

Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives

M. ALLOUE J.-M. ALDRIC J. DESTAIN Y. BOUTAHIR P. THONART

Centre Wallon de Biologie Industrielle Unité de Bio-industries Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux Passage des Déportés, 2B-5030 Gembloux, Belgique.

Correspondance de l'auteur: Tel: +32/ 81622305, Fax: + 32/81614222

Adresse e-mail: bioindus@fsagx.ac.be

Résumé

Cette étude met en évidence un essai de traitement biologique aérobie de la fraction grasse d'un effluent de l'industrie des olives.

Les matières grasses décantées de l'effluent contiennent 38 % de matières extractibles à l'hexane et sont composées principalement de glycérides. Des essais en réacteur de 2 l agité et aéré ont permis de démontrer la capacité de *Yarrowia lipolytica* et de sa lipase à éliminer les matières grasses. La vitesse d'élimination des matières grasses dans le réacteur inoculé à la concentration 10^5 cellules/ml est faible ($0,07 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) mais est nettement améliorée lors de l'adjonction de la lipase de *Y. lipolytica* ($0,14 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Pour une densité d'inoculum de 10^7 cellules/ml, la vitesse moyenne d'élimination est plus importante ($0,24 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) et est encore légèrement améliorée par ajout de la lipase ($0,30 \text{ gl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Mots clés: Effluent, matière grasse, lipase, *Yarrowia lipolytica*, starter

Abstract

This study lies within the scope of an aerobic biological treatment of the fatty fraction of a sewage of the industry of olives.

The elutriated fat of the sewage contain 38% of MEH to the hexane and are composed mainly of glycérides. Experiments in a 2 l stirred batch reactor and made it possible to show the capacity of the *Yarrowia lipolytica* and its lipase to eliminate the fat content from the OMW. The rate of elimination of the fat content in the reactor inoculated with the concentration 10^5 cells/ml is less significant ($0,07 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) but it is clearly improved at the time of the addition of lipase from *Y. lipolytica* ($0,14 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). For a density of inoculum of 10^7 cells/ml, the rate of elimination is more significant ($0,24 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) and is slightly improved by addition of lipase ($0,30 \text{ g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Key words: Sewage, fat matter, lipase, *Yarrowia lipolytica*, chokes

1 INTRODUCTION

Bien que la production de l'olivier soit répartie sur les cinq continents, elle est surtout prédominante dans la zone du Bassin Méditerranéen qui représente 98% de la surface des arbres en production et 97% de la production totale d'olives. La production d'huile d'olive se concentre principalement dans les pays du pourtour méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, Syrie, Tunisie et Maroc. La production de ces pays représente 94% de la production mondiale (Dagga *et al*, 2000).

Les huileries et les industries d'olive sont confrontées à la problématique de traitement de leurs effluents. Les margines notamment sont des eaux très polluantes. Elles colorent les eaux et leur très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer. La pollution peut s'étendre sur de très longues distances (Benyahia et Zein, 2003).

Les processus de traitement des effluents peuvent être : physique, physico-chimique ou biologique. Les traitements physiques et physico-chimiques incluent les processus thermiques (évaporation et incinération), floculation/clarification, ultrafiltration et osmose inverse. Les traitements biologiques quant à eux peuvent être effectués en anaérobie ou en aérobie. Les premiers exploitent des microorganismes qui n'exigent pas d'oxygène pour dégrader les polluants alors que les autres font appel à une source d'oxygène (Rozzi et Malpei, 1996).

Y. lipolytica est une levure aérobie stricte que l'on trouve dans le sol, les effluents, les matières riches en lipides et en protéines tels les fromages et les saucissons. Son métabolisme est exclusivement respiratoire (Finogenova, 1995). Elle est capable d'assimiler une grande variété de substrats : alcanes, lipides, acides gras, alcools, sucres, comme seule source de carbone. A partir de ces substrats carbonés, *Y. lipolytica* est capable de produire de la biomasse, des acides organiques tels que l'acide citrique, ainsi que des enzymes extracellulaires : protéases alcaline et acide, RNAses, phosphatases, ainsi que des lipases et des estérases (Barth et Gaillardin, 1997). Les travaux réalisés au laboratoire du Centre Wallon de Biologie Industrielle par Destain (1998) ont montré une augmentation des rendements de production de l'enzyme par modification de la souche sauvage 6303 de *Y. lipolytica* par mutagenèse non dirigée. Ces travaux ont permis d'isoler le mutant LGx 6481 produisant, en fermenteur, une activité enzymatique de 1000U/ml de surnageant de culture. La mutation semble avoir agi au niveau du système de régulation de l'expression de l'enzyme.

Fickers en 2004 a isolé la souche de *Y. lipolytica* JMY1105 par mutation sur le gène (LIP2) de régulation de la lipase extracellulaire chez la souche LGx6481. Dans la problématique des bacs à graisse les lipases hydrolysant des lipides en glycérol et en acides gras, ont accéléré le processus de dégradation et réduit le problème de colmatage causé par les graisses. (Thonart *et al* ; 1997).

Plusieurs auteurs ont souligné l'intérêt des différents microorganismes dont la levure de *Yarrowia lipolytica* dans le traitement de biodégradation aérobie et de détoxification des margines. Lanciotti *et al.* (2005), Papanikoulaou et Aggelis (2002) ont particulièrement indiqué *Y. lipolytica* comme un bon candidat pour la purification des effluents et la réduction de la pollution.

L'objet du présent travail consiste à tester l'aptitude de la levure de *Y. lipolytica* JMY1105 isolée dans le laboratoire du Centre Wallon de Biologie Industrielle d'une part à dégrader les matières grasses d'un effluent de l'industrie des olives dans un bioréacteur de 2l, d'autre part à étudier l'effet synergique de sa lipase dans le processus de dégradation.

2 MATERIEL et METHODES

2.1 Culture de *Yarrowia lipolytica*

La souche utilisée *Y. lipolytica* JMY1105 est issue de la collection du CWBI.

Des précultures sont préparées dans des fioles de 250ml contenant 100 ml de milieu 863 stérile (Glucose monohydrate, (2%) ; Extrait de levure (1%) ; Peptone de caséine (1%)) inoculées à partir d'une cultures sur milieu solide. Ces précultures sont incubées à 30°C sous agitation à 130 rpm pendant 16h.

Ensuite, des fioles de 2 l contenant 500ml de milieu 863 stérile sont inoculées avec les précultures précédentes et sont incubées dans les mêmes conditions pendant 48h. Les cultures sont ensuite centrifugées et les culots obtenus sont lavés à l'eau physiologique avant de les utiliser pour inoculer le réacteur

2.2 Préparation des déchets graisseux

2.2.1 Echantillonnage des déchets graisseux

Les déchets graisseux sont issus de l'industrie des olives. Ils ont été prélevés en tête de station d'épuration.

2.2.2 Fractionnement des déchets graisseux

Après homogénéisation des échantillons de 1Kg sont pesés dans des berlins gradués et portés à 70°C. Le contenu décante jusqu'à la séparation en trois phases distinctes. La phase supérieure contenant les matières grasses constitue la matière grasse décantée (MGD), la phase du milieu étant constituée essentiellement d'eau, la phase inférieure est formée d'un culot de matières décantables

La matière grasse décantée constitue la matière première mise en œuvre dans les réacteurs.

2.2.3 Extraction des matières grasses

L'extraction à l'hexane se fait en présence de 50 g de matière grasse décantée (MGD) dans 60ml d'hexane (VWR International Prolabo Leuven Belgique) durant 30 minutes. La phase d'hexane est ensuite évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à une température de 60°C. Le ballon taré est refroidi et la matière extractible à l'hexane (MEH) est déterminée par pesée. Cette extraction est réalisée deux fois de suite.

2.3 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl

A 2g de chaque échantillon, on ajoute une pastille de catalyseur Kjeldahl, 10ml d'acide sulfurique concentré et 2ml d'eau oxygénée. Ces échantillons sont digérés dans un minéralisateur par chauffage, selon le programme de température suivant : 20 min à 100°C, 25 min à 185°C, 20 min à 265°C, 30 min à 335°C, 30 min à 440°C.

Après minéralisation, les tubes en verre contenant les échantillons sont refroidis avant d'y ajouter 25 ml d'eau distillée. La distillation est réalisée pendant 5 min en présence de 50ml d'une solution de 500g/l de NaOH. Le distillat est recueilli dans 20 ml d'acide borique (VWR) à 4 %. L'ammoniac recueilli, est titré par H₂SO₄ 0,01N (VWR) en présence du mélange de Tashiro (rouge de méthyle à 0,02% et de bleu de méthylène à 0,1%) comme indicateur.

2.4 Mesure de la proportion d'acides gras libres des MEH

Le dosage des acides gras libres s'est fait par neutralisation au moyen d'une base forte. 50 ml d'éthanol technique neutralisés sont ajoutés à une masse connue de l'échantillon avant titration par NaOH 0,1N, en présence de phénophtaléine, Le pourcentage d'acides gras libres est estimé par la formule suivante :

$$\text{Acides gras libres (\%)} = \text{Volume base} \times N_{\text{NaOH}} \times 282 \times 10^{-1} / (\text{Masse échantillon})$$

282 correspond à la masse molaire de l'acide oléique.

N: Normalité du NaOH.

2.5 Dérivatisation des acides gras

10 mg de MEH sont introduits dans un tube Sovirel ; 0,2 ml d'hexane et 0,5 ml du mélange de transestérification Méthanol-BF₃/Hexane/Méthanol (Sigma B-1252) selon les proportions 25/20/55 (v/v/v) sont ensuite ajoutés et placés sous agitation à 70°C pendant 1h30. Après refroidissement, les esters méthyliques d'AG sont extraits par 8ml d'hexane, 0,2 ml d'H₂SO₄, 0,5ml de NaCl saturé. 1 µl de la phase hexane est injectée en CPG.

2.6 Procédures analytiques

2.6.1 Chromatographie sur couche mince

100mg de la MEH sont dissous dans 5ml de chloroforme. 4 μ l de ce mélange sont déposés pour élution par CCM. Les couches minces sont éluées par l'éluant (éther de pétrole (60-80)/éther diéthylique/acide formique 60/40/1,5 (v/v/v)) (VWR) et séchées à l'air libre. La révélation se fait par aspersion de 2,7 dichlorofluorescéine (2% en solution dans l'éthanol) sur la couche mince.

2.6.2 Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est réalisée sur un chromatographe de type HP 5890 séries II muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne capillaire utilisée est polaire (HP-INNOWAX) de 30m de longueur, de 0,25 mm de diamètre intérieur et d'une épaisseur de 0,25 μ m. L'injecteur est de type cool on column et le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1ml/min.

Le programme de température du four appliqué est le suivant :

- 55°C à 150°C à raison de 30°C/min ;
- 150°C à 250°C à raison de 5°C/min ;
- 250°C pendant 10 minutes.

La température de l'injecteur suit la même évolution exception faite que la température de l'injecteur est toujours supérieure de 3°C à la température du four.

Les témoins utilisés sont les suivants : acide butyrique (C_4) acide heptanoïque (C_7), acide caprique (C_{10}), acide laurique (C_{12}), acide palmitique (C_{16}), acide stéarique (C_{18}), acide oléique ($C_{18:1}$), acide linoléique ($C_{18:2}$) et acide arachidique (C_{20}). Dans cette présente étude, l'acide arachidique, a été choisi comme étalon interne.

Le facteur de réponse de chacun des acides gras par rapport à l'étalon interne est déterminé selon la formule suivante :

$$K = ([X] / \text{Aire X}) \times (\text{Aire acide arachidique} / [\text{acide arachidique}])$$

Il permet la détermination de la concentration en acide gras dans chaque échantillon.

K = facteur de réponse

[X] = concentration massique de chaque acide gras

Aire X = surface de réponse mesurée sur le chromatogramme

2.7 Essai en bioréacteur de 2l

Les essais de biodégradation ont été réalisés en réacteur (Biostat B) de 2l, agité à 130 rpm, doté d'un mobile d'agitation de type TD 6 et aéré (1 vvm). La température est maintenue à 30°C. La quantité de matière grasse décantée ajoutée dans le milieu est telle qu'on se trouve à une concentration proche de 10 g/l en acide gras totaux.

Des quantités d'azote et de phosphore sont ajoutées sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ de manière à respecter un rapport DCO/N/P de 100/2,8/0,6 (g/g/g).

Les réacteurs testés sont inoculés respectivement à l'aide de deux concentrations cellulaires (10^5 et 10^7 cellules/ml de *Y. lipolytica*). Dans le deuxième temps, les mêmes concentrations de cellule sont testées mais en présence, de l'enzyme produite par la souche avec une activité lipolytique de l'ordre de 15.000 U/ml.

1 unité est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour former 1 μmole d'acide gras par minute dans les conditions opératoires choisies de températures: 37°C et pH 7.

Les réacteurs sont suivis en effectuant des prélèvements d'environ 10ml. Ils sont pesés avec précision et additionnés d'acide arachidique en concentration connue (50mg). L'échantillon

est ensuite incubé à 85°C pendant 10 minutes sous agitation puis est ensuite extrait par 20ml d'hexane technique.

La phase hexane est récupérée dans un ballon taré. L'extraction est réalisée deux fois et la totalité de l'hexane est évaporée sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif. La quantité de matière grasse récupérée est pesée et reprise dans de l'hexane de manière à se retrouver dans des concentrations proches de 50 mg/ml. L'échantillon est dérivatisé comme décrit plus haut et injecté en CPG.

3 RESULTATS

3.1 Caractérisation de l'effluent

L'effluent a été caractérisé sous deux formes :

La matière grasse décantée est la fraction grasse flottante du déchet graisseux. Les matières extractibles à l'hexane peuvent être assimilées à la fraction de lipides présents dans l'échantillon. Cette fraction représente $38,6 \% \pm 2,1 \%$ de la matière grasse décantée. Le pH de l'effluent est de 5,7. Ce pH convient parfaitement à la culture de *Yarrowia lipolytica* car elle se développe sur des milieux dont les pH varient de 3 à 8 (Barth et Gaillardin, 1997)

3.2 Pourcentage d'acides gras libres dans les MEH

Le pourcentage d'acides gras libres présents dans les MEH est de 2,4 % ; ce qui indique que la majeure partie de la matière grasse se trouve sous forme de tri et di-glycérides. Ce résultat concorde avec ceux obtenus sur couche mince (figure 1)

3.3 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl

La mesure de la teneur en azote de la matière grasse décantée permet de nous renseigner sur la nécessité d'un supplément d'azote lors des essais de dégradation de la matière grasse de

manière à respecter le rapport massique DCO/N/P de 100/2,8/0,6 conseillé par Canler (2001).

Les résultats expérimentaux sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Teneur en azote de la matière grasse décantée

N total	0,750 ± 0,01 mg N/g éch.
N ammoniacal	0,068 ± 0,002 mg N/g éch.

Les résultats montrent une faible teneur en azote de la matière grasse décantée. 100 g de matière grasse décantée contiennent environ 40 g de matière extractible à l'hexane ce qui correspond à 115,6 g de DCO. (1g de lipides = 2,89 g de DCO), et 0,075 g d'azote. Il y a donc lieu de rajouter 2.7g d'azote pour respecter le rapport préconisé par Canler, 2001.

3.4 Caractérisation qualitative de la matière grasse des effluents

Deux échantillons de l'effluent sont comparés à un mélange témoin de diglycérides, acides gras libre et triglycérides à l'aide de la chromatographie sur couche mince.

Les résultats de la figure 1 montrent que la matière grasse étudiée est présente sous forme de triglycérides, diglycérides, et acides gras. La taille importante du spot correspondant aux triglycérides par rapport aux autres composés, montre que ceux-ci sont présents en quantité importante. Les triglycérides représentent donc une fraction majoritaire de la matière grasse des effluents.

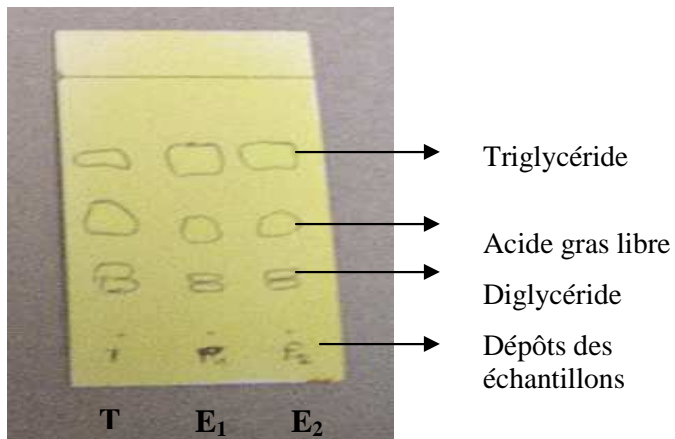


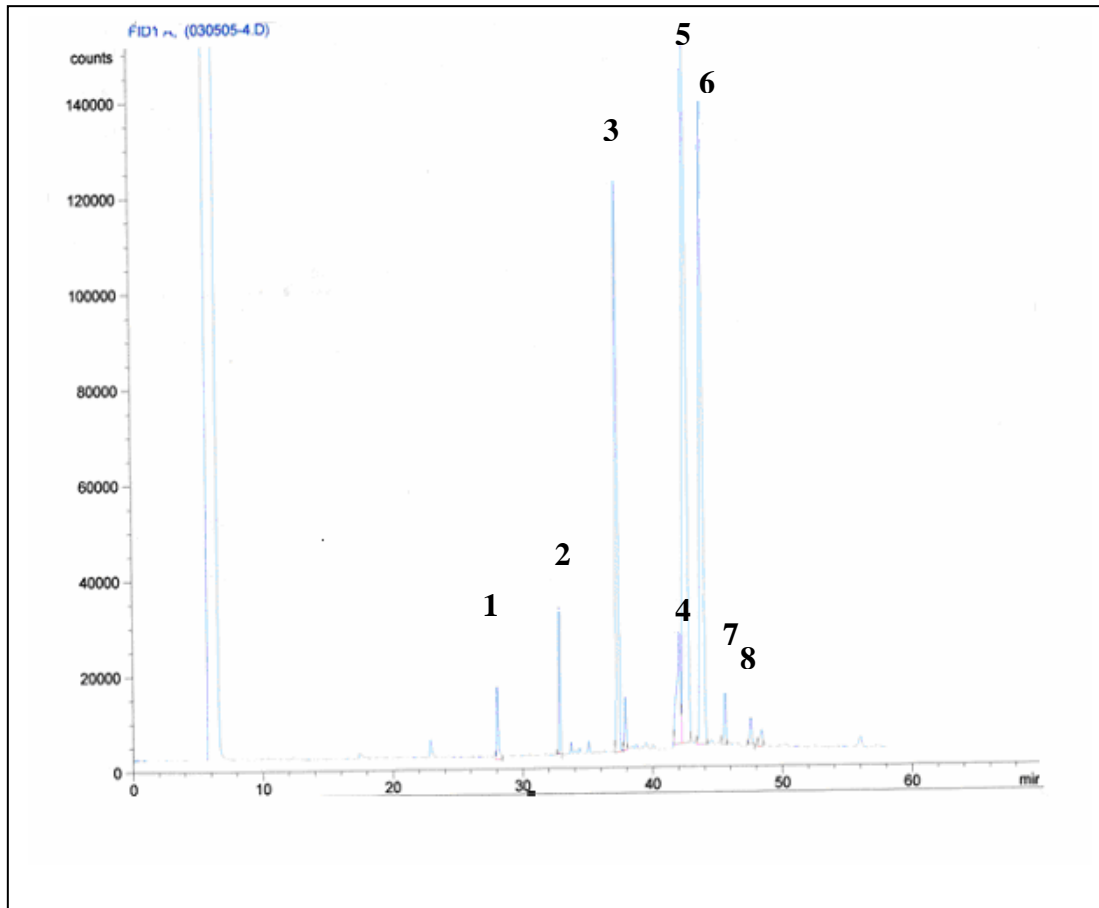
Figure 1 : CCM de la matière grasse décantée issue de l'effluent d'industrie d'huile d'olive par rapport à un mélange des témoins

E₁ et E₂ = échantillons de matière grasse décantée de l'effluent

T = témoin composé de di-triglycerides et acides gras

3.5 Analyse qualitative des matières extractibles à l'hexane : Composition en acide gras.

La chromatographie en phase gazeuse a permis de caractériser la composition totale en acides gras présents dans les matières extractibles à l'hexane (MEH).



La figure 2 : Chromatogramme des acides gras totaux présents dans la matière grasse.

(1) C₁₂ : Acide laurique, (2) C₁₄ Acide myristique, (3) C₁₆ : Acide palmitique, (4) C₁₈ : Acide stéarique
(5) C_{18:1} : Acide oléique, (6) C_{18:2} : Acide linoléique, (7) C_{18:3} : Acide linoléique, (8) C₂₀ : Acide arachidique

La figure 2 présente le chromatogramme des acides gras totaux (voir légende) présents dans la matière grasse. Elle met en évidence quatre acides gras majoritaires : l'acide palmitique (C₁₆), l'acide stéarique (C₁₈), l'acide oléique (C_{18:1}) et l'acide linoléique (C_{18:2}).

Le tableau 2 présente la proportion relative de chacun d'entre eux par rapport à la totalité des acides gras majoritaires et par rapport à la MGD.

Tableau 2: Pourcentage massique des acides gras par rapport à la matière grasse décantée (MGD)

	Ac. palmitique	Ac. stéarique	Ac. oléique	Ac. linoléique	Total des Ac gras majoritaires
% massique des acides gras/ MGD	1,3	0,4 %	11, 2	7,6	20.5
Proportion en acides gras majoritaires (%)	6,5	1,9 %	54,6	36,9	100

De la fraction grasse (MEH) à partir de la matière grasse décantée (38.6%) les acides gras majoritaires représentent 20.5%.

L'acide oléique et linoléique y sont prépondérants, ils représentent respectivement 54,6 et 36,9 %. En réacteur, les essais de dégradations de la matière grasse ont été envisagés en suivant l'évolution des quatre acides gras majoritaires.

3.5 Dégradation de la MGD en bioréacteur aéré

Le premier objectif était de déterminer l'aptitude de *Y. lipolytica* à dégrader seule la matière grasse. Ainsi deux concentrations cellulaires ont été testées, à savoir : 10^5 et 10^7 cellules/ml. Le deuxième objectif était de suivre la dégradation des matières grasses avec les mêmes concentrations mais en présence de l'enzyme produite par la même souche. La concentration de matières grasses décantée dans le réacteur est de 10g/l et 2.79g/l d'azote.

Quatre types de réacteurs ont été mis en oeuvre. Le profil de dégradation des acides gras totaux dans les différents réacteurs est représenté à la figure 3 et dans le tableau 4.

La figure 3 illustre pour chaque réacteur les taux d'élimination des acides gras totaux sur une durée de 48 heures d'essai.

Le tableau 3 résume pour chaque réacteur les taux (%) d'élimination des acides gras majoritaires obtenus après 16 heures ainsi que la vitesse moyenne d'élimination pendant les 16 premières heures.

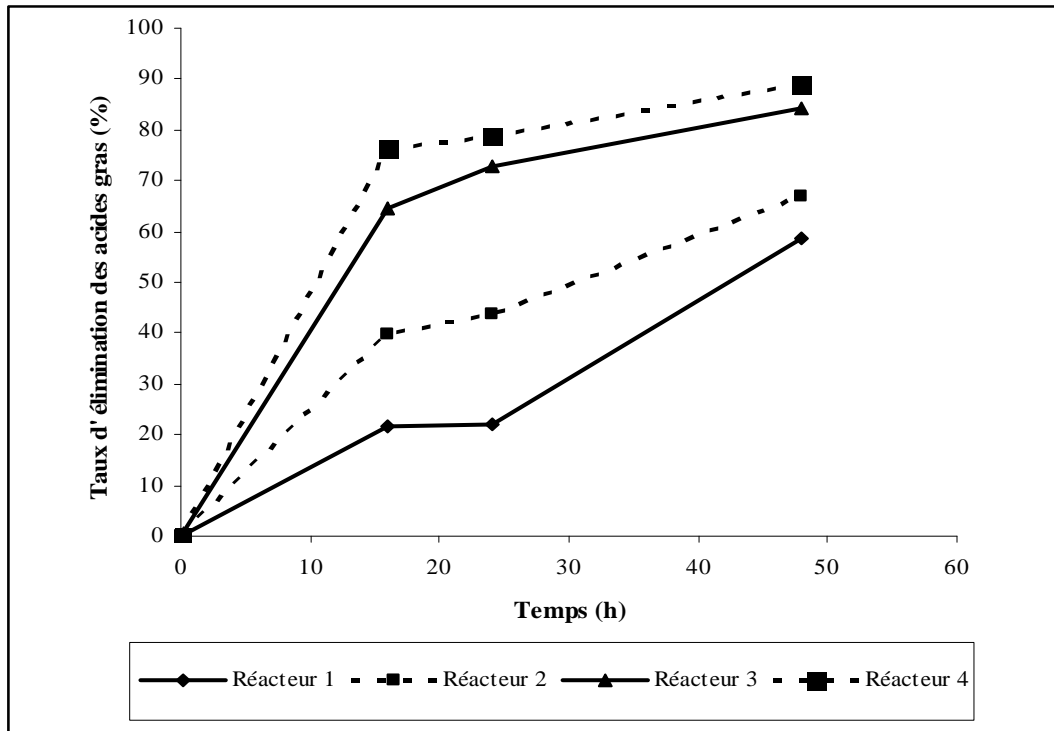


Figure 3: Comparaison des taux d'élimination des acides gras totaux pour les différents types de réacteurs mise en œuvre

- (1) : réacteur inoculé à la concentration de 10^5 cellules/ml ;
- (2) : réacteur inoculé à la concentration de 10^5 cellules/ml + lipase (15.000 U/ml) ;
- (3) : réacteur inoculé à la concentration de 10^7 cellules/ml ;
- (4) : réacteur inoculé à la concentration de 10^7 cellules/ml + lipase (15.000 U/ml).

La figure 3 montre que la dégradation est d'autant plus importante que la densité de l'inoculum est élevée. L'addition de lipase permet d'accélérer le processus de dégradation et de l'augmenter. Au cours des 16 premières heures le taux d'élimination des acides gras passe de 21% à 39 % pour le réacteur1 et de 64 % à 76 % pour le réacteur 3.

Tableau 3 : Bilan des essais de dégradation de la matière grasse

	Réacteur 1	Réacteur 2	Réacteur 3	Réacteur 4
Vitesse de dégr. ($\text{g l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,07	0,14	0,24	0,30
% ac. oléique éliminé	21,73	51,44	60,91	77,18
% ac. Linoléique éliminé	24,10	28,25	74,59	81,14
% ac. palmitique éliminé	4,44	39,13	47,61	53,84
% ac. stéarique éliminé	23,07	31,57	29,41	53,33

L'élimination des quatre acides gras majoritaires montre que les acides gras insaturés (oléique et linoléique) sont nettement plus éliminés que les deux acides gras saturés (palmitique et stéarique).

4 DISCUSSION

Les résultats de cette présente étude démontrent que la souche de *Yarrowia lipolytica* utilisée est capable de se maintenir, de croître dans la matière grasse décantée issue d'un effluent riche en huile et de dégrader cette charge polluante.

Au cours de nos expérimentations deux facteurs ont été étudiés : la concentration de l'inoculum et l'adjonction complémentaire de la lipase.

Les résultats d'élimination des matières grasses décantées par *Y. lipolytica* à la concentration de 10^5 cellules/ml, l'inoculum semble trop faible pour assurer des rendements d'élimination efficace, résultat nettement amélioré par adjonction de lipase au réacteur.

En effet, la lipase accélère l'hydrolyse des glycérides, qui constituent la fraction la plus importante de la matière grasse de l'effluent, en acides gras libres et glycérol et donc facilite l'assimilation subséquente des acides gras par la levure.

En revanche avec la concentration de 10^7 cellules/ml, l'élimination des matières grasses est plus importante.

Les acides gras insaturés (oléique et linoléique) sont mieux éliminés que les deux acides gras saturés (palmitique et stéarique). Papanikolaou et Aggelis (2002) ont mis en évidence une affinité de *Y. lipolytica* pour les mêmes acides gras.

Les courbes d'élimination des matières grasses montrent une élimination rapide au début plus lente ensuite. Conformément à nos observations, Papanikolaou et Aggelis (2002) ont répertorié trois phases distinctes dans les courbes de dégradation. D'abord, ils ont observé une diminution importante des acides gras présents dans le milieu, correspondant à l'accumulation de ceux-ci par *Y. lipolytica*. Une phase de diminution de la quantité d'acides gras consommé par la levure, pour ses réserves lipidiques au cours de cette période. La dernière phase correspond à une légère reprise de consommation des acides gras dans le milieu.

Les résultats de la présente étude sont supérieurs à ceux obtenus par Papanikolaou et Aggelis qui ont travaillé à une température de 29°C sur des essais réalisés en fioles. Cette amélioration des résultats pourrait être due en grande partie à la performance intrinsèque de la souche, à l'aération du réacteur (*Yarrowia lipolytica* est aérobic stricte), et à l'adjonction de la lipase.

5 CONCLUSION

Le traitement des effluents réalisé avec la levure de *Yarrowia lipolytica* montre que cette souche présente une aptitude à dégrader les matières grasses et à assimiler les acides gras libérés lors de leur hydrolyse. Cette étude a montré que la densité de l'inoculum de la souche sélectionnée est un facteur important permettant d'accroître substantiellement le taux d'élimination de la matière grasse par rapport à l'effluent non traité avec la levure. Une densité de 10^7 cellules/ml semble être suffisante pour atteindre des vitesses de dégradation importantes.

L'effet synergique de la lipase sur la biodégradation des matières grasses a également pu être montré. L'enzyme permet l'hydrolyse rapide des triglycérides et accélère le processus de dégradation par le microorganisme.

Enfin, comparativement à la littérature, il a pu être démontré qu'une aération importante au moyen d'un réacteur agité améliore l'efficacité du procédé.

La présente étude pose donc les jalons nécessaires à la mise au point d'un starter mixte original (enzyme –microorganisme) pouvant être utilisé dans un procédé de traitement des effluents gras industriels.

6 REFERENCES

AL-ZUHAIR S., HASAN M. and RAMANCHANDRAN K.B. (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis palm oil by lipase. *Process Biochem*, 38, pp: 1153-1163.

BARTH G. and GAILLARDIN C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, pp : 219-237.

BENYAHIA N. et ZEIN K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse). 2ème Conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II). Lausanne, Suisse.

CANLER J.P. (2001). Performances des systèmes de traitement biologique aérobie des graisses. FNDAE n° 24. Document technique. Cemagref Editions.

DESTAIN J. (1998). Production, purification et caractérisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique.

DESTAIN J., ROBLAIN D., THONART Ph. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol. Lett. 19, pp: 105-107.

DI GIOIA D., FAVA F., BERLIN L. and MARCHETTI L. (2001). Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55, pp: 619-626.

DI GIOIA D., BARBERIO C., SPAGNESI S., MARCHETTI L. and FAVA F. (2002). Characterization of four olive mill wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds. Arch. Microbiol. 178, pp: 208-217.

FICKERS P. (1999). Optimisation de la production en fermenteur d'une lipase par la levure *Yarrowia lipolytica*. Travail de fin d'études. Université de Liège, Belgique.

FICKERS P. (2004). Etude des lipases extracellulaires de la levure de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat. Université de Liège, Belgique 118p.

FINOGENOVA T.V. (1995). Oxidative metabolism of *Yarrowia lipolytica* during the growth on alkanes and ethanol and metabolite oversynthesis. In: Proceedings of first *Yarrowia lipolytica* Meeting. Paris-Grignon.

LANCIOTTI R., GIANOTTI A., BALDI D., ANGRISANI R., SUZZI G., MASTROCOLA D. and GUERSONI M.E. (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater Biores Technol. 96, pp: 317-322.

PAPANIKOLAOU S. AGGELIS G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Biores Techno. 82, pp: 43-49.

ROZZI A., PASSINO R. and LIMONI N. (1989). Anaerobic treatment of olive mill effluents on polyurethane foam bed reactors. Process Biochem. 24, pp: 68-74.

ROZZI A. and MALPEI F. (1996). Treatment and Disposal of Olive Mill Effluents. Internat Biodeterio & Biodegrad, pp: 135-144.

SCIOLI C. and VALLARO L. (1997). The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. Wat. Res. Vol. 31, No. 10, pp: 2520-2524.

THONART P., DESTAIN J., ANTOINE P. (1997). La problématique de la matière grasse : aspect théorique. Trib de l'eau, 50, n°586/2, pp: 3-9.

THONART P., DESTAIN J., ZGOULI S., ANTOINE P., GODEFROID J. et EVRARD P. (1997). Les bacs à graisse. Une solution aux problèmes des matières grasses pour les PME. Trib de l'eau, 50, n°586/2, pp : 41-46.