aux normes italiennes en la matière. Olivae.* 39 : 18-34.
- Rawashdeh R., Saadoun I. et Mahasneh A. (2005).** Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces sp.* (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato

Références bibliographiques

pomace. Department of Applied Biological Sciences. Jordan. University of Science and Technology. 4: 251-255.

- Receveur V., Cejek M., Schulein M., Panine P. et Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *J. Biol. Chem.* 277 (43): 40887-40892.
- Ribeiro D. S., Henrique S. M.B., Oliveira L. S., Macedo G. A., et Fleuri L. F. (2010).** Enzymes in juice processing: a review. *Inter. J. Food Sci. Tech.* 45: 635–641.
- Riva S. (2006).** Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 24: 219–226.
- Romero S., Blánquez P., Caminal G. et al. (2006).** Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochem. Engin. J.* 31: 42–47.
- Roriz M. S., Osma J. F., Teixeira J. A. et Couto S. R. (2009).** Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. *J. Hazard. Mater.* 169: 691–696.
- Roussos S., Perraud-Gaime I., Lakhtar H., Aouidi F., Labrousse Y., Belkacem N., Macarie H., Artaud J. (2009).** Valorisation biotechnologique des sous-produits de l'olivier par Fermentation en Milieu Solide. *Olivebioteq.* 293-300.
- Royse D.J. et Sanchez-Vazquez J.E. (2001).** Influence of substrate wood-chip particle size oshiitake (*Lentinula edodes*) yield. *Biores. Technol.* 76: 229-233.
- Royer J.C., Nakas J.P. (1989).** Xylanase production by *trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb.* 11 : 405–410.
- Ruiz-Barba J.L., Brenes-Balbuena M., Jiménez-Diménez R., Garcia-Garcia P. et Garrido-Fernandez A. (1993).** Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kind of olive brine. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 15-19.

S

- Saha B.C. (2002).** Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochem.* 37 : 1279–1284.
- Salhi-Mohand oussaid O. (2004).** Valorisation de sous-produits et déchets lignocellulosiques par culture de microorganismes cellulolytiques. Thèse de Doctorat. Insitut national agronomique El-harrache. p 131.
- Salmones D., Mata G. (2002).** Detection of extracellular enzymes produced by *Pleurotus spp.* grown on coffee pulp. In: Sanchez, J.E., Huerta, G., Montiel, E. (Eds.), *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Universidad Autonoma de Morelos, Cuernavaca. 213–219.

Références bibliographiques

- Salmones D., Mata G., Waliszewski K.N. (2005).** Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technol.* 96 : 537–544.
- Sansoucy R. (1984).** Utilisation des sous- produits d'olivier en alimentation animale.in séminaire sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Tunisie, PNUD/FAO/COI. 73-87.
- Saradouni N., Penninckx M.J., Salhi O. (1999).** High level production production of thermostable β -xylanase, CMC-ase and β -glucosidase by an *Aspergillus fumigatus* (*Fresenius*) *albino* mutant strain. *Sci. technol.* 12: 65-70.
- Sarlos G., Haldi P.A et Verstraete P. (2003).**Traité de Génie civil de l'EPFL. 21, Systèmes Energétiques.
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M. et Aloui F. (2000).** Detrimental effects high molecularmasse polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochem.*35: 725-735.
- Shabtay A., Hadar Y., Eitam H, Bros A., Orlov A., Izhaki I., Kerem Z., Tadmor Y. (2009).** The potential of *Pleurotus*-treated olive mill solid waste as cattle feed. *Bior. Technol.* 100: 6457–6464.
- Shraddha R.S., Shekher R., Sehgal S., Kamthania M. et Kumar A. (2011).** Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. review enzyme research. 11pp.
- Smaoui S. (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). p207.
- Sobal J. (2002).** Appetite for integration: interdisciplinary careers for interdisciplinary areas. *Appetite.*38: 71-72.
- Stasinakis S., Irene E., Anastasios V., Petalas C., Halvadakis P. (2008).** Removal of total phenols from olive-mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace, *J. Hazard. Mater.*160: 408-413.
- Stackebrandt E., Fowler V. J., Fiedler F. et Seiler H. (1983).** Taxonomic studies on *Arthrobacter nicotianae* and related taxa: description of *Arthrobacter uratoxydans* sp. nov. and *Arthrobacter sulfureus* sp. nov. and reclassification of *Brevibacterium protophormiae* as *Arthrobacter protophormiae* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 470-486.
- Sun R., Lawther J.M., Banks W.B. (1997).** A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Ind. Corp.Prod.* 6: 1-8.
- Sunna A., Antranikian G. (1998).** Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol.* 17: 39-67.

Références bibliographiques

Sugiyama J., Persson J. et Chanzy H. (1991). Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native cellulose. *Macromolecules*. 24: 2461–2466.

Sykes G., Skinner F.A. (1973). Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Academic press. London. New York.

T

Tamburino V., Zimbone S. M. et Quottrone P. (1999). Accumulation et écoulement des margines sur le sol agrivole. *Olivae*. 76 : 36-45.

Techapun C., Charoenrat T., Poosaran N., Watanabe M., Sasaki K. (2002). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces sp.* Ab106. *J. Biosci Bioeng*. 93 : 431–433.

Theriez M. et Boule G. (1970). Valeur alimentaire du tourteau d'olive. *Ann. Zootech*. 19: 143–157.

Topal H., Atimtay A.T., Durmaz A. (2003). Olive cake in a circulating fluidized bed. *Fuel* .82: 1049-1056.

Tuncer M., Ball A. S., Rob A., Wilson M. T. (1999). Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme Microb. Tech*. 25: 38-47.

Tuor U., Winterhalter K. et Fiechter A. (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol*. 41: 1–17.

V

Vaccarino C., Tripodo M.M., Gregorio A., Salvo F., Laganag G. (1982). Amélioration de la valeur nutritionnelle des grignons d'olive par un traitement au carbonate de sodium. *Les Oléagineux*. 37: 307-312.

Van Soest P.J. (1973). Collaborative study of acid-detergent fibre and lignin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 50 : 781–784.

Vanschoubroek F. X. (1966). the utilization of fats animal nutrition; Proceeding of the world congress on animal feeding. Madrid. Spain. 1 : 217-262.

Vasquez-Roncero A., Maestro-Duran R. et Graciani-Constante E. (1974). Componentes fenolicos de la aceituna. II-Polifenoles tel alpechin. *Grasas y Aceites*. 25: 341-345.

W

Références bibliographiques

- Wang S.L., Yen Y.H., Shin I.L., Chang A.C., Chang W.T., Wu W.C., et al. (2003).** Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb. Technol.* 33 : 917–25.
- Warzywoda M., Ballerini D. et Monot F. (2011).** Procédé de Production d'Enzymes Cellulolytiques et Hémicellulolytiques Utilisant les Résidus de Distillation de Fermentation Ethanolique d'Hydrolysats Enzymatiques de Matériaux Lignocellulosiques, Fascicule de Brevet Européen. p44.
- Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch. Microbiol.* 176: 386–390.
- Wertz J. (2010).** Le bioraffinage ou valorisation optimale de la biomasse. *Val.biom.* p 11.
- Whitaker A. (1992).** Actinomycetes in submerged culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 32: 23-35.
- Worgan J.T. (1978).** Feeding value improvement of by-products by microbiological processes. In *New Food Sources for Animal Production*. Editors - Gomez - Cabrera, A. and Garcia de Siles, J.T. Escuela Superior de Ingenieros Agronomos - Cordoba - Espagne. pp 24–45.

Y

- Yacoub M.R., Lemièrre C., Labrecque M., Malo J.L. (2005).** Occupational asthma due to bethabara wood dust. *Allergy.* 60 : 1544-1545.
- Yacoub Y. (1997).** Valorisation des sous-produits. *L'investisseur agricole.* 19: 17-18.
- Yamaguchi T. (1965).** Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *Bact.* 89: 444-453.

Z

- Zenjari B., El Hajjouji H., Baddi G.A., Bailly J.R., Revel J.C., Nejmeddine A. et Hafidi M. (2006).** Eliminating toxic compounds by composting olive mill wastewater-straw mixtures. *J. Hazard. Mater.* 138: 433-437.
- Zhou J., Wang Y. H., Chu J., Luo L. Z., Zhuang Y. P. et Zhang S. L. (2009).** Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam- exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bior. Technol.* 100: 819-825.
- Zoiopoulos P.E. (1983).** The utilization of by-products of brewing, tomato canning and olive oil industries as feeding stuffs. *Bulletin of the Hellenic Society of Animal Production.* 2: 39–58.

Préparation des milieux

I-Composition de milieu solide

Le milieu solide est le milieu M2 modifié, sa composition est la suivante :

Amidon (Biochem).....	3g/L ;
Caséine (Sigma)	0,3g/L ;
NaCl (Sigma).....	2g/L ;
Glucose (Biochem).....	1g/L ;
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	2g/L ;
KNO ₃ (Sigma)	2g/L;
CaCO ₃ (Sigma)	0,02g/L;
MgSO ₄ , 7H ₂ O (Sigma).....	0,05g/L;
FeSO ₄ , 7H ₂ O (Biochem).....	0,01g/L;
Agar (Liofilchem)	18g/L ;
Grignon d'olive de diamètre de 75µm	5g/L.

II-Composition du milieu submergé à base de grignon d'olive:

Sulfate d'ammonium (Biochem)	0,3% ;
Extrait de levure (Biochem)	0,05g/L ;
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	3g/L ;
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	1,5g/L ;
NaNO ₃ (Biochem)	1,2g/L;
MgSO ₄ , 7H ₂ O (Sigma).....	0,2g/L;
CaCl ₂ (Biochem).....	0,02g /L;
ZnSO ₄ , 7H ₂ O (Sigma).....	0,02g/L;
FeSO ₄ , 7H ₂ O (Sigma)	0,001g/L;
Grignon d'olive $\varnothing < 1$ mm.....	5%.

Tous les milieux de culture préparés ont été agités, réchauffés, et autoclavés à 120°C /20min.

A-Dosage des sucres réducteurs

Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS) :

Acide dinitrosalicylique	10g
Soude.....	16g
Tartrate de potassium sodique.....	300g
Eau distilléeqsp	1000ml

La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée dans un flacon couvert d'aluminium.

B-Préparation des solutions détergentes

1-Solution NDF (neutral detergent fiber)

Pour préparer un litre de la solution:

EDTA (Dissodium ethylenediamine tetraacetate, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ xH ₂ O)	18,62g
Borate de sodium décahydrate (Na ₂ B ₄ O ₇ x10H ₂ O).....	6,81g
Sulphate de sodium lauryl (C ₁₂ H ₂₅ SO ₃ Na)	30g
2-ethoxyéthanol.....	10 ml
Dissodium hydrogénophosphate (Na ₂ HPO ₄).....	4,56 g

Pour la préparation de cette solution, les quantités d'EDTA et de borate de sodium sont dissoutes dans une quantité suffisante d'eau distillée, la dissolution des réactifs est assurée par un agitateur chauffant (50°C), puis nous ajoutons le reste des réactifs et après la dissolution complète le volume est complété par l'eau distillée et ajusté à 1000 ml.

2- Solution ADF (acid detergent fiber).

Acide sulfurique (95-96%).....	150ml
C.T.A.B (cétyl trimetyl ammonium bromure)	100g

La solution est préparée par dissolution de C.T.A.B dans une quantité d'eau distillée puis les quantités d'acide sulfurique sont ajoutées avec précaution, le volume ensuite est complété jusqu'à les cinq litres (5000ml).

1-Réalisation de la courbe d'étalonnage pour le dosage de l'activité xylanasique

Tableau VIII : Gamme d'étalonnage pour le dosage de xylose

Tube	1	2	3	4	5	6
Xylose à 1 mg/ml (µl)	0	200	400	600	800	1000
Tampon citrate (µl)	1000	800	600	400	200	0
Concentration (mg /ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

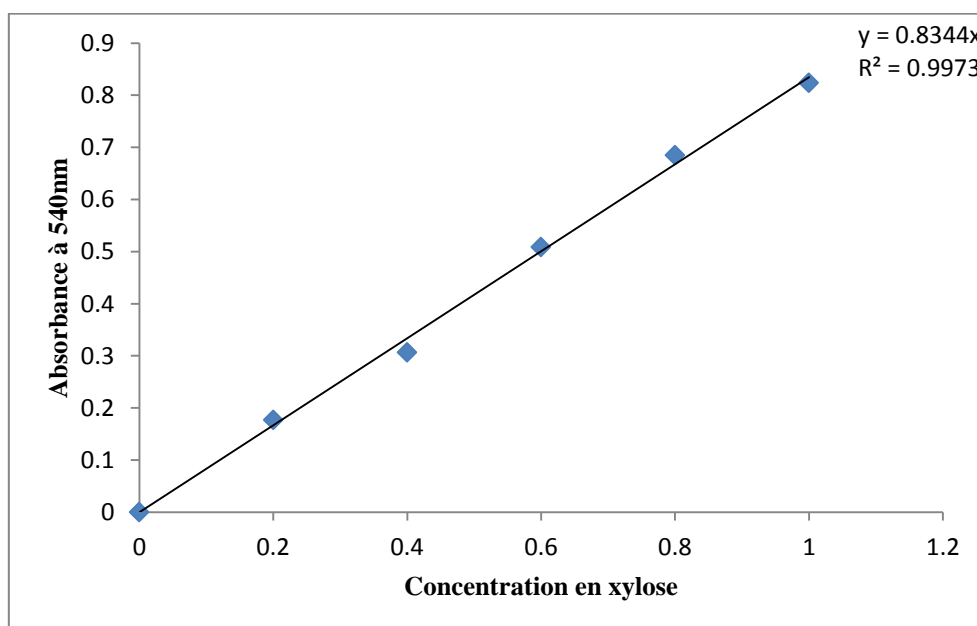


Figure 25: Droite d'étalonnage pour le dosage de xylose.

2-Réalisation de la courbe d'étalonnage pour le dosage de l'activité CMC_{Case}

Tableau IX: Gamme d'étalonnage pour le dosage de glucose pour CMC_{Case}

Tube	1	2	3	4	5	6
glucose à 1 mg/ml (µl)	0	200	400	600	800	1000
Tampon citrate (µl)	1000	800	600	400	200	0
Concentration (mg /ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

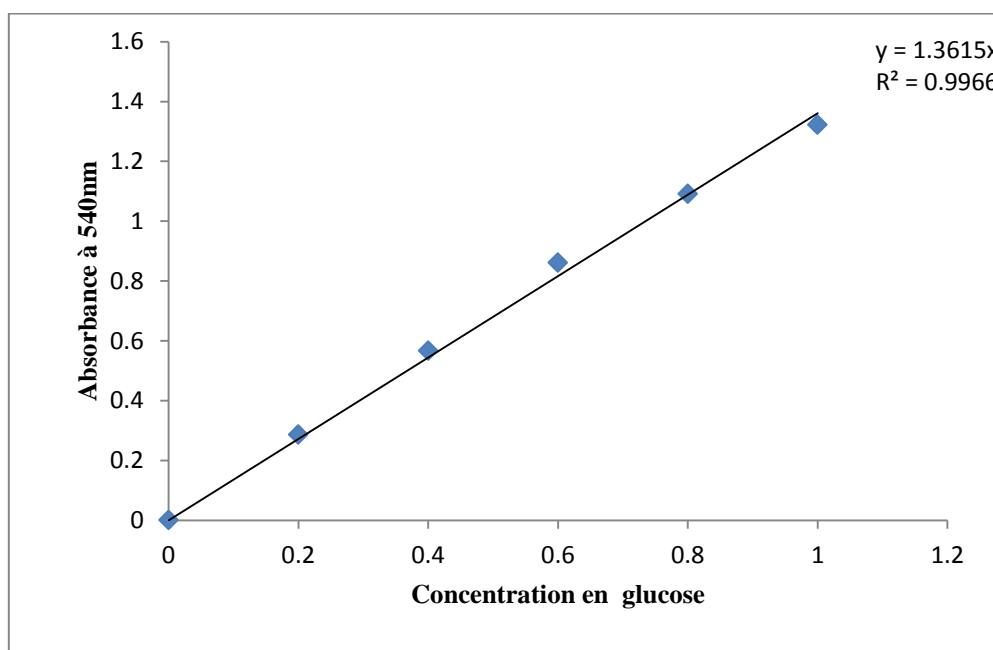


Figure 26 : Droite d'étalonnage pour le dosage du CMC_{Case}.

3-Réalisation de la courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux

Tableau X : Gamme d'étalonnage pour le dosage des glucose

Tube	1	2	3	4	5
glucose à 0,16 mg/ml (µl)	0	250	500	750	1000
Tampon citrate (µl)	1000	750	500	250	0
Concentration (mg /ml)	0	0,04	0,08	0,12	0,16

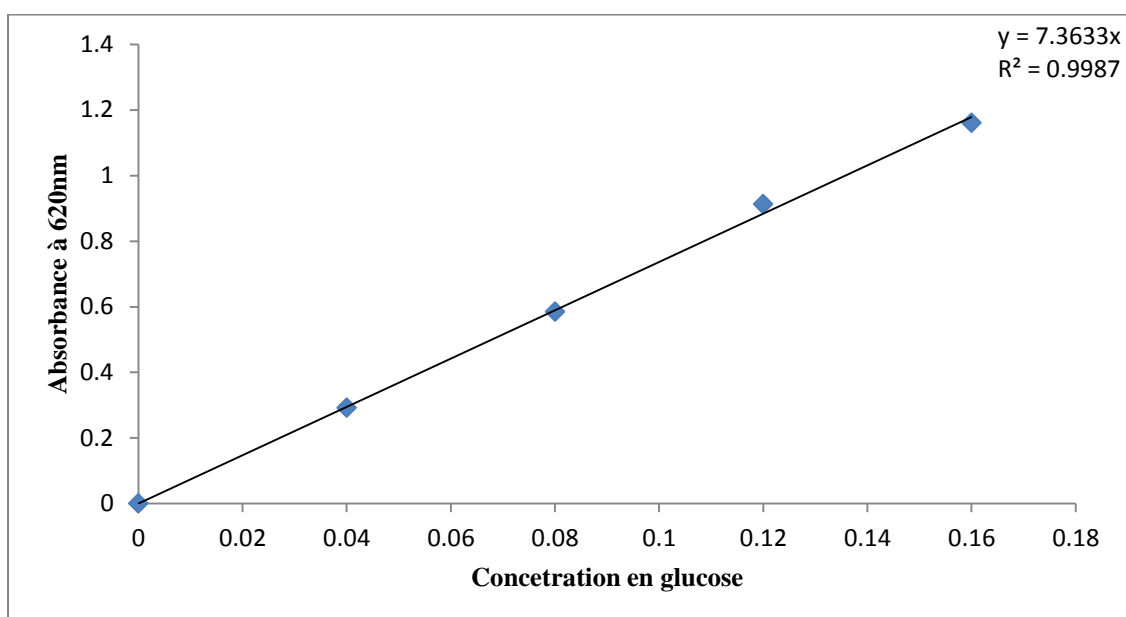


Figure 27: Droite d'étalonnage pour de glucose

4-Réalisation de la courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux

Tableau XI : Gamme d'étalonnage pour le dosage de l'acide gallique

Tube	1	2	3	4	5	6
Acide gallique à 1 mg/ml (µl)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (µl)	1000	800	600	400	200	0
Concentration (mg /ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

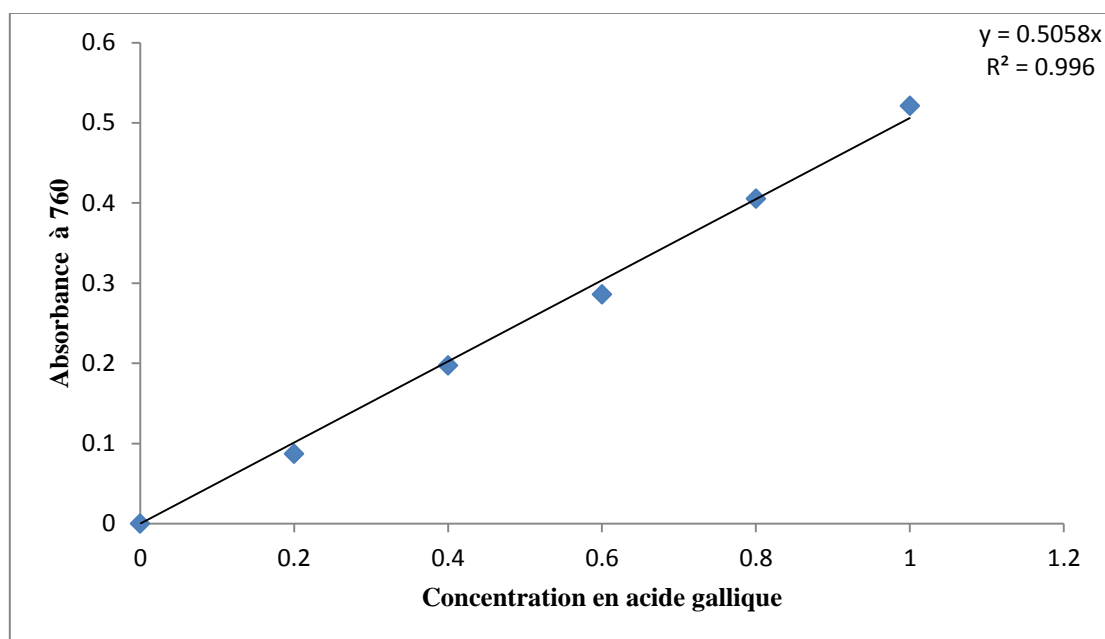


Figure 28: Droite d'étalonnage pour le dosage de l'acide gallique

5-Réalisation de la courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

Tableau XII: Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines.

Tube	1	2	3	4	5	6
BSA à 2mg/ml (µl)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (µl)	1000	800	600	400	200	0
Concentration (mg /ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2

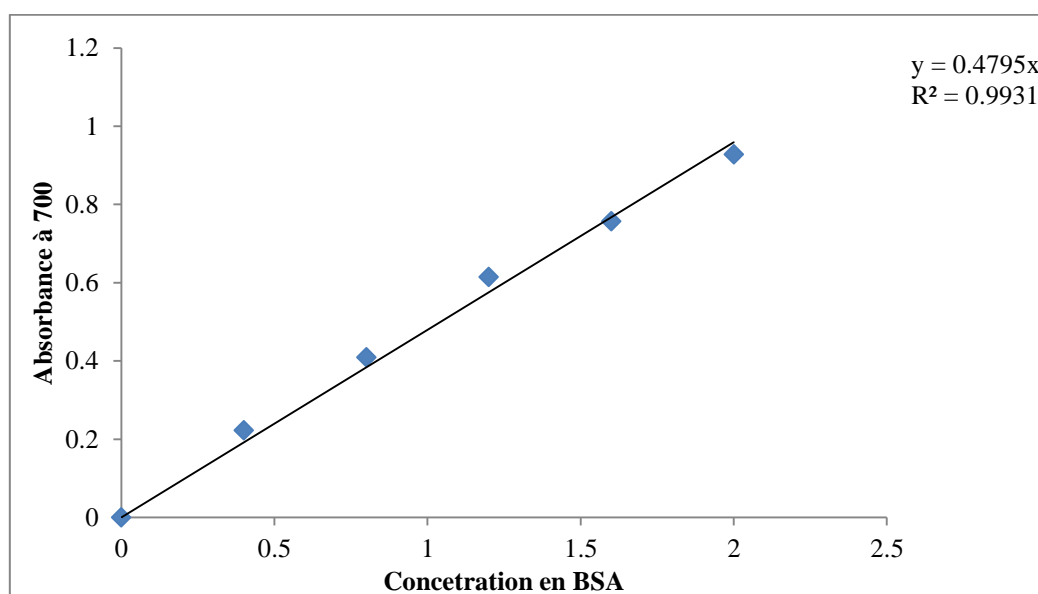


Figure 29: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines

Résumé

En Algérie, le grignon d'olive, généré par les industries d'huile d'olive, est présent en quantité importante. Il pose des problèmes potentiels dans la pollution de l'environnement. En effet, ce travail présente l'étude de la bioamélioration de grignon d'olive en fermentation en milieu submergé avec une souche d'actinomycète « *Streptomyces sp. S1M₃I* » afin de produire des enzymes lignocellulosique et de mettre à niveau ses valeurs nutritionnelles pour son utilisation comme aliment pour les ruminants. La souche a été cultivée sur milieu submergé à base de grignon d'olive pendant 30 jours, et par la suite, les activités enzymatiques lignocellulolytiques, la composition chimique du substrat résultant ont été déterminés. Les résultats obtenus ont montré des productions enzymatiques de $5,6 \pm 0,006$ U/ml, $1,445 \pm 0,016$ U/ml et $0,17 \pm 10^{-2}$ U/ml pour l'activité xylanase, CMC_{Case} et laccase respectivement, et une diminution notable dans les constituants suivant :NDF avec une réduction de 30,95%, ADF avec une réduction de 22,88% et ADL avec un réduction de 21,16%.

Une réduction de 44% en polyphénols, de 82,23% en matières grasses ont été obtenus et une augmentation de 34,18 % en protéine est observée avec une quantité en sucres totaux de $1,49 \pm 0,095$ mg/ml après 30 jours d'incubation ont été obtenus.

Mots clés : Grignon d'olive, *Streptomyces sp. S1M₃I*, Activité lignocellulosique, Fermentation submergée à base de grignon d'olive.

Abstract

In Algeria, the olive pomace, generated by olive oil industries, is present in large quantities. It poses potential problems in environmental pollution. Indeed, this work presents the study of olive pomace Bioconversion in middle submerged fermentation with actinomycetes "*Streptomyces sp. S1M₃I* "to produce enzymes and lignocellulosique to upgrade its nutritional values for its use as feed for ruminants. This strain was grown on medium submerged based olive pomace for 30 days, and thereafter, enzymatic activity lignocellulolytic, the chemical composition of the resulting substrate were determined. The results obtained showed enzyme production $5.6 \pm 0,006$ U / ml, $1.445 \pm 0,016$ U / ml and 0.17 ± 10^{-2} U / ml for xylanase activity, CMC_{Case} and laccase respectively. And a significant decrease in the following components: NDF with a 30.95% reduction, ADF with a 22.88% reduction and ADL with a 21.16% discount

A reduction of 44% of polyphenols, 82.23% fat were obtained and an increase of 34.18% in protein is observed with a quantité total sugars of $1.49 \pm 0,095$ mg / ml after 30 days incubation were obtained.

Keys words: Olive pomace, *Streptomyces sp.* S1M₃I, Lignocellulotic enzyme activités, Submerged middle.

الملخص

في الجزائر، ثقل الزيتون، الناتج عن صناعات زيت الزيتون، موجود بكميات كبيرة، وهذا يطرح مشاكل جدية في التلوث البيئي. يتمثل هذا العمل في دراسة تحويل ثقل الزيتون بواسطة البكتيريا الخيطية –الاكتينومييسيتات- من النوع .

Streptomyces sp. S1M₃I

Streptomyces sp. S1M₃I يتم زراعتها في وسط مغمور بثقل الزيتون لمدة 30 يوما و بعد ذلك

يتم حساب النشاط الانزيمي و التركيب الكميائي للركيزة. اظهرت النتائج حصول انتاج انزيم الكسيلا ناز بمعدل

$5,6 \pm 0,006$ U/ml ، و معدل انتاج الكريوكسيمثيل سيلولاز $1,445 \pm 0,016$ U/ml

اما معدل انتاج اللاكاز فهو $0,17 \pm 10^{-2}$ U/ml

هناك انخفاض ملحوظ في العناصر التالية،

NDF مع انخفاض بنسبة 30,95%

ADF مع انخفاض بنسبة 22,88%

ADL مع انخفاض بنسبة 21,16%

انخفاض نسبة البونيفينول بمعدل 44% والمادة الدهنية بمعدل 82,23%

وارتفاع مهم بالنسبة للبروتينات بمعدل 34,18%، ووصلت كمية السكريات الي $1,49 \pm 0,095$ mg/ml بعد 30

يوم من الحضانة

الكلمات المفتاحية

، *Streptomyces sp.* S1M₃I، ثقل الزيتون، انزيم الينوسيليلوز