

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
—  
PARIS  
—

①1 N° de publication :

**2 942 224**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

**09 00752**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 07 C 39/11** (2012.01), C 07 C 37/68, A 23 L 1/29, 3/  
349, A 61 K 8/97, 8/34, A 61 Q 19/02, 19/08

⑫

## BREVET D'INVENTION

**B1**

⑤4 PROCÉDE D'EXTRACTION DE COMPOSES PHENOLIQUES A PARTIR D'EAU DE VEGETATION DE L'OLIVE ET PREPARATION D'EXTRAIT TITRE EN POLYPHENOLS D'OLIVE ET DE RAISIN.

②2 Date de dépôt : 18.02.09.

③0 Priorité :

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE DE COOPERATION  
INTERNATIONALE EN RECHERCHE  
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT  
Etablissement public à caractère industriel et  
commercial , GRAP'SUD et CTRE INTERNATIONAL  
D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES  
AGRONOMIQUES (MONTPELLIER SUP AGRO)  
Etablissement public — FR.*

④3 Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 20.08.10 Bulletin 10/33.

④5 Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 30.11.12 Bulletin 12/48.

⑦2 Inventeur(s) : URBAN NELLY, DORNIER MANUEL,  
PALLET DOMINIQUE et REYNES MAX.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑦3 Titulaire(s) : *CENTRE DE COOPERATION  
INTERNATIONALE EN RECHERCHE  
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT  
GRAP'SUD, CTRE INTERNATIONAL D'ETUDES  
SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES  
(MONTPELLIER SUP AGRO)*

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ORES.

**FR 2 942 224 - B1**



## **Procédé d'extraction de composés phénoliques à partir d'eau de végétation de l'olive et préparation d'extrait titré en polyphénols d'olive et de raisin**

La présente invention se rapporte à un procédé d'extraction de composés phénoliques de faible masse moléculaire à partir d'eaux de végétation d'olive ; elle se rapporte également à des compositions enrichies en composés phénoliques comprenant au moins 40% de matière sèche, ladite matière sèche étant composée d'au moins 30% d'hydroxytyrosol ; l'invention se rapporte en outre à un procédé de séchage desdites compositions par atomisation en utilisant des extraits de polyphénols de raisin comme support de séchage ainsi qu'aux poudres titrées en composés phénoliques d'olive et de raisin obtenues après séchage.

Le procédé de fabrication de l'huile d'olive consiste à écraser (broyage) les olives entières jusqu'à l'obtention d'une pâte fine ou pulpe. Au cours de cette étape, le broyat d'olives peut être constamment lavé avec de l'eau. La pâte est ensuite pressée mécaniquement (pressurage) pour en extraire son contenu liquide. Le liquide obtenu est alors décanté pour séparer les deux phases qui le composent : l'huile et la phase aqueuse. Les eaux de lavage du broyat et la phase aqueuse récupérées à l'issue du pressage sont appelées eaux de végétation ou encore margines. Ces eaux représentent environ 60% du poids de l'olive.

Ces eaux de végétation sont très riches en composés phénoliques antioxydants ; un composé phénolique antioxydant particulièrement recherché est l'hydroxytyrosol ; il est présent à hauteur de 0,1 à 2 g/l dans les margines.

L'hydroxytyrosol est un composé phénolique simple ayant une chaîne latérale de type alcool en position 1 du cycle aromatique, ainsi que deux substitutions hydroxyles en positions 3 et 4 dudit cycle. Ce composé appartient à la famille des *ortho*-diphénols, composés généralement connus pour avoir des propriétés antioxydantes intéressantes.

Sa consommation participerait à l'effet bénéfique du régime crétois sur la santé humaine. De nombreuses recherches effectuées sur l'hydroxytyrosol ont montré l'intérêt de ce composé en tant qu'antioxydant. L'activité antioxydante de l'hydroxytyrosol lui confère des propriétés d'agent conservateur des corps gras ; il est également connu pour ses propriétés anti-bactériennes, anti-virales et anti-fongiques.

Ce composé est donc considéré comme un très bon complément ou additif alimentaire et comme un agent actif utile pour renforcer la protection cellulaire vis-à-vis du stress oxydant et des pathologies qu'il engendre.

En raison de l'intérêt, notamment pour les industries alimentaire et cosmétique, que représentent l'hydroxytyrosol et, plus généralement, les polyphénols d'olives, diverses tentatives de valorisation des sous-produits riches en composés phénoliques tels que les eaux de végétation (Visioli *et al.* « *Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidants* » *Experientia*, 1995; 51: 32-34) ont été menées.

Le Brevet Américain US 6,361,803 décrit ainsi un procédé d'extraction de compositions antioxydantes à partir de produits dérivés d'olives : la pulpe, l'huile ou encore les eaux de végétation d'olives à différents stades de maturité. Lorsque le produit de départ est constitué d'eaux de végétation, le procédé consiste à les traiter sur une résine polymérique adsorbante qui piège les composés antioxydants, puis à laver la résine avec un solvant polaire organique pour récupérer les composés antioxydants.

La mise en œuvre de ce procédé apparaît cependant moins adaptée aux eaux de végétation qu'aux autres produits dérivés d'olive. En effet, la comparaison de la composition en composés phénoliques d'extraits obtenus à partir de différents matériaux de départ montre que celui obtenu à partir d'eaux de végétation présente une faible teneur en composés phénoliques : 16,8% ; en outre, cet extrait a une activité antioxydante la plus faible de tous les extraits obtenus.

La Demande de Brevet Européen EP 1 623 960 décrit un procédé de préparation de tyrosol et/ou d'hydroxytyrosol à partir d'eaux de végétation d'olive (margines) qui comprend des étapes de :

- séparation physique impliquant plusieurs traitements membranaires (microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration et osmose inverse) des margines, de préférence à un pH neutre ou alcalin ;

- séparation chromatographique du tyrosol, de l'hydroxytyrosol et d'autres composés phénoliques à partir du concentrat obtenu après le dernier traitement membranaire ;

- conversion catalytique du tyrosol en hydroxytyrosol en présence d'un mélange de trioxyde de méthylrhénium (MTO) et de peroxyde d'hydrogène ;

- récupération de la phase aqueuse comprenant les composés phénoliques antioxydants.

Ce procédé présente l'inconvénient de mettre en œuvre une hydroxylation chimique du tyrosol en hydroxytyrosol ; or, en vue de la consommation ultérieure de l'hydroxytyrosol obtenu, il est nécessaire d'éliminer les catalyseurs, notamment le trioxyde de méthylrhénium qui est un fort irritant. En outre, ce procédé comporte de très nombreuses étapes : l'exemple 1 de ce document met en œuvre un procédé qui ne comporte pas moins de 13 traitements membranaires. Il est donc très long à mettre en œuvre, coûteux en moyens techniques et humains et son dimensionnement à l'échelle industrielle n'est pas économiquement envisageable.

Il en est de même du procédé décrit dans la Demande Internationale WO 2005/123603 qui est destiné au fractionnement des eaux de végétation d'olives dans le but de les valoriser. Ce procédé comprend une étape d'ajustement du pH ; d'hydrolyse enzymatique de la cellulose, de l'hémicellulose et de la pectine contenues dans les eaux de végétation ; de centrifugation ; de microfiltration tangentielle ; d'ultrafiltration tangentielle ; de diafiltration ; de nanofiltration tangentielle et d'osmose inverse.

La Demande Internationale WO 2007/013032 décrit une méthode d'obtention de concentrats riches en hydroxytyrosol notamment à partir d'eaux de végétation ; cette méthode combine au moins deux étapes :

- une extraction d'hydroxytyrosol et d'autres composés bioactifs à l'aide d'un fluide supercritique et/ou par nanofiltration ; et
- une osmose inverse.

L'extraction par fluide supercritique nécessite l'utilisation de pressions très élevées (supérieures à 74 bars lors de l'utilisation de CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique), c'est donc un procédé complexe et également coûteux à mettre en œuvre. En outre, l'osmose inverse est un procédé qui conduit à la concentration d'un extrait par élimination d'eau ; en particulier, l'osmose inverse ne permet pas un enrichissement sélectif en composés phénoliques de bas poids moléculaire.

Le Brevet Américain US 6,416,808 décrit un procédé d'obtention d'une composition riche en hydroxytyrosol à partir d'eaux de végétation d'olive comprenant les étapes suivantes : (i) production d'une eau de végétation à partir d'olives dénoyautées ; (ii) ajout d'une quantité suffisante d'acide, de préférence de l'acide citrique, pour atteindre un pH compris entre 1 et 5 ; (iii) incubation des eaux de végétation acidifiées pendant au moins deux mois afin que l'oleuropéine soit hydrolysée en hydroxytyrosol. Le procédé peut en outre comprendre une étape d'extraction de l'hydroxytyrosol avec un solvant

organique, une chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC) ou encore une extraction par fluide supercritique.

Bien qu'il conduise à des compositions enrichies en hydroxytyrosol, ce procédé, lorsqu'il met en œuvre une extraction par HLPC ou fluide supercritique, est trop coûteux pour être utilisé à l'échelle industrielle. En outre, l'extraction liquide-liquide utilise des solvants organiques toxiques qui ne sont pas compatibles avec une utilisation de l'extrait obtenu dans les industries cosmétique ou alimentaire.

Ainsi les procédés décrits dans l'art antérieur ne donnent pas entière satisfaction et il demeure le besoin de mettre au point un procédé d'extraction de composés phénoliques de faible masse moléculaire à partir d'eaux de végétation de l'olive qui soit simple et adapté à une mise en œuvre industrielle.

La Demanderesse s'est fixée comme objectif de proposer un procédé conduisant à un fractionnement des phénols contenus dans les margines afin de séparer la fraction phénolique de faible masse moléculaire des composés de masse moléculaire plus élevée comme l'oleuropéine et le verbascoside.

Pour présenter un intérêt dans le cadre de la présente invention, il est nécessaire que le procédé permette un enrichissement sélectif en hydroxytyrosol et en tyrosol. C'est ce à quoi est parvenue la Demanderesse en sélectionnant des membranes de nanofiltration qui présentent une rétention en hydroxytyrosol et en tyrosol la plus faible possible et, simultanément, une rétention maximale des autres composés phénoliques, en particulier des composés polyphénoliques. Ainsi, l'utilisation des membranes de nanofiltration sélectionnées permet d'augmenter de 1,5 à 3,5 fois la teneur massique en composés phénoliques de la matière sèche des perméats et, en particulier, 2 à 20 fois la teneur massique en hydroxytyrosol de la matière sèche des perméats issus du traitement de nanofiltration ; les perméats sont donc significativement enrichis en composés phénoliques de faible masse moléculaire.

La matière sèche d'un échantillon est mesurée par séchage de l'échantillon ; le pourcentage de matière sèche est alors déterminé par le ratio entre la masse de la matière sèche et la masse totale de l'échantillon.

A moins qu'il n'en soit précisé autrement, dans ce qui suit, les concentrations sont exprimées en pourcentages en masse.

On entend par rétentat, la fraction d'un échantillon retenue par une membrane lors du traitement de séparation membranaire dudit échantillon.

On entend par perméat, la fraction d'un échantillon traversant une membrane lors du traitement de séparation membranaire dudit échantillon.

Par traitement de séparation membranaire, on entend dans le cadre de la présente invention, un procédé de filtration -microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration- ou d'osmose inverse.

On entend par éluat, le produit obtenu par la remise en solution par un solvant d'une ou plusieurs substances adsorbées sur un support ; l'éluat comprend donc le solvant et la ou lesdites substances.

Par eaux de végétation ou margines, on entend les eaux générées lors de la production de l'huile d'olive. La teneur en matière sèche des margines est variable et dépend du procédé mis en œuvre en huilerie ; à titre indicatif, les margines brutes non clarifiées peuvent contenir entre 3 à 15% de matière sèche.

Selon un premier de ses objets, la présente invention se rapporte à un procédé d'extraction de composés phénoliques de faible masse moléculaire à partir d'eaux de végétation d'olives comprenant :

- (a) une étape de clarification desdites eaux de végétation ;
- (b) une étape d'ultrafiltration tangentielle des eaux de végétation clarifiées obtenues à l'étape (a) sur une membrane céramique tubulaire de seuil de coupure compris entre 100 et 200 kDa et de récupération du perméat ;
- ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend en outre :
  - (c) une étape de nanofiltration dudit perméat obtenu à l'étape (b) sur une membrane organique spirale de seuil de coupure compris entre 150 et 400 Da à une pression comprise entre 1 et 3 MPa ; ladite membrane est telle qu'elle permet d'obtenir un rétentat comprenant entre 70 et 90% de la matière sèche contenues dans lesdites eaux de végétation et au plus 20% d'hydroxytyrosol et
  - (d) une étape d'adsorption des composés phénoliques contenus dans le perméat obtenu à l'étape (c) par passage sur une matrice polymérique suivie de l'éluat des composés phénoliques adsorbés sur ladite matrice avec un solvant polaire organique et obtention d'un éluat.

Pour être utilisées dans le procédé selon l'invention, les eaux de végétation peuvent comprendre jusqu'à 15% de matière sèche. Le pourcentage de matière sèche des eaux de végétation est le ratio entre la masse de la matière sèche et la masse totale des eaux de végétation. En particulier, les eaux de végétation présentent un taux de

matière sèche compris entre 3 et 7%. L'utilisation de margines comportant plus de 7% de matière sèche nécessite un traitement préalable tel qu'une dilution.

Par composés phénoliques de faible masse moléculaire, on entend des composés ayant une masse moléculaire inférieure ou égale à 400 Da. En particulier, les  
5 composés phénoliques de faible masse moléculaire sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol, les acides phénoliques tels que les acides hydroxycinnamiques, comme par exemple les acides ferrulique, coumarique ou caféique, ou leurs esters, comme par exemple l'acide chlorogénique.

La clarification consiste en une extraction solide-liquide, telle que la  
10 filtration, la centrifugation ou encore la décantation, des eaux de végétation.

Par filtration, on entend un procédé de séparation des constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. Pour la mise en œuvre de l'étape (a) du procédé selon l'invention, on peut utiliser une filtration clarifiante, c'est-à-dire un milieu poreux tel que le diamètre des pores se situe  
15 entre 10 et 450  $\mu\text{m}$  ; la filtration peut être mise en œuvre à l'aide de filtres à cartouche, à bougies, à plateaux, à sable, de filtres presses ou de filtres rotatifs sous vide.

La centrifugation est une technique utilisant la force centrifuge pour séparer des éléments solides en suspension dans un fluide ; cette technique est mise en œuvre à l'aide d'une centrifugeuse dont l'homme du métier choisira les caractéristiques en  
20 fonction des margines à traiter ; à titre d'exemple, on peut citer les centrifugeuses à bol tubulaire, à bol à chambres concentriques, les centrifugeuses à assiettes ou décanteur centrifuge.

Enfin, la décantation est une opération de séparation mécanique, sous l'action de la gravitation, de plusieurs phases non-miscibles dont l'une au moins est liquide.  
25 On peut ainsi séparer des solides insolubles en suspension dans un liquide comme dans le cas des margines. Pour mettre en œuvre une telle décantation, on peut utiliser un décanteur (aussi appelé épaisseur) dont l'homme du métier ajustera les caractéristiques en fonction des margines à traiter. on peut notamment citer les décanteurs discontinus et les décanteurs continus éventuellement à cloison ou à étage.

30 De préférence, la clarification est réalisée par une opération de filtration.

L'ultrafiltration tangentielle mise en œuvre à l'étape (b) du procédé selon l'invention est un procédé mécanique de séparation en phase liquide basé sur les propriétés de tamisage moléculaire d'une membrane poreuse balayée tangentiellement par un liquide

contenant les constituants à séparer. Dans le cadre du présent procédé, l'ultrafiltration tangentielle est réalisée avec des membranes céramiques tubulaires ayant un seuil de coupure de préférence de 150 kDa comme par exemple les membranes d'ultrafiltration proposées par les sociétés TAMI et EXEKIA. Le procédé est mis en œuvre à basse  
5 pression, c'est-à-dire inférieure ou égale à 0,1 MPa.

Après le passage des eaux de végétation clarifiées obtenues à l'étape (a) à travers la membrane d'ultrafiltration, on obtient deux fractions : le perméat qui contient le solvant et toutes les molécules dissoutes ayant un diamètre inférieur au diamètre des pores de la membrane ; et le rétentat qui est enrichi par rapport au liquide initial en molécules et  
10 composés ayant un diamètre supérieur au diamètre des pores de la membrane.

L'étape (c) consiste en un traitement de nanofiltration du perméat obtenu à l'étape (b). La nanofiltration est un procédé de séparation effectué par l'application d'une pression, qui en est la force motrice, sur une membrane semiperméable ; elle se caractérise par la nature de la membrane utilisée qui définit la taille des particules ciblées et la  
15 pression d'opération.

Dans le cadre du procédé selon la présente invention, l'étape de nanofiltration est réalisée sur une membrane organique spirale de seuil de coupure compris entre 150 et 400 Da, de préférence entre 300 et 400 Da. Dans ces conditions, la nanofiltration du perméat issu de l'étape (b) conduit à un second perméat issu de l'étape (c)  
20 contenant les composés phénoliques de faible masse moléculaire (hydroxytyrosol, tyrosol et acides phénoliques).

De façon plus spécifique, il a été montré dans l'exemple 1 ci-après que seules les membranes organiques spirales de seuil de coupure compris entre 150 et 400 Da présentant les caractéristiques décrites ci-après conduisent à un fractionnement satisfaisant  
25 des composés phénoliques des margines : ainsi, sont utiles selon l'invention les membranes dont l'utilisation conduit à un rétentat comprenant entre 70 et 90% de la matière sèche contenues dans lesdites eaux de végétation et au plus 20% d'hydroxytyrosol. Ces valeurs sont par exemple obtenues lors du traitement de margines à 4% de matière sèche dans le cadre d'essais sur installation pilote de laboratoire à 3 l de volume nominal en  
30 configuration plane avec une surface membranaire utile de  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$ , une pression transmembranaire comprise entre 1 et 3 MPa et une vitesse tangentielle de  $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .



La mise au point de l'étape de nanofiltration a nécessité plusieurs essais sur diverses installations pilotes. Les résultats de sélection des membranes sont détaillés dans l'exemple 1.

Grâce à cette sélection de membranes, la fraction phénolique des perméats obtenus après nanofiltration est significativement enrichie en composés phénoliques de faible masse moléculaire ; à titre indicatif, l'hydroxytyrosol et le tyrosol y représentent entre 63 et 84% des composés phénoliques totaux.

De façon préférée, la mise en œuvre de l'étape (c) de nanofiltration est réalisée dans des conditions telles que le flux de perméat est supérieur ou égal à  $10 \text{ kg.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  (voir l'exemple 2 ci-après).

L'étape (d) de passage sur la matrice polymérique adsorbante permet d'éliminer les composés non phénoliques présents dans le perméat, notamment les minéraux, les sels et les acides organiques. Les composés phénoliques totaux représentent environ 30% de la matière sèche du perméat ; après passage sur résine, ils représentent plus de 80% de la matière sèche de l'éluat.

La matrice polymérique utilisée à l'étape (d) est de préférence une résine adsorbante styrénique, acrylique ou phénolique ; de préférence, il s'agit d'une résine adsorbante polystyrénique.

Les solvants polaires organiques ou la solution aqueuse de solvants polaires organiques utiles pour l'élution des composés phénoliques adsorbés sur ladite matrice sont notamment des solvants acceptables dans le domaine alimentaire ; de préférence, il s'agit d'un alcool en  $C_1$ - $C_4$  ou d'un mélange d'alcools ; préférentiellement, il s'agit de l'éthanol.

Selon des variantes préférées de mise en œuvre de la présente invention, le procédé comprend en outre une ou plusieurs des étapes suivantes :

- une étape (a0), préalable à l'étape (a), d'acidification des eaux de végétation pour atteindre un pH inférieur ou égal à 4.5.

L'acidification des eaux de végétation peut être mise en œuvre avec tout acide compatible avec la consommation alimentaire humaine ou animale. En particulier, l'acidification peut être réalisée avec tout acide organique tel que l'acide citrique, l'acide tartrique, l'acide malique ou l'acide lactique. Avantagusement, l'acidification est réalisée avec de l'acide citrique. Quel que soit l'acide utilisé pour la mise en œuvre de l'étape (a0) du procédé selon l'invention, l'homme du métier saura ajuster la quantité nécessaire

d'acide à introduire dans les eaux de végétation, par exemple par une méthode itérative consistant à ajouter des petites quantités d'acide puis à mesurer le pH.

- une étape (e) de concentration par distillation sous vide de l'éluat obtenu à l'étape (d).

5 Selon une variante particulière de mise en œuvre du procédé, il comprend successivement les étapes (a0), (a), (b), (c), (d) et (e).

Le procédé peut encore comprendre trois étapes additionnelles utiles en vue d'un stockage des eaux de végétation avant la mise en œuvre du procédé selon l'invention. Ces trois étapes, s'intercalant entre les étapes (a) et (b), sont les suivantes :

10 (a1) concentration des margines acidifiées et clarifiées pour les stocker ;  
(a2) stockage des margines acidifiées concentrées ; puis  
(a3) dilution dans un solvant des margines acidifiées concentrées à environ 4% de matière sèche avant de pratiquer l'étape (b).

15 L'étape (a1) peut être réalisée par une technique de concentration sous vide.

Le stockage selon l'étape (a2) est préférentiellement réalisée à une température comprise entre 6 et 15°C.

Le solvant de l'étape (a3) est de préférence de l'eau.

20 La mise en œuvre du procédé selon l'invention conduit à une composition enrichie en composés phénoliques de faible masse moléculaire qui est également un objet de la présente invention. Cette composition –ci-après appelée composition A- comprend avantageusement au moins 40% de matière sèche ; ce pourcentage de matière sèche est le ratio entre la masse de la matière sèche obtenu après séchage de la composition A et la masse totale de la composition A ; ladite matière sèche est composée d'au moins 80% de  
25 composés phénoliques totaux ; en particulier, elle comprend au moins 30% d'hydroxytyrosol et au moins 10% de tyrosol.

Ce procédé présente en particulier l'avantage de conduire de façon reproductible à une composition en composés phénoliques comprenant des teneurs minimales en hydroxytyrosol, en tyrosol et en autres composés phénoliques de faible  
30 masse moléculaire tels que les acides hydroxycinnamiques, comme par exemple les acides ferrulique, coumarique ou caféique, ou leurs esters, comme par exemple l'acide chlorogénique. C'est un critère important pour une utilisation ultérieure dans les industries cosmétique ou alimentaire par exemple.

La composition A ainsi obtenue est avantageusement séchée, par exemple par atomisation. De préférence, et afin d'éviter l'utilisation de supports de séchage tels que des polyosides de charge comme les dextrines ou les gommés, on utilise comme support de séchage un extrait de raisin comprenant au moins 60% en masse de polyphénols totaux.

5 Ainsi, l'invention se rapporte également à l'utilisation d'un extrait de raisin comprenant au moins 60% en masse de polyphénols totaux comme support de séchage par atomisation d'une composition A.

L'invention se rapporte encore à un procédé de préparation d'une poudre titrée en composés phénoliques et polyphénoliques d'olive et de raisin comprenant les  
10 étapes suivantes :

(e1) mélange d'une composition A avec un extrait de raisin comprenant au moins 60% de polyphénols totaux ; ledit mélange comprend une quantité de ladite composition A telle que la matière sèche de ladite composition A représente entre 5 et 40% de la matière sèche totale du mélange ;

15 (e2) séchage par atomisation du mélange obtenu à l'étape (e1).

Le pourcentage de matière sèche du mélange de la composition A et de l'extrait de raisin est le ratio entre la masse de la matière sèche mesurée après séchage dudit mélange et la masse totale dudit mélange.

Ledit extrait de raisin comprend de préférence au moins 60% de  
20 polyphénols totaux, et encore préférentiellement au moins 90% de polyphénols totaux. La teneur en polyphénols totaux d'un extrait de raisin peut notamment être mesurée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Folin Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Meth Enzymol 1999; 299: 152-178).

25 L'extrait de raisin peut être obtenu par passage sur une résine adsorbante, notamment une résine adsorbante styrénique, acrylique ou phénolique, de piquette de marc ou d'extraits aqueux de pépins de raisin. La piquette de marc est une solution obtenue après la diffusion à l'eau de marc de raisin ; le marc de raisin est la partie solide récupérée à l'issue de l'étape du pressage du raisin, il est constitué de l'ensemble des pellicules, des  
30 pépins de raisin ainsi que de la rafle.

Selon une variante de mise en œuvre de ce procédé, ces deux étapes (e1) et (e2) suivent l'étape (e) du procédé d'extraction de composés phénoliques de faible masse moléculaire selon l'invention.

Le séchage par atomisation (ou pulvérisation) est une technique d'élimination d'eau par entraînement consistant à pulvériser un produit liquide dans un courant d'air chaud. Concrètement, cette technique consiste à injecter le produit liquide à déshydrater sous la forme d'un fin brouillard en haut d'une tour en même temps qu'un  
 5 courant d'air très chaud parcourt ladite tour ; sous l'effet de la chaleur, l'eau s'évapore et la poudre déshydratée tombe en bas de la tour.

Ledit procédé de préparation d'une poudre titrée en composés phénoliques et polyphénoliques d'olive et de raisin conduit à une poudre comprenant au moins 95% de composés phénoliques et polyphénoliques.

10 A titre indicatif, les poudres titrées en composés phénoliques et polyphénoliques d'olive et de raisin obtenues à partir d'olive et d'extraits de pépins de raisin présentent les gammes de teneurs suivantes :

	Composés phénoliques totaux	de 60 à 100%
	Procyanidines	de 18 à 50%
15	Hydroxytyrosol	de 1,5 à 16%
	Tyrosol	de 0,5 à 8%

Dans le cas où les polyphénols de raisins proviennent de marc de raisin, la poudre comprend les gammes de teneurs suivantes :

	Composés phénoliques totaux	de 60 à 100%
20	Procyanidines	de 9 à 25%
	Anthocyanes	de 1,2 à 8%
	Hydroxytyrosol	de 1,5 à 16%
	Tyrosol	de 0,5 à 8%

25 Les poudres obtenues selon ce procédé sont également des objets de la présente invention.

Les compositions A enrichies en composés phénoliques de faible masse moléculaire et les poudres selon l'invention présentent de nombreuses applications. Elles ont un intérêt particulièrement marqué dans le domaine de la cosmétique, pour leur  
 30 utilisation comme agent de prévention du stress oxydant de la peau (derme et épiderme), comme agent anti-radicalaire, comme agent anti-âge ; mais aussi dans le domaine alimentaire notamment pour une utilisation comme compléments alimentaires ou encore comme conservateur.

Les compositions A enrichies en composés phénoliques de faible masse moléculaire et les poudres selon l'invention sont particulièrement actives comme agents dépigmentants et/ou blanchissants de la peau ; elles favorisent ainsi l'élimination des taches et des irrégularités pigmentaires de la peau.

5 L'invention est maintenant décrite plus en détail au regard des exemples qui suivent. Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

### **Exemple 1 - Sélection d'une membrane de nanofiltration**

10 Afin d'optimiser la séparation des composés phénoliques de faible masse moléculaire par nanofiltration, plusieurs membranes commerciales ont été évaluées en termes de performance (densité de flux de perméat) et de rétention.

Les essais ont été réalisés à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  sur une installation pilote de laboratoire (3l de volume nominal) en configuration plane avec une surface membranaire utile de l'ordre de  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$ . Les pressions transmembranaires choisies s'échelonnent  
15 entre 1 et 3 MPa et la vitesse tangentielle avoisine  $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Pour évaluer la faisabilité de la séparation des composés phénoliques de faible masse moléculaire, neuf membranes de nanofiltration ont été présélectionnées (fournisseur Mycrodin Nadir, Dow Filmtec, GE Osmonics, Toray, Koch). Ces membranes  
20 présentent un seuil de coupure compris entre 150 et 400 Da (valeurs annoncées par les fabricants).

Elles ont été testées sur une margine standard à 4% de matière sèche sans concentration, c'est-à-dire avec un facteur de réduction volumique proche de 1. Selon la membrane et la pression transmembranaire utilisée, les densités de flux de perméat varient  
25 entre 3 et  $133 \text{ kg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ .

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau I ci-après.

Membranes		Densité de flux de perméat ( $\text{l.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )	Rétention (%)		
Fournisseur	Référence		Matière sèche	Polyphénols totaux	hydroxytyrosol
Mycriidin Nadir	NP030	3-5	78	51	17
	NP010	13-23	52-73	41-46	9
Dow Flimtec	NF270	20-56	90-96	58-59	26-43
	NF200	14-42	87-94	56-64	22-40
	NF90	3-19	>99	98	99
GE	DK	20-92	92-99	78-82	1-40
Osmonics	DL	27-133	75-97	51-78	1-44
Toray	UTC60	14-45	90-94	56-66	22-39
Koch	MPF34	7-17	>99	33	87

Tableau 1 : Résultats de nanofiltration obtenus sur les différentes membranes testées.

Les membranes testées retiennent entre 52 et 99% de la matière sèche et entre 41 et 98% de polyphénols totaux des margines traitées (déterminé avec la méthode de Folin-Ciocalteu, Folin Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. Meth Enzymol 1999; 299: 152-178.).

La rétention en hydroxytyrosol, principal composé phénolique de faible masse moléculaire, est plus faible ; les membranes testées retiennent entre 1 et 44% de l'hydroxytyrosol présent dans les margines traitées, à l'exception des membranes Dow Filmtec NF90 et Koch MPF34.

Bien que les membranes soient *a priori* voisines, on observe que les performances globales du procédé (densité de flux de perméat) et les performances de la séparation (rétention) sont étroitement liées au choix de la membrane de nanofiltration.

### **Exemple 2 – Influence de la concentration des margines sur l'efficacité de l'étape de nanofiltration**

Afin d'évaluer l'impact de la concentration des margines sur la densité de flux de perméat et la rétention, des margines présentant une teneur en matière sèche variant de 3,5 à 22% ont été traitées. Pour ces essais, deux membranes parmi les plus performantes testées à l'exemple 1, sont choisies : GE Osmonics Desal DL et DK.

Comme dans l'exemple 1, les essais ont été réalisés à 30°C sur une installation pilote de laboratoire en configuration plane avec une surface membranaire utile

de l'ordre de  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$ . Les pressions transmembranaires utilisées s'échelonnent entre 20 bars (2 MPa) et 30 bars (3 Mpa) et la vitesse tangentielle avoisine  $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Membrane	Matière sèche des margine (%)	Pression transmembranaire (bar)	Flux de perméat ( $\text{kg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ )
GE Osmonics Desal DL	4	20	95,4
		25	105,3
		30	132,7
	13	20	10,4
		25	19,5
		30	29,8
	22	20	< 0,8
		25	1,1
		30	3,2
GE Osmonics Desal DK	4	20	63,2
		25	78,2
		30	91,9
	13	20	5,0
		25	12,7
		30	22,5
	22	20	< 0,8
		25	< 0,8
		30	0,8

Pour les deux membranes, le flux de perméat diminue rapidement avec l'augmentation de la teneur en matière sèche. Par exemple, à 20 bars, la densité de flux de perméat est divisée par 10 lorsque la teneur en matière sèche passe de 4 à 13%. A 22% de matière sèche, les densités de flux de perméat sont très faibles : la pression doit être maintenue supérieure à 25 bars pour obtenir des densités de flux de perméat de quelques  $\text{kg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ .

Ces résultats montrent que, pour garantir un flux supérieur à  $10 \text{ kg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  dans les conditions opératoires testées, il est difficile de dépasser 13 à 15% de matière sèche. Cette teneur correspond à un facteur de réduction volumique compris entre 3 et 4 soit un rendement de production de perméat voisin de 70%.

Le facteur de réduction volumique (FRV) est défini comme le rapport entre le volume de produit initial sur le volume de rétentat final soit  $\text{FRV} = V_0/V_r$  ; comme

$V_0 = V_r + V_p$ , FRV est directement lié au rendement volumique de production de perméat  $X = V_p/V_0$  soit en pourcentage  $X = 100.(1-1/FRV)$ .

On constate par ailleurs que les rétentions sont peu affectées par la teneur en matière sèche des margines l'alimentation ; les taux de matière sèche et de polyphénols totaux dans le rétentat diminue légèrement lorsque la concentration des margines augmente.

### **Exemple 3 – Essais de nanofiltration à une échelle semi-industrielle**

Les essais de laboratoire ont permis d'évaluer la faisabilité technique du procédé de nanofiltration pour enrichir le produit en composés phénoliques de faible masse moléculaire. Ils ont également permis de sélectionner des membranes commerciales appropriées pour réaliser l'opération. Afin d'évaluer le procédé à une échelle plus en adéquation avec une utilisation industrielle, des essais ont été réalisés en utilisant des modules de nanofiltration spiralés de 2,5 m<sup>2</sup> de surface utile. L'installation mise en œuvre a une capacité nominale de 80 l. La pression transmembranaire choisie est comprise entre 2 et 3 MPa, la température est de 30°C et le débit de circulation est de 1,7.10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>.

Le premier essai est réalisé sur les mêmes membranes que celles présentées en exemple 2, c'est-à-dire les membranes GE Osmonics Desal DL et DK. Lors de cet essai, le perméat est extrait continuellement jusqu'à atteindre un facteur de réduction volumique de 8.

Les résultats obtenus en termes de performance sont en adéquation avec ceux obtenus sur pilote de laboratoire : la densité de flux de perméat diminue lorsque le pourcentage de matière sèche des margines augmente. Le facteur de réduction volumique maximal pour obtenir une densité de flux de perméat supérieure à 10 kg.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> est compris entre 4,5 et 6 soit un rendement de production de perméat voisin de 80%. Pour des facteurs de réduction volumique compris entre 2 et 6, la matière sèche du perméat est enrichie de 2 à 4 fois en composés phénoliques totaux et de 5 à 13 fois en hydroxytyrosol.

Des essais complémentaires ont été réalisés avec les deux mêmes modules membranaires spiralés de 2,5 m<sup>2</sup> et dans des conditions similaires à celles décrites ci-avant. Ces essais visent à vérifier la stabilité des performances de l'opération en simulant un fonctionnement continu avec deux étages de concentration successifs. Le premier étage correspond à un facteur de réduction volumique de 2 (soit un rendement de production de perméat de 50%) et le second à un facteur de réduction volumique de 8 (soit un rendement de production de 75%).



Les densités de flux de perméat sont environ 15 fois plus faibles dans le second étage par rapport au premier. Vérifiées sur des durées de palier de 120 minutes, les densités de flux sont stables au cours du temps dans les deux étages. En termes de rétention, les résultats corroborent ceux obtenus précédemment. La mise en œuvre industrielle du procédé en continu est donc aisément envisageable.

**Exemple 4 – Mise en œuvre du procédé selon l'invention à une échelle industrielle**

Afin de valider le procédé dans sa globalité, un essai a été réalisé à l'échelle industrielle en intégrant toutes les étapes du procédé selon l'invention.

10 Pour cet essai, 19,3 m<sup>3</sup> de margines fraîches acidifiées avec de l'acide citrique à pH 4,2 ont été utilisées.

Ces margines sont tout d'abord clarifiées par filtration sur filtre rotatif sous vide puis traitées par ultrafiltration sur une installation munie de 37,2 m<sup>2</sup> de membranes céramiques tubulaires de seuil de coupure 150 kDa. Le perméat obtenu 15 (13,9 m<sup>3</sup>) est ensuite nanofiltré sur une installation munie de 18 m<sup>2</sup> de membranes organiques spiralée GE Osmonics Desal DL. Le perméat de nanofiltration (10,6 m<sup>3</sup>) est alors traité sur des résines absorbantes RELITE SP411®. Après élution à l'éthanol à 80% et concentration sous vide de l'éluat alcoolique, 45,7 kg de composition enrichie en composés phénoliques de faible masse moléculaire à 48% de matière sèche sont obtenus. 20 Cette composition contient 41,7% de polyphénols (A<sub>280nm</sub> éq. Catéchine, c'est-à-dire exprimé en équivalent de la catéchine et mesuré avec un spectrophotomètre à 280 nm selon J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *J Food Chem*, Volume 64, pp 555-559), 17% d'hydroxytyrosol et 6% de tyrosol (mesurés par chromatographie en phase liquide haute performance, HPLC). 25

La composition enrichie en composés phénoliques de faible masse moléculaire est enfin séchée par atomisation avec un extrait de raisin. Préalablement au séchage, la composition et l'extrait de raisin sont mélangés de telle sorte que la matière sèche du mélange est composée à 80% de matière sèche de raisin et 20% de matière sèche 30 de ladite composition. Le produit fini obtenu est une poudre fluide qui ne prend pas en masse. Elle contient uniquement des polyphénols (100%, A<sub>280nm</sub> éq. catéchine). Elle se constitue de 17,4% de procyanidines, 7,6% d'hydroxytyrosol, 2,7% de tyrosol (HPLC) et

3,1% d'anthocyanes (mesuré par la méthode de Riberau-Gayon *et al.*, 1975, Sciences et techniques du vin. Tome III. Dunod, Paris).

Le séchage de ladite composition dans les mêmes conditions mais avec un support de polyphénols de pépins de raisin (de la même façon, le mélange est tel que la matière sèche du mélange est composée à 80% de matière sèche de pépins de raisin et 20% de matière sèche de la composition) conduit également à une poudre fluide, ne reprenant pas en masse et constituée uniquement de polyphénols. Cette seconde poudre se compose de 31,2% de procyanidines (méthode à la vanilline, Broadhurst R.B., Jones W.T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. J. Science Food Agriculture, 29 :788-794), de 6,9% d'hydroxytyrosol et de 2,5% de tyrosol (HPLC).

**Exemple 5 – Exemple comparatif de mise en œuvre du procédé selon l'invention à une échelle industrielle avec une membrane de nanofiltration ne présentant pas les caractéristiques requises**

Un autre essai de mise en œuvre du procédé à l'échelle industrielle est réalisé avec une membrane KOCH SR3 N2.

Pour cet essai, 28 m<sup>3</sup> de margines sont acidifiées avec de l'acide citrique pour atteindre un pH 4,2.

Les margines acidifiées sont ensuite ultrafiltrées sur une installation munie de 37.2 m<sup>2</sup> de membranes céramiques tubulaires de seuil de coupure de 150 kDa.

Le perméat obtenu (24 m<sup>3</sup>) est nanofiltré sur une installation munie de 18 m<sup>2</sup> de membranes organiques spiralées KOCH SR3 N2. Le perméat de nanofiltration (18 m<sup>3</sup>) a été traité sur une résine adsorbante RELITE SP411. Après dilution à l'éthanol à 80% et concentration sous vide de l'éluat alcoolique, 41 kg de composition enrichie en composés phénoliques de faible masse moléculaire à 48,8% de matière sèche sont obtenus. Cette composition contient 37,6% de polyphénols (A<sub>280nm</sub> éq. catéchine), 11% d'hydroxytyrosol et 4% de tyrosol (HPLC). Dans cette composition, le ratio hydroxytyrosol / polyphénols totaux est seulement de 29,3 g / 100 g. Cet essai confirme les résultats de l'exemple 1, la sélectivité de cette membrane de nanofiltration est insuffisante pour obtenir une composition enrichie en composés phénoliques d'intérêt.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé d'extraction de composés phénoliques de faible masse moléculaire à partir d'eaux de végétation d'olives comprenant :

(a) une étape de clarification desdites eaux de végétation ;

5 (b) une étape d'ultrafiltration tangentielle des eaux de végétation clarifiées obtenues à l'étape (a) sur une membrane céramique tubulaire de seuil de coupure compris entre 100 et 200 kDa et de récupération du perméat ;

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

10 (c) une étape de nanofiltration dudit perméat obtenu à l'étape (b) sur une membrane organique spirale de seuil de coupure compris entre 150 et 400 Da à une pression comprise entre 1 et 3 MPa ; ladite membrane est telle qu'elle permet d'obtenir un rétentat comprenant entre 70 et 90% de la matière sèche contenue dans lesdites eaux de végétation et au plus 20% d'hydroxytyrosol et

15 (d) une étape d'adsorption des composés phénoliques contenus dans le perméat obtenu à l'étape (c) par passage sur une matrice polymérique suivie de l'élution des composés phénoliques adsorbés sur ladite matrice avec un solvant polaire organique et obtention d'un éluat.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une étape (a0) additionnelle, préalable à l'étape (a), d'acidification des eaux de végétation pour  
20 atteindre un pH inférieur ou égal à 4,3.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape (d) est suivie d'une étape (e) de concentration par distillation sous vide de l'éluat obtenu à l'étape (d).

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend  
25 successivement les étapes (a0), (a), (b), (c), (d) et (e).

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend trois étapes additionnelles s'intercalant entre les étapes (a) et (b) consistant en :

(a1) la concentration des margines acidifiées et clarifiées pour les stocker ;

30 (a2) le stockage des margines acidifiées concentrées ; puis

(a3) la dilution dans un solvant des margines acidifiées concentrées à environ 4% de matière sèche avant de pratiquer l'étape (b).

6. Composition enrichie en composés phénoliques de faible masse moléculaire comprenant au moins 40% de matière sèche, ladite matière sèche étant

composée d'au moins 80% de composés phénoliques totaux dont au moins 30% d'hydroxytyrosol et au moins 10% de tyrosol ; ladite composition étant susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

5 7. Procédé de préparation d'une poudre titrée en composés phénoliques et polyphénoliques d'olive et de raisin comprenant les étapes suivantes :

(e1) mélange d'une composition selon la revendication 6 ou obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 avec un extrait de raisin comprenant au moins 60% de polyphénols totaux ; ledit mélange comprend une quantité de ladite composition telle que la matière sèche de ladite composition représente entre 5 et 10 40% de la matière sèche totale du mélange ;

(e2) séchage par atomisation du mélange obtenu à l'étape (e1).

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les deux étapes (e1) et (e2) suivent l'étape (e) du procédé selon la revendication 3 ou 4.

9. Poudre titrée en composés phénoliques et polyphénoliques d'olive et de 15 raisin comprenant au moins 95% de composés phénoliques, dont 5 à 40% de la matière sèche provient d'une composition obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, la matière sèche provenant de ladite composition étant composée d'au moins 80% de composés phénoliques totaux dont au moins 30% d'hydroxytyrosol et au moins 10% de tyrosol, ladite poudre et susceptible d'être obtenue par le procédé selon la 20 revendication 7 ou 8.

10. Utilisation de la composition selon la revendication 6 ou obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou de la poudre selon la revendication 9 ou obtenue par le procédé selon la revendication 7 ou 8 comme complément alimentaire.

25 11. Utilisation de la composition selon la revendication 6 ou obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou de la poudre selon la revendication 9 ou obtenue par le procédé selon la revendication 7 ou 8 comme agent conservateur.

30 12. Utilisation de la composition selon la revendication 6 ou obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou de la poudre selon la revendication 9 ou obtenue par le procédé selon la revendication 7 ou 8 comme agent anti-radicalaire.

13. Utilisation de la composition selon la revendication 6 ou obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou de la poudre selon la

revendication 9 ou obtenue par le procédé selon la revendication 7 ou 8 comme agent dépigmentant et/ou blanchissant de la peau.

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

EP 1 623 960 A (LACHIFARMA SRL LAB CHIMICO FAR [IT])  
8 février 2006 (2006-02-08)

WO 2005/123603 A (ENEA ENTE NUOVE TEC [IT]; VERDIANA S R L [IT]; PIZZICHINI MASSIMO [IT])  
29 décembre 2005 (2005-12-29)

WO 2006/005986 A (NATRACEUTICAL S A [ES]; SNIDERMAN ZACHARY NOLD [ES]; IBARRA ALVIN [ES])  
19 janvier 2006 (2006-01-19)

SKALTSOUNIS L ET AL: "MINOS PROJECT Process development for an integrated olive mill waste management recovering natural antioxidants and producing organic fertilizer" INTERNET CITATION, [Online] XP002354663 Extrait de l'Internet: URL:<http://www.pharm.uoa.gr/minos/manualeng.pdf> [extrait le 2005-11-16]

ES 2 177 457 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES])  
1 décembre 2002 (2002-12-01)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT