

Effet des enzymes fibrolytiques exogènes sur l'utilisation digestive de trois types de grignons d'olives



IABC 2015
International
TUNISIA

H. YAICH*, J. JABRI, K. ABID, A. MALEK, J. REKHIS, M. KAMOUN

École Nationale de Médecine Vétérinaire, Service d'alimentation et de nutrition animale : Sidi Thabet – Tunis, Tunisie

* Auteur correspondant: helia.yaich@gmail.com

Abstract- In Tunisia, the olive cake are available in large quantities, they are characterized by a very limited nutritional value. The effect of supplementation with exogenous fibrolytic enzymes (EFE) on digestibility of these by-product remains poorly understood until our days. In this context, we propose to study the effect of such supplementation on digestibility and energy value of 3 types of olives cakes: crude olive cake exhausted olive cake (crude olive cake treated with a solvent) and defatted residue (crude olive cake heat treated followed by a solvent). Therefore, the gas production technique using syringes was used to determine the fermentation parameters of the food. An enzymatic complex containing a cellulase-xylanase mixture (1: 1, v / v) was used at two concentrations: C₆₀ = 60 mg / g DM and C₁₂₀ = 120 mg / g DM. Besides the various parameters of kinetics of gas production, the digestibility of the organic matter (OMD), the content of metabolisable energy (ME) and the production of volatile fatty acids (VFA) have been the subject of this study. Compared to the control (C₀), the use of EFE improves significantly OMD, EM and VFA. This effect seems to be more effective for defatted and especially with C₁₂₀. For crude olive cake and exhausted olive cake, the supplementation with EFE has a beneficial effect on these studied parameters but the difference between the two concentrations (C₆₀ and C₁₂₀) has no effect. We note that this supplementation has improved only the theoretical maximum gas production without affecting the lag time and the maximum rate gas production

Keywords: cellulase, digestibility, olive cake, xylanase

Résumé- En Tunisie, les grignons d'olives qui sont disponibles en quantité sélevées, se caractérisent généralement par une valeur nutritive très limitée. L'effet d'une supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes (EFE) sur l'utilisation digestive de ce sous-produit reste jusqu'à nos jours peu élucidé. Dans ce contexte, nous proposons d'étudier l'effet d'une telle supplémentation sur la digestibilité et la valeur énergétique de 3 types de grignons d'olives: grignons bruts (GB), grignons épuisés (GE) (GB traités par un solvant) et grignons dégraissés (GD) (GB traités par la chaleur puis par un solvant). De ce fait, la technique de production de gaz (PG) *in vitro* dans les seringues a été utilisée pour déterminer les paramètres fermentaires de l'aliment. Un complexe enzymatique constitué d'un mélange cellulase-xylanase (1:1, v/v) a été utilisé à deux concentrations : C₆₀= 60 mg/g MS et C₁₂₀=120 mg/g MS. A part les différents paramètres de la cinétique de PG, la digestibilité de la matière organique (dMO), la teneur en énergie métabolisable (EM) et la production des acides gras volatils (AGV) ont été également étudiées. Par rapport aux aliments témoins (C₀), l'utilisation des EFE a amélioré d'une manière très hautement significative la dMO, l'EM et l'AGV. Cet effet paraît nettement meilleur pour les GD et particulièrement avec C₁₂₀. Pour les GB et les GE, la supplémentation en EFE présente un effet bénéfique sur les paramètres étudiés mais la différence entre les deux concentrations (C₆₀ et C₁₂₀) est non significative. On note que cette supplémentation a amélioré uniquement le maximum théorique de production de gaz sans modifier le temps de latence et la vitesse maximale de production de gaz.

Mots clés: cellulase, digestibilité, grignon d'olive, xylanase



1. Introduction

Les grignons d'olives sont les résidus solides obtenus après extraction d'huile d'olives. Ils présentent environ 35% des olives transformées (Neifar et al. 2013). Ce sous-produit est composé de peaux, de résidus de pulpe et de fragments de noyaux (Nefzaoui et al.1991). En Tunisie, la production annuelle de grignons d'olives est d'environ 200 000 tonnes. Elle provient essentiellement des régions du nord et du centre durant la période allant du mois de novembre jusqu'au mois de février (Moujahed-Raach et al. 2001).

La digestibilité des grignons d'olives est généralement très faible vu leur richesse en lignine (Sansoucy et al.1984; Zaidi et al. 2008). Ce composé constitue un complexe peu accessible aux enzymes bactériennes du rumen (Aguilera et Moulina 1986). La présence de certains composés phénoliques pénalise aussi la digestibilité de ces grignons (Zaidi et al. 2008). De même, leur teneurs en matières grasses souvent élevées altèrent l'activité cellulolytique des microorganismes et par conséquent la digestibilité ruminale (Sansoucy et al.1984 ; Zaidi et al. 2008). D'autre part, la digestibilité des protéines de ces grignons est aussi très limitée. Ceci serait dû au fait que la majorité de ces protéines se trouvent impliquées dans des structures lignocellulosiques complexes qui sont généralement inaccessibles aux enzymes (Nefzaoui1988;Nefzaoui 1991). Toutefois, l'effet d'une supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes sur l'utilisation digestive de ces grignons reste mal étudié. Dans la littérature, les études menées dans ce contexte restent très limitées et parfois contradictoires.

L'objectif de cette étude consiste à mettre en évidence l'effet de la supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes sur l'utilisation digestive de quelques types de grignons d'olives tout en utilisant la méthode *in vitro* de Menke et Steingass (1988).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Trois types de grignons, collectés à partir de quelques huileries situées dans les banlieues de Tunis, ont été utilisés comme matériel végétal pour réaliser cette étude :

- Des grignons d'olives bruts (GB) : obtenus par la méthode traditionnelle de préparation des huiles
- Des grignons d'olives épuisés (GE): qui présentent le résidu obtenu après déshuilage des grignons bruts par un solvant organique
- Des grignons d'olives dégraissés (GD): qui présentent le résidu obtenu après traitement thermique des grignons bruts suivi d'un traitement chimique (solvant organique).

2.2. Analyse chimique des aliments

Pour les trois types de grignons collectés, les différentes teneurs en matière sèche (MS), en matière organique (MO), en cellulose brute (CB), en matières azotées totales (MAT), en extrait éthéré (EE), en matières minérales (MM), en calcium (Ca) et en phosphore (P) ont été déterminées suivant les méthodes décrites et adoptées par les AOAC (1990).

2.3. Traitement enzymatique

Les grignons d'olives ont été pulvérisés par un complexe enzymatique composé de deux enzymes commerciales qui sont la cellulase plus (ayant une activité en cellulase de 30000 à 36000 unités par g et en β -glucanase de 7500 à 10000 unités par g) et laxylanase plus (ayant une activité en xylanase de 34000 à 41000 unités par g, en β -glucanase de 12000 à 15000 unités par g et en cellulase de 45000 à 55000 unités par g). Ces deux enzymes (Dyadic International, Jupiter, FL, USA) qui sont extraites à partir *Trichoderma longibrachiatum*, ont été mélangées suivant les proportions (1:1/v:v) pour constituer le complexe enzymatique. Ce dernier a été utilisé suivant trois concentrations différentes et qui sont : $C_0 = 0$, $C_{60} = 60$ et $C_{120} = 120$ mg par g de MS d'échantillon.

2.4. Incubation *in vitro* : production de gaz dans les seringues

La méthode *in vitro* décrite par Menke et Steingass (1988) a été utilisée pour étudier la cinétique de production de gaz dans des seringues en verre ayant une capacité de 100 ml. L'inoculum utilisé pour l'incubation est obtenu à partir du jus de rumen d'une vache de race Brown Swiss équipée d'une canule ruminale. Ayant subit une diète hydrique de 12 heures, cette femelle à l'entretien reçoit deux

fois par jour une ration complète composée d'aliment concentré et de foin d'avoine. La collecte de jus du rumen a été réalisée avant le repas du matin par l'intermédiaire d'une pompe manuelle. Une fois filtré, le jus de rumen est mélangé avec la solution tampon de Menke et Steingass (1988) en proportion 1:2 (v/v) pour constituer l'inoculum d'incubation. Les seringues contenant une prise d'essai de 200 mg d'aliment et 30 ml d'inoculum ont été immédiatement fermées par des pinces, agitées et puis placées dans un incubateur à 39°C. Pour chaque seringue, la production de gaz a été enregistrée après 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 et 72 heures d'incubation. Pour chaque point de cinétique, trois répétitions ont été prévues.

• **Ajustement des cinétiques de production de gaz**

L'ajustement des cinétiques de la production de gaz dans les seringues a été réalisé suivant le modèle Gompertz proposé par Schofield et al. (1994) et où les différents paramètres ont été estimés par une régression non linéaire des moindres carrés (nls) du logiciel R (3.1.3) (2015) :

$$PG = A \exp \left[-\exp \left(1 + \frac{b * e}{A} (\text{Lag} - t) \right) \right]$$

Avec, PG est la production cumulative de gaz (ml), A est le maximum théorique de production de gaz (ml), b est la vitesse maximale de production de gaz (ml/h), e est la constante d'Euler et Lag est le temps de latence (h) avant le début de production de gaz.

La digestibilité de la matière organique (dMO) et la teneur en énergie métabolisable (EM) ont été évaluées en utilisant des équations spécifiques proposées par Menke et Steingass (1988). La production d'acides gras volatils est calculée selon l'équation de Getachew et al (2002).

$$\begin{aligned} dMO_{(g/kg \text{ MO})} &= 148.8 + 8.89 \times PG + 4.5 \times PB_{(\%MS)} + 0.651 \times MM_{(\%MS)} \\ EM_{(MJ/kg \text{ MS})} &= 2.20 + 0.13570 \times PG + 0.0057 \times PB_{(g/kg \text{ MS})} + 0.000286 \times (EE_{(g/kg \text{ MS})})^2 \\ AGV_{(mmol/200mg \text{ MS})} &= -0.00425 + 0.0222 \times PG \end{aligned}$$

Avec :

PG est la production nette de gaz après 24 h d'incubation (ml/ 200 mg de MS de l'échantillon)

PB est la teneur en protéines brutes

MM est la teneur en matières minérales

EE est l'extrait éthéré.

• **Etude statistique**

Les résultats de la PG *in vitro* et les différents paramètres de fermentation ont été analysés statistiquement en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS (2003). Le test de Duncan a été utilisé avec un seuil $\alpha = 0.05$ pour comparer les moyennes. Le modèle statistique utilisé est le suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + C_j + (G \times C)_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} : l'observation, μ : moyenne générale, G : effet du type du grignon C_j : effet de la concentration, e_{ijk} : erreur expérimentale, i : type du grignon, j : la concentration d'enzymes, $(G \times C)_{ij}$: interaction entre type de grignons et concentration en enzymes.

3. Résultats et discussion

Les différentes teneurs en MO, en MAT, en CB, en EE et en minéraux des trois types de grignons étudiés sont présentées dans le tableau 1. Concernant l'enrichissement de ces grignons en matières grasses, les différentes teneurs en EE trouvées peuvent être plus ou moins similaires avec celles trouvées par Mennane et al. 2010, Molina Alcaide et al. 2003, Neifar et al. 2013, Sadegh et al. 2009, Sansoucy et al. 1984, mais différentes de celles trouvées par Awawde et Obeidat 2011. Pour chaque type de grignons, la variabilité de ces teneurs constatée d'une étude à une autre est due vraisemblablement à un aspect variétal des olives d'origine et aux différentes techniques de presse et d'extraction utilisées par les huileries.

Tableau1: La composition chimique des différents types de grignons d'olives (% par rapport à la MS)

Type de grignon	MS (%MB)	MO	MAT	EE	CB	MM	P	Ca
GB	59,52	91,03	6,87	6,20	48,00	8,97	0,04	1,20
GD	90,25	84,25	7,23	0,20	44,5	15,75	0,02	1,86
GE	89,65	93,55	6,39	4,70	50,00	6,45	0,03	1,26

GD : grignons d'olives dégraissés, GE : grignons d'olives épuisés, GB : grignons d'olives bruts

D'autre part, et comme le montrent les résultats du tableau 2, la supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes n'a pas d'effet significatif ni sur la vitesse maximale de production de gaz, ni sur le temps de latence. Par contre, elle améliore d'une manière hautement significative le maximum théorique de production de gaz (figure 1) quelque soit le type de grignons. L'écart entre les grignons non supplémentés et les grignons supplémentés est particulièrement remarquable avec le type dégraissé (GD). L'augmentation de la concentration du complexe enzymatique améliore davantage ce maximum théorique de production de gaz, mais la différence entre les deux concentrations utilisées (C_{60} et C_{120}) reste non significative. De même, cette différence est aussi remarquable avec les GD.

Tableau 2: Effet de la concentration en enzymes fibrolytiques sur les paramètres d'ajustement de la production de gaz des trois types de grignons étudiés

	GD			GE			GB			ESM	P		G*C
	C_0	C_{60}	C_{120}	C_0	C_{60}	C_{120}	C_0	C_{60}	C_{120}		G	C	
A	1.79 ^d	4.31 ^{bc}	6.03 ^{ab}	4.17 ^{bc}	6.38 ^{ab}	6.73 ^a	3.60 ^{cd}	6.15 ^{ab}	6.41 ^{ab}	0.96	0.03	0.007	0.69
b	1.96	3.36	0.67	2.26	0.99	0.37	2.27	0.65	0.41	1.45	0.54	0.18	0.60
Lag	0.41 ^a	-0.45 ^a	-3.49 ^{ab}	-	-4.61 ^{ab}	-	0.01 ^a	-	-	2.69	0.11	0.07	0.86
				2.01 ^{ab}		7.68 ^b		3.46 ^{ab}	3.15 ^{ab}				

^{a, b, c} Les lettres différentes sur la même ligne indiquent des valeurs statistiquement différentes
GD : grignons d'olives dégraissés, GE : grignons d'olives épuisés, GB : grignons d'olives bruts
ESM : erreur standard de la moyenne, A (ml / 200 mg MS) : maximum théorique de production de gaz, b (ml / h) : vitesse maximale de production de gaz, Lag (h) : temps de latence, G : type de grignons, C : concentration en enzyme

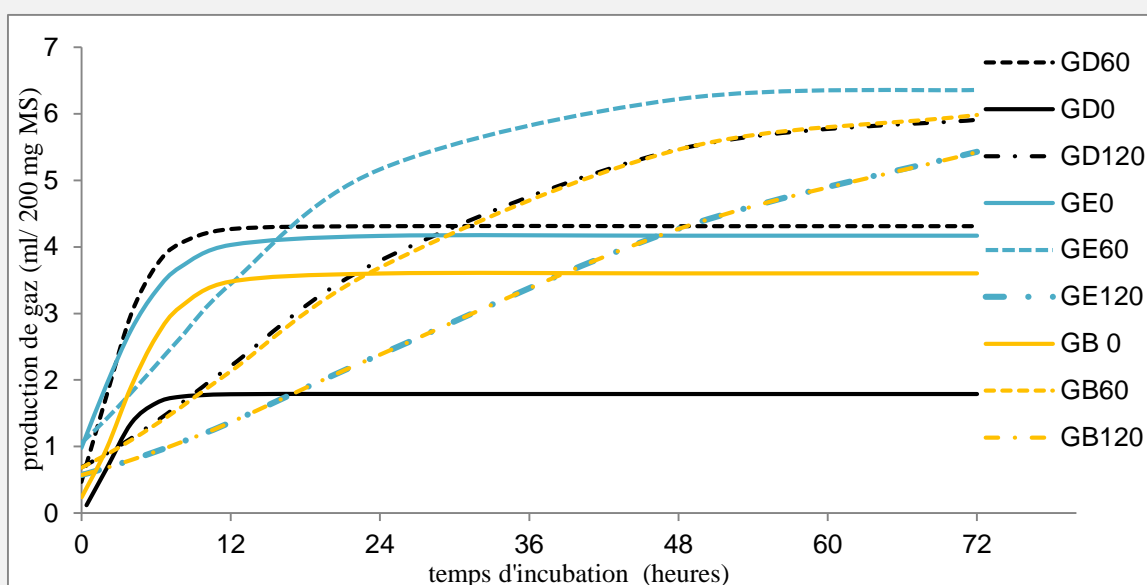


Figure 1. Effet de la concentration en enzymes fibrolytiques sur la cinétique de production de gaz des trois types de grignons étudiés (ajustement suivant le modèle Gompertz proposé par Schofield et al. 1994)

$C_0 = 0$, $C_{60} = 60$ et $C_{120} = 120$ mg par g de MS d'échantillon
GD : grignons d'olives dégraissés, GE : grignons d'olives épuisés, GB : grignons d'olives bruts

D'autre part, et comme le montrent les résultats du tableau 3, et par rapport aux grignons témoins (C_0), la supplémentation en EFE a amélioré d'une manière très hautement significative la DMO quelque soit le type de grignons étudié. Cette amélioration pourrait être expliquée par le fait que les cellulases et les xylanases du complexe utilisé agissent directement sur les liaisons β 1-4 de la cellulose et de l'hémicellulose (Bhat et Hazelwood 2001) et changent la structure du substrat en augmentant les surfaces de contact avec les microorganismes du rumen (Sprey et Bochem 1992). Ceci favorise la

colonisation du substrat par ces microorganismes pour augmenter sa digestibilité (Morgavi et al. 2004 ; Wang et al. 2012). Cependant, la supplémentation en EFE a ainsi augmenté d'une manière très hautement significative la teneur en EM et la production d'AGV, et ce pour les trois types de grignons étudiés.

Tableau 3: Effet de la concentration en enzymes fibrolytiques sur la digestibilité de la matière organique, la teneur en énergie métabolisable et la production d'acide gras volatil des trois types de grignons étudiés

	GD			GE			GB			ESM	G	P	G*C
	C ₀	C ₆₀	C ₁₂₀	C ₀	C ₆₀	C ₁₂₀	C ₀	C ₆₀	C ₁₂₀				
dM	20.49	22.71 ^{bc}	24.49	21.51 ^{cd}	23.06 ^a	22.18 ^{bcd}	21.22 ^d	23.22 ^a	22.77 ^b	0.61	0.6	0.000	0.02
O	e	d	a	e	b	c	e	b	c	9	9	4	9
EM	2.82 ^e	3.16 ^{bcd}	3.43 ^a	3.14 ^{cd}	3.38 ^{ab}	3.24 ^{abcd}	3.11 ^d	3.42 ^a	3.35 ^{abc}	0.09	0.0	0.000	0.02
										4	4	4	9
AG	0.029	0.085 ^{bc}	0.129	0.079 ^{cd}	0.118	0.096 ^{abc}	0.062	0.112	0.101	0.01	0.2	0.000	0.02
V	e	d	a	cd	ab	d	de	abc	abc	5	2	4	9

^{a, b, c} Les lettres différentes sur la même ligne indiquent des valeurs statistiquement différentes

ESM : erreur standard de la moyenne

GD : grignons d'olives dégraissés, GE : grignons d'olives épuisés, GB : grignons d'olives bruts

C : concentration en mg / g MS; dMO: la digestibilité de la matière organique en %, EM: la teneur en énergie métabolisable en MJ/ kg MS, AGV: la production des acides gras volatils en mmol/200 MS.

Pour la dMO, la teneur en EM et la production d'AGV, l'écart entre les grignons non supplémentés et les grignons supplémentés est particulièrement remarquable avec le type dégraissé (GD). Pour les grignons du type (GB) et du type (GE), l'augmentation de la concentration du complexe enzymatique ne présente pas de différences significatives. Par contre, pour les grignons du type (GD), la concentration C₁₂₀ améliore davantage et d'une manière significative la dMO, la teneur en EM et la production d'AGV.

4. Conclusion

Pour les grignons d'olives, la supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes présente un effet bénéfique sur leur utilisation digestive et leur valeur énergétique quelle que soit la concentration du complexe enzymatique utilisée. Toutefois, l'effet d'une telle supplémentation paraît nettement meilleur avec des grignons dégraissés qu'avec des grignons bruts ou épuisés. Il s'améliore davantage avec des concentrations enzymatiques croissantes.

Acknowledgments : Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet D3.10.27 CRP financé par l'IAEA.

5. Références

- Aguilera JF, Moulina E (1986).** Valorisation nutritive d'un grignon d'olive traité à la soude. *Ann. Zootech.* 35:205–218.
- AOAC (1990)** Official methods of analysis association of official analytical Chemists Washington DC
- Bhat MK, Hazlewood GP (2001)** Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 11–60
- Getachew G, Makkar HPS, Becker K (2002).** Tropical browses: contents of phenolics compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *J. Agr. Sci.* 139: 341-352.
- Menke KH, Steingass H (1988)** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7–55.
- 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). *Les technologies de laboratoire* 19: 4-9.
- Molina-Alcaide E, Yáñez Ruiz D, Moumen A, Martín García A.I. (2003).** Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheep of some olive by-products. *Small Ruminant Research* 49: 329–336.
- Moujahed-Raach A, Moujahed N, Kayouli C (2001).** Strategy of utilization of locally available corp residues and by-products for livestock feeding in Tunisia. *Tropicicultura* 12:15-20.

- Morgavi DP, Beauchemin KA, Nsereko VL, Rode LM, McAllister TA, Wang Y (2004)** Trichoderma enzymes promote Fibrobacter succinogenes S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84 : 1083-1090.
- Nefzaoui A (1988)**. Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *Options Méditerranéennes : Série n.153-173*.
- Nefzaoui A. (1991)**. Valorisation des sous-produits de l'olivier. *Options Méditerranéennes : Série A. Etudes et Recherches* 16: 101-108.
- Neifar M, Jaouani A, Ayari A, Abid O, Ben Salem H, Boudabous A, Najar T, EllouzeGhorbel R (2013)**. Improving the nutritive value of olive cake by solid state cultivation of the medicinal mushroom *Fomesfomentarius*. *Chemosphere* 91: 110-114.
- Sadeghi H, TeimouriYansari A, et Ansari-Pirsarai Z (2009)**. Effects of different olive cake by products on dry matter intake, nutrient digestibility and performance of Zel sheep. *International journal of agriculture and Biology*. 11: 39-43.
- Sansoucy R, Alibes A, Martilotti F, Nefzaoui A, Zoïopoulos P (1984)**. Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. *Etude FAO production et santé animales* N 43.
- SAS (2003)** SAS/STAT user's guide, version 9.1. SAS Institute Cary, North Carolina, USA
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN (1994)**. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 72: 2980-2991.
- Sprey B, Bochem HP (1992)**. Effect of endoglucanase and cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* on cellulose microfibril structure. *FEMS MicrobiolLett* 97:113-117
- Wang Y, Ramirez-Bribiesca JE, Yanke LJ, Tsang A, McAllister TA (2012)** Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on the microbial attachment and digestion of barley straw *in vitro*. *Asian - Aust. J. Anim. Sci.* 25: 66-74
- Zaidi F, Hassissene N, Boubekeur N, Bouaiche A, Bouabdellah A, Grongnet JF, Bellal MM, Youyou A (2008)**. Etude *in vitro* de facteurs limitant la valeur nutritive du grignon d'olive: effets des matières grasses et des métabolites secondaires. *Livestock Research for Rural Development* 20: 3.