

THESE

présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse



SPECIALITE : CHIMIE



Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation

par

Sébastien Veillet

Soutenue le 29 juin 2010

Olivier Dangles

Professeur
UMR A-408 INRA Université d'Avignon

Président du jury

Gérard Vilarem

Docteur HDR
Directeur CRITT Agroressources Toulouse

Rapporteur de thèse

Francesco Visioli

Professeur
Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

Rapporteur de thèse

Karim Allaf

Professeur
Université de La Rochelle

Membre du jury

Pierre Passalacqua

Président de la FEMOS

Invité

Farid Chemat

Professeur
UMR A-408 INRA Université d'Avignon

Directeur de thèse

Valérie Tomao

Docteur HDR
UMR A-408 INRA Université d'Avignon

Co-encadrante de thèse

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier très chaleureusement mon directeur de thèse, le Professeur Farid Chemat et ma co-directrice de thèse, le Docteur HDR Valérie Tomao pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire GREEN. Ces trois années de collaboration ont été facilitées par leur disponibilité à chaque moment important de la thèse. La confiance qu'ils m'ont accordée m'a également permis de pleinement m'épanouir au sein du laboratoire et de développer mes recherches de façon encadrée mais autonome. Leurs conseils avisés ont toujours été très constructifs et m'ont permis de toujours bien avancer dans la thèse. La philosophie de travail du professeur Chemat m'a également permis de rédiger 4 publications, un chapitre de livre et de participer à de nombreux congrès dont 3 de dimension internationale ce qui a été très enrichissant pour ma future carrière.

Je remercie également la région Provence-Alpes-Côte d'Azur et la Fédération Méditerranéenne d'Oléiculture et Santé pour leur cofinancement de la thèse.

Je remercie très sincèrement le Professeur Francesco Visioli et le Docteur HDR Gérard Vilarem pour avoir accepté de corriger le manuscrit de thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie chaleureusement les autres membres du jury, le professeur Olivier Dangles, le professeur Karim Allaf ainsi que monsieur Pierre Passalacqua.

Je tiens à remercier les membres du GREEN, Mme Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Mme Sandrine Issartier-Perino, Mme Maryline Abert-Vian, Mme Karine Ruiz et M. Emmanuel Petitcolas pour leur présence tous les jours dans la vie du laboratoire. Travailler dans cet environnement jeune et dynamique a toujours été très stimulant pour moi et je remercie les deux ingénieurs pour leur assistance technique pour certaines manipulations.

J'adresse également mes remerciements à M. Christian Giniès pour son expertise dans le domaine de la chromatographie gazeuse. Je lui suis reconnaissant de m'avoir initié à cette technique analytique et d'avoir pris du temps pour m'expliquer l'exploitation des données. Je remercie tout particulièrement Mme Isabelle Bornard pour les études réalisées en microscopie électronique à balayage. Sa disponibilité, son adaptabilité, son intérêt pour découvrir de nouvelles matrices et sortir des sentiers battus ainsi que sa bonne humeur m'ont permis de faire un très gros travail de microscopie dans des conditions de travail optimales.

Un grand merci à tous les mouliniers ayant participé à ce projet, M. Yvon Gras, M. Serge Pérignon et M. Gérard Bodet pour la mise à disposition de leur moulin en plein milieu de leur période d'activité. Je remercie également M. Pierre Passalacqua et le professeur Philippe Coulomb pour leurs apports en olives, base de toutes les études. Je tiens également à remercier tous les membres de la FEMOS s'étant intéressés au projet et ayant suivi mes résultats au cours des trois années.

J'adresse également mes remerciements à tous les doctorants m'ayant accompagné au cours de ces trois années, notamment Matthieu Virod, Fanny Choteau, Aurélie Cendrès et Daniella Pingret. Leur compagnie à l'université ainsi qu'en dehors de celle-ci a été un réel plaisir. Je remercie également tous les amis qui m'ont entouré et intégré dans ma vie avignonnaise en me permettant ainsi de trouver un bon équilibre entre vie universitaire et vie extra-universitaire.

Enfin je remercie ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur soutien permanent tout au long de cette thèse et plus généralement tout au long de ma vie universitaire.

Table des matières

	Page
Introduction Générale.....	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	3
1.1 Production d'huile d'olive.....	3
1.1.1. De l'olivier à l'huile d'olive.....	3
1.1.2 Méthodes de fabrication de l'huile d'olive.....	6
1.1.2.1 La récolte des olives.....	7
1.1.2.2 Evolutions concernant la trituration des olives.....	8
1.1.2.3 Le malaxage.....	11
1.1.2.4 La séparation solide/liquide.....	12
1.1.2.5 Séparation huile/eau.....	17
1.1.2.6 Avantages et inconvénients des techniques.....	18
1.1.3. Classification des huiles d'olive.....	21
1.2 Caractéristiques qualitatives des huiles.....	23
1.2.1 Données physico-chimiques.....	23
1.2.2 Caractéristiques sensorielles.....	26
1.3 Composition générale des huiles d'olive.....	28
1.3.1 Les acides gras.....	28
1.3.2 Les composés phénoliques.....	30
1.3.3 Les tocophérols.....	34
1.3.4 Les composés aromatiques.....	35
1.4 Bénéfices santé associés à l'huile d'olive.....	36
1.4.1 Les acides gras.....	36
1.4.2 Les composés phénoliques.....	38
1.4.2.1 Les espèces réactives oxygénées.....	38
1.4.2.2 L'action antioxydante des composés phénoliques.....	39
1.4.3 Les tocophérols.....	41
1.5 Conclusion.....	42
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	43
2.1 Solvants et réactifs.....	43
2.2 Matrices végétales.....	44
2.3 Protocoles des analyses physicochimiques.....	45
2.3.1 Acidité libre.....	45

2.3.2 Valeur peroxyde	45
2.3.3 Dosage des phénols totaux.....	46
2.4 Analyses en chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	47
2.4.1 Matériel.....	47
2.4.2 Le dosage des tocophérols.....	47
2.4.3 Dosage des phénols.....	48
2.5 Analyses en chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	49
2.5.1 Etude des arômes de l'huile par micro-extraction en phase solide et analyse en CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM).....	49
2.5.2 Analyse de la composition en acides gras en CPG couplée à la détection en ionisation de flamme (FID).....	49
2.6 Analyses en Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	50
2.7 Conception et développement de nouvelles procédures de Dean-Stark.....	51
2.7.1 Dean-Stark Conventionnel.....	51
2.7.2 Dean-Stark Accélééré par micro-ondes.....	51
2.7.3 Dean-Stark utilisant un bio-solvant : le <i>d</i> -limonène.....	52
2.7.4 Généralisation des procédures.....	52
2.8 Aromatisation d'une huile d'olive par ultrasons.....	53
2.9 Extraction de β-carotène par ultrasons.....	54
2.10 Analyses statistiques.....	55
Chapitre 3 : Enrichissement endogène de l'huile d'olive dans les moulins.....	56
3.1 Introduction.....	56
3.2 Plans d'action dans les moulins.....	57
3.2.1 Campagne 2007/2008.....	57
3.2.2 Campagne 2008-2009.....	58
3.2.3 Campagne 2009-2010.....	60
3.3 Analyse des données récoltées.....	62
3.3.1 Etude du procédé de broyage des olives.....	62
3.3.1.1 Caractéristiques physicochimiques.....	62
3.3.1.2 Analyse des polyphénols	64
3.3.1.3 Analyse de la composition en acides gras.....	65
3.3.1.4 Analyse des composés volatiles.....	67
3.3.1.5 Analyse en microscopie électronique à balayage (MEB).....	69
3.3.1.6 Bilan de l'effet du système de broyage.....	70
3.3.2 Etude du procédé de séparation liquide-liquide.....	70
3.3.2.1 Caractéristiques physicochimiques.....	71

3.3.2.2 Dosage des tocophérols.....	72
3.3.2.3 Analyse des polyphénols.....	74
3.3.2.4 Analyse de la composition en acides gras.....	74
3.3.2.5 Analyse des arômes de l'huile d'olive.....	75
3.3.2.6 Bilan sur l'impact du procédé de séparation des phases liquides.....	76
3.3.3 Comparaison entre les deux chaînes de production en continu :	
système à trois phases <i>versus</i> deux phases.....	78
3.3.3.1 Données physicochimiques.....	78
3.3.3.2 Analyse de la teneur en tocophérols.....	79
3.3.3.3 Analyse de la composition en acides gras.....	80
3.3.3.4 Analyse des arômes de l'huile d'olive.....	81
3.3.3.5 Bilan de l'influence du type de séparateur solide/liquide.....	82
3.4 Conclusions sur l'enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive	
 dans les moulins.....	82
Chapitre 4 : Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive après récolte.....	85
4.1 Les ultrasons.....	86
4.1.1 Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore.....	86
4.1.2 Facteurs influençant la cavitation.....	89
4.1.3 Equipements de laboratoires et industriels.....	92
4.1.4 Applications des ultrasons.....	94
4.1.4.1 Les ultrasons en technologie de transformation.....	94
4.1.4.2 Les ultrasons en technologie de préservation.....	96
4.1.4.3 Les ultrasons en technologies d'extraction.....	97
4.1.5 Réglementation et sécurité.....	101
4.1.6 Coût, investissement et impact environnemental.....	103
4.2 Extraction de β-carotène par ultrasons.....	104
4.2.1 Essais préliminaires.....	104
4.2.2 Présentation du plan d'expérience.....	106
4.2.3 Traitement des données par Statgraphics.....	108
4.2.4 Bilan du plan d'expérience.....	109
4.3 Aromatisation d'une huile d'olive assistée par ultrasons.....	110
4.3.1 Analyse de la composition de l'huile essentielle de basilic.....	111
4.3.2 Cinétiques d'aromatisation de l'huile.....	112
4.3.3 Effet de la sonication sur les glandes d'huile essentielle.....	115
4.4 Conclusions sur l'enrichissement exogène de l'huile par ultrasons.....	117

Chapitre 5 : Conception et développement de procédures de Dean Stark innovantes.....	118
5.1 Le Dean Stark accéléré par micro-ondes.....	119
5.1.1 Etudes préliminaires	120
5.1.2 Généralisation de la méthode.....	121
5.1.3 Bilan.....	122
5.2 Le Dean Stark utilisant un agro-solvant : le <i>d</i>-limonène.....	122
5.2.1 Cinétiques de distillation.....	123
5.2.2 Généralisation de la méthode.....	124
5.2.3 Bilan.....	125
5.3 Conclusions sur le Dean Stark.....	125
Conclusion Générale.....	126
Références.....	130

Table des illustrations

Annexes

Introduction générale

L'huile d'olive est le produit méditerranéen par excellence. On la retrouve à travers l'histoire, depuis la civilisation grecque jusqu'à nos jours. Elle est la principale source de matières grasses du régime crétois ou du régime méditerranéen qui sont bien connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Si l'huile d'olive est un produit intéressant d'un point de vue nutritionnel c'est tout d'abord pour sa composition en acides gras. En effet elle est largement insaturée et contient une petite partie d'acides gras essentiels. Outre cette composition particulière en acides gras, l'huile d'olive est surtout intéressante pour ses composés minoritaires tels que les polyphénols. L'intérêt nutritionnel de ces composés phénoliques réside dans leur forte capacité antioxydante qui pourrait prévenir ou ralentir l'apparition de certaines maladies dégénératives ainsi que les maladies cardiovasculaires. Optimiser leur contenu dans l'huile d'olive présente donc un réel intérêt de santé publique.

L'huile d'olive est une huile de table directement issue d'un fruit sans recourir à des étapes de raffinage. En effet, selon les normes officielles, l'huile d'olive ne peut être obtenue qu'à partir du fruit de l'olivier et uniquement par utilisation de procédés physiques. L'absence d'étape de raffinage permet à l'huile d'olive de conserver tous ses antioxydants car ils ne vont pas être éliminés lors de ce procédé. L'olive étant un fruit riche en antioxydants (oleuropéine, ligstroside...), l'huile brute qui en résulte est elle aussi riche en composés antioxydants. Les principaux antioxydants de l'huile d'olive sont des dérivés de l'oleuropéine et du ligstroside et font donc partie de la classe des composés phénoliques. Ces composés vont permettre une bonne conservation de l'huile d'olive dans le temps puisque ces molécules ainsi que le tocophérol vont prévenir son oxydation.

Cette thèse intitulée « enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : entre innovation et tradition » a été cofinancée par la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) et la Fédération Méditerranéenne d'Oléiculture et Santé (FEMOS). Le premier objectif de ce travail de trois ans était d'étudier les chaînes de fabrication de l'huile d'olive afin de comprendre les mécanismes d'extraction et d'identifier les opérations unitaires qui ont le plus d'influence sur les qualités nutritionnelles et organoleptiques de l'huile. Le second objectif aura été d'enrichir de façon exogène l'huile d'olive après récolte par l'utilisation d'ultrasons.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons mené dans une première partie une étude sur la consommation et sur la production d'huile d'olive dans le monde et en France. Ensuite nous avons répertorié et imagé toutes les techniques de fabrication de l'huile d'olive, des méthodes les plus traditionnelles aux systèmes continus actuels. De nombreux critères de qualités permettent de différencier les huiles obtenues, l'appellation la plus recherchée étant celle d' « huile d'olive vierge extra ». A la fin de cette première partie nous avons décrit le rôle biologique des différents nutriments à l'origine de l'intérêt nutritionnel de l'huile d'olive.

Dans une seconde partie nous avons optimisé les conditions d'extraction de l'huile dans des moulins de la région PACA. Chaque étape de la chaîne de fabrication de l'huile d'olive a ainsi pu être étudiée individuellement afin de comprendre quelles sont celles qui ont le plus d'influence sur la qualité finale de l'huile d'olive. La première de ces étapes est la trituration des olives. Deux types de procédés s'opposent : l'un traditionnel utilisant des meules tournantes en granit, l'autre faisant appel à des systèmes de broyage à marteaux métalliques. La deuxième étape importante est celle de séparation des phases liquides : les margines (eau de l'olive) devant être séparées de l'huile. Cette étape se fait soit par simple décantation gravitationnelle, soit par centrifugation. Enfin, la troisième étude a été réalisée sur une chaîne de production utilisant un système dit à deux phases. Les avantages principaux de ce système par rapport au système à trois phases plus classique sont qu'il ne nécessite que très peu d'eau pour fonctionner et que l'huile est directement extraite lors de l'étape de centrifugation horizontale. Chaque huile a ensuite été analysée tant en termes de composition en acides gras et en antioxydants que sur sa composition aromatique.

Dans la dernière partie de la thèse, nous avons enrichi l'huile d'olive de façon exogène. Les ultrasons sont une technologie de plus en plus utilisée dans l'industrie agroalimentaire car ils permettent souvent d'améliorer les procédés notamment les cinétiques d'extraction. Nous avons testé le potentiel des ultrasons sur l'extraction d'une molécule réputée difficile à extraire : le β -carotène. Ensuite ces mêmes ultrasons ont été utilisés dans un processus d'aromatisation de l'huile d'olive par du basilic frais. L'avantage de ces deux techniques est qu'aucun solvant autre que l'huile d'olive n'est utilisé pour l'extraction des molécules.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1 Production d'huile d'olive

1.1.1. De l'olivier à l'huile d'olive

Si la production de l'huile d'olive est actuellement en plein essor, celle-ci n'est pas un produit du XXI^e siècle. En effet des fossiles de fragments d'olivier datant du XIII^e millénaire avant Jésus Christ ont été retrouvés autour de la Méditerranée (Conseil Oléicole International, COI, 1997). L'olivier et l'huile d'olive font partie intégrante de l'histoire du bassin méditerranéen et on les retrouve au fil des siècles à travers différents mythes et croyances. C'est notamment le cas dans la mythologie grecque où Athéna devint protectrice d'Athènes au dépens de Poséidon après avoir offert à la ville d'Athènes un présent bien plus utile que le cheval de Poséidon : un olivier. Le bois d'olivier servira ensuite pour les gravures de divinités grecques et sera le bois utilisé pour la fabrication de la massue d'Hercule. Les premiers vainqueurs des jeux olympiques se voyaient remettre des rameaux d'olivier et des jarres d'huile d'olive en récompense de leurs performances. De tout temps l'olivier a été associé à des vertus telles que la sagesse, la paix, la victoire, la richesse et la fidélité.

Il y a aujourd'hui près d'un milliard d'oliviers (*Olea europaea L.*) cultivés à travers le monde et cela sur presque tous les continents. Plus de 90% des oliviers sont cultivés dans le bassin méditerranéen, notamment en Espagne, en Italie et en Grèce. Il existe plus de cent variétés d'oliviers, cultivées en fonction de leur objectif final. Les olives peuvent avoir deux grandes utilisations : la première est l'utilisation en tant que fruit entier ou encore appelée "olives de table", la seconde est pour la production d'huile d'olive. La production mondiale d'olives de table est d'environ un million de tonnes soit 10 % de la récolte totale d'olives. La grande majorité des olives est donc utilisée pour la fabrication de l'huile d'olive.

Après une forte augmentation au cours des années 1990, la production mondiale d'huile d'olive reste relativement stable depuis le début des années 2000 avec une production annuelle située entre 2,4 et 3,2 millions de tonnes (COI, 2009a). Les variations observées d'une année à une autre sont dues à la fois aux conditions climatiques et au fait que les olives ne grandissent que sur des bois de 2 ans (récolte bisannuelle). La production mondiale est grandement influencée par celles de l'Espagne et de l'Italie qui représentent à eux seuls près des 2/3 de la production mondiale (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition de la production mondiale d'huile d'olive (campagne 2009/2010) (COI, 2009a)

Pays	Production (1000 tonnes)	Production (% total Monde)
Espagne	1200	41,6
Italie	540	18,7
Grèce	348	12,1
Portugal	50	1,7
<i>France</i>	5	0,2
Total Europe	2148,4	74,6
Syrie	150	5,2
Turquie	147	5,1
Tunisie	140	4,9
Maroc	95	3,3
Algérie	50	1,7
Total Monde	2881,5	

Tableau 2 : Répartition de la consommation mondiale d'huile d'olive (campagne 2009/2010) (COI, 2009b)

Pays	Consommation (1000 tonnes)	Consommation (% total Monde)
Italie	710	25,0
Espagne	560	19,7
Grèce	220	7,7
France	108,8	3,8
Portugal	74	2,6
Royaume-Uni	55,5	2,0
Allemagne	51,4	1,8
Total Europe	1856,5	65,4
Etats-Unis	260	9,2
Syrie	120	4,2
Turquie	98	3,5
Maroc	70	2,5
Algérie	50	1,8
Brésil	42,5	1,5
Tunisie	35	1,2
Japon	29,5	1,0
Total Monde	2839	

Parmi les principaux pays producteurs européens, seule l'Espagne a très significativement augmenté sa production d'huile d'olive depuis la campagne 1999/2000, le reste des pays européens a eu une production stable voire légèrement décroissante (Italie, Grèce). La production française a été multipliée par 4 entre 1990 et 2000 et se situe autour des 4 000 tonnes depuis le début des années 2000 soit seulement 0,2% de la production européenne. Les principaux pays producteurs sont également les principaux consommateurs de cette huile. Le tableau 2 donne la consommation globale des principaux pays consommateurs d'huile d'olive.

L'Italie et l'Espagne apparaissent une nouvelle fois en première ligne de ce classement, cependant ce tableau ne tient pas compte de la population des différents pays. En effet, si l'on calcule la consommation par habitant, la Grèce arrive en tête avec environ 20 L d'huile par an et par habitant, loin devant les 12 L annuels des Espagnols et des Italiens. En France, 1,5 L d'huile d'olive est consommé par habitant chaque année. La production et la consommation de cette huile française se fait principalement dans les régions proches de la Méditerranée (Tableau 3).

Tableau 3 : Répartition géographique de la production française (campagne 2008/2009) (AFIDOL, 2009)

Origine	Production d'huile (tonnes)
Languedoc-Roussillon	1361
Aude	91
Gard	880
Hérault	310
Pyrénées orientales	80
Provence-Alpes-Côte d'Azur	4649
Alpes de Haute Provence	259
Alpes Maritimes	521
Bouches du Rhône	2573
Var	846
Vaucluse	450
Rhône-Alpes	659
Ardèche	93
Drôme	566
Corse	330

Les tableaux 1 et 2 montrent que l'huile d'olive est principalement un produit méditerranéen, tant pour ce qui est de sa production que pour sa consommation. Cette production millénaire joue un rôle important dans l'économie de ce bassin et elle fait également partie de sa culture et de son régime alimentaire (Keys, 1980 ; Viola, 1987). Cependant, à l'échelle mondiale, les 3 millions de tonnes d'huile d'olive ne représentent qu'environ 2,5% des huiles de tables (Boskou, 1996), loin derrière l'huile de soja, l'huile de palme, l'huile de colza et l'huile de tournesol (Harwood, 2000).

1.1.2 Méthodes de fabrication de l'huile d'olive

Selon le COI, l'huile d'olive est une huile obtenue à partir du fruit de l'olivier, à l'exclusion des huiles obtenues par extraction avec des solvants, par des procédures de ré-estérification, ou par n'importe quel mélange avec d'autres types d'huiles. A la différence des autres huiles végétales ou d'autres produits tels que le vin, l'huile d'olive ne requiert aucune étape de raffinage ni aucune transformation chimique. Grâce à cette simplicité procédurale, l'huile d'olive a pu être fabriquée depuis l'antiquité. La technique a subi de nombreuses évolutions au cours du temps qui peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les évolutions relatives au broyage des olives et les évolutions relatives à la séparation des différentes phases. Entre ces deux grandes étapes, la pâte d'olive est malaxée afin d'être homogénéisée et de permettre la coalescence des gouttelettes d'huile.

Lors de leur arrivée chez un moulinier, les olives sont pesées puis passent généralement dans un système de laveuse-effeuilleuse qui va les nettoyer et permettre d'en retirer les impuretés (terre, cailloux, feuilles...) avant le broyage. Le broyage (ou trituration) des olives a pour but de détruire les cellules des olives afin que celles-ci puissent ensuite libérer leur contenu. A ce stade du procédé les olives sont réduites en une pâte plus ou moins homogène qui devra être malaxée. Outre le rôle d'homogénéisation de la pâte, le bac de malaxage permet la coalescence des gouttes d'huile : les microgouttelettes d'huile qui viennent d'être libérées de leurs lipovacuoles cellulaires vont se regrouper afin de former des gouttes de plus grande taille qui seront plus faciles à extraire de la pâte. La pâte malaxée va ensuite être pressée ou centrifugée horizontalement afin de séparer les phases solides et liquides. La phase solide contient les restes des noyaux ainsi que la peau et la pulpe des olives dépourvue de son huile. Cette phase solide s'appelle « grignons » et constitue l'un des deux principaux coproduits de la fabrication de l'huile d'olive. La phase liquide est un mélange d'eau et d'huile qu'il faut séparer. Cela se fait soit par simple décantation

gravitationnelle, soit par centrifugation. Dans les deux cas la phase aqueuse aussi appelée « margines » est séparée de l'huile et constitue le second coproduit de la fabrication de l'huile d'olive. La phase grasse est l'huile d'olive pure ; comme aucun traitement ni aucune réaction chimique supplémentaire n'est nécessaire, l'huile d'olive est comestible en l'état.

1.1.2.1 La récolte des olives

En France, la période de récolte des olives va de septembre à février en fonction de l'utilisation des olives (olives de table plus précoce que pour l'huile) ainsi qu'en fonction de la variété d'olives (*Picholine* variété précoce, *Tanche* variété tardive). Les conditions climatiques ainsi que la région de production ont également un impact sur la vitesse de maturation des olives et donc sur la période optimale de récolte.

Il existe de nombreuses techniques de récolte des olives variant en fonction de la destination finale de ces olives, de la nature du sol et de la superficie de l'exploitation. La méthode traditionnelle est la récolte à la main (Figure 1a); c'est la plus respectueuse de l'arbre mais la récolte est fastidieuse et très longue donc cette technique n'est plus utilisée que pour les olives de table (car elles ne doivent pas être abimées). La méthode la plus communément utilisée en Provence est la cueillette au peigne manuel (Figure 1b) : les oléiculteurs déposent un filet sur le sol et utilisent un peigne qui va arracher les olives de la branche et les faire tomber sur le filet.



Figure 1 : Récolte des olives à la main (a) et au peigne manuel (b)

Il existe maintenant des systèmes de peignes mécaniques équipés d'un moteur faisant tourner les peignes au bout d'un manche télescopique. Cette technique permet une récolte plus rapide des olives et reste peu traumatisante pour les oliviers. En Espagne ou en Italie la technique la plus utilisée sur les grandes exploitations est celle par vibration des branches : des pinces métalliques viennent enserrer le tronc de l'olivier et une vibration à haute fréquence va être appliquée au tronc. Les olives mûres vont alors tomber de l'arbre et peuvent être utilisées pour la production d'huile. Le principal inconvénient de ce système, outre son coût à l'achat, est les dégâts qu'il peut occasionner aux jeunes rameaux des oliviers.

1.1.2.2 Evolutions concernant la trituration des olives

Les tous premiers systèmes de trituration des olives ont été utilisés par les Hébreux (X^{ème} siècle avant Jésus Christ) qui pilaient les olives dans de grands mortiers. La pâte obtenue était alors extrêmement grossière et très peu d'huile pouvait en être retirée.

Cette technique peu pratique car difficilement applicable à grande échelle et surtout peu efficace, a peu à peu été remplacée par des broyeurs à meule. La forme des meules (conique, cylindroconique, cylindrique) a évolué au cours des siècles, mais le principe de base est toujours le même : le poids de la pierre et sa rotation sur les olives vont détruire les olives et ainsi libérer le contenu cellulaire des drupes. Les premiers moulins disposant de roues de granit faisaient partie de la catégorie des moulins à sang (moulin nécessitant une force animale ou humaine pour effectuer les rotations). Les animaux de la ferme servaient alors de force motrice pour entraîner la roue de granit. Les animaux les plus souvent utilisés étaient les chevaux et les vaches. Les principaux défauts de cette technique est la place nécessaire pour permettre le mouvement circulaire de l'animal autour du pressoir et la lenteur du procédé.

Les moulins à sang ont ensuite été remplacés petit à petit par des moulins à eaux qui ont permis d'augmenter le nombre de meules en action et donc de réduire les temps de trituration. Au cours du XX^e siècle, les moulins se sont modernisés et électrifiés. Les roues de granit sont aujourd'hui entraînées par des moteurs électriques, ce qui facilite le travail et permet de travailler avec de 2 à 5 roues de granit identiques (Figure 2) ou de différentes tailles.



Figure 2 : Meule de granit à deux roues

Même si l'électrification des systèmes de trituration des olives a permis d'augmenter l'efficacité du système et de réduire le travail des mouliniers, ce procédé reste relativement long compte-tenu de l'augmentation de la demande en huile et de l'accroissement en taille des moulins. Pour cela, différents systèmes de broyeurs métalliques ont été développés (Figure 3). Ils peuvent être regroupés en trois catégories : les broyeurs à marteaux (Figures 4a et 4b), les broyeurs à couteaux et les broyeurs à disques.



Figure 3 : Marteaux à 6 bras métalliques

Dans tous les cas, les bras métalliques avec des arêtes vives sont placés sur un axe entraîné par un moteur électrique à une vitesse de 1000 à 3000 tours par minute. Les olives sont introduites dans le broyeur et elles vont être déchetées par la vitesse de rotation des bras métalliques. Dans le cas des marteaux, différents bras de différentes longueurs sont placés autour d'un axe central (Figure 3). Afin de mieux broyer les olives, ces bras sont également légèrement désaxés les uns par rapport aux autres.

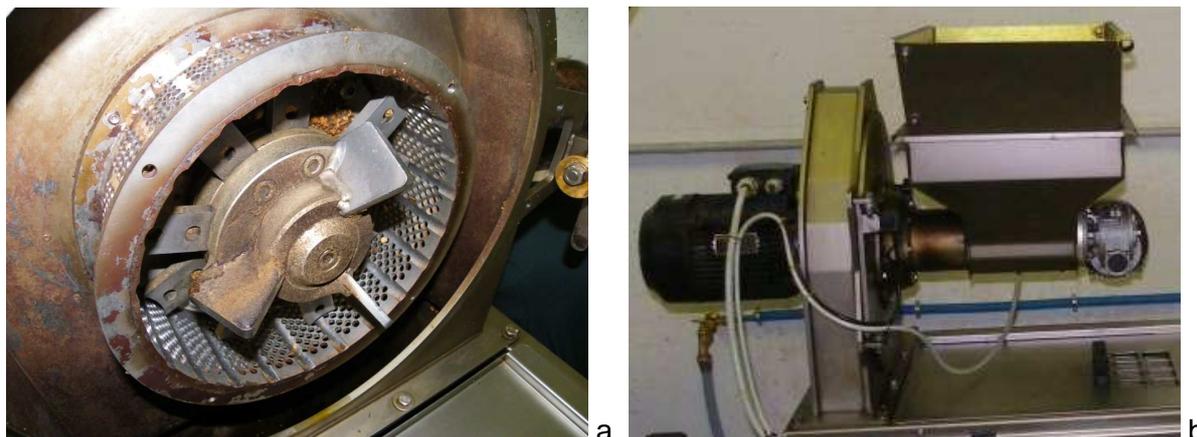


Figure 4 : Broyeurs à marteaux

La cavité dans laquelle tournent les bras métalliques n'est pas hermétique mais entourée d'une grille. Le diamètre des trous de la grille peut être variable mais c'est un paramètre important car il va déterminer la granulométrie de la pâte d'olive. En effet, une fois broyées, les olives devront passer à travers la grille avant de tomber dans le bac de malaxage. Les systèmes métalliques permettent d'accélérer le processus de broyage, donc d'augmenter les volumes de production journaliers et ils sont particulièrement adaptés pour des systèmes de production en continu. Dans ce type de système, le moulinier n'a jamais à manipuler directement la pâte d'olive car celle-ci est convoyée automatiquement d'un appareil à un autre.

Depuis quelques années de nouvelles innovations sont apparues sur le marché. La plus importante est sûrement celle du dénoyautage des olives avant le broyage. Les résultats obtenus par cette nouvelle technique semblent assez contradictoires donc il est difficile d'évaluer son impact réel. Certaines publications vantent les bienfaits du dénoyautage sur la teneur en phénols (augmentation de 75 à 110%, (Amirante, 2006)) dans l'huile d'olive et l'expliquent par le fait que de nombreuses enzymes de dégradation sont présentes dans les noyaux. Del Caro *et coll.* (2006) ont trouvé de plus faibles teneurs en phénols dans les huiles issues d'olives dénoyautées mais une meilleure stabilité de l'huile dans le temps (notamment grâce à une plus forte teneur en tocophérols). Une étude parue dans le « Journal of American Oil Chemist Society » qui est souvent utilisé comme référence pour l'analyse des huiles, montrait quand à elle qu'aucune différence significative entre une huile obtenue à partir d'olives dénoyautées ou non dénoyautées ne pouvait être attribuée à cette technologie (Patumi, 2003).

1.1.2.3 Le malaxage

Quelle que soit la technique de trituration, une étape est indispensable avant la séparation des différentes phases de la pâte, il s'agit du malaxage. Le malaxage a pour but d'homogénéiser la pâte d'olive, mais il va également et surtout permettre la coalescence des gouttelettes d'huile. La figure 5 est une photographie de microscope électronique à balayage (MEB) montrant le regroupement de ces gouttelettes d'huile qui formeront ensuite de grosses gouttes facilement séparables de la matière solide.

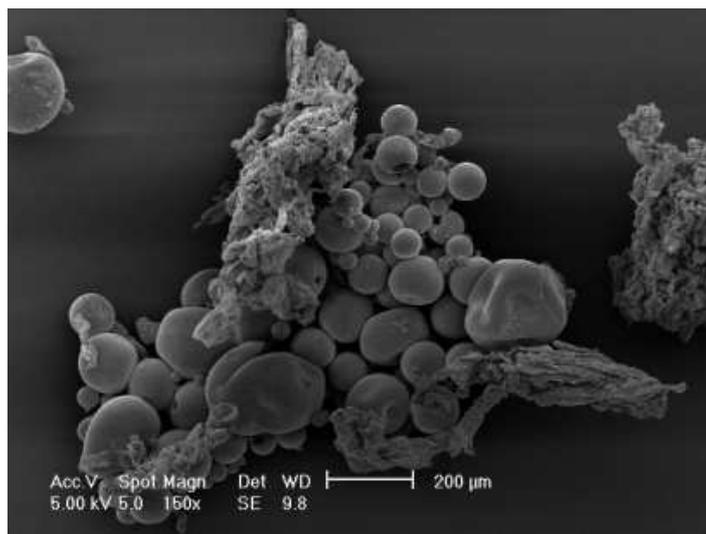


Figure 5 : Image au MEB de coalescence de gouttelettes d'huile

Le malaxage est une étape très contrôlée car les mouliniers ont la possibilité de chauffer la pâte d'olive afin de faciliter la coalescence et donc d'augmenter les rendements, mais la pâte d'olive ne doit en aucun cas dépasser les 27°C pour que l'huile d'olive puisse porter la mention « extraction à froid ». Les bacs de malaxage sont le plus souvent fermés, de façon à retenir les arômes de la pâte et à limiter son oxydation.

Selon le procédé de trituration utilisé, de 1 à 3 bacs de malaxage peuvent être montés en série (Figures 6a et 6b). Le malaxage se fait par rotation lente d'une vis sans fin qui va retourner continuellement la pâte. Les broyeurs métalliques ont tendance à augmenter l'émulsion entre l'huile et l'eau, par conséquent les temps de malaxage et/ou le nombre de bacs de malaxage sont plus importants que pour les systèmes à meule de granit. Le temps de malaxage varie en général entre 15 et 30 minutes.



Figure 6 : Bacs de malaxage (a) unique, (b) trois bacs en série

1.1.2.4 La séparation solide/liquide

Une fois la pâte d'olive homogénéisée et la coalescence effectuée, l'étape suivante consiste en la séparation de la phase solide et de la phase liquide. Deux systèmes de séparation de phases sont utilisés : un système de presse et un système de centrifugation horizontale.

La presse est utilisée depuis les débuts de la fabrication de l'huile d'olive. À l'origine, la pâte d'olive était placée dans des doubles disques de fibre de coco tressée, reliés par le bord extérieur et percés au centre, appelés « scourtins ». Le moulinier chargeait la pâte dans ces derniers, puis empilait les disques avant de les presser à la force des bras.

Le principe reste le même aujourd'hui, mais les fibres de coco ont été remplacées par des fibres de nylon et les disques ne sont plus reliés entre eux par le bord extérieur. Cela permet un meilleur nettoyage des disques et ainsi une limitation des phénomènes de moisissure et de forte oxydation observés dans les scourtins traditionnels. Le système de presse manuelle a également été remplacé par un système hydraulique plus puissant et automatisé (Figure 7).



Figure 7 : Presse hydraulique

La pression exercée lors de cette étape varie de 200 à 400 bars en fonction de l'humidité de la pâte d'olive. Sous ces conditions de pression, le mélange eau/huile va sortir de l'empilement de scourtins soit par le bord extérieur, soit par l'aiguille centrale. Les matières solides (fragments de noyaux, de pulpe et de peau) restent quant à elles emprisonnées dans les fibres de nylon. Cette matière solide contenant environ 4% d'huile est appelée grignons. Comme peu ou pas d'eau est ajoutée au cours du procédé utilisant la presse, ces grignons sont dits « secs » (Figure 8), par opposition aux grignons humides obtenus par d'autres procédés.



Figure 8 : Grignons secs à la sortie de la presse

Le progrès technologique a permis le développement de systèmes automatisés et moins fastidieux que les presses : il s'agit des centrifugeuses horizontales à 2 ou à 3 phases, aussi improprement nommées décanteurs. Les centrifugeuses horizontales à 3 phases ont été les premières à être développées (Figure 9).



Figure 9 : Centrifugeuse 3 phases

Ces centrifugeuses sont dites à trois phases car elles séparent :

- Les grignons
- L'huile avec un peu d'eau
- Les margines avec un peu d'huile

Les deux phases liquides n'étant pas bien séparées, les deux dernières phases sont regroupées et envoyées dans une centrifugeuse verticale (voir plus bas). Le principal inconvénient de ce type de système est qu'il requiert un grand ajout d'eau pour fonctionner. L'eau ajoutée va se mélanger aux margines et donc grandement augmenter le volume de coproduits à éliminer. A la sortie de la centrifugeuse, on se retrouve avec d'un côté des grignons très humides et de l'autre une émulsion huile/eau (Figure 10).



Figure 10 : Sortie d'une centrifugeuse 3 phases, à droite les grignons humides, à gauche l'émulsion huile/eau

Les avancées technologiques et une meilleure compréhension des phénomènes se passant au sein de la centrifugeuse ont permis de développer des centrifugeurs horizontaux à 2 phases (Figure 11a). L'intérêt majeur de ce type de système est qu'aucune étape supplémentaire n'est requise après centrifugation : lorsque l'appareil est bien réglé, l'huile d'olive sera directement séparée des grignons humides (Figure 11b).



Figure 11 : (a) système à 2 phases ouvert, (b) huile d'olive à la sortie du système

Différents réglages permettent d'obtenir ce résultat. Tout d'abord le moulinier doit régler la quantité d'eau à ajouter au système afin de ne pas colmater la centrifugeuse. Ceci est à adapter à chaque lot d'olives à triturer car il dépend de sa teneur de départ en eau. Ensuite le paramètre le plus critique à régler est celui de la profondeur de l'aiguille de prélèvement de l'huile. Comme indiqué figure 12, un réglage défectueux va engendrer une huile de très mauvaise qualité ou un très faible rendement.

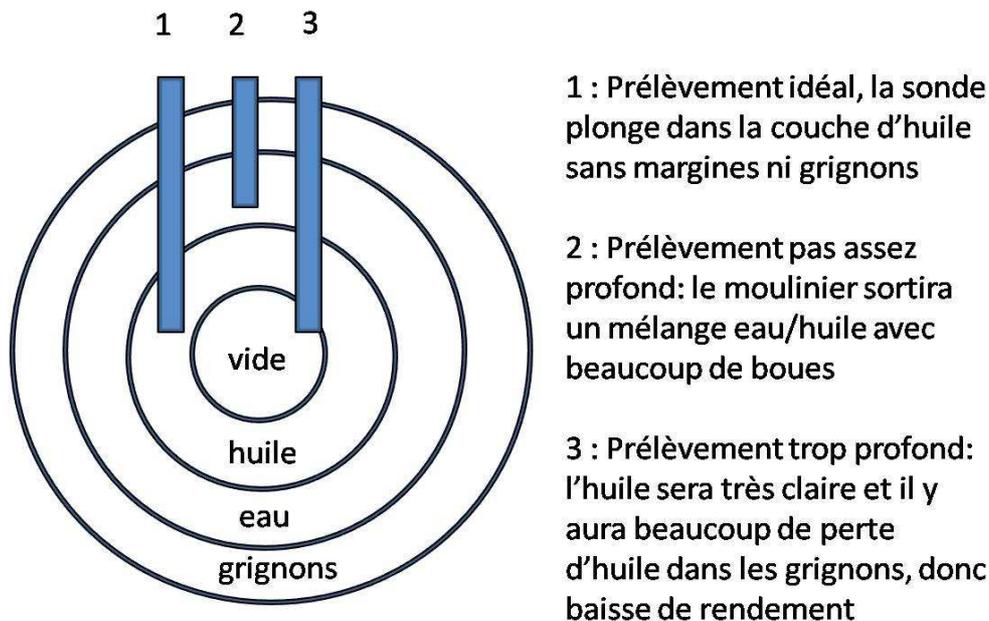


Figure 12 : Représentation de l'intérieur d'un système à deux phases et réglage de l'aiguille de prélèvement

D'autres systèmes moins couramment utilisés ont également été développés, c'est notamment le cas de la méthode Sinolea (Sinolea 1991). Après broyage des olives, les peignes métalliques du dispositif Sinolea vont alternativement plonger dans la pâte d'olive, se soulever puis l'huile qui se sera déposée sur le peigne va être raclée. Ce système est basé sur un phénomène physique simple : l'eau et l'huile ont des tensions superficielles très différentes, ce qui fait que l'huile adhère plus facilement que l'eau sur une surface métallique. Lorsque le peigne du Sinolea plonge dans la cuve de pâte, les gouttelettes d'huile vont adhérer à la surface métallique, il suffira donc ensuite de retirer ce peigne de la pâte d'olive et de le racler pour en déloger l'huile d'olive pure. A chaque cycle seules quelques gouttes d'huile vont être retirées ce qui fait du Sinolea un procédé relativement long. L'autre principal défaut de cette technique est le faible rendement de la méthode. Afin de pallier ce défaut, les systèmes Sinolea sont le plus souvent couplés à des systèmes traditionnels.

1.1.2.5 Séparation huile/eau

Cette étape est devenue facultative pour certaines techniques (Sinolea et systèmes à deux phases) mais reste d'actualité pour la majorité des autres systèmes. L'huile d'olive et l'eau ont des densités très différentes (0.913 pour l'huile d'olive, 0,9982 pour l'eau à 20°C) ce qui fait que ces deux liquides ne sont pas séparables par gravité dans des conditions standards. La méthode la plus simple pour les séparer est donc la décantation gravitationnelle. Pour cela les phases liquides sont placées dans des cuves en inox (Figure 13) et le moulinier laisse reposer les phases, puis retire l'eau de végétation afin de ne conserver que l'huile d'olive.



Figure 13 : Cuve de décantation en inox

Ce procédé de décantation gravitationnelle possède cependant quelques inconvénients. En effet, le temps de séparation des phases peut être relativement long (quelques heures à quelques jours), or le temps de contact entre l'eau et l'huile a une influence négative sur la qualité finale de l'huile d'olive. De plus, les systèmes de trituration métalliques augmentent l'émulsion huile/eau et cette émulsion est trop stable pour être séparée par simple décantation à échelle industrielle. Afin d'accélérer la séparation des phases, le mélange huile/eau est passé dans une centrifugeuse (Figure 14). La vitesse de rotation de la centrifugeuse va rompre l'émulsion et favoriser la séparation des deux phases liquides.



Figure 14 : Centrifugeuse. A droite sortie de l'huile d'olive, à gauche sortie des margines

1.1.2.6 Avantages et inconvénients des techniques

Si de nombreuses techniques sont disponibles sur le marché, c'est que chacune d'elles présente des avantages et des inconvénients. Tout d'abord concernant le procédé de broyage des olives : les deux types de systèmes à comparer sont les meules de granit et les systèmes métalliques dans leur ensemble.

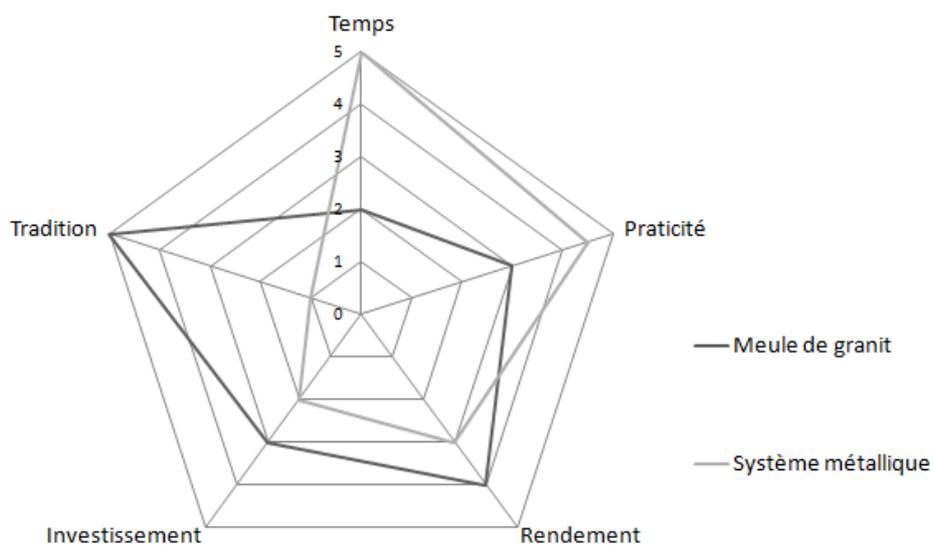


Figure 15 : Avantages et inconvénients des systèmes de broyage

La figure 15 est une représentation graphique des avantages et inconvénients des deux systèmes : plus on se place sur l'extérieur de la toile, plus le critère est favorable. Ce graphique met en avant la rapidité des systèmes métalliques et leur praticité. En effet, là où il faut 20 à 30 minutes de broyage pour un système de meules de granit, quelques secondes suffisent pour les broyeurs métalliques. De plus ces systèmes s'intègrent mieux dans un procédé continu et l'encombrement du matériel est inférieur à celui des meules tournantes. Si on ne s'intéresse qu'au processus du broyage, les systèmes à meule pourraient donner de meilleurs rendements du fait de leur plus faible degré d'émulsion huile/eau. Ceci n'est pas réel dans les faits car les systèmes de centrifugation sont suffisamment puissants pour rompre cette émulsion et ne pas réduire les rendements. L'atout principal des meules tournantes est qu'elles rappellent les pratiques traditionnelles qui peuvent ensuite être valorisées sur les étiquettes : le consommateur a envie de produits naturels, faits de façon traditionnelle, donc les meules sont un réel atout d'un point de vue commercial pour les mouliniers.

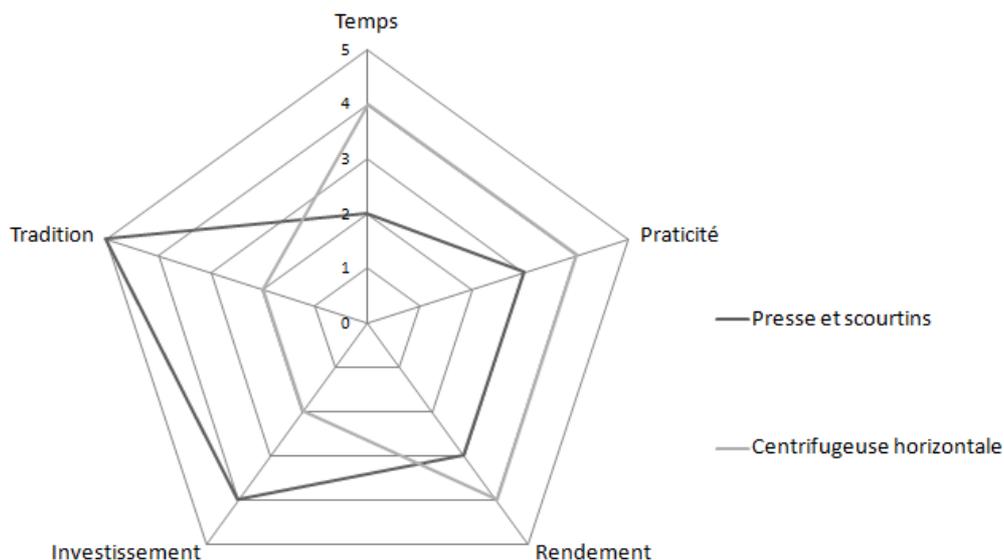


Figure 16 : Avantages et inconvénients des systèmes de séparation solide/liquide

Dans les procédés traditionnels, les meules tournantes sont suivies d'un système de presse. Là encore l'impact visuel de ce type de procédé joue un rôle déterminant pour le consommateur, même si pour le moulinier ce système présente quelques désavantages par rapport aux systèmes plus modernes (Figure 16). En effet, les centrifugeuses horizontales travaillent plus rapidement que la presse, prennent moins de place et surtout sont beaucoup plus faciles à intégrer dans un moulin en continu. Des systèmes de convoyage de pâte par

pompage existent entre le bac de malaxage et la centrifugeuse, ce qui évite toute manipulation de pâte pour le moulinier. Au contraire, dans les systèmes de presse, le moulinier a au minimum à vider les scourtins après la presse et les nettoyer régulièrement afin d'éviter les phénomènes de moisissure. L'autre intérêt des centrifugeuses est le faible temps de contact entre la pâte d'olive et l'air ambiant, ce qui limite les phénomènes d'oxydation de la pâte et donc de l'huile.

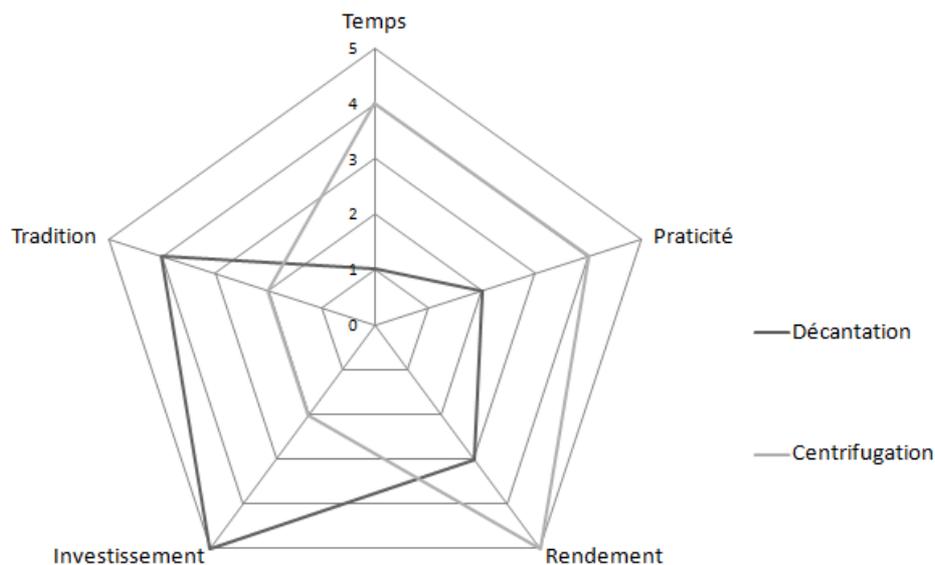


Figure 17 : Avantages et inconvénients des systèmes de séparation huile/eau

Les mêmes critères de différenciation ont été utilisés pour évaluer les avantages et inconvénients des deux principaux systèmes de séparation de l'huile et de l'eau (Figure 17). On peut constater que la centrifugation possède un réel avantage par rapport à la décantation en ce qui concerne le temps de séparation des phases. En effet l'huile n'a besoin que de passer quelques secondes dans la centrifugeuse pour être séparée des margines alors que selon le degré d'émulsion, ce processus peut prendre plusieurs heures par décantation gravitationnelle. La centrifugation est également un atout pour rompre les émulsions générées par les systèmes de broyage métalliques et elle s'intègre très bien dans les systèmes de moulin en continu. L'investissement reste plus lourd que celui pour la simple décantation car dans ce cas seules des cuves avec une ou deux sorties sont nécessaires. De même que pour l'utilisation des meules tournantes, l'utilisation de cuves de décantation fait appel aux aspects traditionnels de la fabrication de l'huile d'olive. Ce critère peut constituer un argument de vente s'il est mis en valeur par le moulinier.

1.1.3. Classification des huiles d'olive

Comme spécifié dans le paragraphe précédent, pour être nommée en tant que telle, une huile d'olive ne peut être obtenue que par des procédés physiques sans intervention de solvants. Cette définition est cependant incomplète et d'autres critères permettent de diviser les huiles en différentes sous-catégories (Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement, (CNUCED), 2005).

- Huiles d'olive vierges : huiles obtenues à partir du fruit de l'olivier, uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions, thermiques notamment, qui n'entraînent pas l'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. Elles font l'objet du classement et des dénominations ci-après :
 - o Huile d'olive vierge extra : huile d'olive vierge dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 0,8 gramme pour 100 grammes et dont les autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie ;
 - o Huile d'olive vierge : huile d'olive dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 2 grammes pour 100 grammes et dont les autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie ;
 - o Huile d'olive vierge courante : huile d'olive dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 3,3 grammes pour 100 grammes et dont les autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie ;
 - o Huile d'olive vierge lampante (non propre à la consommation en l'état) : huile d'olive dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est supérieure à 3,3 grammes pour 100 grammes et/ou dont les caractéristiques organoleptiques et les autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie. Elle est destinée au raffinage en vue de son utilisation pour la consommation humaine ou destinée à des usages techniques.
- Huile d'olive raffinée : huile d'olive obtenue par le raffinage d'huiles d'olive vierges. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 0,3 gramme pour 100 grammes et ses autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie

- Huile d'olive : huile constituée par un coupage d'huile d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges propres à la consommation en l'état. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 1 gramme pour 100 grammes et ses autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie.

Une autre catégorie d'huiles peut être mise en évidence ; il s'agit des huiles de grignons d'olive. Cette huile est obtenue par traitement aux solvants ou d'autres procédés physiques des grignons d'olive, à l'exclusion des huiles obtenues par des procédés de ré-estérification et de tout mélange avec des huiles d'autre nature.

Outre cette classification internationale, d'autres labels de distinction sont utilisés en France afin de valoriser les produits auprès des consommateurs : ce sont les Appellations d'Origine Contrôlée (AOC). Il en existe 8 en France : huile d'olive de Nyons (1994), huile d'olive de la vallée des Baux-de-Provence (1997), huile d'olive d'Aix en Provence (1999), huile de Haute Provence (1999), huile d'olive de Nice (2004), huile d'olive de Nîmes (2004), oliu di Corsica (2004), huile d'olive de Provence (2007) (Figure 18).



Figure 18 : Exemples d'huiles d'olive présentes sur le marché français

1.2 Caractéristiques qualitatives des huiles

1.2.1 Données physico-chimiques

Le CNUCED propose une classification rapide des huiles en fonction de leur acidité libre. Cependant les critères de sélection ou d'exclusion d'une huile dans une catégorie sont très nombreux. Ils peuvent être spécifiques à une catégorie d'huile ou plus généraux. Le suivi de ces différents critères est nécessaire car une dégradation de la qualité de l'huile peut avoir de nombreuses conséquences tant d'un point de vue nutritionnel que d'un point de vue risque sanitaire. En effet, certains composés tels que les acides gras poly-insaturés (acides gras essentiels) ou la vitamine E sont parmi les acteurs principaux de l'intérêt nutritionnel de l'huile d'olive, mais ils sont très sensibles à l'oxydation. Une huile oxydée aura un intérêt nutritionnel plus faible qu'une huile bien conservée. Les produits d'oxydation des acides gras (radicaux peroxydes) pourraient potentiellement entraîner des mutations génétiques à l'origine de certains cancers (voir 1.4).

Tableau 4 : Données physico-chimiques de classification des huiles (Food and Agriculture Organization (FAO), 2001 et Codex Alimentarius, 1989)

	Densité relative (à 20°C)	Acidité (% acide oléique)	Indice peroxyde (meq O ₂ /kg)	Extinction spécifique à 270 nm E _{1cm} [%]	Acides gras saturé en position 2 (%)
Huile d'olive vierge extra		<1	<20	<0,25	<1,5
Huile d'olive vierge		<2	<20	<0,3	<1,5
Huile d'olive vierge ordinaire	0,910	<3,3	<20	<0,3	<1,5
Huile d'olive raffinée	- 0,916	<0,3	<5	<1,1	<1,8
Huile d'olive		<1,5	<15	<0,9	-
Huile de grignon d'olive raffinée		<1,5	<5	<2,0	<2,2
Huile de grignon d'olive		<1,5	<15	<1,7	-

A la lecture du tableau 4, on peut remarquer que l'huile d'olive considérée doit avoir une densité comprise entre 910 et 916 g par litre. Les calculs dans les tableaux de résultats présentés ultérieurement incluront donc la relation 1 L d'huile équivaut à 913 g d'huile pour tous les résultats exprimés en kg.

Dans une huile, les acides gras naturels sont essentiellement présents sous forme de triglycérides (98-99%). L'hydrolyse de ces derniers libère les acides gras (Figure 19) donc leur dosage permet d'avoir un état de l'avancement de la dégradation de l'huile. On remarque que c'est le principal critère distinctif entre les huiles commercialisées car les trois catégories d'huile vierge ont des seuils de qualité différents. Les seuils de tolérance sont plus faibles sur les huiles raffinées car cette étape doit supprimer presque toute trace d'acides gras libres.

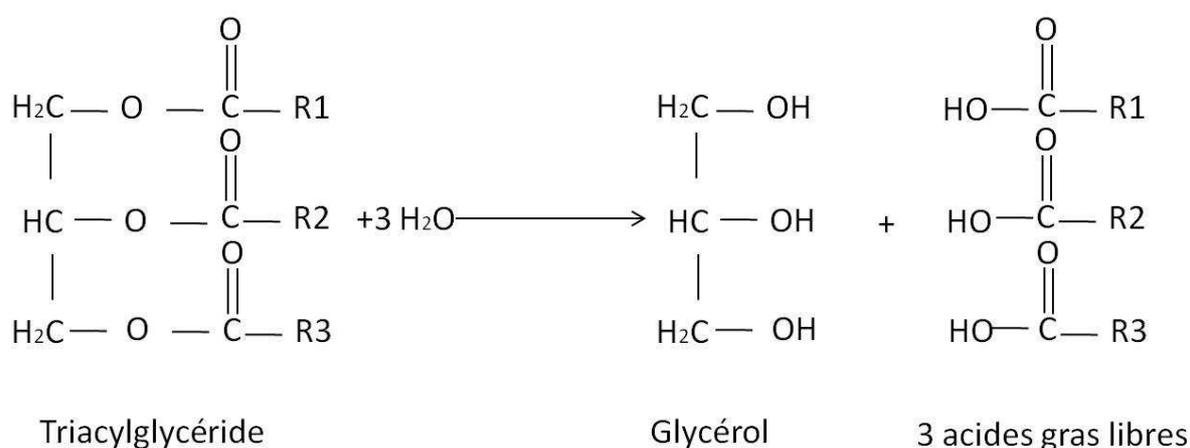


Figure 19 : Hydrolyse du glycérol et libération des acides gras

L'oxydation des acides gras insaturés aboutit à la formation d'hydroperoxydes (Figure 20). Cette étape est aussi appelée initiation de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes sont instables et peuvent réagir avec d'autres molécules pour générer de nouveaux radicaux. Ceci constitue l'étape de propagation dans la peroxydation des acides gras. Topallar *et coll.* ont démontré en 1997 que l'oxydation des acides gras dépend directement de la capacité de l'oxygène à réagir avec les radicaux peroxydes. Leur dosage permet donc d'avoir un état de l'avancement ou non de l'oxydation de l'huile.

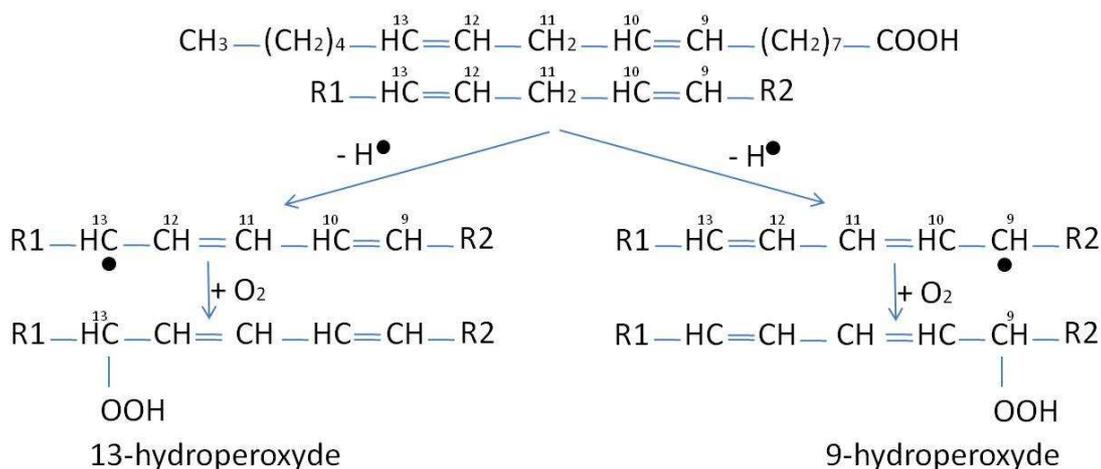


Figure 20 : Auto-oxydation d'acide linoléique (Frankel, 1984)

L'examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet fournit des informations complémentaires sur la qualité d'une huile. Le coefficient d'extinction à 270 nm est un bon révélateur de la teneur de l'huile en peroxyde. Cette analyse peut donc venir en complément de la précédente ou peut intervenir en amont afin de vérifier si un dosage précis des hydroperoxydes est nécessaire.

Ces trois analyses (acidité libre, valeur peroxyde et examen à spectrophotométrique à 270 nm) sont rapides et nécessitent peu de matériel onéreux. Il est donc possible de connaître rapidement l'état général de la qualité de l'huile d'olive à analyser. Les normes de qualité en industries agroalimentaires étant de plus en plus rigoureuses, d'autres critères doivent cependant être pris en considération (Tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques complémentaires des huiles d'olive (Codex Alimentarius, 1989)

	Indice de réfraction (n_D 20°C)	Indice de saponification (mg KOH/g)	Indice d'iode (Wijs)	Insaponifiable	Cires
Huile d'olive vierge	1,4677-	184-196	75-94	<15g/kg	<250
Huile d'olive raffinée	1,4705				<350
Huile de grignon d'olive raffinée	1,4680-1,4707	182-193	75-92	<25 g/kg	<350

Des dispositions sur la teneur des huiles en métaux lourds et métaux de transition sont également à prendre en compte car ceux-ci, même à l'état de traces, peuvent servir de catalyseur pour des réactions d'oxydation et donc faciliter la dégradation des huiles. La commission du codex alimentarius a également établi des limites maximales de résidu pour ce qui concerne les pesticides dans l'huile.

Si la caractérisation physico-chimique des huiles d'olive est une étape essentielle dans la classification des huiles, elle n'est pas suffisante. En effet les caractères organoleptiques sont également à respecter :

- l'huile d'olive vierge est une huile claire, de couleur jaune à vert, d'odeur et de saveur spécifiques, exempte d'odeurs ou de saveurs révélant une altération ou une pollution de l'huile

- l'huile d'olive raffinée est une huile claire, limpide, sans sédiment, de couleur jaune clair, sans odeur ou saveur spécifique et exempte d'odeurs ou de saveurs révélant une altération ou une pollution de l'huile

- l'huile de grignons d'olive raffinée est une huile claire, limpide, sans sédiment, de couleur jaune clair à jaune brun, sans odeur ou saveur spécifique et exempte d'odeurs ou de saveurs révélant une altération ou une pollution de l'huile

De manière générale, pour être catégorisée en huile d'olive vierge extra, une huile ne doit présenter aucun défaut organoleptique, une très faible acidité et un très faible état d'oxydation. Ces caractéristiques assurent au consommateur l'achat d'un produit de qualité qui se conservera bien dans le temps.

1.2.2 Caractéristiques sensorielles

Une simple analyse chimique ne peut suffire pour déterminer la qualité d'une huile. En effet, les composés volatiles qui se développent au cours du procédé de fabrication de l'huile puis pendant son stockage sont capables de modifier l'odeur et la saveur de l'huile. Pour cela une analyse sensorielle codifiée et détaillée a été développée par le COI et la Communauté Economique Européenne (CEE). Les attributs sensoriels d'une huile ont été classés en deux catégories : les attributs positifs et les défauts.

Il existe 3 grands attributs positifs (COI, 2007):

- Amer : il est défini comme le goût élémentaire caractéristique de l'huile obtenue d'olives vertes ou au stade de la véraison, perçu par les papilles caliciformes formant le V lingual.
- Fruité : ensemble des sensations olfactives caractéristiques de l'huile, dépendant de la variété des olives, provenant de fruits sains et frais, perçues par voie directe ou rétronasale. Le fruité vert correspond aux caractéristiques rappelant les fruits verts à l'inverse du fruité mûr qui témoigne d'une récolte des olives plus tardive.
- Piquant : sensation tactile de picotement, caractéristique des huiles produites au début de la campagne, principalement à partir d'olives encore vertes, pouvant être perçue dans toute la cavité buccale, en particulier dans la gorge.

Toute caractéristique autre que ces trois attributs sera perçue comme un défaut de l'huile. Il est à noter que pour être classée comme « huile d'olive vierge extra », l'huile ne doit présenter aucun de ces défauts. Les principaux défauts sont :

- Chômé/lies : flaveur caractéristique de l'huile tirée d'olives entassées ou stockées dans des conditions telles qu'elles se trouvent dans un état avancé de fermentation anaérobie, ou de l'huile restée en contact avec les « boues » de décantation, ayant elles aussi subi un processus de fermentation anaérobie, dans les piles et les cuves.
- Moisi/humide : flaveur caractéristique d'une huile obtenue d'olives attaquées par des moisissures et des levures par suite d'un stockage des fruits pendant plusieurs jours dans l'humidité.
- Vineux/vinaigré ou acide/aigre : flaveur caractéristique de certaines huiles rappelant le vin ou le vinaigre. Cette flaveur est due fondamentalement à un processus de fermentation aérobie des olives ou des restes de pâte d'olive dans des scourtins qui n'auraient pas été lavés correctement, qui donne lieu à la formation d'acide acétique, acétate d'éthyle et éthanol.
- Métallique : flaveur qui rappelle les métaux. Elle est caractéristique de l'huile qui est demeurée longtemps en contact avec des surfaces métalliques, au cours du procédé de broyage, de malaxage, de pression ou de stockage.
- Rance : flaveur des huiles ayant subi un processus d'oxydation intense

D'autres attributs négatifs moins courants ont également été décrits par le Comité Oléicole International. Parmi ceux-ci le cuit ou brûlé (dû à un réchauffement excessif et prolongé de la pâte lors du malaxage), le « vers » (olives ayant subi une attaque de la mouche de l'olivier, *Bactrocera Oleae*) ou encore le bois humide (olive ayant subi une congélation sur l'arbre avant récolte).

1.3 Composition générale des huiles d'olive

Les huiles d'olive vierges jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire et sont importantes en nutrition humaine pour plusieurs raisons. En premier lieu car les lipides sont la principale source d'énergie pour le corps humain en comparaison de leur masse. De plus l'intérêt pour les huiles d'olive a été accru depuis la découverte de leur richesse en vitamines liposolubles et en polyphénols qui sont des antioxydants. Elles sont également une source importante d'acides gras poly-insaturés essentiels car non synthétisables par le corps humain. Si les acides gras sont les constituants majeurs de l'huile d'olive, ce sont les constituants mineurs qui permettent l'authentification d'une huile, tant sur le plan de la provenance géographique que sur sa qualité physico-chimique.

1.3.1 Les acides gras

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides. Ces lipides contiennent une fraction principale dite saponifiable (phospholipides, triglycérides) et une fraction mineure insaponifiable (stéroïdes, vitamines liposolubles, caroténoïdes). Les lipides sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau et la solubilité dans les solvants organiques.

Les acides gras sont des molécules organiques comprenant une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxyle. Cette chaîne carbonée peut être dépourvue de toute double liaison carbone-carbone, dans ce cas les acides gras sont dits « saturés ». Elle peut également contenir une double liaison (acides gras monoinsaturés AGMI) ou plusieurs doubles liaisons (acides gras polyinsaturés AGPI). Pour les acides gras insaturés, ils sont souvent référencés selon la position de la première double liaison par rapport au groupement méthyl terminal. Il existe 2 grandes familles d'AGPI : la série en n-6 (ou oméga 6) et la série n-3 (ou oméga 3). Dans l'huile d'olive on trouve de l'acide linoléique (oméga 6) et de l'acide alpha-linolénique (oméga 3). Ces acides gras sont dits « essentiels » car ils ne peuvent pas

être synthétisés par l'homme et doivent donc être apportés par l'alimentation. Dans la nature, les acides gras sont généralement sous forme de triesters entre des acides gras et du glycérol selon la formule :



Dans le cas de l'huile d'olive les triacylglycérides représentent entre 98% et 99% de la masse totale. Quelques rares acides gras libres peuvent être trouvés et témoignent d'une oxydation du triester. La composition en acide gras est très variable et dépend de la variété d'olives, la région de production et de l'année de la récolte (influence des conditions environnementales). Des normes telles que celle du codex alimentarius régulent cependant cette variabilité en plaçant des limites hautes et basses sur les proportions de chacun des acides gras (Tableau 6).

Tableau 6 : Composition en acide gras d'une huile d'olive selon les résultats d'Ollivier *et coll.* (2003) et selon la norme du codex alimentarius

Acide gras	Formule brute	Ollivier et coll. (%)	Codex alimentarius (%)
Acide myristique	C14:0	Tr	<0,1
Acide palmitique	C16:0	7,5-15,6	7,5-20
Acide sapiénique	C16:1n-9	0,1-0,2	0,3-3,5
Acide palmitoléique	C16:1n-7	0,3-1,9	
Acide margarique	C17:0	<0,3	<0,5
Acide margaroléique	C17:1n-8	<0,5	<0,6
Acide stéarique	C18:0	1,4-3,4	0,5-5
Acide oléique	C18:1n-9	60,9-82,1	55-83
Acide vaccénique	C18:1n-7	0,7-3,6	-
Acide linoléique	C18:2n-6	4,5-16,1	3,5-21
Acide α -linoléique	C18:3n-3	0,4-1,2	<1,5
Acide arachidonique	C20:0	0,3-0,5	<0,8
Acide gadoléique	C20:1n-9	0,2-0,5	-
Acide béhénique	C22:0	<0,2	<0,2
Acide lignocérique	C24:0	<0,1	<1

Cx:yn-z où x est le nombre de carbones, y le nombre de double liaisons, z la position de la double liaison en partant du méthyle terminal. tr = traces.

Les travaux de cette thèse ayant été réalisés en France, le tableau 6 montre les valeurs obtenues par Ollivier *et coll.* (2003) pour des huiles uniquement produites en France. Cette étude est représentative de ce que l'on peut produire sur le territoire français car elle résulte de l'analyse de 564 échantillons d'huile, prélevés sur quatre campagnes consécutives et sur cinq variétés d'olives.

La variabilité en acides gras est relativement importante, mais en moyenne, l'huile d'olive vierge se compose à 72% d'acides gras mono-insaturés (AGMI), 14% d'acides gras poly-insaturés (AGPI) et 14% d'acides gras saturés (AGS) (Harwood, 2000). L'acide gras majoritaire est l'acide oléique qui représente à lui seul près de 70% des acides gras. Les acides gras poly-insaturés représentent une fraction non négligeable de l'huile et sont majoritairement composés d'acide linoléique. Les acides gras insaturés sont généralement de configuration *cis*, mais certains acides gras peuvent présenter une configuration spatiale *trans*, notamment dans les produits issus de transformations industrielles. L'isomérisation *cis-trans* se fera d'autant plus facilement que l'acide gras sera insaturé et que le traitement thermique sera poussé (Judd, 1994). Des risques cardiovasculaires sont associés à l'absorption de ces acides en grande quantité, cependant les acides gras *trans* d'origine naturelle semblent non nocifs pour la santé humaine (Motard-Bélanger, 2003). En France les industries agroalimentaires doivent limiter la proportion d'acides gras *trans* à 1g/100g de produit alimentaire (recommandation AFSSA, 2005).

1.3.2 Les composés phénoliques

Si les acides gras représentent la très grande majorité de la composition de l'huile d'olive en terme de masse, les composés mineurs tels que les composés phénoliques jouent un rôle très important dans la caractérisation des huiles et pour leur intérêt nutritionnel (Brenes, 2002 ; Visioli, 1998). L'huile d'olive contient des composés phénoliques simples et complexes qui augmentent sa stabilité et lui confère des propriétés antioxydantes et modulent sa saveur (Fedeli, 1977). Les composés phénoliques contribuent fortement au goût piquant, à l'astringence et à l'amertume des huiles (Brenes, 2000). Mais si les composés phénoliques sont aujourd'hui au centre de nombreuses études, c'est surtout pour leur potentiel en matière de prévention de la santé humaine (Garcia, 2010 ; Vierhuis, 2001).

Différentes familles de composés phénoliques sont présentes dans les olives et dans les huiles :

- Les dérivés sécoiridoides qui sont des composés glycosylés issus du métabolisme secondaire des terpènes (Soler, 2000). Parmi eux, l'oleuropéine (Figure 21a) est le composé majoritaire dans les feuilles d'olivier et dans les olives et c'est le principal responsable de l'amertume des olives (Andrews, 2003 ; Soler, 2000 ; Shasha, 1961). Le ligstroside (un groupement hydroxyle de moins que l'oleuropéine) (Figure 21b) est également présent en grande quantité dans l'olive. Cependant, lors de la transformation en huile d'olive, ces molécules sont hydrolysées en de nombreux dérivés de masses moléculaires très variables, les plus grosses molécules résiduelles étant leurs dérivés aglycones.

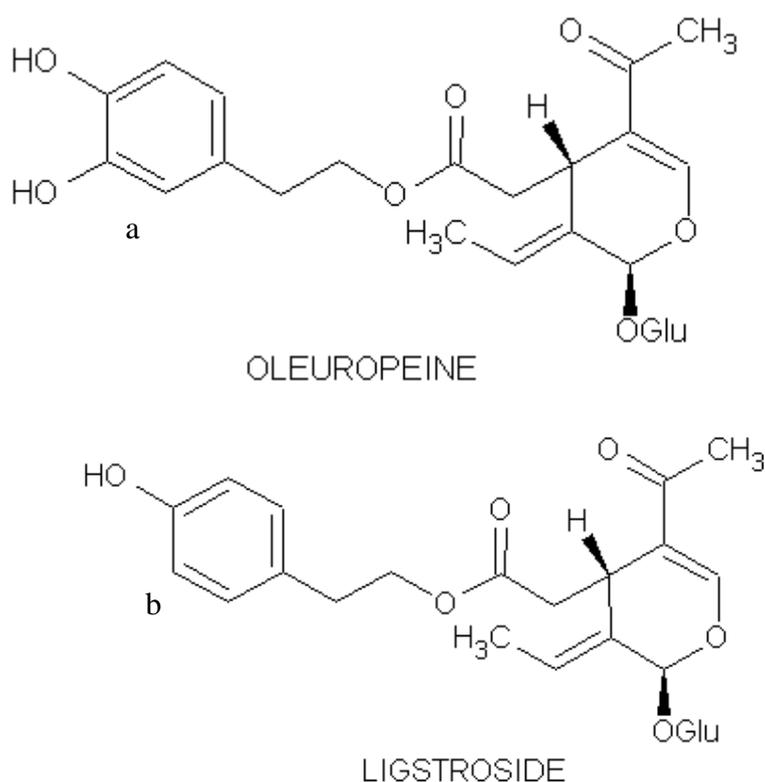


Figure 21 : Structure de l'oleuropéine (a) et du ligstroside (b)

- les lignanes telles que le pinorésinol, l'acétoxy-pinorésinol et l'acide élenolique sont également détectées dans les huiles (Yang, 2007 ; Brenes, 2000) (Figure 22).

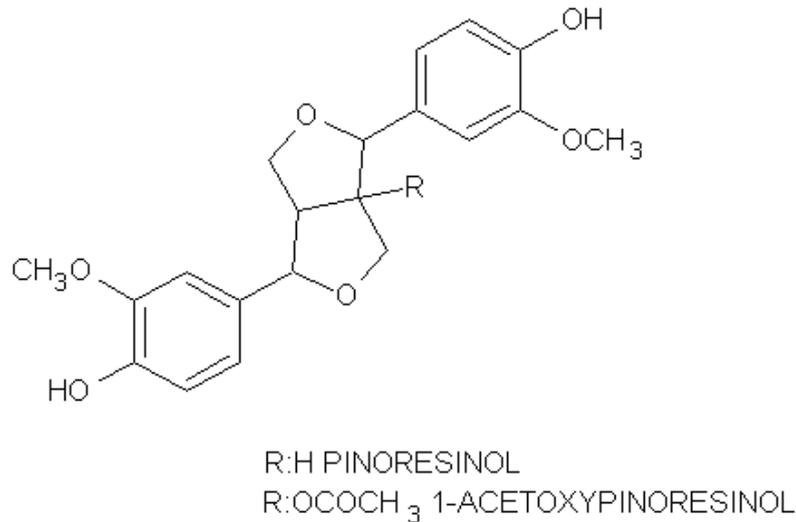


Figure 22 : Structure du pinorésinol et de l'acétoxypinorésinol

- des flavonoïdes font également partie des composés majoritaires trouvés dans l'huile, il s'agit de l'apigénine et de la lutéoline (Ocakoglu, 2009 ; Murkovic, 2004 ; Ryan, 2003) (Figure 23).

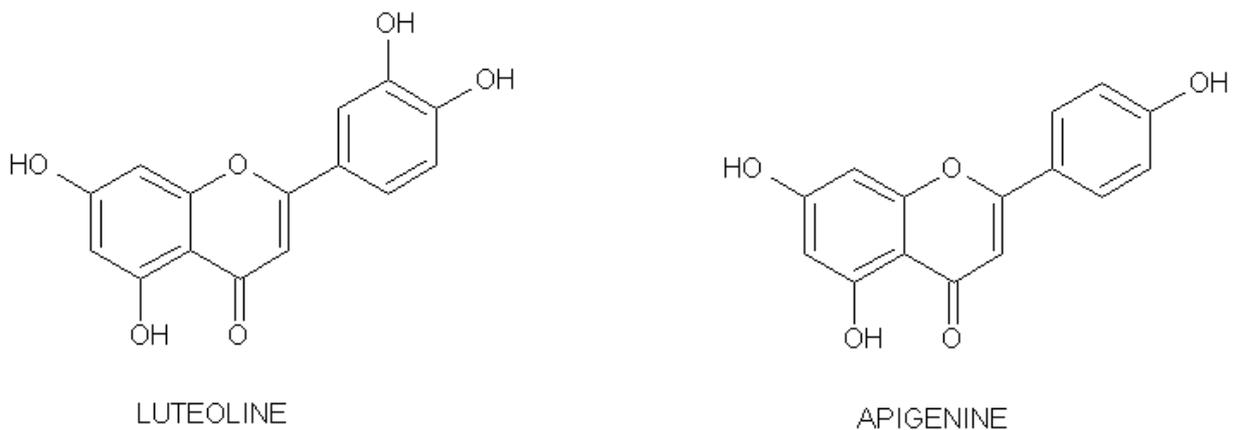


Figure 23 : Structure de la lutéoline et de l'apigénine

- les phénols simples : deux sous catégories avec les alcools phénoliques (Figure 24) et les acides phénoliques (Figure 25). Dans le premier groupe on retrouve l'hydroxytyrosol et le tyrosol (Romero, 2002 ; Mazza, 1993 ; Macheix, 1990). Ces deux composés sont directement dérivés de l'hydrolyse de l'oleuropéine et du ligstroside. Dans le groupe des acides phénoliques on peut citer l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique ou encore l'acide vanillique qui sont également généralement retrouvés dans les huiles (Yang, 2007 ; Pinelli, 2003 ; Garcia, 2003 ; Tuck, 2002 ; Ryan, 1998).

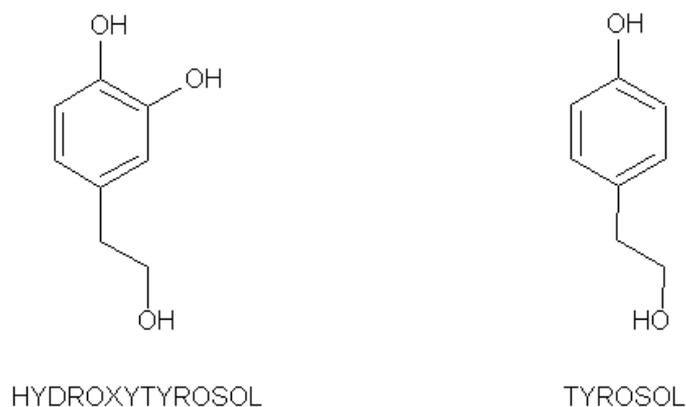


Figure 24 : Structure de deux alcools phénoliques : l'hydroxytyrosol et le tyrosol

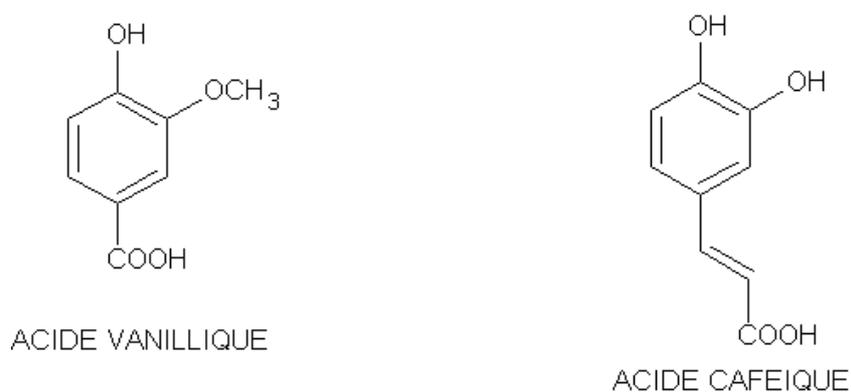


Figure 25 : Structure de deux acides phénoliques : l'acide vanillique et l'acide caféique.

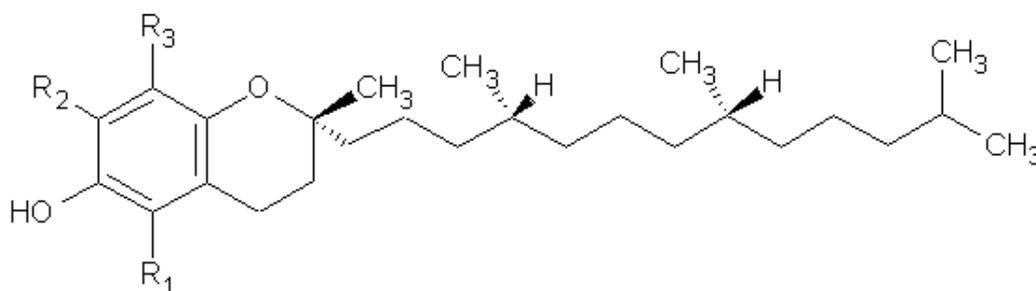
Les composés phénoliques sont très variables d'une huile à une autre, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Il est généralement admis que l'activité phénolique se situe entre 200 et 600 mg d'équivalents d'acide gallique par litre d'huile. Si la composition phénolique peut servir de marqueur pour l'identification des huiles c'est parce que l'origine géographique a une forte influence sur le développement de certains phénols (Vinha, 2005). Le second facteur influençant la composition phénolique est la culture de l'olivier, notamment les systèmes d'entretien des arbres ou les systèmes d'irrigation (Gomez, 2009). En effet, un stress hydrique engendrera une plus grande richesse des huiles en composés phénoliques. Si l'entretien des parcelles ainsi que les systèmes d'irrigation peuvent être optimisés ou standardisés, le facteur climatique ne peut pas être maîtrisé par les oléiculteurs or différentes conditions météorologiques engendreront des compositions phénoliques très variables. Enfin le facteur le plus déterminant de tous est la variété des olives cultivées. De nombreuses études ont montré que certaines variétés d'olives étaient plus riches en composés

phénoliques que d'autres (Gomez, 2008 ; Tura, 2008 ; Tura, 2007 ; Vinha, 2005). Les auteurs ont par exemple trouvé que la variété *Cornicabra* avait beaucoup plus de composés phénoliques que *Picolimon* (Espagne) ou encore que la variété *Madural Fina* était plus riche en composés phénoliques que la *Borrenta* (Portugal).

Une forte teneur en composés phénoliques semble constituer un attrait nutritionnel et donc pourrait favoriser une variété d'olive plutôt qu'une autre. Cependant compte-tenu des autres facteurs d'influence (géographie, météo...), de la disponibilité et de l'adaptabilité de certaines variétés d'olives à certaines conditions climatiques, cette sélection ne s'est jamais opérée. Ainsi près de 400 variétés d'oliviers sont présentes en France même si seulement environ 15 sont cultivées à grande échelle.

1.3.3 Les tocophérols

Les tocophérols (Figure 26) sont reconnus pour leur double action bénéfique. En effet ils ont tout d'abord l'atout d'être une vitamine (vitamine E) et ils ont également une forte activité antioxygène (Burton, 1986). La teneur totale en tocophérols dans les huiles d'olive est très variable puisqu'elle a été reportée dans une gamme allant de quelques mg à 450 mg/kg d'huile (Grigoriadou, 2007 ; Boskou, 2006 ; Gutierrez, 1999). L'alpha-tocophérol représente à lui seul 90% de la totalité des tocophérols (Sherwin, 1976), mais on trouve également un peu de beta et gamma tocophérols, alors que le delta tocophérol n'est présent qu'à l'état de traces (Psomiadou, 2000).



	R1	R2	R3
Alpha-tocophérol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Beta-tocophérol	CH ₃	H	CH ₃
Gamma-tocophérol	H	CH ₃	CH ₃
Delta-tocophérol	H	H	CH ₃

Figure 26 : Structure des tocophérols

1.3.4 Les composés aromatiques

Si l'huile d'olive est intéressante d'un point de vue nutritionnel, elle est surtout appréciée pour son goût et ses arômes particuliers. Les composés aromatiques sont des molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 300 Da) possédant une volatilité à température ambiante. L'odeur de l'huile est due à la capacité de certaines de ces molécules volatiles à atteindre les récepteurs olfactifs du nez (Angerosa, 2002). Ces composés volatiles sont majoritairement des produits de l'oxydation des acides gras. D'une manière générale, les enzymes endogènes présentes dans l'olive, vont dégrader les acides gras par des voies de lipoxygénases et ces produits de dégradation vont être associés aux perceptions positives des arômes de l'huile d'olive. A l'inverse, les produits d'oxydation chimique ou dus à des enzymes exogènes (activité microbologique) seront généralement associés à des défauts sensoriels (Venkateshwarlu, 2004).

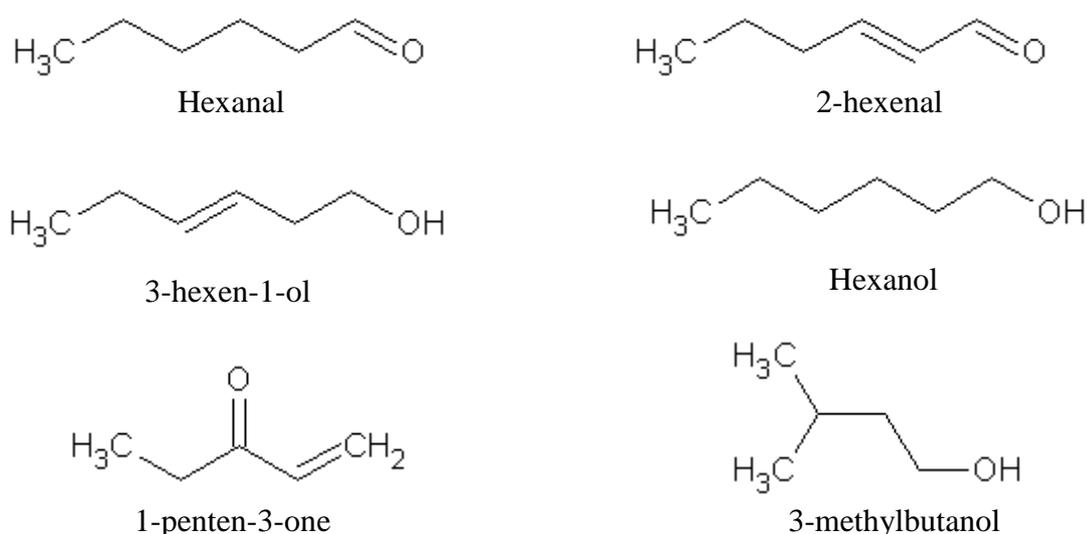


Figure 27 : Structure chimique des composés volatiles majoritaires

Plus de 70 molécules composent la fraction volatile des huiles d'olive. Elles sont réparties en aldéhydes, alcools, esters, hydrocarbures et cétones. La majorité des composés a 5 ou 6 atomes de carbone (Figure 27) et parmi eux on trouve l'hexanal, le trans-2-hexenal, l'hexan-1-ol et le 3-méthylbutan-1-ol (Angerosa, 2002 ; Kiritsakis, 1998 ; Aparicio, 1997). Aucune de ces molécules ne peut être à elle seule responsable d'un arôme caractéristique d'une huile, cependant des corrélations positives ou négatives ont été observées entre

concentration de certaines molécules et développement de certains attributs de l'huile. Ainsi le 1-penten-3-one est positivement corrélé à la sensation d'amer alors que le 3-hexen-1-ol et l'hexanal sont eux corrélés de façon négative avec l'amertume (Angerosa, 2000). De même, concernant la sensation de piquant, le 1-penten-3-one est positivement corrélé à la sensation de piquant alors que le 2-hexenal et l'hexanal sont eux corrélés de façon négative avec le piquant (Angerosa, 2000).

1.4 Les bénéfices santé associés à l'huile d'olive

1.4.1 Les acides gras

Doll *et coll.* ont pour la première fois remarqué en 1966 que la fréquence de certains cancers était très variable d'une région du globe à une autre, sans qu'aucun des facteurs classiques (tabac, alcool...) ne puisse l'expliquer. C'est alors que les modes de vie et d'alimentation des populations ont commencé à intéresser les scientifiques et le monde médical. Aujourd'hui, l'Agence Française Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) estime que le facteur alimentaire pourrait être à l'origine de près de la moitié des cancers. La forte teneur de l'huile d'olive en acide oléique constitue un réel atout d'un point de vue intérêt nutritionnel. En effet dès le début des années 80, Charbonnier (1982) suggérait que l'acide oléique était capable de ralentir la pénétration des acides gras dans les parois des cellules artérielles. Or la pénétration puis l'oxydation de ces acides gras est à l'origine de la formation de la plaque d'athérome dans l'intima des vaisseaux sanguins. Cette plaque d'athérome (ou d'athérosclérose) est responsable de nombreux problèmes cardio-vasculaires (Ross, 1999; Westhuyzen, 1997). Le premier est la thrombose des vaisseaux sanguins en association avec le cholestérol et le LDL-cholestérol oxydé. L'accumulation dans la paroi artérielle du cholestérol et des macrophages ayant phagocyté celui-ci va réduire le diamètre de la lumière artérielle et donc ralentir la circulation sanguine, jusqu'à arrêt total à l'origine d'un accident cardio-vasculaire. La rupture de la plaque d'athérome peut aussi entraîner une hémorragie interne ou une thrombose des vaisseaux due à l'agrégation plaquettaire au niveau de la zone de rupture.

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés, leur prévention est donc d'un grand intérêt pour tous ces pays. Pour les acides gras mono-insaturés comme l'acide oléique, les effets les plus significatifs ont été observés lors d'études de substitution entre acides gras saturés et acides gras mono-insaturés. Un

remplacement isocalorique de 5% de l'apport énergétique des acides gras saturés par des acides gras mono-insaturés peut réduire de 20 à 40% les risques de maladies cardiovasculaires (Kris-Etherton, 1999). Gardner *et coll.* quelques années plus tôt (1995) avaient déjà constaté que le remplacement d'acides gras saturés par des acides mono ou poly-insaturés (ω 6) pouvait réduire significativement le taux de LDL-cholestérol. Un fort apport alimentaire en acides gras mono-insaturés va augmenter la proportion de ces acides dans les LDL ce qui va protéger ces derniers de l'oxydation (Kratz, 2002 ; Reaven, 1996). La relative stabilité des acides gras mono-insaturés par rapport aux acides gras poly-insaturés en fait des molécules plus intéressantes si l'on veut limiter l'oxydation du cholestérol dans les LDL.

Une autre grande cause de mortalité dans les pays développés est le cancer. En France, les trois cancers les plus importants en nombre sont le cancer du sein, le cancer du côlon et le cancer de la prostate (Institut de Veille Sanitaire, InVS). Si les acides gras mono-insaturés semblent avoir un rôle prépondérant dans la protection des maladies cardiovasculaires, ce sont les acides gras poly-insaturés qui semblent plus impliqués dans la protection vis-à-vis de certains cancers. Dans le cas du cancer du sein de nombreuses études cas témoins ont montré une tendance à la baisse du risque d'apparition du cancer du sein avant et après ménopause (Witte, 1997 ; Franceschi, 1996). Des études de cohorte utilisant des biomarqueurs sanguins (phospholipides sériques) ont montré une forte association entre apport en AGPI et baisse du risque de cancer chez la femme ménopausée (Saadatian-Elahi, 2002 ; Pala, 2001). Des discordances entre des études existent cependant, notamment en fonction du type de prélèvement. Cela peut être dû au fait que les prélèvements sériques ne reflètent que les profils alimentaires des quelques jours précédents alors que la demi-vie des acides gras du tissu adipeux est d'environ 2 ans. Un changement récent des habitudes alimentaires pourra donc être rapidement visualisé au niveau sérique mais pas au niveau des tissus adipeux.

Concernant les cancers colorectaux peu de données significatives sont disponibles. Franceschi *et coll.* en 1998 ont trouvé une corrélation négative entre cancer du côlon et consommation d'AGPI. Nkondjock *et coll.* (2003) a également mis en évidence une diminution significative du risque de cancer colorectal chez la femme (mais pas chez l'homme) associée à la consommation d'acide linoléique. Le reste des études cliniques montre parfois une légère réduction du risque mais pas de façon significative. Peu d'analyses montrent également un rôle significatif des AGPI sur le cancer de la prostate.

Les AGPI de longue chaîne (Acide éicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA)) ne sont pas présents naturellement dans l'huile d'olive, cependant le corps humain est capable de les synthétiser à partir d'AGPI à 18 carbones. Ces acides gras à longue chaîne carbonée sont particulièrement suivis dans l'étude des maladies liées au vieillissement. Des études récentes sur le rat montrent que l'EPA pourrait améliorer la mémoire et donc réduire le risque de maladie d'Alzheimer (Taepavarapruk, 2010). D'autres études ont mis en relation la présence de DHA et d'EPA dans la structure cérébrale et apparition de dépressions nerveuses (Logan, 2004). Le profil lipidique et la teneur en oméga 3 à longue chaîne ralentirait la prévalence de cette maladie. Cela a été confirmé par des études épidémiologiques comparant le Japon, le Chili et la Corée aux autres pays du monde. Dans ces trois pays, l'apport nutritionnel en oméga 3 est supérieur par rapport au reste du monde et un plus faible taux de dépression nerveuse y est décelé (Timonen, 2004). Les patients souffrant de dépression présentent trois fois plus de risques que des patients sains de déclencher la maladie de Parkinson (Mercury, 2007). Da Silva *et coll.* en 2008 sont même parvenus à réduire les symptômes de dépression chez des patients déjà atteints d'Alzheimer en enrichissant leur alimentation en huile de poisson (riche en oméga 3).

1.4.2 Les composés phénoliques

1.4.2.1 Les espèces réactives oxygénées

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des dérivés réactifs issus de la réduction de l'oxygène. Trois principales ERO ont été mises en évidence (Gilbert, 1999a) : le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (HO^\cdot) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces espèces oxygénées sont ensuite capables de réagir avec d'autres molécules pour former des radicaux carbonés (RO^\cdot ou ROO^\cdot) notamment avec les acides gras à longue chaîne présents dans l'huile d'olive. Ces ERO sont générées de façon naturelle dans l'organisme humain lors de la respiration au niveau cellulaire ou lors de l'action de certaines enzymes telles que la lipoxygénase (Gutteridge, 1994). Ces radicaux peuvent aussi être générés par l'environnement par les rayonnements ultraviolets, certains herbicides ou des médicaments (Brook 2004 ; Gilbert, 1999b). Un trop fort développement de ces ERO peut engendrer des lésions au niveau cellulaire, c'est ce que l'on appelle le « stress oxydant ». Les sites d'action et les conséquences du stress oxydant sont multiples ; comme énoncé précédemment les ERO peuvent agir sur les acides gras et initier la peroxydation lipidique. Les lipides sont

présents dans toutes les membranes cellulaires et dans le sang donc les ERO peuvent agir dans tout l'organisme. Les produits de peroxydation (les hydroperoxydes) ne sont pas stables et sont capables d'interagir avec d'autres molécules dans ce qui est appelé la « phase de propagation » du stress oxydant. Le malonaldéhyde est le dérivé secondaire le plus connu pour ses effets nocifs sur le matériel intracellulaire (Pryor, 1975). En effet, il a été démontré que le malonaldéhyde (MDA) peut s'additionner à des résidus neutrophiles des protéines (empêchant le bon fonctionnement de certaines enzymes) ou aux bases des acides nucléiques (perturbation de la reproduction cellulaire et de la transcription de l'ADN) (Marnett, 1999). Le MDA peut aujourd'hui être utilisé comme marqueur du stress oxydant chez l'homme (Del Rio, 2005). Comme présenté rapidement ci-dessus, les espèces réactives oxygénées et leurs dérivés ont été reliés à de nombreuses pathologies telles que le cancer (Floyd, 1990) et les maladies cardio-vasculaires (Moreno, 2003 ; Ross, 1993). L'organisme humain possède de nombreux systèmes de détoxification capables de stabiliser ces radicaux, mais dans certains cas (sport, stress...) trop de radicaux sont générés par rapport à la capacité de ces systèmes, ce qui génère le stress oxydant. Afin de limiter les effets néfastes des ERO, des antioxydants doivent être apportés par l'alimentation. Les composés phénoliques contenus dans l'huile d'olive font partie de ces antioxydants exogènes.

1.4.2.2 L'action antioxydante des composés phénoliques

Si les acides gras représentent la très grande majorité de la composition de l'huile d'olive en terme de masse, les composés phénoliques pourraient être ceux qui sont les plus importants au niveau des bénéfices santé. En effet, leur activité antioxydante a deux effets principaux : tout d'abord ils protègent l'huile de l'oxydation (donc augmentent sa durée de vie) mais ils vont également augmenter le bagage antioxydant de l'organisme et ainsi prévenir le développement de certaines maladies. Des extraits d'huile d'olive ont souvent été utilisés *in vitro* pour tester leur activité vis-à-vis de la prolifération de cellules cancéreuses. C'est notamment le cas sur les lignées SKBR3 et JIMT-1 qui sont des lignées de référence en matière de cancer du sein car elles surexpriment HER2 qui est un gène oncogène (Garcia-Villalba, 2010 ; Menendez, 2009). Une étude sur le cancer du côlon a également montré que des extraits phénoliques d'huile d'olive semblaient réduire la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses, ce qui ralentirait la prolifération du cancer du côlon (Hashim, 2005). Manna *et coll.* (1999) ont souligné une protection des phénols vis-à-vis de l'oxydation des érythrocytes sanguins. L'oxydation des érythrocytes peut entraîner des déformations de

ceux-ci et donc des défauts de transport d'oxygène dans le sang et à grande échelle une hémolyse (Van Dyke, 1996). Cela est particulièrement vrai lorsque les érythrocytes sont exposés à du peroxyde d'hydrogène.

Individuellement, des composés tels que l'hydroxytyrosol et l'acide vanillique (à moindre échelle le tyrosol) ont démontré de fortes activités antioxydantes (Owen, 2000). Ils ont aussi été associés à certains effets bénéfiques dans la protection de certaines maladies. Ainsi l'hydroxytyrosol exerce une action inhibitrice sur les lipooxygénases ce qui va protéger les acides gras de l'oxydation et donc *in vivo* réduire le dépôt des LDL dans les parois artérielles (Visioli, 1998). L'hydroxytyrosol est capable de donner un hydrogène au radical LOO^\bullet puis de se stabiliser (Figure 28). En ce qui concerne la prévention des maladies cardio-vasculaires il a aussi été associé à une réduction de l'agrégation plaquettaire tout comme la lutéoline et l'apigénine (Petroni, 1995). La présence de quelques polyphénols et de l'hydroxytyrosol est également corrélée à une réduction de la formation de molécules pro-inflammatoires comme la thromboxane et les leucotriènes (Rotondo, 2000 ; Kohyama, 1997).

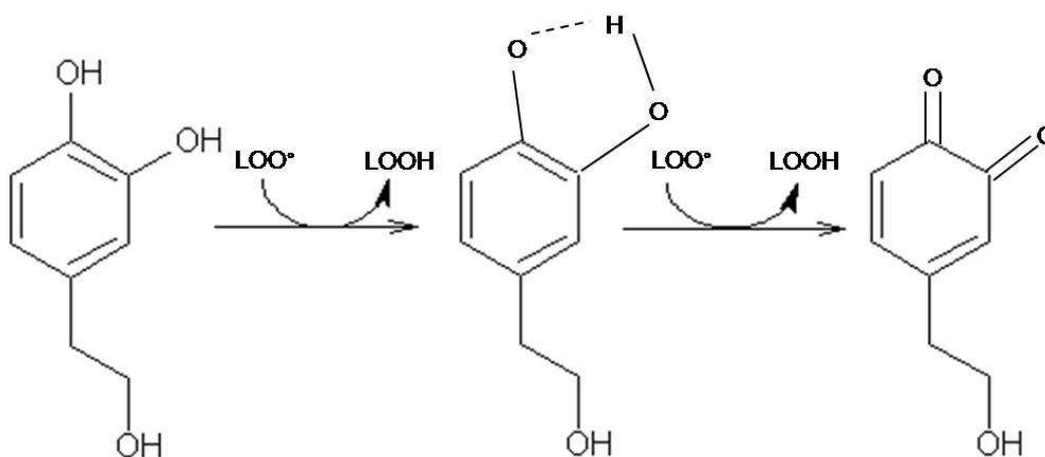


Figure 28 : Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol (Tripoli, 2005)

L'acide caféique et l'acide férulique ont un effet cytoprotecteur sur les cellules endothéliales en bloquant l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} en réponse à l'oxydation des LDL (Viera, 1998). L'acide caféique, l'acide férulique ainsi que l'hydroxytyrosol sont donc tous impliqués dans la protection contre les maladies cardio-vasculaires.

Deux études ont montré un effet hypocholestérolémique et hypoglycémique de l'oleuropéine et de l'oleuropéine aglycone (Le Tutor, 1992 ; Ficarra, 1991). Ces deux composés et l'hydroxytyrosol sont également impliqués dans la protection de l'organisme contre certains agents pathogènes responsables de maladies intestinales ou du système respiratoire (Bisignano, 1999).

Si toutes ces études ont permis de mettre en évidence certaines actions des composés phénoliques, beaucoup de choses sont encore à découvrir car les effets bénéfiques mis en évidence par des études épidémiologiques ne sont toujours pas pleinement explicités. Les composés phénoliques peuvent également présenter des effets synergiques entre eux ce qui complique la mise en évidence d'effets spécifiques de chacun d'entre eux. Ce qui semble acquis c'est qu'une ingestion régulière de composés phénoliques comme ceux présents dans l'huile d'olive est fortement corrélée à une diminution des risques de développement de maladies dégénératives, cardiovasculaires ou de cancers.

1.4.3 Les tocophérols

Les tocophérols sont liposolubles et leur présence dans les huiles les protège du rancissement. Dans l'organisme humain, les principaux systèmes antioxydants endogènes agissent dans les parties aqueuses de la cellule. L'alpha-tocophérol (90 % des tocophérols dans l'huile d'olive) va s'insérer dans les membranes cellulaires ainsi que dans les lipoprotéines en stabilisant les radicaux peroxy (Serbinova, 1991). L'alpha-tocophérol est en effet connu pour être l'antioxydant lipophile le plus puissant pour limiter le processus d'oxydation radicalaire. Une déficience en tocophérol dans les membranes cellulaires peut augmenter la perméabilité des cellules et donc les rendre plus vulnérables à la dégradation. Il est aussi l'antioxydant le plus important dans les LDL et pourrait donc jouer un rôle clé en inhibant leur oxydation. Une fois oxydé, l'alpha-tocophérol peut être régénéré par l'acide ascorbique (vitamine C) ou l'ubiquinol (Gille, 2008 ; Pincemail, 2003, Bascetta, 1983). En plus de leur activité antioxydante, les tocophérols ont été associés à un ralentissement de la propagation cellulaire, de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des monocytes dans les vaisseaux sanguins. Zingg (2004) suggérait que ces effets pourraient être dus à des interactions entre l'alpha-tocophérol, certaines enzymes et des protéines structurales.

1.5 Conclusion

L'huile d'olive est la principale source d'apport de matière grasse dans les régimes alimentaires méditerranéens. Ce type de régime a souvent été associé à une meilleure résistance à certaines maladies, notamment les maladies cardio-vasculaires et les maladies dégénératives. De nombreuses études scientifiques se sont donc intéressées au contenu nutritionnel de l'huile d'olive afin de comprendre les mécanismes d'action pouvant expliquer ces phénomènes. La première explication est sa composition spécifique en acides gras. La proportion d'acides gras saturés est très faible (14%) alors que l'acide gras très majoritaire est l'acide oléique qui est un acide gras mono-insaturé. La mono-insaturation de l'acide oléique confère à l'huile une certaine stabilité car il est peu sensible à l'oxydation. Les acides gras polyinsaturés essentiels sont également présents en proportions intéressantes dans l'huile et leurs bienfaits, notamment au niveau de la protection vis-à-vis des maladies cardio-vasculaires et des cancers, ont largement été étudiés au cours de ces dernières décennies. Par contre ces molécules sont très sensibles à l'oxydation ce qui pourrait provoquer un rancissement prématuré des huiles.

Pour protéger ses principales molécules de l'oxydation, l'olive a développé des moyens de défense : les composés phénoliques. Ces composés phénoliques sont partiellement retrouvés dans l'huile (même si la majorité des composés phénoliques est très hydrosoluble et est donc éliminée dans les margines) ce qui permet de prolonger sa durée de vie. S'ils permettent de protéger l'huile de l'oxydation, c'est surtout sur leur rôle *in vivo* que les scientifiques ont travaillé. En effet les radicaux générés par le stress oxydant ont souvent été désignés comme pouvant être à l'origine des principales causes de mortalité dans les pays développés : les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Leur stabilisation semble donc être un enjeu majeur et c'est ce qui explique l'engouement de plus en plus important pour les antioxydants.

L'huile d'olive est riche en antioxydants, cependant de nombreuses études ont montré que la qualité d'une huile peut être grandement influencée par son procédé de fabrication. Dans un premier temps, les travaux de cette thèse ont donc été réalisés dans le but de répertorier les différentes techniques de fabrication de l'huile, de les analyser étape par étape et d'optimiser les procédures dans les moulins de façon à obtenir une huile de très haute valeur nutritionnelle. Dans un second temps, des techniques d'extraction innovantes ont été utilisées dans le but d'effectuer un enrichissement post-fabrication de l'huile d'olive sur le plan nutritionnel et organoleptique.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Solvants et réactifs

Tableau 7 : Solvants et réactifs utilisés au cours des travaux

Nom du produit	CAS	Fournisseur	M (g/mol)
Acétonitrile HPLC	75-05-8	Fisher	41,05
Acide acétique	64-19-7	VWR	60,05
Acide férulique	1135-24-6	Alfa Aesar	194,18
Acide gallique	149-91-7	Alfa Aesar	170,12
Acide <i>p</i> -coumarique	7400-08-0	Alfa Aesar	164,16
Acide <i>trans</i> -cinnamique	140-10-3	Alfa Aesar	148,16
Acide vanilique	121-34-6	Alfa Aesar	168,15
Alpha-tocophérol	9-02-9	Extrasynthèse	430,71
Amidon	9005-95-9	Labover	-
Apigénine	520-36-5	Extrasynthèse	270,24
BF3-méthanol	373-57-9	VWR	99,85
Cacodylate de sodium	124-65-2	Agar Scientific	214,03
Chloroforme	67-66-3	Alfa Aesar	119,35
Chlorure de sodium	7647-14-5	Sigma	58,00
<i>d</i> -limonène	5989-27-5	Fluka	136,23
Eau HPLC	7732-18-5	Merck	18,00
Ethanol	64-17-5	VWR	46,07
Glutaraldéhyde	111-30-8	Agar Scientific	100,12
Heptane	142-82-5	VWR	100,20
Hexaméthyl disilazane	999-97-3	Agar Scientific	161,39
Hexane	110-54-3	VWR	86,18
Hexane HPLC	110-54-3	VWR	86,18
Hexane UV	110-54-3	VWR	86,18
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Sigma	40,00
Hydroxytyrosol	10597-60-1	Extrasynthèse	154,17
Iodure de potassium	7681-11-0	Sigma	166,00
Isopropanol HPLC	67-63-0	Sigma	60,10
Lutéoline	491-70-3	Extrasynthèse	286,24
Méthanol	67-56-1	Aldrich	32,00
Méthanol HPLC	67-56-1	VWR	32,00
Oleuropéine	32619-42-4	Extrasynthèse	540,53
Phénolphtaléine	77-09-08	Labover	318,32
Soude 0,1N	1310-73-2	VWR	40,00
Tétraoxyde d'osmium	20816-12-0	Agar Scientific	254,23
Thiosulfate de sodium 1N	7772-98-7	Pancreac	158,10
Toluène	108-88-3	Sigma	92,14
Tyrosol	501-94-0	Extrasynthèse	138,17

2.2 Matières végétales

Les olives utilisées au cours de ces trois années aussi bien pour le travail au moulin que pour le développement de nouvelles techniques analytiques étaient toutes de la variété *Aglandau*. Ces olives ont été collectées comme suit :

- Récolte 2007 : les olives ont été récoltées les 1^{er} et 2 décembre dans une petite production locale (Domus Claudia, Hameau de St Veran, Vaucluse, France), propriété de M. Philippe Coulomb, pour une trituration des olives le 3 décembre à "le petit moulin" à Travaillan (M. Yvon Gras, Vaucluse, France).
- Récolte 2008 : les olives ont été récoltées les 17 et 18 novembre au domaine "la plantade", propriété de M. Pierre Passalacqua, dans la vallée des Baux de Provence (Fontvieille, Bouches-du-Rhône, France) pour une trituration des olives le 19 novembre à "le moulin d'Aureille" (M. Serge Pérignon, Bouches-du-Rhône, France).
- Récolte 2009 : les olives ont été récoltées le 12 novembre au domaine "la plantade", propriété de M. Pierre Passalacqua, dans la vallée des Baux de Provence (Fontvieille, Bouches-du-Rhône, France) pour une trituration des olives le 13 novembre à "le moulin d'Aureille" (M. Serge Pérignon, Bouches-du-Rhône, France) et à "le moulin artisanal" à St Rémy de Provence (M. Gérard Bodel, Bouches-du-Rhône, France).

Dans les trois cas les huiles ont été placées dans des récipients hermétiques à l'air et à la lumière et conservées à -18°C en attendant les analyses. Afin de limiter l'altération des huiles, les analyses ont été conduites le plus rapidement possible après extraction. Des échantillons d'olives ont également été prélevés à chaque récolte, placés dans des sachets hermétiques et stockés à -18°C en attendant d'être utilisés lors de la mise au point des protocoles expérimentaux.

2.3 Protocoles des analyses physicochimiques

Toutes les extractions et les analyses ont été réalisées en trois fois dans un même intervalle de temps et la moyenne de ces trois analyses ainsi que les écart-types sont présentés dans les différents tableaux de données.

2.3.1 Acidité libre

L'acidité libre de chaque huile a été déterminée selon la norme officielle AOCS Ca 5a-40. Les volumes de réactifs et de produits ajoutés sont fonction de tests préliminaires permettant d'évaluer un pourcentage approximatif d'acides libres dans l'huile avant l'analyse précise dans les conditions suivantes : 56,4 g d'huile d'olive ont été pesés et solubilisés dans 50 mL d'éthanol 96% préalablement neutralisé. 2 mL d'indicateur coloré (phénolphtaléine) ont ensuite été ajoutés et cette solution a été titrée contre une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 N. L'acidité libre a ensuite été exprimée en pourcentage d'acide oléique libre selon la formule :

$$\% \text{ ac. oléique} = (V_{\text{NaOH}} \times 0,1 \times 28,2) / m_{\text{huile}} \quad \text{Equation 1}$$

2.3.2 Valeur peroxyde

La valeur peroxyde a été déterminée par la méthode dite à l'acide acétique et chloroforme correspondant à la norme AOCS Cd 8-53. 5 g d'huile d'olive ont été dissous dans 30 mL d'un mélange acide acétique:chloroforme (3:2) puis 0,5 mL d'une solution saturée d'iodure de potassium ont été ajoutés au mélange, puis enfin 30 mL d'eau distillée après exactement une minute d'agitation. Cette solution a ensuite été titrée avec du thiosulfate de sodium à 0,01 N en utilisant de l'amidon comme indicateur coloré. La valeur peroxyde est exprimée en milliéquivalents peroxyde par 1000 g d'huile selon la formule :

$$\text{VP (meq.O}_2\text{/kg)} = ((V_{\text{ech}} - V_{\text{blanc}}) \times 0,01 \times 1000) / m_{\text{huile}} \quad \text{Equation 2}$$

Remarque : Le titrage par la méthode officielle Cd 8-53 utilise une solution de thiosulfate de sodium à 0,1 N, mais en accord avec l'alinéa N°4 de cette même norme, une solution à 0,01 N doit être utilisée si le volume de titrage est inférieur à 0,5 mL.

2.3.3 Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux se faisant en milieu aqueux, ceux-ci doivent tout d'abord être extraits des huiles d'olive avant d'être dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu (Box, 1983). Après solubilisation de 20 g d'huile dans 20 mL d'hexane, les phénols sont extraits trois fois par 20 mL d'un mélange méthanol-eau (60/40). Les trois extraits sont ensuite combinés dans une fiole de 100 mL et le volume est ajusté par de l'eau distillée. Cet extrait est ensuite utilisé pour le dosage par le réactif de Folin Ciocalteu. En milieu basique, le réactif de Folin Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés phénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de réduction (oxydes métalliques W_8O_{23} et Mo_8O_{23}) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon. Cette analyse a été réalisée à l'aide de kits de dosages de polyphénols de chez Isitec-lab (Montauban, France) selon le mode opératoire précisé dans le tableau 8.

Tableau 8 : Mode opératoire pour l'utilisation du kit de dosage des polyphénols

	Blanc	Etalon	Echantillon
H2O	0,100 mL		
Etalon		0,100 mL	
Echantillon			0,100 mL
Chromogène	2 mL	2 mL	2 mL

Mélanger et attendre 1 minute

Tampon	1 mL	1 mL	1 mL
--------	------	------	------

Placer les échantillons à l'abri de la lumière pendant 30 minutes

Mesurer l'absorbance à 750 nm

Comme précisé dans ce tableau, l'absorbance de la solution finale est mesurée à 750 nm. Cette mesure a été réalisée sur un spectromètre à barrette de diodes HP 8452. La concentration en phénols est calculée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique comme molécule de référence. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique par kg d'huile d'olive.

2.4 Analyses en chromatographie liquide haute performance (CLHP)

2.4.1 Matériel

Ces dosages ont été réalisés sur une CLHP Waters (Mildford, MA, USA) équipée d'une pompe « Model 600 » et d'un contrôleur de gradient « Model 600 », auxquels sont connectés un injecteur automatique « Model 717 » et un détecteur à barrette de photodiodes « Model 996 ». Le volume de solution étalon ou de solution test injecté est de 20 µl. Toutes les analyses ont été traitées par le logiciel Empower (Waters).

2.4.2 Le dosage des tocophérols

Le dosage des tocophérols se fait selon la méthode officielle AOCS Ce 8-89 et se fait en plusieurs étapes :

- la première étape consiste en un équilibrage du système. Pour cela le solvant de migration (hexane:isopropanol, 99/1) est amené dans le système à un débit d'élution de 1,5 mL/min puis il est maintenu jusqu'à obtention d'une pression constante en tête de colonne (30 minutes minimum). La colonne de séparation utilisée pour ce type d'analyse est une colonne de silice nucleosil (S.F.C.C.) 5 µm de 4,6 mm x 250 mm.
- la seconde étape est la réalisation de la courbe d'étalonnage. Pour cela 10 mg d'étalon de tocophérol sont solubilisés dans 100 mL d'hexane puis 10 mL de cette solution sont placés dans un ballon puis évaporés à l'évaporateur rotatif. 10 mL de méthanol sont utilisés pour reprendre les tocophérols contenus dans le ballon et l'absorbance de cette solution est mesurée à 292 nm sur un spectromètre à barrette de diodes HP 8452. La concentration de la solution (en µg d'alfa-tocophérol par mL) est calculée en divisant l'absorbance de la solution par 0,0076. Différentes concentrations d'étalons sont ensuite injectées en CLHP afin de réaliser la courbe d'étalonnage (comprise entre 1 et 5 µg/mL).
- pour le dosage dans les huiles, 2 grammes d'huile sont solubilisés dans 25 mL d'hexane puis 20 µl de cette solution sont injectés en CLHP. La concentration en tocophérols est ensuite calculée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée précédemment.

Calcul :

$$C_{\text{tocophérols}} (\mu\text{g}/\text{mg}) = \frac{C \times a \times D \times 25}{A \times m} \quad \text{Equation 3}$$

C = concentration de tocophérol dans l'étalon

A = moyenne des aires sous la courbe pour l'étalon

D = facteur de dilution

m = masse de l'échantillon

a = moyenne des aires sous la courbe pour l'échantillon

2.4.3 Dosage des phénols

La séparation des composés phénoliques a été réalisée sur une colonne Purospher Star C₁₈ 250 x 4,6 mm de 5 μm avec une pré-colonne Purospher Star C₁₈ (Merck, Allemagne). Le système de solvants utilisés était un gradient de A (eau/0,5 % acide formique) et B (acétonitrile) (Tableau 9).

Tableau 9 : Gradient de solvants pour le dosage des phénols par CLHP

t (min)	A	B
0	90	10
5	60	40
40	20	80
45	0	100
48	0	100
51	90	10
61	90	10

Le débit utilisé était de 1mL/min. La détection spectrophotoscopique a été faite sur la gamme de 200 à 800 nm avec une résolution de 1,2 nm et la détection des composés a été réalisée à 280 nm sauf pour la lutéoline et l'apigénine qui ont été relevées à 340 nm. La quantité de composés phénoliques a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage pour chaque composé.

2.5 Analyses en chromatographie en phase gazeuse (CPG)

2.5.1 Etude des arômes de l'huile par micro-extraction en phase solide et analyse en CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM)

La composition en molécules volatiles dans l'huile d'olive a été estimée par analyse de l'espace de tête de flacons contenant l'huile. Pour cela, 4 grammes d'huile ont été placés dans un flacon de 20 mL et pré-incubés à 35°C pendant 15 min. Les composés volatiles contenus dans l'espace de tête des flacons ont été adsorbés sur une fibre de micro-extraction en phase solide (SPME) pendant 30 minutes. La fibre utilisée pour l'adsorption et la désorption était une fibre SPME carboxen-PDMS (polydimethylsiloxane) de 75 µm et les composés volatiles ont ensuite été séparés par une CPG/SM QP2010 de chez Shimadzu (Kyoto, Japon) équipée avec un injecteur automatique AOC 5000. La séparation s'est effectuée sur une colonne capillaire CP WAX 52 CB (10 m x 0,1 mm). Les conditions optimales de séparation ont été obtenues pour les conditions suivantes : température initiale du four de 35°C, conservée pendant 3 minutes, puis la température a été augmentée à une vitesse de 5°C/min jusqu'à atteindre 110°C, suivi par une augmentation de 10°C/min jusqu'à 230°C, puis cette température a été maintenue pendant 5 minutes. Les spectres de masse ont été enregistrés à la vitesse de 3 scans par seconde pour une gamme de 50 à 400 amu (atomic mass unit) avec un mode d'ionisation en impact électronique de 70 eV. Les composés volatiles ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse, leurs temps et indices de rétention par rapport à des composés de référence. Quand ces étalons n'étaient pas disponibles, la tentative d'identification a été réalisée en utilisant la librairie de spectres de masse NIST'98 (US National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) et en comparant les indices de rétention à ceux de la littérature.

2.5.2 Analyse de la composition en acides gras en CPG couplée à la détection en ionisation de flamme (FID)

- Préparation des esters méthyliques d'acides gras (FAMES) (norme officielle AOCS Ce 2-66). Pour préparation des esters méthyliques d'une huile d'olive, commencer à l'alinéa 3 de la norme : 200 mg d'huile ont été dissous dans 4 mL de soude

méthanolique à chaud (0,5 M), puis 5 mL de BF₃-méthanol ont été ajoutés et ce mélange réactionnel est maintenu à ébullition pendant 2 minutes. Ensuite, comme spécifié à l'alinéa 2 de la norme, 5 mL d'heptane sont ajoutés dans le ballon et l'ébullition est prolongée d'une minute avant de retirer le système du chauffe-ballon pour y introduire 15 mL de solution saturée de chlorure de sodium. Cette solution est agitée vigoureusement pendant au moins 15 secondes puis la phase organique est récupérée, filtrée à 0,2 µm (Alltech Associates, Deerfield, IL, USA) et injectée en chromatographie gazeuse.

- Pour l'analyse, les FAMES ont été séparés, identifiés et quantifiés par CPG/FID. Ces analyses ont été réalisées sur une chromatographie gazeuse HP 5890 série II (GMI inc., Ramsey, Minnesota, USA) équipée d'une colonne capillaire DB 225 30 m x 0,25 mm x 0,5 µm (Varian, Inc., USA) avec une pression sur le gaz vecteur (Hydrogène) de 100 kPa. 1 µl de chaque extrait a été injecté avec un facteur de dilution de 1/15 et une température d'injection de 250°C. La température initiale du four était de 100°C et a été augmentée à la vitesse de 20°C/min jusqu'à 160°C, puis de 3°C/min jusqu'à atteindre 220°C. Cette température maximale a ensuite été maintenue pendant 5 minutes. La détermination des acides gras a été réalisée par comparaison des temps de rétention à ceux d'étalons provenant d'un kit FAME.

2.6 Analyses en Microscopie Electronique à Balayage

Des fragments d'olives ont été collectés à chaque étape de la production de l'huile d'olive : juste après le broyage après le malaxage et après la presse. Après avoir été prélevés avec précaution, les échantillons ont été plongés dans du glutaraldéhyde à 4% (v/v) dans du tampon de cacodylate sodium afin de fixer les structures végétales, puis les échantillons ont été conservés à 4°C avant d'être post-fixés dans du tétraoxyde d'osmium (dilué à 1% (v/v)). Les échantillons ont ensuite été rincés par des bains d'eau distillée puis déshydratés progressivement par de l'éthanol (30 %, 50 %, 70%, 90%, and 100%). La dernière étape de la déshydratation était un bain d'hexaméthyle disilazane jusqu'à évaporation complète de celui-ci, puis les échantillons ont été métallisés par une fine couche d'or avant d'être observés en microscopie électronique à balayage sur un microscope XL 30 (Philips FEI) au laboratoire de microscopie de l'INRA PACA, site de St Maurice à Montfavet.

2.7 Conception et développement de nouvelles procédures de Dean-Stark

2.7.1 Dean-Stark Conventionnel

La détermination de la teneur en eau des olives a tout d'abord été réalisée en suivant la norme AOCS Ja 2a-46. L'équipement est composé de trois parties principales : un ballon de 500 mL placé sur un chauffe-ballon, un réceptacle de Dean Stark gradué et un réfrigérant. Pour chaque analyse $20 \pm 0,5$ g d'olives (soit neuf olives de taille moyenne) ont été utilisés. La masse de l'échantillon a été adaptée selon les recommandations de Harel et Talmi (1957) à savoir avoir suffisamment d'eau dans le réceptacle en fin d'expérience mais pas plus de 10 mL car c'est la contenance maximale de celui-ci. 100 mL de toluène ont été utilisés comme solvant de distillation pour chaque analyse.

Au début de la distillation le chauffage électrique était poussé à son maximum jusqu'à ce que les premières gouttes de distillation refluent dans le réceptacle. Ensuite le chauffage a été adapté pour avoir une vitesse de distillation de 100 gouttes/minute afin de respecter les recommandations de la norme. Lorsque la majorité de l'eau a été récupérée (environ 80 %), la vitesse de distillation a été portée à 200 gouttes/minute et la distillation a duré jusqu'à ce que le niveau d'eau dans le réceptacle de Dean Stark n'évolue pas plus que 0,1 mL en 30 minutes ou alors jusqu'à ce que la distillation ait duré 2 h. Après la distillation environ 30 mL de toluène ont été ajoutés par le haut du condensateur afin de déloger d'éventuelles gouttes d'eau qui auraient adhéré à ses parois. La teneur en eau dans le produit de départ est déterminée en rapportant la quantité d'eau récoltée dans le réceptacle de Dean Stark à la masse de l'échantillon de départ.

2.7.2 Dean-Stark Accéléré par micro-ondes

Les essais sous micro-ondes ont été réalisés dans un four micro-onde de chez Milestone (Bergame, Italie) (Figure 29). Ce four est équipé d'un magnétron de 2,45 GHz et d'un réacteur multi-mode pouvant délivrer jusqu'à 1000 watts, puissance variable par palier de 10 watts. Les données concernant la température, la puissance délivrée et le temps d'expérience sont toutes contrôlées par un logiciel interne.

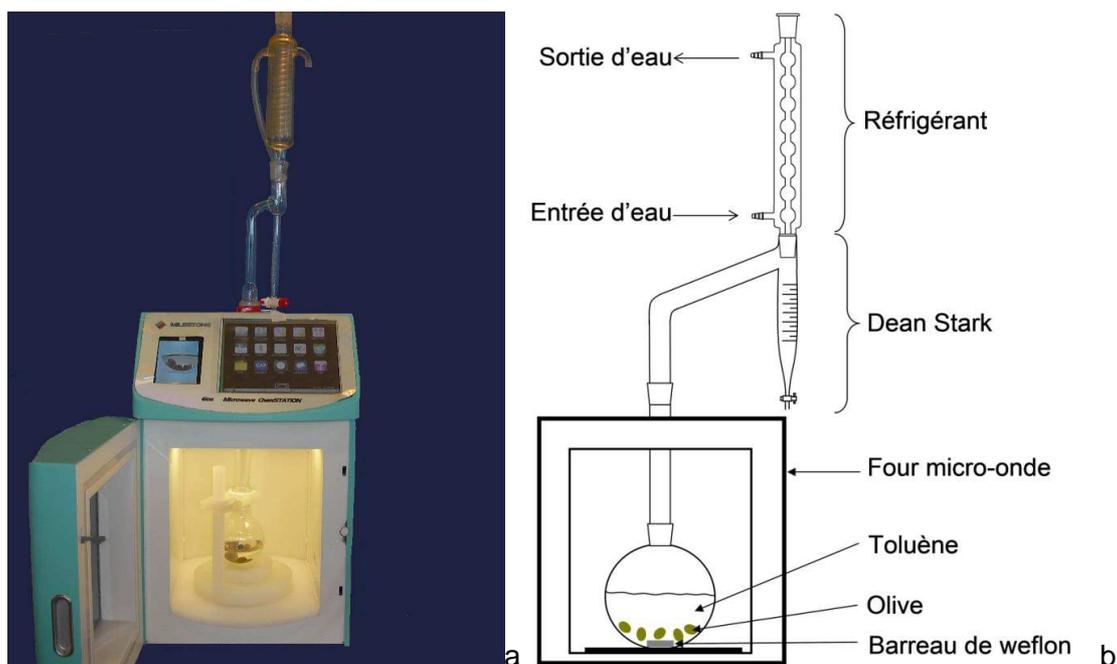


Figure 29 : Dean-Stark par micro-ondes, photo (a) et schéma (b) du montage

La verrerie utilisée est la même que celle utilisée pour le Dean Stark conventionnel (500 mL) et les mêmes quantités de matrices alimentaires et de solvant ont également été utilisées. Du weflon (composé de polytetrafluoroethylene et de graffite) est utilisé sous micro-ondes car le toluène est très faiblement polaire, ce qui le rend presque transparent aux micro-ondes. Le weflon est donc capable d'absorber l'énergie micro-onde et de la restituer sous forme de chaleur au milieu environnant.

2.7.3 Dean-Stark utilisant un bio-solvant : le α -limonène

Le montage de distillation et les conditions opératoires sont les mêmes que celles utilisées pour le Dean Stark conventionnel et les mêmes quantités de matrices alimentaires et de solvant ont également été utilisées. Le seul changement vient de l'utilisation du α -limonène à la place du toluène.

2.7.4 Généralisation des procédures

Pour vérifier l'efficacité des nouvelles techniques (accélérée par micro-ondes et utilisant du α -limonène), différentes matrices ont été testées et les résultats obtenus ont été

comparés à ceux obtenus par distillation conventionnelle. Des bulbes (ail, oignon, échalote), des fromages (camembert, mozzarella), des plantes aromatiques (romarin, sauge, menthe), de la viande de bœuf hachée et des légumes (poireaux, carottes) ont été analysés afin d'évaluer le potentiel des deux nouvelles techniques. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois, dans la même journée, aussi bien pour la technique conventionnelle que pour les techniques innovantes et les moyennes et écart-types sont présentés dans les tableaux de résultats.

2.8 Aromatisation d'une huile d'olive par ultrasons

Les feuilles fraîches de basilic (*Ocimum basilicum* L.) sont issues de plants achetés au producteur de plantes aromatiques « saint-Rémy Basilic » (St Rémy de Provence, Bouches du Rhône, France). L'huile d'olive utilisée est de l'huile du Vaucluse. L'aromatisation de l'huile d'olive est réalisée d'une part dans un réacteur ultrasons PEX3 (R.E.U.S., Contes, France) (Figure 30), 25 kHz, 150 W, à température ambiante et d'autre part par macération conventionnelle dans les mêmes conditions sans assistance des ultrasons. L'huile essentielle de basilic est également extraite par distillation avec entraînement à la vapeur afin d'effectuer des comparaisons entre les méthodes.

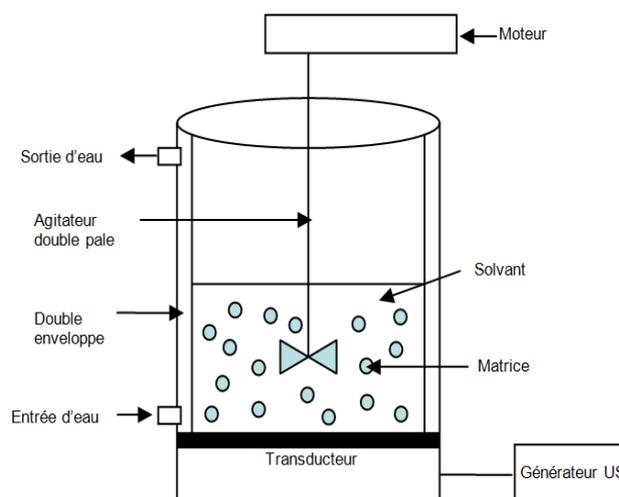


Figure 30 : Bac à ultrason de laboratoire de 3 L (R.E.U.S.)

Les composés volatiles des extraits d'huile d'olive et de basilic ont été analysés par micro extraction en phase solide à partir de l'espace de tête (HS-SPME) associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les feuilles de basilic ont été observées par microscopie à balayage électronique avant extraction, après macération (24h) et après extraction assistée par ultrasons (15 min).

2.9 Extraction de β -carotène par ultrasons

Le même appareillage a également été utilisé pour l'extraction de β -carotène dans l'huile d'olive. Différentes concentrations de poudre de carotte achetée chez « l'herbier du Diois » (Chatillon-en-Diois, Drôme, France) ont été extraite dans de l'huile d'olive du Vaucluse achetée dans un supermarché local.

Tableau 10 : Programmation des expériences par Statgraphics

Expérience	Plan codé			Plan décodé		
	A	B	C	temps (min)	Puissance (W)	Température (°C)
1	0	1	0	20	60	22
2	-1	-1	-1	5	20	10
3	-1	-1	1	5	20	34
4	-1	1	1	5	60	34
5	-1	0	0	5	40	22
6	0	0	0	20	40	22
7	0	0	1	20	40	34
8	0	0	0	20	40	22
9	1	1	-1	35	60	10
10	0	0	0	20	40	22
11	0	0	0	20	40	22
12	1	-1	1	35	20	34
13	0	0	-1	20	40	10
14	0	-1	0	20	20	22
15	-1	1	-1	5	60	10
16	1	1	1	35	60	34
17	1	0	0	35	40	22
18	0	0	0	20	40	22
19	1	-1	-1	35	20	10
20	0	0	0	20	40	22

Dans le but d'optimiser les conditions d'extraction tout en réalisant un nombre raisonnable d'expériences, un plan d'expériences a été mené au cours de ce projet. Lors des essais préliminaires, la cinétique de la concentration en β -carotène dans l'huile a été suivie en utilisant différents ratios solide/liquide (de 100 à 300 g de poudre de carotte par litre d'huile). Lors du plan d'expérience, 200 g de carotte ont été utilisés par litre d'huile.

Le plan d'expérience utilisé est un plan composite centré aussi appelé plan de Box-Wilson. Au cours de ce plan 3 paramètres sont étudiés simultanément : ici nous avons l'effet de la température, du temps d'extraction et de la puissance ultrasonore appliquée. La programmation du plan (Tableau 10) et le traitement des données ont été réalisés à l'aide d'un logiciel information de plans d'expériences statistiques : Statgraphics plus 2000 (Statgraphics, Manugistics, Rockville, USA). La méthodologie des surfaces de réponse permet de modéliser les réponses obtenues ainsi de déterminer l'optimum de chacun des paramètres pour favoriser l'extraction du β - carotène.

2.10 Analyses statistiques

Les résultats présentés sont les moyennes d'analyses réalisées en triple exemplaire avec les écart-type correspondants. Le seuil de différence significative a été fixé à 5% dans l'analyse statistique de Student.

Chapitre 3 : Enrichissement endogène de l'huile d'olive dans les moulins

3.1 Introduction

L'huile d'olive fait partie du patrimoine culturel et historique de l'humanité. Elle se trouve être un produit doté de grandes qualités organoleptiques et nutritionnelles qui lui valent l'honneur d'être servie sur les plus grandes tables, citée par les plus grands chefs et étudiée par le monde scientifique. L'huile d'olive est composée d'environ 99 % de triglycérides. Sa composition en acides gras est caractérisée par une teneur importante en acides gras mono-insaturés, en particulier en acide oléique et en acides gras poly-insaturés (linoléique, et acide linoléique). Outre ce bagage intéressant, l'autre attrait de l'huile d'olive réside en sa richesse en composés minoritaires tels que les composés phénoliques et en tocophérols.

De nombreuses études ont montré par le passé que le type de chaîne de fabrication de l'huile d'olive pouvait avoir une grande influence sur la qualité finale de celle-ci (Di Giovacchino, 2002 ; Gimeno, 2002). Ces travaux de thèse permettent de détailler l'influence de chacune des étapes de production de l'huile à travers l'étude de nombreux paramètres :

- l'analyse des paramètres physicochimiques de l'huile
- les détails de la composition de l'huile en acide gras, arômes, composés phénoliques ou encore en tocophérols
- une analyse originale en microscopie électronique à balayage pour comprendre l'impact cellulaire de certaines étapes de la chaîne de production.

L'ensemble des données collectées ouvre de nouvelles réflexions sur les techniques conventionnelles de fabrication de l'huile d'olive et permet de mettre en valeur l'intérêt de certaines techniques par rapport à d'autres. Cela aboutit également au développement de certains systèmes innovants comme celui de l'utilisation du vase florentin en fin de procédé pour permettre de retirer très rapidement les margines du mélange de liquides.

3.2 Plans d'action dans les moulins

3.2.1 Campagne 2007/2008

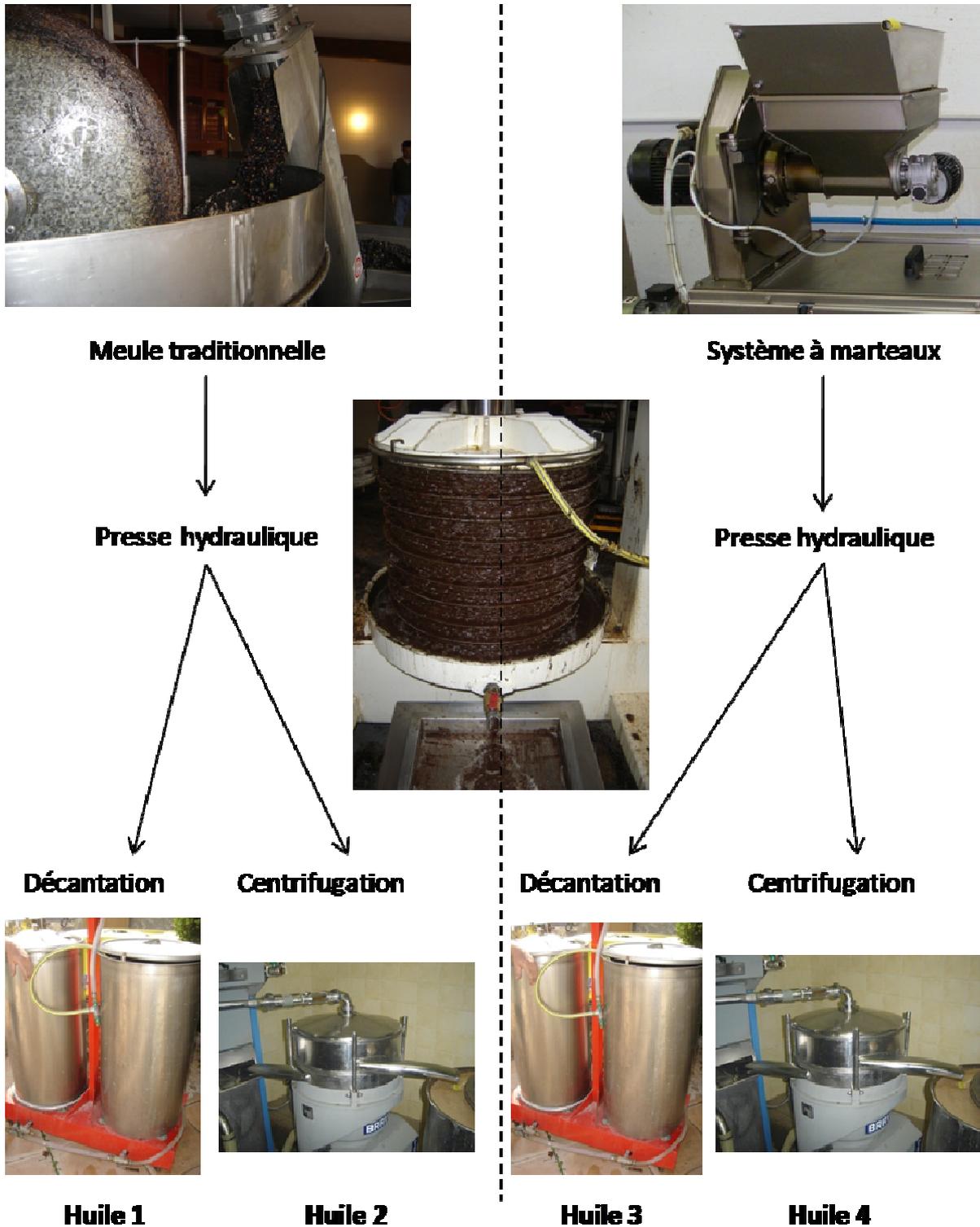


Figure 31 : Prélèvements pour la campagne 2007-2008

Lors de cette première année de prélèvements, deux systèmes de trituration des olives ont été testés (Figure 31) :

- un système de meules tournantes comprenant deux meules de granit de 23 cm d'épaisseur et tournant à la vitesse de 17 tours par minute. La charge maximale du bac de trituration était de 250 kg d'olives et le broyage a duré 35 minutes à température ambiante (20°C).
- un système de marteaux à 6 bras métalliques (voir également Figure 3) tournant à une vitesse de 2890 tours par minute. Une fois triturée à température ambiante, la pâte d'olives broyées passe à travers une grille de 0,7 cm de diamètre avant de tomber dans le bac de malaxage.

Le malaxage a ensuite été réalisé dans un container métallique où tournait une vis sans fin sans aucun chauffage de la pâte d'olive. Cette étape dura 25 minutes afin de permettre une bonne coalescence des gouttelettes d'huile. La pâte d'olive a ensuite été placée sur des disques de fibre synthétique empilés les uns sur les autres puis placés dans un système de presse hydraulique où une pression de 400 bars a été appliquée à l'empilement de disques. Ceci permet une séparation solide/liquide puis la fraction liquide contenant de l'eau et de l'huile est centrifugée à 7000 tours par minute pendant 10 minutes. Les différentes huiles d'olive obtenues ont été aliquotées puis immédiatement congelées et conservées à -18°C avant analyses.

3.2.2 Campagne 2008-2009

Lors de la seconde campagne de prélèvements (Figure 32) les deux mêmes systèmes de trituration ont été utilisés (meules de granit et broyeurs à marteaux). Deux raisons principales à cela ; tout d'abord parce que des conclusions ne peuvent pas être tirées sur les résultats d'une seule campagne mais sur la répétition sur plusieurs campagnes consécutives ; ensuite parce que cette deuxième année le travail a aussi porté sur l'influence de la séparation des phases solides et liquides. Le moulin d'Aurillac possède deux types d'installations : un système continu et un système de meules tournantes.



Meule traditionnelle



Presse hydraulique

Décantation

Centrifugation



Huile 1



Huile 2



**Système à marteaux
avec triple malaxeur**



Séparateur 3 phases

Décantation

Centrifugation



Huile 3



Huile 4

Figure 32 : Prélèvements pour la campagne 2008-2009

- le système semi-continu avec un broyage des olives par des meules tournantes en granit, cuve de malaxage simple, presse hydraulique avec empilement de scourtins suivie soit d'une décantation gravitationnelle soit d'une centrifugation pour la séparation des phases liquides. Le système est dit semi-continu car la pâte d'olive est convoyée automatiquement du bac de broyage au malaxeur puis déposée sur les scourtins mais l'empilement de scourtins doit être amené manuellement vers la presse hydraulique. Le mélange huile/eau est ensuite pompé et convoyé automatiquement vers la centrifugeuse, mais le moulinier doit vider les scourtins après l'étape de pressage.
- un système continu avec broyage des olives par un système de marteaux, triple bac de malaxage puis centrifugeuse horizontale pour la séparation entre matières solides et liquides, puis une centrifugeuse classique pour la séparation des phases liquides. Il est à noter que le moulinier contrôle chaque étape du procédé mais il ne manipule jamais la pâte d'olive. Celle-ci est convoyée d'une étape à une autre par des systèmes de pompage et de tuyauterie, du broyage jusqu'à l'obtention du produit fini : l'huile d'olive.

3.2.3 Campagne 2009-2010

Les travaux effectués durant des deux premières années ont été repris au cours de cette dernière année et deux nouveaux systèmes y ont été ajoutés (Figure 33):

- Un système de vase florentin (Figure 34) : ce système pourrait venir en complément ou remplacer celui de la décantation gravitationnelle classique. L'intérêt de ce système est que le temps de contact entre les margines et l'huile est réduit puisque les margines sont éliminées au fur et à mesure.
- Système continu avec séparateur deux phases. Cette installation est présente au moulin de Mr Bodel. L'intérêt principal de cette étude est d'analyser l'impact de la centrifugation horizontale sur la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive puisque cette étude est menée en parallèle de celle avec un séparateur trois phases.

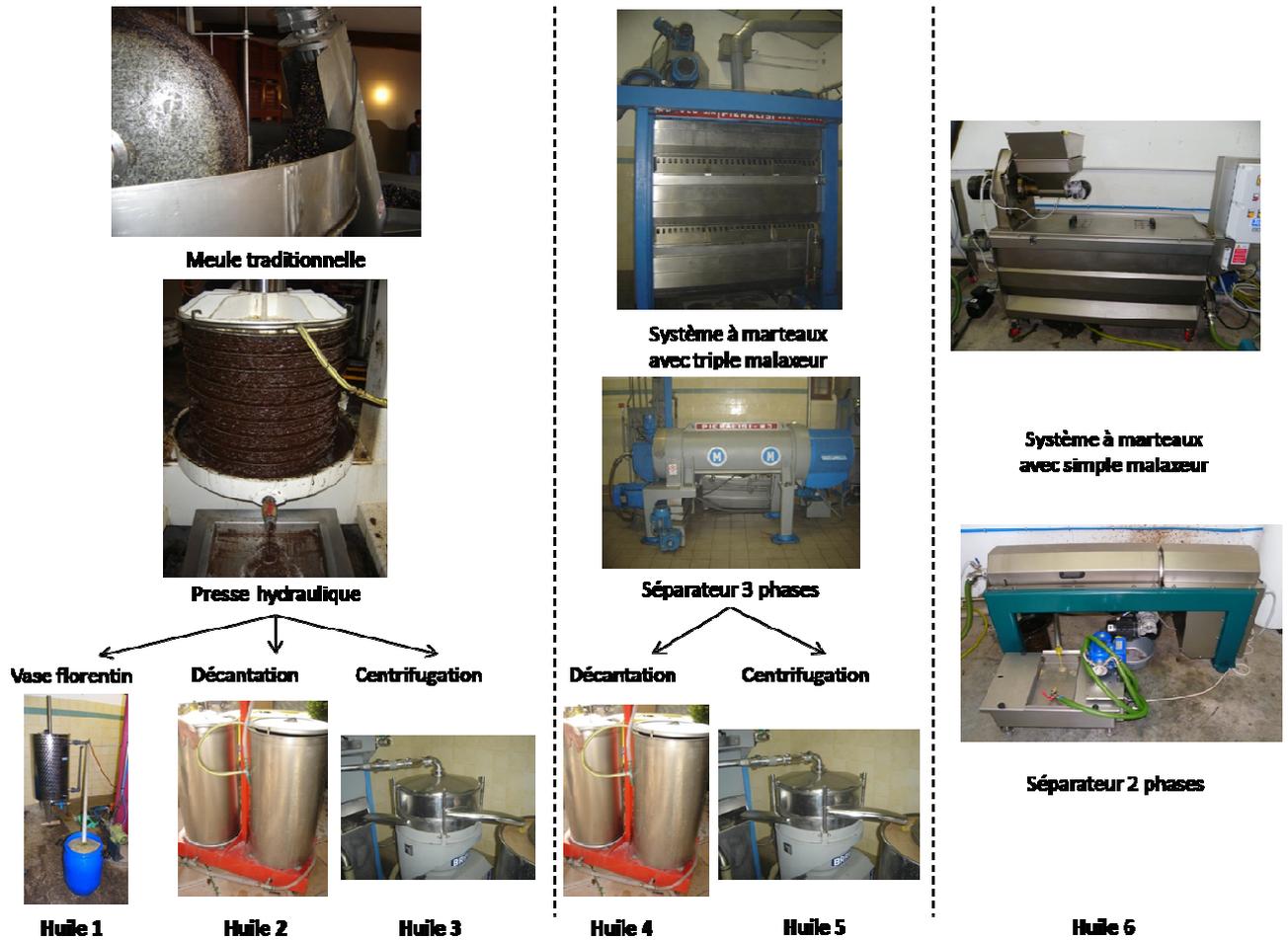


Figure 33 : Prélèvements pour la campagne 2009-2010

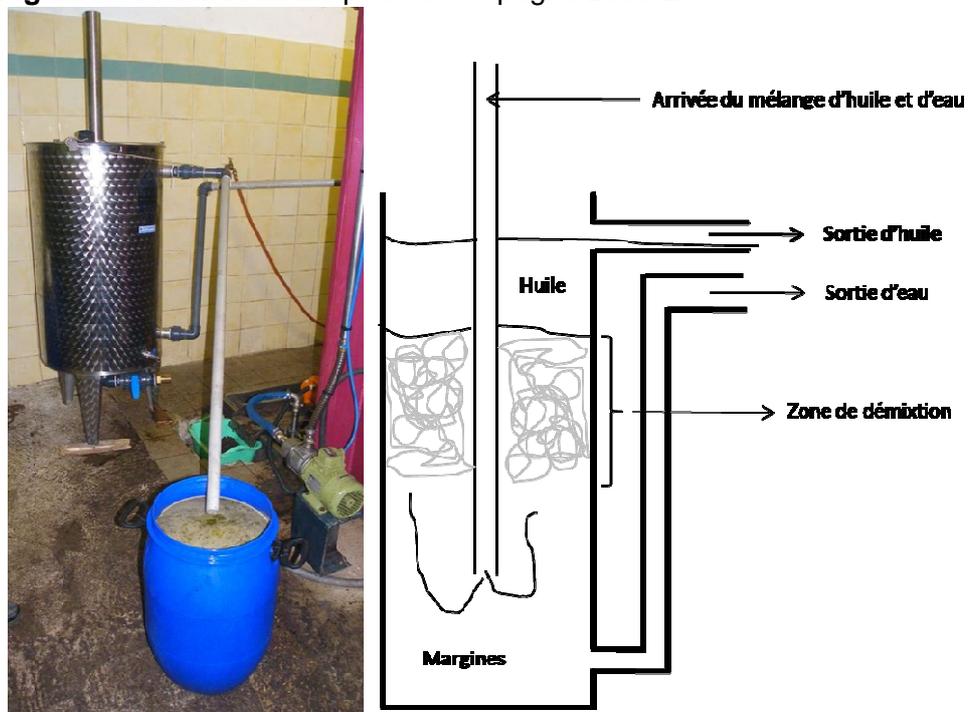


Figure 34 : Vase florentin expérimental

3.3 Analyse des données récoltées

Afin d'optimiser la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive finale, les différentes chaînes de production de l'huile d'olive ont été étudiées dans leur ensemble et par opération unitaire. Les différentes étapes de la chaîne de production peuvent être séparées en trois phases :

- Effet du procédé de trituration : les huiles obtenues suite à un broyage à la meule traditionnelle seront comparées à celles obtenues suite à un broyage par système à marteaux, indépendamment des autres phases du procédé de fabrication de l'huile d'olive.
- Effet du procédé de séparation des phases liquides : les huiles obtenues par centrifugation verticale seront comparées à celles obtenues par décantation gravitationnelle.
- Effet du système à deux phases par rapport au système à trois phases suivi d'une étape de centrifugation

3.3.1 Etude du procédé de broyage des olives

Afin d'évaluer les changements de composition chimique des huiles d'olive en fonction du procédé de trituration des olives, un même lot d'olives a été broyé soit par meule traditionnelle, soit par un système à marteaux (Veillet, 2009a). Dans les deux cas les pâtes obtenues ont subi une étape de malaxage puis une étape de pressage avant que les fractions liquides ne soient séparées par centrifugation.

3.3.1.1 Caractéristiques physicochimiques

Différents paramètres ont ensuite été étudiés, à commencer par les paramètres physicochimiques des huiles. Ceux-ci comprennent la valeur peroxyde, l'acidité libre et la teneur en polyphénols totaux et les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Impact du broyage sur les caractéristiques physicochimiques des huiles

Paramètre	Meule traditionnelle	Système à marteaux
Acidité libre (% acide oléique)	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Valeur peroxyde (meqO ₂ /kg)	5,79 ± 0,21	5,40 ± 0,10
Polyphénols totaux (mg GAE/L)	416 ± 27	563 ± 39

GAE : équivalents acide gallique

Ces études préliminaires montrent que les huiles d'olive issues des deux procédés d'extraction sont très peu oxydées car elles ont des valeurs peroxyde très faibles par rapport à de nombreuses autres études (Rotondi, 2004 ; Aparicio, 1999) et également très peu d'acidité libre. La norme européenne stipule que pour porter l'appellation « huile d'olive vierge extra » l'huile d'olive ne doit pas avoir un taux d'acidité libre supérieur à 0,8 % d'acide oléique et une valeur peroxyde inférieure à 20 meq O₂/kg d'huile. Ces huiles ne présentent donc aucune contre-indication à ce stade pour pouvoir porter l'appellation. Aucune différence significative ($\alpha = 0,05$) n'a été trouvée entre les deux traitements sur les critères de valeur peroxyde et d'acidité libre. Rotondi *et al.* (2004) ont trouvé une corrélation positive entre faible acidité et longue durée de vie de l'huile d'olive. Nous pouvons donc pronostiquer une bonne durée de conservation pour ces huiles, peu importe le procédé de trituration utilisé.

La détermination de la teneur totale en composés phénoliques dans les huiles est la première étape dans la caractérisation des polyphénols et ces résultats ont été exprimés en équivalents acide gallique (GAE). Comme présenté dans le tableau 11, la teneur totale en composés phénoliques est très fortement corrélée au procédé utilisé. Les valeurs les plus élevées ont été trouvées dans les huiles issues du broyeur à marteaux (563 ± 39 contre 416 ± 27 mg GAE/kg, significativement différent ($\alpha = 0,05$)) ce qui met en évidence une meilleure extraction des composés phénoliques lors de l'utilisation d'un broyeur à marteaux. Cette observation concorde avec des précédents travaux (Di Giovacchino, 2002 ; Caponio, 1999) qui attribuent cette valeur supérieure au fait que les broyeurs métalliques sont des procédés plus destructeurs au niveau de la chair de l'olive que ne le sont les roues de granit.

La plus forte teneur en composés phénoliques dans les huiles issues d'un procédé de trituration par marteaux se ressent au niveau sensoriel car les composés phénoliques sont associés à l'amertume et au piquant de l'huile d'olive (Esti, 2009 ; Gutierrez-Rosales, 2003).

Chez les amateurs de « fruité vert » ce paramètre peut être très important, néanmoins les huiles dégustées directement à la sortie d'un procédé utilisant des marteaux sont souvent décrites comme trop amères et elles doivent être laissées quelques semaines en cuve ou en bouteille avant d'être consommées. La plus faible teneur en composés phénoliques dans les huiles issues de la meule fait que ces huiles sont directement consommables, mais elles pourraient avoir une durée de vie plus courte étant donné que les composés phénoliques sont positivement corrélés à la durée de vie de l'huile.

3.3.1.2 Analyse des polyphénols

Afin de compléter l'étude sur les composés phénoliques, nous avons cherché à déterminer les modifications au niveau de chaque composé phénolique. La tentative d'identification des phénols dans les deux types d'huile d'olive a été réalisée par CLHP à barrette de diode (Figure 35). L'identification des composés phénoliques a été réalisée par comparaison de leur temps de rétention et de leurs spectres UV avec ceux d'étalons. Le tyrosol, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique, l'acide ferulique et l'acide trans-cinnamique pour les phénols simples et les acides phénoliques et l'apigénine et la lutéoline pour les flavonoïdes ont été facilement identifiés et quantifiés grâce à la présence d'étalons disponibles dans le commerce (Tableau 12).

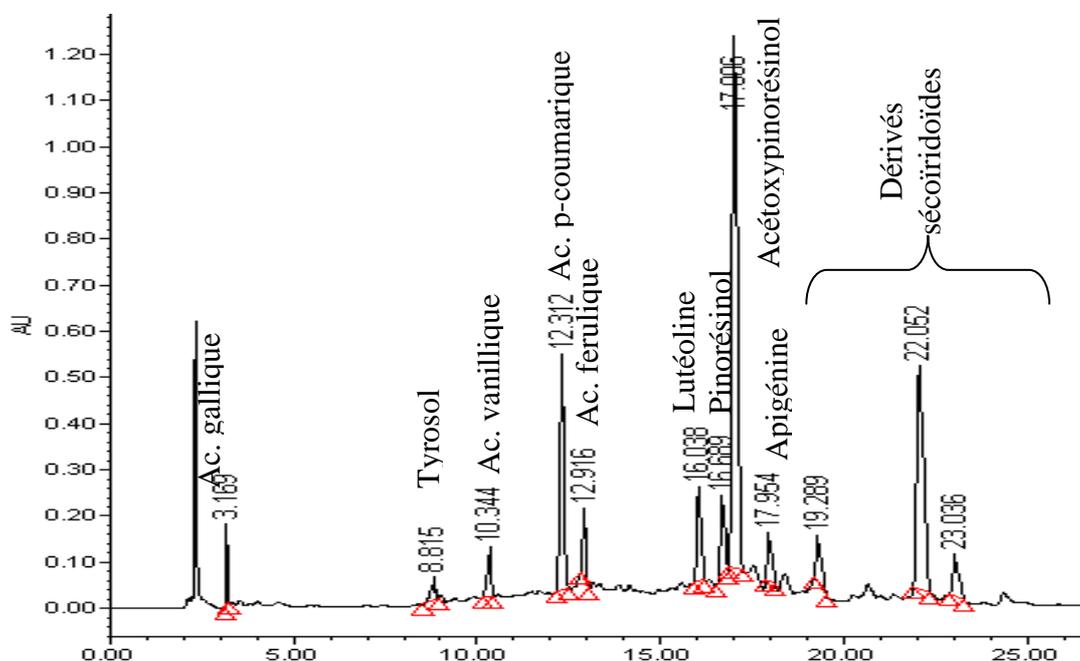


Figure 35 : Séparation des composés phénoliques

Tableau 12 : Concentrations en composés phénoliques déterminées par CLHP

Composé	TR (min)	λ_{\max} (nm)	Meule (mg/kg)	Marteaux (mg/kg)
Ac. Gallique	3,1	226, 272	1,60 ± 0,20	1,32 ± 0,14
Tyrosol	4,6	225, 277	2,99 ± 0,17	3,00 ± 0,54
Ac. vanillique	5,6	261, 292	1,83 ± 0,12	1,27 ± 0,12
Ac. p-coumarique	8,4	230, 310	2,25 ± 0,16	1,97 ± 0,42
Ac. ferulique	9,2	235, 323	1,95 ± 0,12	1,62 ± 0,22
Lutéoline	12,7	253, 348	4,66 ± 0,25	4,20 ± 0,31
Apigénine	14,7	224, 267, 337	1,64 ± 0,17	1,61 ± 0,14

TR : temps de rétention

Les résultats montrent que la lutéoline et le tyrosol sont les composés identifiés majoritaires dans l'huile d'olive et cela dans les deux types d'huile. Très peu de différence de composition entre les deux types d'huile a été observée donc le type de broyage ne semble pas influencer la distribution en composés phénoliques. Il est à noter que ces résultats ne sont représentatifs que de certaines familles de composés car d'autres familles telles que celle des composés sécoïridoïdes sont beaucoup plus difficiles à étudier étant donné la très forte diversité des dérivés et l'absence de molécules étalons.

3.3.1.3 Analyse de la composition en acides gras

Dès la première observation du chromatogramme (Figure 36), nous remarquons que l'acide gras majoritaire est l'acide oléique (C18 :1) suivi de l'acide palmitique (C16 :0) et de l'acide linoléique (C18 :2). L'intégration des aires sous les pics permet de déterminer les proportions de chacun de ces acides gras. Les résultats de cette intégration sont présentés dans le tableau 13.

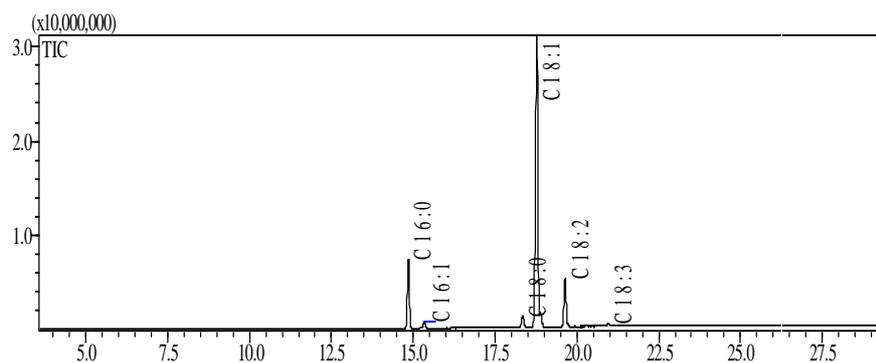


Figure 36 : Chromatogramme de la composition en acides gras de l'huile d'olive déterminée par CPG/FID

Tableau 13 : Composition en acides gras des huiles issues d'un broyage à meule traditionnelle ou d'un broyeur à marteaux

Acide gras	TR (min)	Meule (%)	Marteaux (%)
C14:0	9,73	Traces	Traces
C15:0	10,85	Traces	Traces
C16:0	12,18	11,76 ± 0,37	12,32 ± 0,27
C16:1	12,60	0,88 ± 0,02	1,12 ± 0,26
C17:0	13,68	0,16 ± 0,04	0,12 ± 0,05
C17:1	14,04	0,30 ± 0,09	0,29 ± 0,11
C18:0	15,30	2,59 ± 0,18	2,78 ± 0,08
C18:1	15,75	73,12 ± 0,69	73,28 ± 0,42
C18:2	16,43	9,64 ± 0,06	9,05 ± 0,15
C18:3	17,49	0,56 ± 0,01	0,51 ± 0,06
C19:0	16,89	Traces	Traces
C20:0	18,61	0,46 ± 0,03	0,28 ± 0,07
C20:1	18,99	0,17 ± 0,13	0,07 ± 0,05
C21:0	20,44	Traces	Traces
C22:0	22,60	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,02
C23:0	25,31	Traces	Traces
C24:0	28,74	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01
AGS		15,32 ± 0,13	15,69 ± 0,10
AGMI		74,48 ± 0,23	74,76 ± 0,17
AGPI		10,20 ± 0,04	9,56 ± 0,07
C18:1/C18:2		7,59	8,10
ω6/ω3		16,5	17,7

Le procédé de trituration n'influence pas grandement la composition en acide gras des huiles. Deux explications à cela : tout d'abord le fait que les lipovacuoles des drupes d'olive ne peuvent pas libérer préférentiellement un acide gras plutôt qu'un autre en fonction du procédé de trituration, mais elles libèrent l'ensemble de leur contenu. Ensuite la forte teneur des huiles en composés minoritaires protège les acides gras de l'oxydation ou de la dégradation. Les acides gras majoritaires sont l'acide oléique, palmitique, linoléique et stéarique comme repérés sur la figure 36. Un bon rapport entre acide oléique et acide linoléique a également été trouvé (rapport recommandé supérieur à 7) or ce rapport a déjà été corrélé à une longue durée de vie de l'huile d'olive (Rotondi, 2004). Des rapports similaires ont également été trouvés dans une autre publication sur l'huile d'olive de la même région de France (Ollivier, 2006).

3.3.1.4 Analyse des composés volatiles

Le tableau 14 résume les résultats obtenus par analyse en HS-SPME/CG/SM (figure 37). Les principales familles de composés identifiés sont des alcools et des aldéhydes principalement à 5 et 6 atomes de carbone. En effet, les composés majoritaires sont l'hexenal et l'hexanal qui développent les arômes de « vert » ou « d'herbe fraîchement coupée » et de « sucré » dans l'huile (Kalua, 2007; Morales 1997). Les composés à 6 atomes de carbone représentent environ 70 % de la fraction volatile totale et ils sont issus de la dégradation des acides gras poly-insaturés par des lyxogénases. Les aldéhydes et les alcools à 5 atomes de carbone contribuent aussi de façon positive à l'arôme de l'huile en apportant une sensation de « fruité ». A l'inverse, les cétones à 5 atomes de carbone (particulièrement le penten-3-one) apportent une sensation de piquant et sont aussi corrélés à l'amertume de l'huile (Angerosa, 2000b). La petite quantité d'esters présents dans l'huile peut aussi avoir un impact positif au niveau sensoriel car ils apportent généralement une sensation de fruité (Kalua, 2007).

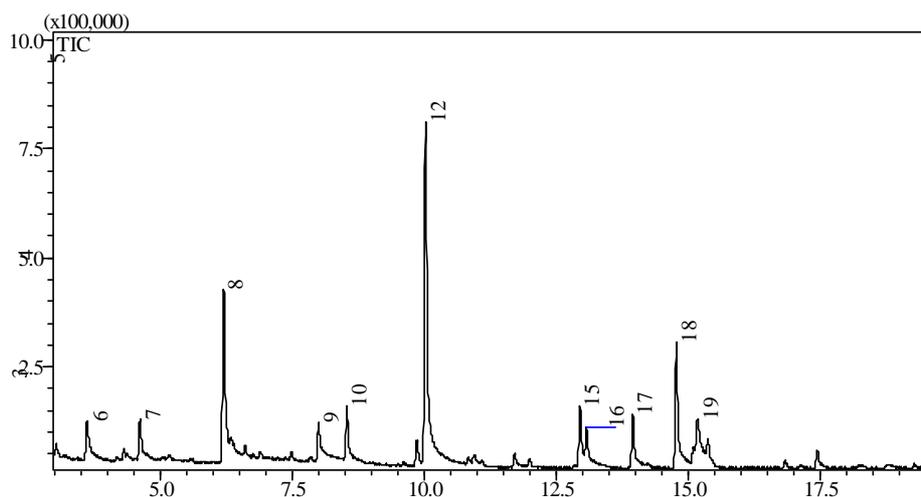


Figure 37 : Chromatogramme de CPG/SM représentant les composés de la fraction volatile d'une huile d'olive. Les pics majoritaires sont : ⁽⁶⁾ 3-pentanone ; ⁽⁷⁾ 1-penten-3-one ; ⁽⁸⁾ hexanal ; ⁽⁹⁾ (*Z*)-3-hexenal ; ⁽¹⁰⁾ 1-penten-3-ol ; ⁽¹²⁾ (*E*)-2-hexenal ; ⁽¹⁵⁾ (*E*)-3-hexenyl acetate ; ⁽¹⁶⁾ (*E*)-2-pentenol ; ⁽¹⁷⁾ hexanol ; ⁽¹⁸⁾ (*Z*)-hex-3-en-1-ol ; ⁽¹⁹⁾ (*E*)-2-hexen-1-ol

Tableau 14 : Composition de la fraction volatile de l'huile d'olive déterminée par CPG/SM

N° pic	Composés volatiles	IR échantillon	IR étalon	IR bibliographie	Meule (%)	Système à marteaux (%)
6	3-pentanone	975		980 ^a	3,1 ± 0,01	5,1 ± 0,30
7	1-penten-3-one	1012	1012		1,7 ± 0,08	3,9 ± 0,05
8	Hexanal	1069	1073		15,8 ± 0,99	11,1 ± 0,39
9	(<i>Z</i>)-3-hexenal	1134		1132 ^b	2,0 ± 0,41	2,1 ± 0,14
10	1-penten-3-ol	1153	1154		3,4 ± 0,38	4,5 ± 0,28
12	(<i>E</i>)-2-hexenal	1208	1209		31,5 ± 0,80	25,1 ± 1,51
15	(<i>E</i>)-3-hexenyl acetate	1313		1308 ^b	4,8 ± 0,22	4,2 ± 0,05
16	(<i>E</i>)-2-pentenol	1317		1335 ^a	2,9 ± 0,25	3,2 ± 0,03
17	hexanol,	1348		1351 ^b	3,6 ± 0,06	3,9 ± 0,02
18	(<i>Z</i>)-hex-3-en-1-ol,	1378	1378		9,2 ± 0,08	9,3 ± 0,98
19	(<i>E</i>)-2-hexen-1-ol	1400		1400 ^b	2,3 ± 0,36	1,9 ± 0,06

IR échantillon: Indice de rétention du composé dans l'échantillon

IR étalon: Indice de rétention du composé étalon

IR bibliographie: Indice de rétention trouvé dans la bibliographie

^a : Ruther, 2000

^b : Bianchi., 2007

3.3.1.5 Analyse en microscopie électronique à balayage (MEB)

Des fragments d'olive prélevés aux différentes étapes des deux procédés de fabrication de l'huile d'olive (broyage et malaxage) ont été observés par MEB (Figure 38) afin de voir l'impact des procédés de trituration à l'échelle cellulaire. Les critères les plus importants étaient la structure intercellulaire des olives et la présence ou non de gouttelettes d'huile d'olive. Comme le montrent les figures 38a et 38b, la structure intercellulaire de la chair de l'olive a été conservée après le broyage par les marteaux. Ceux-ci ont seulement coupé et ouvert le fruit mais n'ont pas détruit la structure intercellulaire (l'organisation cellulaire est toujours facilement visible). Au milieu de la figure 38a on peut observer des gouttelettes d'huile prêtes à être libérées de la matrice cellulaire. Une fois libérées, les gouttelettes ont une apparence sphérique en MEB.

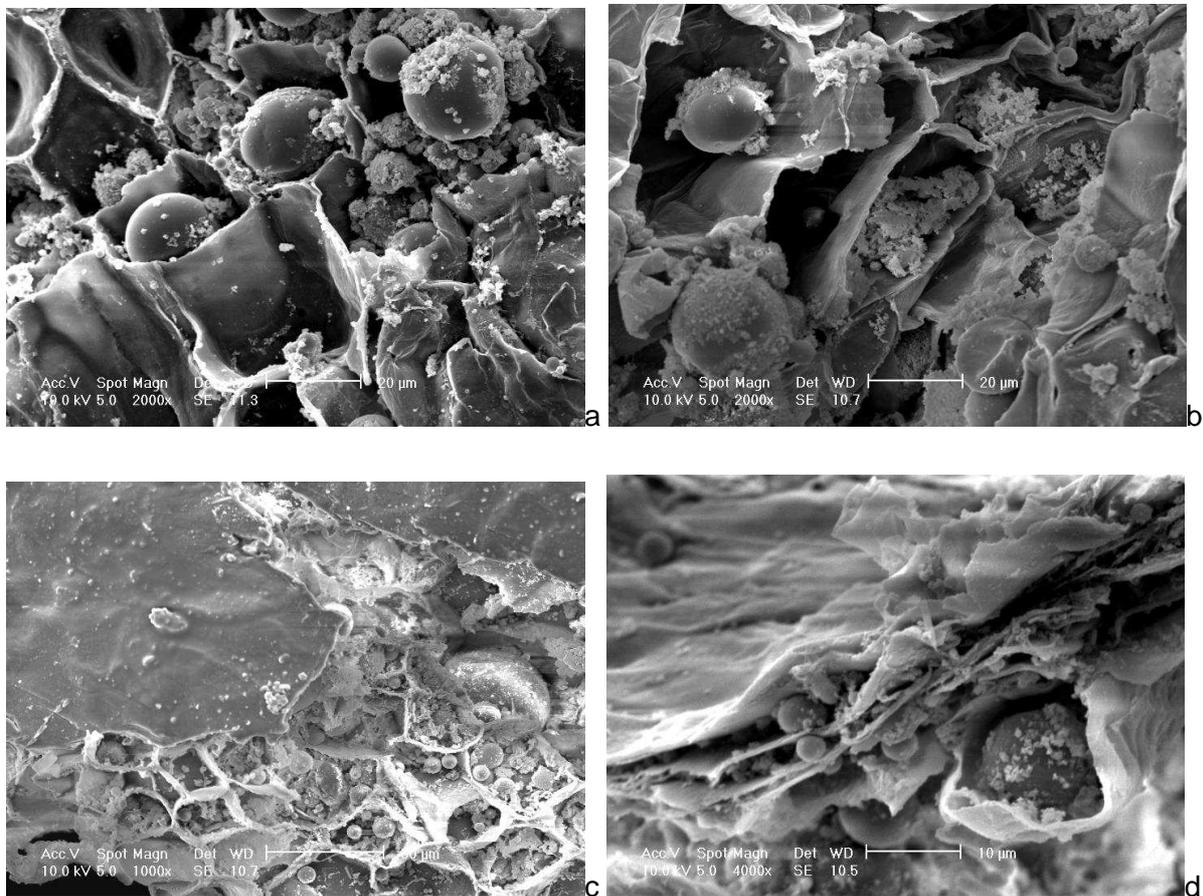


Figure 38 : Photographies de microscopie électronique à balayage à 10 kV: (a) et (b) après broyage à marteaux, (c) et (d) après broyage à meule.

Au contraire de ce qui a été observé pour le broyage à marteaux, la roue de granit détruit les structures intercellulaires comme le montrent les figures 38c et 38d. Sur ces images, nous voyons que les différentes couches de cellules ont subi une compression et il est facile de comprendre qu'une partie des gouttelettes d'huile d'olive peut être retenue à l'intérieur de cet empilement de couches cellulaires, ce qui pourrait expliquer les plus faibles rendements obtenus par ce type de procédé.

Cette étude montre que le type de broyage utilisé peut influencer ce qui se passe au niveau cellulaire : les meilleurs rendements habituellement observés après le broyage aux marteaux peuvent être expliqués à la fois par des meilleures coupes des cellules et aussi par la rétention des gouttelettes d'huile d'olive entre les couches cellulaires lors d'un broyage à la meule de granit.

3.3.2 Etude du procédé de séparation liquide-liquide

Des dosages sur les huiles issues de la centrifugation et de la décantation ont été faits au cours des trois années. L'année de référence pour les résultats sera la campagne 2009/2010 car c'est celle qui comporte le plus d'informations, puis les résultats de cette campagne seront comparés aux résultats des autres campagnes afin de dégager de réelles tendances sur 3 années.

Les résultats concernant l'influence du procédé de séparation eau/huile ne peuvent être que comparés deux à deux. En effet, les procédés de trituration et de séparation des phases liquides et solides sont différents (meule suivie de presse hydraulique contre marteaux suivis de centrifugeuse horizontale) et peuvent donc avoir un impact sur la composition de l'huile d'olive (voir 3.3.1). Nous pourrions donc comparer ici les huiles obtenues par décantation et centrifugation suite au broyage à la meule traditionnelle d'une part et les huiles obtenues par décantation et centrifugation suite au broyage à marteaux d'autre part.

3.3.2.1 Caractéristiques physicochimiques

Quel que soit le procédé utilisé, les huiles sont très peu oxydées puisque l'acidité libre et la valeur peroxyde sont très inférieures aux valeurs limites correspondant à l'appellation « huile d'olive vierge extra » (Tableau 15). Cependant quelques disparités

peuvent être observées au niveau du dosage en peroxydes. En effet, dans les deux types de procédés (traditionnel et continu), les valeurs peroxydes sont légèrement plus élevées après centrifugation de l'huile par rapport aux huiles obtenues par décantation. Cela signifie que l'activité oxydative est légèrement plus développée dans ce type d'huile et peut entraîner une réduction de la durée de vie des huiles centrifugées.

Tableau 15 : Paramètre physicochimiques des huiles d'olive en fonction du procédé de séparation huile/eau

Paramètres	Meule traditionnelle		Système à marteaux	
	Décantation	Centrifugation	Décantation	Centrifugation
Acidité libre (% acide oléique)	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Valeur peroxyde (meq O ₂ /kg)	2,82 ± 0,18	3,25 ± 0,10	3,76 ± 0,12	4,35 ± 0,25
Polyphénols totaux (mg GAE/kg)	423 ± 23	321 ± 17	570 ± 19	445 ± 19

La même observation peut être faite pour la teneur totale en composés phénoliques. Une augmentation de 32 % de cette teneur a été observée pour l'huile issue de la décantation suite à un procédé de trituration traditionnel (423 ± 23 contre 321 ± 17 mg GAE/kg) et une augmentation de 28 % a été observée sur l'huile obtenue par système en continu (570 ± 19 contre 445 ± 19 mg GAE/kg). Ces différences sont statistiquement significatives et montrent que la décantation permet une meilleure rétention des composés phénoliques dans l'huile. Ceux-ci sont plus ou moins polaires en fonction de la taille de la molécule, du nombre de groupements hydroxyles et de la présence de glucosides ce qui fait que la majeure partie des composés phénoliques est éliminée dans les margines. Lors de la centrifugation des huiles, l'équilibre de partage entre l'huile et l'eau est encore déplacé, favorisant ainsi le passage des molécules ayant la partie hydrophile la plus importante vers la phase aqueuse. Cela induit de plus faibles proportions de composés phénoliques dans les huiles obtenues par centrifugation.

Ce plus faible taux de composés phénoliques a des conséquences multiples sur l'huile et sa stabilité car les acides gras sont moins bien protégés vu que la quantité d'antioxydants est moins importante. Cela a pour conséquence d'accélérer légèrement la vitesse de dégradation de l'huile et de favoriser la formation de radicaux peroxydes. Ce type d'huile pourra donc se conserver moins longtemps qu'une huile obtenue par simple décantation.

3.3.2.2 Dosage des tocophérols

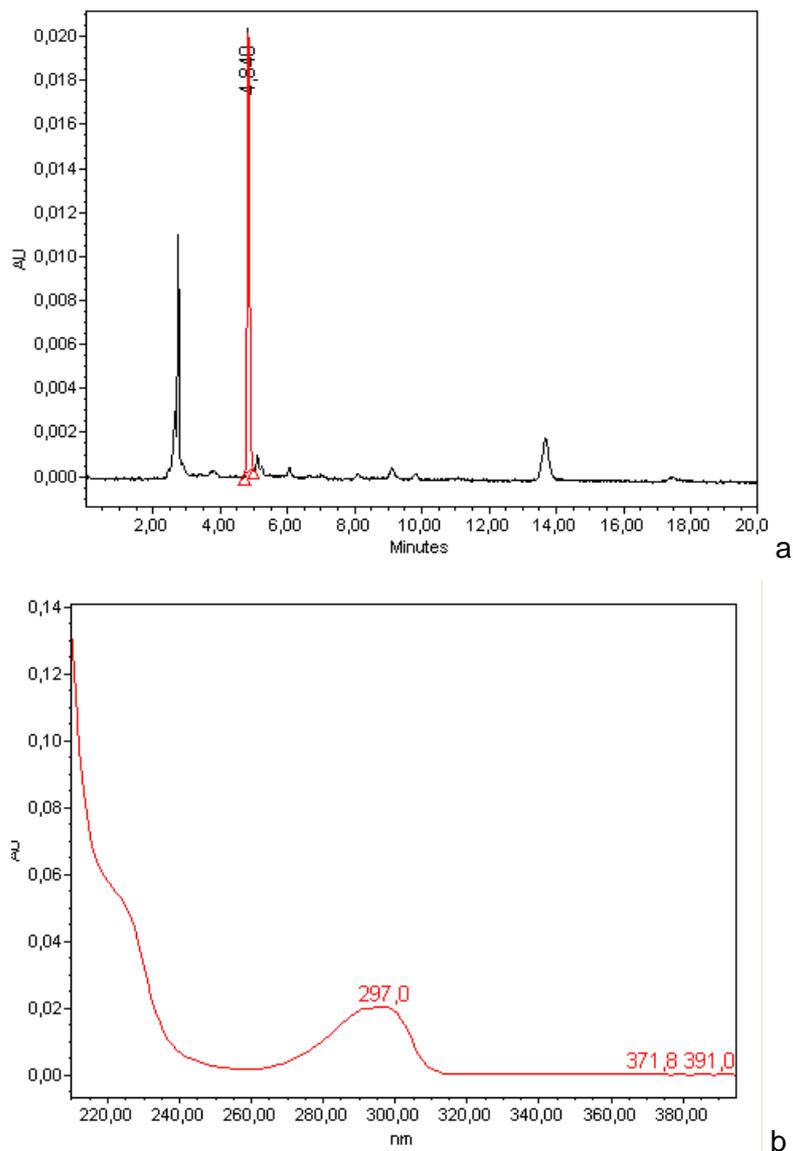


Figure 39 : Dosage des tocophérols : chromatogramme (a) et spectre d'absorption correspondant au pic identifié (b)

Les tocophérols protègent les composés phénoliques de l'oxydation et ont donc un rôle très important dans les huiles d'olive. Ils ont ici été détectés et quantifiés par CLHP (Figure 39). Contrairement aux composés phénoliques, les tocophérols ne se retrouvent que dans la phase lipophile ce qui les rend moins sensibles au phénomène de centrifugation (Tableau 16). Des valeurs légèrement supérieures ont cependant été retrouvées dans les huiles issues de la décantation. Les tocophérols étant les premiers antioxydants à réagir, la très légère diminution de leur contenu dans les huiles obtenues par centrifugation pourrait signifier que certains tocophérols ont déjà été consommés pour protéger l'huile de l'oxydation. Cette plus faible concentration en tocophérols pourrait également réduire le temps de conservation de ces huiles, cependant la différence n'est pas significative donc elle ne devrait pas jouer un rôle majeur.

Tableau 16 : Concentration en tocophérols en fonction du procédé de séparation des phases liquides

	Meule traditionnelle		Système à marteaux	
	Décantation	Centrifugation	Décantation	Centrifugation
α -tocophérols (mg/kg)	179 \pm 18	148 \pm 17	214 \pm 12	192 \pm 24

3.3.2.3 Analyse des polyphénols

Tableau 17 : Composition phénolique des huiles en fonction du système de séparation eau/huile

Composé	Meule traditionnelle (mg/L)		Système à marteaux (mg/L)	
	Décantation	Centrifugation	Décantation	Centrifugation
Ac. Gallique	0,16 \pm 0,07	0,24 \pm 0,07	0,16 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02
Tyrosol	2,02 \pm 0,14	2,11 \pm 0,25	1,48 \pm 0,04	1,40 \pm 0,21
Ac. Vanillique	0,69 \pm 0,04	0,42 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01
Ac. p-coumarique	1,59 \pm 0,01	1,18 \pm 0,14	1,56 \pm 0,05	1,02 \pm 0,04
Ac. Ferulique	0,58 \pm 0,08	0,22 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01
Lutéoline	2,17 \pm 0,32	1,43 \pm 0,10	4,09 \pm 0,11	3,47 \pm 0,13
Apigénin	1,52 \pm 0,07	1,16 \pm 0,09	1,74 \pm 0,07	1,66 \pm 0,11

Le tableau 17 met en évidence que les concentrations des différents composés phénoliques sont généralement plus élevées dans les huiles obtenues par simple décantation, ce qui confirme le résultat obtenu en 3.3.2.1. Les principales différences observées entre les deux types d'huile sont au niveau de l'acide p-coumarique et des flavonoïdes. Ces derniers sont les composés identifiés ayant la masse moléculaire la plus importante ce qui les rend plus sensibles au phénomène de centrifugation que les composés de taille inférieure.

3.3.2.4 Analyse de la composition en acides gras

Une nouvelle fois, très peu de différences de composition en acides gras peuvent être observées en fonction de l'un ou l'autre des procédés de séparation des phases liquides (Tableau 18). Les rapports $\omega6/\omega3$ sont proches de 12 ce qui correspond aux valeurs trouvées par de précédentes études (Ollivier, 2006).

Tableau 18 : Composition en acides gras en fonction du procédé de séparation eau/huile

Acide gras	Meule traditionnelle (%)		Système à marteaux (%)	
	Décantation	Centrifugation	Décantation	Centrifugation
C16:0	13,94 ± 0,22	14,11 ± 0,37	13,76 ± 0,10	14,30 ± 0,34
C16:1	1,34 ± 0,02	1,35 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,38 ± 0,04
C18:0	2,42 ± 0,11	2,27 ± 0,12	2,27 ± 0,03	2,46 ± 0,20
C18:1	74,28 ± 0,45	74,06 ± 0,84	73,22 ± 0,39	72,47 ± 1,30
C18:2	6,98 ± 0,28	7,33 ± 0,06	7,98 ± 0,05	8,35 ± 0,33
C18:3	0,60 ± 0,01	0,58 ± 0,04	0,70 ± 0,10	0,64 ± 0,01
C20:0	0,35 ± 0,02	0,23 ± 0,20	0,54 ± 0,29	0,35 ± 0,01
AGS	16,71	16,61	16,57	17,11
AGMI	75,62	75,41	74,58	73,85
AGPI	7,58	7,91	8,68	8,99
$\omega6/\omega3$	11,6	12,6	11,4	13,0

3.3.2.5 Analyse des arômes de l'huile d'olive

Les résultats concernant le profil aromatique des huiles donnent un peu plus d'informations sur l'influence des procédés (Tableau 19). En effet les huiles obtenues par centrifugation possèdent plus d'alcools avec une chaîne de 6 carbones (hexanol et hexenal). A l'inverse les huiles obtenues par simple décantation sont plus riches en composés à 5 atomes de carbone (1-penten-3-one et 1-penten-3-ol). Le 1-penten-3-one ayant été positivement corrélé au piquant et à l'amertume de l'huile (Angerosa, 2000), les huiles obtenues par centrifugation pourraient donc être plus douces que celles obtenues par décantation. Le tableau 19 nous montre également que la concentration de 1-penten-3-one est plus influencée par l'ensemble des étapes en amont que par l'étape de séparation des phases liquides (2 % de la fraction volatile pour les huiles issues du procédé traditionnel contre 18 % pour les huiles obtenues par procédé continu). Ces différences peuvent être dues soit au procédé de trituration, au malaxage ou au mode de séparation solide/liquide ou à la combinaison de ceux-ci sans que cette étude permette de le déterminer.

Tableau 19 : Composition de l'espace de tête des huiles en fonction de leur procédé de fabrication

Composé	Meule (%)			Marteaux (%)	
	TR	Décantation	Centrifugation	Décantation	Centrifugation
3-pentanone	7.044	4,34 ± 0,17	6,23 ± 0,45	4,22 ± 0,70	4,22 ± 1,01
1-penten-3-one	8.507	2,73 ± 2,22	1,10 ± 0,03	20,50 ± 0,08	15,49 ± 1,70
1-propanol	8.901	2,33 ± 0,56	2,29 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,57 ± 0,07
Hexanal	10.626	3,47 ± 0,05	2,83 ± 0,48	3,38 ± 0,49	4,03 ± 0,66
Isobutanol	11.128	4,62 ± 0,68	4,69 ± 0,41	0,45 ± 0,12	0,61 ± 0,13
1-penten-3-ol	13.567	3,79 ± 0,21	2,82 ± 0,23	5,98 ± 0,20	4,70 ± 0,30
3-methylbutan-1-ol	15.496	12,29 ± 0,42	16,58 ± 1,54	1,47 ± 0,21	1,60 ± 0,19
2-hexenal	15.809	37,01 ± 2,05	25,73 ± 0,50	37,82 ± 0,60	40,39 ± 2,21
2-penten-1-ol	19.556	4,76 ± 0,70	4,31 ± 0,17	8,09 ± 0,15	8,29 ± 0,34
Hexanol	20.714	4,26 ± 0,31	8,10 ± 0,35	1,20 ± 0,01	1,71 ± 0,08
3-hexen-1-ol	21.889	6,37 ± 0,20	9,09 ± 0,52	4,11 ± 0,09	4,55 ± 0,24
2-hexen-1-ol	22.661	5,11 ± 0,32	8,95 ± 0,44	2,46 ± 0,09	2,79 ± 0,16
2,4, hexadienal	22.960	2,84 ± 0,34	1,68 ± 0,06	4,33 ± 0,03	4,63 ± 0,20

TR : temps de rétention

3.3.2.6 Le système de « vase florentin »

D'une manière générale les huiles d'olive obtenues par décantation gravitationnelle possèdent des indicateurs de qualité et de stabilité de l'huile supérieurs aux huiles obtenues par centrifugation. Ces observations ont pu être réalisées sur les 3 campagnes successives puisque sur la campagne 2007/2008 nous avons observé une augmentation de près de 70 % de la teneur en composés phénoliques après décantation et une augmentation de plus de 26 % a été observée durant la campagne 2008/2009.

La décantation des huiles pourrait donc s'imposer comme un réel atout pour l'amélioration de la qualité nutritionnelle des huiles dans les moulins, cependant ce procédé n'est pas toujours applicable à échelle industrielle, notamment pour ceux utilisant des systèmes métalliques, car la fabrication de l'huile prendrait beaucoup plus de temps, ce qui pose de nombreux problèmes :

- le premier est la nécessité de disposer d'énormes volumes de décantation
- le second serait qu'en augmentant le temps de contact entre l'huile et l'eau la quantité de composés phénoliques à migrer vers la phase aqueuse serait plus importante ce qui annulerait le bénéfice de la décantation
- même en augmentant les temps de séparation, une fraction resterait sous forme émulsionnée ce qui abaisserait les rendements en huile
- les risques de contamination microbienne sont augmentés
- enfin l'intérêt majeur des systèmes à marteaux est l'automatisation des systèmes de production, or la décantation gravitationnelle ne rentre pas dans ce type de production.

Au cours de la campagne 2009/2010, un système de vase florentin a été placé juste après la presse hydraulique. L'objectif de ce travail était le développement d'une nouvelle technique de séparation de l'eau et de l'huile dans les moulins. Les essais menés au cours de cette campagne ont permis de voir que le vase florentin permet de retirer très rapidement de grandes quantités de margines, cependant il est difficile d'obtenir de l'huile limpide dès la sortie du vase florentin. Ces premières observations sont néanmoins positives et avec quelques améliorations ce système pourrait être performant (régulation du débit d'entrée du mélange eau/huile dans le vase, optimisation de l'équilibre entre hauteur de sortie d'huile et de sortie des margines, optimisation du volume de la cuve...).

3.3.3 Comparaison entre les deux chaînes de production en continu : système trois phases *versus* deux phases

La principale différence de procédé entre ces deux systèmes de fabrication de l'huile d'olive se situe donc au niveau de la séparation entre la phase solide et la phase liquide. Dans le procédé à trois phases, l'huile est séparée des grignons par centrifugation horizontale, mais beaucoup d'eau se retrouve dans les deux fractions. Cela est dû au fort apport d'eau ajoutée pour faciliter l'action de la centrifugeuse et l'extraction de l'huile. Il en ressort de grandes quantités de grignons très humides et un mélange huile/eau qu'il faut séparer par centrifugation. Le procédé à deux phases correspond à une optimisation du système à trois phases : le principe reste le même sauf que très peu d'eau (ou pas d'eau) est ajouté au système. Les volumes de grignons sont donc beaucoup moins importants et beaucoup plus épais. En optimisant la vitesse de rotation de la centrifugeuse et le point de prélèvement à l'intérieur de celle-ci on obtient directement l'huile d'olive, sans avoir recours à une étape de centrifugation verticale. Dans les deux cas de notre étude, les olives issues d'un même lot ont été lavées, effeuillées, broyées par un système à marteaux puis la pâte a été malaxée avant la séparation des différentes phases.

3.3.3.1 Données physicochimiques

Les premières analyses réalisées étaient une nouvelle fois le dosage de l'acidité libre, de la valeur peroxyde et la détermination de la teneur totale en composés phénoliques (Tableau 20).

Tableau 20 : Caractéristiques physicochimiques des huiles obtenues par un système à deux ou trois phases

Paramètre	Centrifugeuse trois phases	Centrifugeuse deux phases
Acidité libre (% acide oléique)	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Valeur peroxyde (meq O ₂ /kg)	4,35 ± 0,25	3,32 ± 0,28
Polyphénols totaux (mg GAE/kg)	445 ± 19	691 ± 24

Les valeurs d'acidité libre et de peroxydes sont faibles et les deux types d'huile peuvent porter l'appellation « huile d'olive vierge extra » vis-à-vis de ces critères. L'acidité libre est légèrement supérieure dans les huiles issues du système à deux phases, mais cette différence n'est pas significative, contrairement aux valeurs suivantes.

Tout d'abord la valeur peroxyde est de plus de 30 % supérieure dans l'huile issue du système à trois phases (significativement différent, $p < 0.01$). Dans les deux cas nous avons des systèmes continus et pratiquement clos, mais le système à trois phases comporte une étape de procédé de plus que le système à deux phases, ce qui augmente le temps de contact entre les margines et l'huile d'olive et qui pourrait expliquer une valeur peroxyde légèrement plus élevée.

Le second paramètre significatif dans le tableau 20 est la teneur totale en composés phénoliques. En effet, dans cette étude, l'huile issue du procédé à deux phases comporte environ 55 % de composés phénoliques en plus que l'huile obtenue par séparateur à trois phases. Cette forte augmentation de la teneur en composés phénoliques est en accord avec d'autres travaux préalablement réalisés. Ainsi Gimeno en 2002 trouvait une augmentation de près de 70 % par un système à deux phases alors que Salvador en 2003 obtenait près de 15 % de phénols en plus dans une huile issue d'un système à deux phases. Gimeno justifie cet écart par le fait que l'addition d'eau dans le système à trois phases altère l'équilibre de partition des phénols entre les deux phases liquides. La diminution de la concentration de composés phénoliques dans la phase lipidique est due à une dilution de ceux-ci dans la phase aqueuse. L'addition d'eau a donc pour effet de favoriser le retrait des composés phénoliques de la phase lipidique. Ces différences significatives vont permettre une meilleure conservation dans le temps des huiles issues d'un système à deux phases par rapport à celles obtenues par un séparateur à trois phases.

3.3.3.2 Analyse de la teneur en tocophérols

Si le fait d'ajouter de l'eau peut déplacer l'équilibre de partage des composés phénoliques entre l'huile et l'eau, il ne peut pas en être de même avec les tocophérols puisque ceux-ci sont uniquement liposolubles. Il n'est donc pas surprenant de ne pas trouver de différence significative entre les deux types d'huile (Tableau 21). Gimeno (2002) faisait la même observation et arrivait à la même conclusion pour le β -carotène qui est également un composé liposoluble.

Tableau 21 : Dosage des tocophérols en fonction du type de séparateur utilisé

	Centrifugeuse trois phases	Centrifugeuse deux phases
α -tocophérols (mg/kg)	192 \pm 24	174 \pm 12

Nous pouvons remarquer dans le tableau 22 que tous les composés phénoliques sont présents en plus grande quantité dans l'huile issue du système à deux phases. Cette observation vient confirmer le dosage des polyphénols totaux (3.3.3.1). Nous remarquons que ce sont surtout les concentrations en acides phénoliques et en petits composés phénoliques qui sont influencées par le type de séparateur. Les flavonoïdes sont également positivement influencés par le système à deux phases, mais dans une plus faible proportion. La polarité des acides phénoliques étant plus élevée que celle des flavonoïdes, leur partition entre la phase aqueuse et la phase lipophile se retrouve plus affectée par l'ajout d'eau dans le système à trois phases. Ces petits composés polaires sont lavés de l'huile et dilués dans les grignons humides et les margines.

Tableau 22 : Composition phénolique des huiles d'olive en fonction du type de centrifugeuse utilisé

Composé	Centrifugeuse trois phases (mg/L)	Centrifugeuse deux phases (mg/L)
Ac. Gallique	0,12 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01
Tyrosol	1,40 \pm 0,21	3,13 \pm 0,21
Ac. Vanillique	0,19 \pm 0,01	0,54 \pm 0,01
Ac. p-coumarique	1,02 \pm 0,04	3,02 \pm 0,05
Ac. Ferulique	0,18 \pm 0,01	0,32 \pm 0,09
Lutéoline	3,47 \pm 0,13	5,17 \pm 0,68
Apigénin	1,66 \pm 0,11	2,03 \pm 0,12

3.3.3.3 Analyse de la composition en acides gras

La composition des huiles en acides gras n'est pas influencée par le type de séparateur utilisé (Tableau 23). Dans les deux cas nous retrouvons environ 73 % d'acide oléique, 14 % d'acide palmitique et 8 % d'acide linoléique. Ces concentrations correspondent aux valeurs trouvées précédemment (Ollivier, 2006).

Tableau 23 : Composition des huiles en acides gras en fonction du type de séparateur utilisé

Acide gras	Système trois phases (%)	Système deux phases (%)
C16:0	14,30 ± 0,34	13,99 ± 0,14
C16:1	1,38 ± 0,04	1,56 ± 0,02
C18:0	2,46 ± 0,20	2,43 ± 0,17
C18:1	72,47 ± 1,30	73,62 ± 0,61
C18:2	8,35 ± 0,33	7,33 ± 0,06
C18:3	0,64 ± 0,01	0,62 ± 0,16
C20:0	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,01
AGS	17,11	16,78
AGMI	73,85	75,18
AGPI	8,99	7,95
ω6/ω3	13,0	11,8

3.3.3.4 Analyse des arômes de l'huile d'olive

Tableau 24 : Composition de la fraction volatile des huiles en fonction du type de séparateur utilisé

Composé	TR	Système 3 phases (%)	Système 2 phases (%)
3-pentanone	7.044	4,22 ± 1,01	2,41 ± 0,27
1-penten-3-one	8.507	15,49 ± 1,70	18,20 ± 0,68
1-propanol	8.901	0,57 ± 0,07	0,47 ± 0,01
Hexanal	10.626	4,03 ± 0,66	5,08 ± 0,64
Isobutanol	11.128	0,61 ± 0,13	0,40 ± 0,03
1-penten-3-ol	13.567	4,70 ± 0,30	8,29 ± 0,07
3-methylbutan-1-ol	15.496	1,60 ± 0,19	1,73 ± 1,56
2-hexenal	15.809	40,39 ± 2,21	34,13 ± 0,54
2-penten-1-ol	19.556	8,29 ± 0,34	5,72 ± 0,21
Hexanol	20.714	1,71 ± 0,08	0,56 ± 0,07
3-hexen-1-ol	21.889	4,55 ± 0,24	2,93 ± 0,03
2-hexen-1-ol	22.661	2,79 ± 0,16	5,16 ± 0,16
2,4, hexadienal	22.960	4,63 ± 0,20	11,30 ± 0,22

TR : Temps de rétention

Le tableau 24 montre que les composés majoritaires dans les fractions volatiles des deux huiles sont le 2-hexenal et le 1-penten-3-one. La concentration de ce dernier est d'ailleurs relativement élevée ce qui pourrait entraîner une forte amertume et une sensation de piquant intense pour les deux huiles. Le 2-hexenal qui est le composé majoritaire dans les deux huiles est quant à lui associé aux sensations de « vert » ou d' « herbe fraîchement coupée » (Morales, 1997).

3.4 Conclusions sur l'enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive dans les moulins

Comme expliqué précédemment dans ce rapport, la présence ou l'absence d'eau dans un procédé est le principal facteur responsable de la teneur finale de l'huile d'olive en composés phénoliques et donc de sa qualité nutritionnelle. Cependant le fait de chercher à éliminer rapidement l'eau par centrifugation peut également présenter des inconvénients puisque cela provoque un déplacement de l'équilibre de partition des composés phénoliques entre la phase aqueuse et la phase lipidique. Une partie des composés phénoliques est ainsi retirée de l'huile et dilués dans l'eau ajoutée au système de production.

Le second facteur influençant fortement la teneur finale en composés phénoliques est le mode de broyage des olives. En effet, cette étude met en évidence que les systèmes de broyeurs à marteaux sont plus performants que les meules traditionnelles pour ce qui est d'extraire les composés phénoliques. Cela peut venir du fait que les procédés utilisés pour l'extraction de l'huile sont radicalement différents.

- Dans le cas des meules de granit, le poids de la roue va écraser les olives et donc déformer la structure cellulaire et sortir une partie de l'huile de cet amas cellulaire par exsudation. La rotation de ces roues de granit va également provoquer un déchirement de la structure cellulaire qui va également permettre la libération d'une certaine quantité d'huile. Outre le fait de libérer de plus faibles quantités de composés phénoliques, cette technique d'écrasement et de déchirement provoque la rétention d'une partie de l'huile d'olive dans les amas cellulaires, ce qui explique les rendements généralement plus faibles observés par ce type de procédé.

- Dans les systèmes à marteaux, la vitesse de rotation des bras métalliques et leurs arrêtes vives vont éclater les olives. Nous retrouvons ainsi des fragments de plus petite taille et des coupes franches au niveau de la structure cellulaire. Cela facilite la libération de l'huile d'olive et induit de meilleurs rendements de production. Le broyage plus fin de la chair des olives augmente également la libération des composés phénoliques de la structure cellulaire et donc leur présence dans l'huile.

Ces deux premières observations posaient un problème technologique puisque les moulins étaient équipés soit d'un système de broyage à meules traditionnelles qui pouvait permettre une décantation gravitationnelle en fin de procédé, soit d'un système de broyeurs à marteaux mais suivi d'un séparateur à trois phases et d'une centrifugeuse verticale. Dans le premier système le facteur limitant pour l'optimisation de la teneur en composés phénoliques était le broyage, dans le second c'était la centrifugation finale. Le dernier système développé à grande échelle met en jeu un nouveau type de séparateur à deux phases. De plus en plus de moulins s'équipent avec ce type de centrifugeuse pour diverses raisons :

- tout d'abord parce que l'encombrement est limité donc le moulinier n'a pas besoin de beaucoup d'espace pour utiliser ce type d'appareil
- un système à deux phases possède l'avantage de supprimer une des étapes du procédé (la centrifugation verticale), ce qui réduit l'achat de matériel et donc d'autant le risque de problèmes liés à une panne éventuelle de ces machines
- ce système utilise moins d'eau, ce qui a deux conséquences : moindre coût de fonctionnement et réduction des volumes de coproduits (grignons et margines)

Le principal frein au développement de ce système à plus grande échelle se situe au niveau de la productivité de la technique par rapport aux systèmes à trois phases. En effet, le séparateur tournant moins rapidement dans le système à deux phases, la séparation met plus de temps à se réaliser et le débit horaire d'olives traitées se retrouve réduit. L'autre frein peut être la difficulté de réglage de l'appareil afin de conserver de bons rendements sans avoir des margines dans l'huile.

Cette étude vient compléter celle de Gimeno (2002) qui avait trouvé que le système de séparation à deux phases induisait une meilleure qualité nutritionnelle de l'huile d'olive

par rapport au système à trois phases. Les volumes d'eau réduits pour le fonctionnement de l'appareil permettent en effet une meilleure rétention des composés phénoliques dans la phase lipidique. Ce phénomène ne peut être observé que sur les composés phénoliques car ce sont ceux qui peuvent le plus facilement se retrouver dans la phase aqueuse. Les autres antioxydants tels que l' α -tocophérol et le β -carotène étant des composés très lipophiles, ils ne sont pas influencés par l'addition ou non d'eau, donc le système à deux phases n'apporte pas d'avancée sur ces molécules. Cette étude montre également que les différents procédés n'influencent pas la composition des huiles en acides gras ni leur acidité libre.

Chapitre 4 : Enrichissement exogène de l'huile d'olive par ultrasons

Les techniques conventionnelles d'extraction ou d'isolation de composés chimiques de matrices végétales présentent souvent des contraintes telles que celles des faibles rendements, des temps d'extraction très longs, l'utilisation de grandes quantités de solvants. Ces dernières années de nombreuses techniques alternatives ayant pour but de pallier à ces problèmes se sont développées. Parmi elles émergent les micro-ondes, les fluides supercritiques ou les ultrasons. Les contraintes écologiques et l'émergence de la sécurité alimentaire et industrielle, incitent les professionnels à découvrir de nouvelles applications aux technologies innovantes. Toutes visent une performance accrue et un meilleur respect de l'environnement.

Les ultrasons de puissance sont maintenant bien connus pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps de procédés industriels. En effet la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations de rendement, notamment en ce qui concerne l'extraction solide-liquide. Au cours de ces travaux de thèse, des recherches sur le principe de fonctionnement des ultrasons ainsi que sur les applications dans les technologies d'extraction m'ont permis la rédaction d'un chapitre de livre « ultrasound assisted extraction of aromas and antioxidants » (Veillet, 2009c).

La production oléicole française a tendance à augmenter légèrement suite à l'arrivée de jeunes oliviers à maturation pour la production d'olives. Ainsi un nouveau record de production d'huile a été battu en France lors de la campagne 2008/2009. Si cela semble être un atout pour les producteurs, cela pose également des problèmes d'écoulement des stocks. Ils doivent ainsi trouver de nouveaux débouchés et donc diversifier leurs gammes de produits. C'est ainsi que l'on a vu apparaître de nouveaux produits tels que les huiles aromatisées avec des plantes telles que le thym, le romarin ou le basilic. L'inconvénient de ces aromatisations pratiquées en général par macération est qu'elles sont longues et nécessitent des zones de stockage importantes. Une aromatisation assistée par ultrasons a ici été testée afin de réduire ce temps d'aromatisation et de faciliter sa mise en place pour les professionnels de l'huile d'olive.

Depuis quelques années, de plus en plus d'attention est portée à la protection de l'environnement. En chimie cela passe par l'utilisation raisonnée des solvants et/ou si possible leur remplacement par des solvants de plus faible impact environnemental. Nous avons ainsi pu observer le développement de techniques utilisant des agro-solvants issus du recyclage des coproduits de l'industrie agroalimentaire (*d*-limonène, α -pinène...). Nous avons choisi ici d'utiliser l'huile d'olive comme solvant d'extraction car ses caractéristiques doivent permettre d'extraire des molécules liposolubles (β -carotène, lycopène..). Un plan d'expérience a été réalisé afin de déterminer les conditions optimales d'extraction de β -carotène assistée par ultrasons dans l'huile d'olive à partir de poudre de carotte.

Ces deux études confirment que les ultrasons ont de nombreuses applications potentielles dans le domaine de l'agroalimentaire comme dans le domaine de la nutraceutique. Si de nombreuses études ont déjà été menées sur leurs effets, il reste beaucoup de secteurs à développer car les champs d'application des ultrasons ne sont pas encore pleinement explorés.

4.1 Les ultrasons

4.1.1 Principe et mécanisme de la cavitation ultrasonore

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui sont capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz) (Figure 40). Les ultrasons peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leurs fréquences :

- Ultrasons de diagnostic : ces ultrasons sont aussi appelés ultrasons de basse intensité ou de haute fréquence (2 à 10 MHz). Les ultrasons constituent une méthode non destructive d'évaluation de propriétés physico-chimiques ou mécaniques, de mesures de concentrations, de mesures de niveaux, etc. Les applications sont nombreuses dans le domaine médical comme outil de diagnostic et de contrôle car leur utilisation est simple, efficace et autorise une visualisation en temps réels des organes comme le cœur sans effet ionisant ni destructif.

- Ultrasons de puissance, aussi appelés ultrasons de haute intensité ou de basse fréquence (20 kHz à 100 kHz). Ils sont appliqués à des domaines industriels variés comme le nettoyage des surfaces, la production d'émulsion, l'accélération de réactions chimiques en milieu hétérogène ou l'extraction d'arômes. Contrairement aux ultrasons de diagnostic, ces ultrasons sont capables de générer des bulles de cavitation.

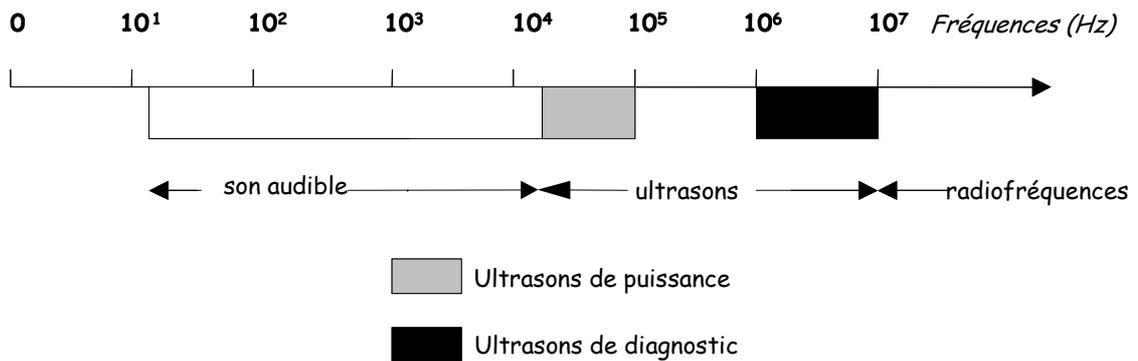


Figure 40 : Domaines d'utilisation des Ultrasons en fonction de la fréquence

Plusieurs effets peuvent être attribués à l'utilisation des ultrasons de puissance tels que le déplacement des molécules de liquide autour de leur point d'équilibre ou les déplacements convectifs appelés vents ultrasonores. Lorsque des ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation de zones de compression et de dépression (Figure 41).

Les séries de compressions et de raréfactions générées lorsque l'onde sonore traverse le milieu créent une pression acoustique (Pa) dans le milieu définie comme suit :

$$P_a = P_A \sin 2\pi f t \quad \text{Equation 4}$$

Avec P_A pour l'amplitude maximale de la pression de l'onde sonore, f la fréquence des ultrasons et t le temps. L'amplitude de la pression de l'onde est directement liée à l'intensité de celle-ci. Cette intensité est définie comme l'énergie transmise par seconde et par mètre carré de liquide et est définie comme suit :

$$I = P_A^2 / 2\rho c \quad \text{Equation 5}$$

Avec ρ pour la densité du milieu et c pour la vitesse du son dans le milieu d'étude.

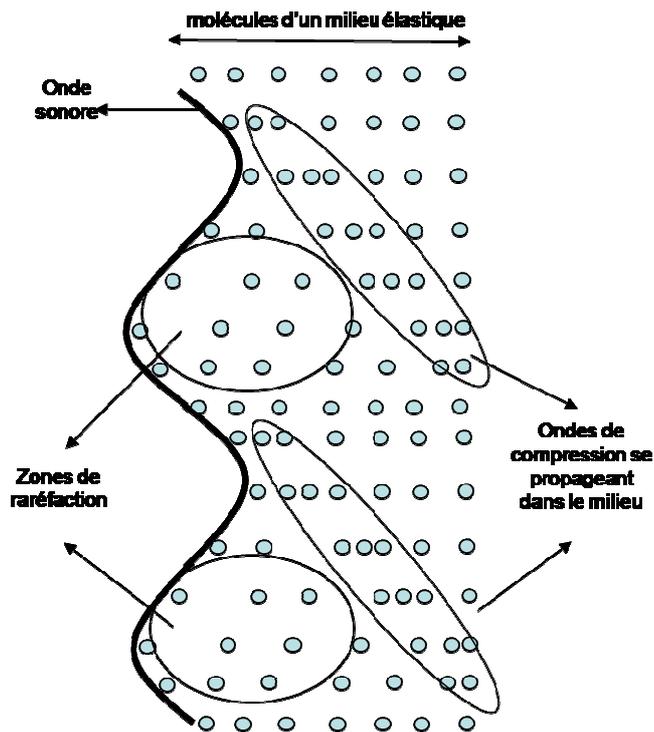


Figure 41 : Propagation de l'onde sonore dans un milieu

La pression acoustique est positive pendant les cycles de compression et négative pendant les cycles de raréfaction. Ces variations de pression entre phases de compression et de raréfaction impliquent des mouvements moléculaires induisant des distensions et des rapprochements entre des groupes de molécules. Lors de cycles de raréfaction la distance d augmente (Figure 42)

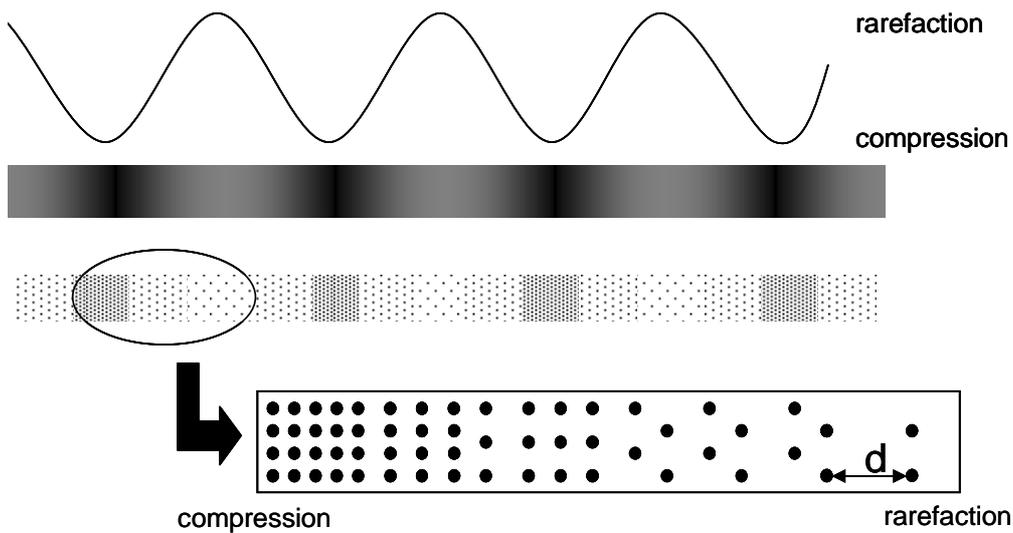


Figure 42 : Cycles de compression et de raréfaction induits par une onde sonore

Chaque milieu liquide a une distance moléculaire critique (distance critique d sur Figure 42) : au dessous de cette distance le liquide reste intacte, mais au dessus de ce seuil caractéristique, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation contenant de la vapeur du liquide et des gaz dissous apparaissent. Ce phénomène, appelé cavitation, a été étudié de manière théorique et expérimentale. Neppiras et Noltingk (1950) ont initié la théorie du point chaud selon laquelle l'implosion d'une bulle de cavitation génère des valeurs locales de température et de pression très élevées (milliers de degrés Kelvin et milliers de kPa). Cette théorie a ensuite été reprise par Suslick (1988). Le comportement des bulles dépend de leur taille et de la nature du champ ultrasonore local qui détermine leur stabilité ou leur implosion.

4.1.2 Facteurs influençant la cavitation

- Présence de gaz dissous : les bulles de cavitation peuvent être constituées de vapeur du liquide dans lequel elles sont générées. La cavitation prend naissance à partir de noyaux qui sont constitués par les occlusions gazeuses au sein du liquide. La présence de gaz dissous favorisera donc le phénomène de cavitation.
- Pression du milieu : les bulles de cavitation peuvent être générées lorsque la pression appliquée au milieu (P_L) descend au dessous de la tension de vapeur de ce liquide (P_v). La pression appliquée au milieu quand celui-ci est soumis aux ultrasons peut être calculée comme étant la somme de la pression hydrostatique (P_h) et de la pression acoustique (Equation 6). Par conséquent la cavitation sera possible dans le liquide si la tension de vapeur du liquide est supérieure à la somme de la pression hydrostatique et la pression acoustique (Equation 7). Cela signifie que plus la pression appliquée au milieu sera élevée, plus il sera difficile de provoquer de la cavitation. En effet, pour la provoquer il faudra augmenter la pression acoustique et donc augmenter l'intensité des ultrasons.

$$P_L = P_h + P_a \quad \text{Equation 6}$$

$$P_v > P_h + P_a \quad \text{ou} \quad P_a > P_h - P_v \quad \text{Equation 7}$$

- Intensité des ultrasons : comme décrit dans l'équation 5, il y a une relation directe entre intensité des ultrasons et l'amplitude de la pression de l'onde sonore qui est

elle corrélée à la pression acoustique (Equation 4). La pression acoustique étant un paramètre clé dans la génération des ultrasons, plus l'intensité des ultrasons sera élevée plus facilement la cavitation pourra se faire.

- Fréquence des ultrasons : les fréquences le plus couramment utilisées sont entre 20 et 40 kHz. De plus haute fréquences rendent plus difficile la cavitation. En effet, les bulles de cavitation ont besoin d'un petit laps de temps pour être générées pendant la phase de raréfaction. Plus la fréquence est élevée, plus les phases de raréfaction sont courtes donc moins la bulle a de chance d'être créée. C'est la raison pour laquelle les ultrasons de haute fréquence sont dits non destructeurs ; la fréquence est trop élevée pour pouvoir permettre la cavitation.
- Température : l'importance de ce paramètre est difficile à évaluer car très complexe. En effet elle modifie la viscosité du milieu et la pression de vapeur saturante ce qui peut influencer la capacité de cavitation du milieu d'étude. Plus l'on se rapproche du point d'ébullition du liquide, plus les bulles de cavitation vont être générées facilement mais elles perdent leur capacité d'implosion c'est pourquoi la majorité des réactions sonochimiques sont favorisées par de faibles températures.
- Impuretés : chaque impureté présente dans le liquide ou à la surface de la verrerie utilisée peut agir comme un nouveau site de cavitation. En effet, des gaz peuvent être emprisonnés dans les interstices des impuretés et les dépressions générées par les cycles de raréfaction vont déloger ces gaz de l'impureté et constituer un nouveau noyau de cavitation.

Les différentes conditions expérimentales vont produire différents types de bulles de cavitation. Certaines sont dites stables, les autres sont dites transitoires. Les bulles transitoires n'existent que pendant quelques cycles acoustiques avant d'imploser violemment. Sachant que la durée de vie de telles bulles est trop faible pour observer un transfert de matière par diffusion de gaz vers l'intérieur ou l'extérieur de la bulle, leur implosion ne se trouve pas amortie et procède d'une grande violence. Selon Mason et Lorimer (2002), on peut ainsi atteindre des températures voisines de 5000 K et des pressions de l'ordre de 1000 atmosphères (Tableau 25). Les bulles de cavitation stables sont des bulles de gaz et de vapeur qui oscillent de manière non linéaire autour d'une taille de pseudo-équilibre pendant un bien plus grand nombre de cycles. A chaque cycle, leur volume augmente car le bilan des échanges entre les phases de désorption et de condensation

(entrée dans la bulle) et celles d'absorption et de vaporisation (sortie de la bulle) est positif. La bulle implose alors lorsqu'elle atteint une taille critique. Cette implosion est moins violente car elle est amortie par les gaz présents et les températures atteintes alors se situent aux alentours de 1800 K.

Tableau 25 : Caractéristiques et effets des ultrasons selon le type de cavitation induit

Type de cavitation	Stable	Transitoire
Intensité	1 à 3 W/cm ²	> 10 W/cm ²
Type d'oscillations	faibles et autour de l'équilibre	Fortes
Cycle	plusieurs cycles	1 à 2 cycles
Durée de vie des bulles	Longue	Courte
Phénomène local	simple diffusion gaz/liquide mais risque de résonance	températures et pression très élevées
Nature de la bulle	gaz résiduel ou vapeur du liquide environnant	vapeur du liquide seulement
Effet	à court terme : dégazage à long terme : mélange	violents : érosion, émulsification, sonochimie, sonoluminescence

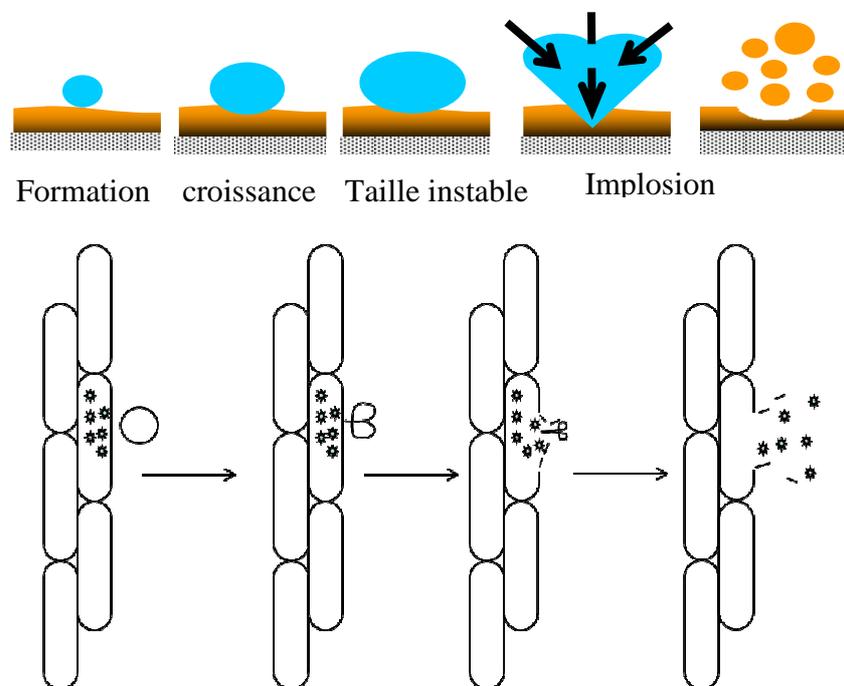


Figure 43 : Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (a) et d'une cellule végétale (b)

Les ultrasons ont des actions mécaniques et physiques, notamment lors de l'explosion des bulles de cavitation. La présence d'un obstacle adjacent provoque la perte de symétrie du système par rapport à une implosion au sein de la solution (Figure 43). Le principal effet physique et mécanique des ultrasons est alors la production de micro-jets dirigés vers une surface solide lors de l'implosion des bulles de cavitation.

Ces micro-jets peuvent atteindre des vitesses considérables (plus de 120 m/s) et ils pourraient avoir une influence prépondérante dans les effets induits par la cavitation et dans l'augmentation de l'agitation à l'interface obstacle/milieu réactionnel. En plus de leurs effets mécaniques et physiques, les ultrasons produisent des effets chimiques qui résultent également du phénomène de cavitation. Lorsqu'une solution aqueuse est soumise aux ultrasons, des radicaux libres peuvent être générés et initier des réactions en chaînes. Ces entités peuvent ensuite réagir avec des espèces en solution ou se recombinaison pour former de l'hydrogène, de l'eau oxygénée ou d'autres radicaux. Si la nature des espèces chimiques est fortement dépendante des gaz dissous, la fréquence influence considérablement la cinétique de réactions.

4.1.3 Equipements de laboratoires et industriels

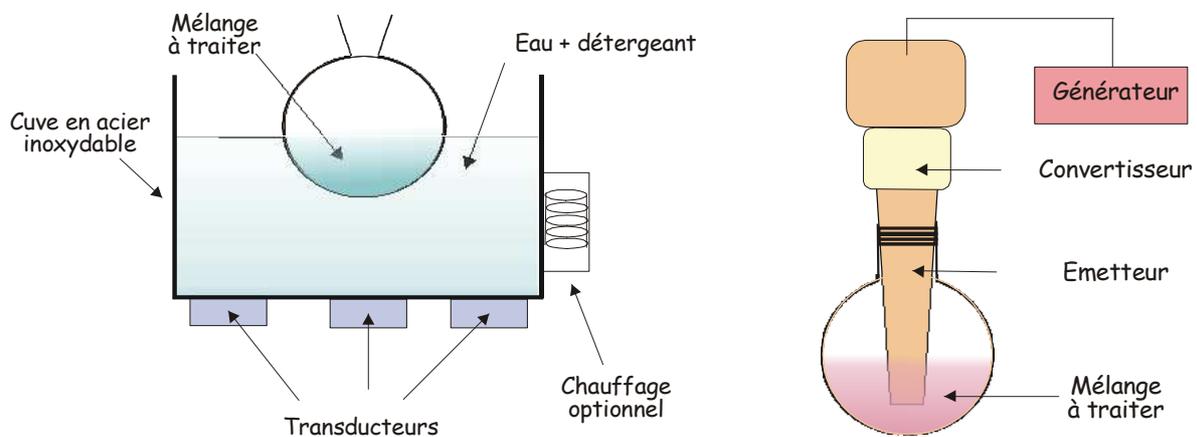


Figure 44 : Schéma de dispositifs à ultrasons : bac et sonde

Deux types d'équipements sont couramment utilisés dans les laboratoires. Le premier est le bac à ultrasons qui est peu onéreux et trouve de nombreuses applications pour la préparation d'échantillons, l'homogénéisation, la dispersion, le dégazage et le nettoyage (Figure 44). Il génère des fréquences comprises entre 25 et 50 kHz et des puissances acoustiques de 1 à 5 W.cm⁻². Ce type d'instrumentation possède l'avantage d'être simple à

utiliser mais nécessite l'emploi d'un contenant pour le mélange à traiter qui va agir comme amortisseur de l'effet des ultrasons qui ne pourront agir que de manière indirecte. Le second appareillage est la sonde à ultrasons. A la différence du bac, elle permet une irradiation directe du milieu tout en générant des puissances acoustiques nettement supérieures (plus de 100 fois plus élevées). Cependant, son utilisation reste seulement adaptée au traitement de petits volumes de liquide et une attention particulière doit être portée à ce type de manipulation car l'échantillon peut subir une augmentation rapide de température. Le couplage de ces deux types d'appareillage à des systèmes de pompes permet un travail en mode continu car cela favorise la circulation ininterrompue de solvant « frais » à travers l'échantillon soumis aux ultrasons.



Figure 45 : (A) réacteur d'extraction assistée par ultrason de 3L, (B) équipement à l'échelle pilote : cuve de 50 L et (C et D) équipement à l'échelle industrielle : cuves de 500 et 1000 L

Les systèmes industriels sont communément utilisés en combinaison avec des cuves tampon de grande capacité et des pompes (traitement en ligne) ou mode en batch avec des cuves équipées. Ces dernières sont utilisées depuis quelques années pour l'extraction de composés aromatiques de végétaux afin d'accélérer la macération.

Une gamme de nouveaux appareillages a été développée par la société REUS (France) (Figure 45). Celle-ci va de l'équipement de laboratoire (0,5 à 3 L) à des modèles industriels (1000 L) en passant par des modèles pilotes (30 et 50 L). L'appareillage de laboratoire génère une puissance ultrasonore d'environ 1 W/cm², la fréquence d'utilisation est de 25kHz. Les autres spécificités de ce réacteur sont de posséder un système de double enveloppe permettant de thermostatier le système et la possibilité de travailler directement dans le réacteur induisant l'application directe des ultrasons sur le mélange réactionnel.

4.1.4 Applications des ultrasons

La diversité des appareillages et des actions des ultrasons permet une large gamme d'applications. Dans le domaine de l'agroalimentaire celles-ci peuvent être de l'ordre de la transformation, de l'extraction ou encore de la préservation des produits alimentaires (Mason, 2003).

4.1.4.1 Les ultrasons en technologie de transformation

Les ultrasons de puissance génèrent d'intenses forces de pression et de cisaillement ainsi que des forts gradients de température dans le milieu traité. Cette action physique intense des ultrasons permet de déstructurer la matière et/ou induire des réactions chimiques ou biochimiques. L'énergie ultrasonore résultante peut ainsi améliorer les transferts de chaleur, de matière ou bien de quantité de mouvement. Dans de nombreuses applications, la technologie des ultrasons possède des avantages considérables par rapport aux autres technologies conventionnelles. Les ultrasons améliorent le rendement réactionnel, les qualités organoleptiques ainsi que les propriétés visuelles du produit agroalimentaire final destiné à la consommation humaine. Plusieurs exemples de transformation des aliments assistés par ultrasons sont résumés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Applications des ultrasons dans les technologies de transformation

Procédé	Méthode conventionnelle	Principe des ultrasons	Apport des ultrasons	Produits
Découpage	Lames et couteaux	Phénomène de la cavitation	Gain de temps, pas de perte de matière, découpe précise, répétitive	Produits fragiles, hétérogènes
Marinage	Bain de saumure	Les vibrations ultrasoniques facilitent le transfert en saumure uniformément reparti dans le produit	Gain de temps, gain de matière, amélioration du transfert de matière	Légumes, viande, poisson
Séchage/ déshydratation	Atomisation, Air chaud, Congélation	Les vibrations permettent un transfert de chaleur uniforme au sein du produit	Gain de temps, amélioration des qualités organoleptiques	Aliments déshydratés (fruits, végétaux)
Emulsification	Agitation mécanique	Le phénomène de cavitation réduit le diamètre des gouttes	Stabilité des émulsions, gain de temps	Tout type d'émulsion (mayonnaise)
Filtration	Filtres à membrane semi-perméable	Vibration ultrasoniques au contact des fibres	Gain de temps, amélioration de la filtration	Tout type de liquide (jus de fruit...)

Un exemple d'application est la filtration ; elle est utilisée dans l'agroalimentaire pour enlever les particules solides contenues dans un liquide comme c'est le cas dans les jus de fruits. Deux produits en découlent : le rétentat (constituant la partie retenue par la membrane) et le filtrat (partie filtrée). Cependant, les filtres sont souvent obstrués au bout d'une certaine durée d'utilisation et nécessitent d'être changés régulièrement. Les ultrasons améliorent considérablement la filtration et permettent d'augmenter la durée d'utilisation des filtres. Le phénomène de la filtration assistée par les ultrasons est basé sur la libération rapide des pores du filtre en évitant l'agglomération des fines particules. Les vibrations ultrasonores permettent au rétentat d'être partiellement en suspension au dessus du filtre,

ainsi les pores ne sont pas obstrués (Figure 46). Les rendements de la filtration assistée par ultrasons sont élevés par rapport à la filtration conventionnelle (Mason, 2010).

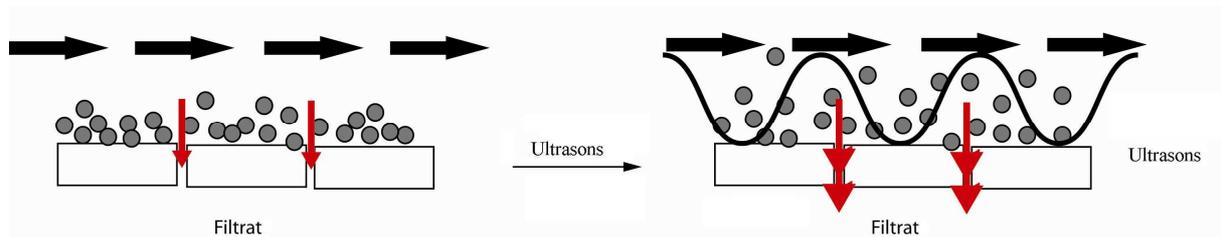


Figure 46 : Avantage de la filtration assistée par ultrasons

4.1.4.2 Les ultrasons en technologie de préservation

Il existe plusieurs exemples de microorganismes inactivés par ultrasons et étudiés dans des milieux de cultures de laboratoire et au sein de modèles alimentaires. Les cellules bactériennes ont chacune des sensibilités différentes aux traitements ultrasoniques. De manière générale, les plus grandes cellules sont plus sensibles aux ultrasons. Cela est peut-être dû au fait que les grandes cellules ont une plus grande surface les rendant plus vulnérables aux fortes pressions produites pendant la cavitation acoustique. Les cellules Gram positifs paraissent être plus résistantes que les Gram négatifs ; cela est peut-être dû à la structure de la paroi cellulaire. Les cellules Gram positifs ont des parois plus épaisses qui procurent à la cellule une certaine protection contre le traitement ultrasonique (Mason *et al.* 2003). La cavitation produit de fortes températures et pressions localisées qui désintègrent toutes les cellules biologiques et/ou dénaturent toute enzyme présente. L'implosion des bulles produit des forces de cisaillement et des jets de liquides dans le milieu qui pourraient avoir suffisamment d'énergie pour endommager physiquement les parois cellulaires. L'inactivation par ultrasons a aussi été attribuée à la génération de cavitation intracellulaire pouvant perturber la structure cellulaire et les composants fonctionnels jusqu'à atteindre la lyse cellulaire (Figure 47).

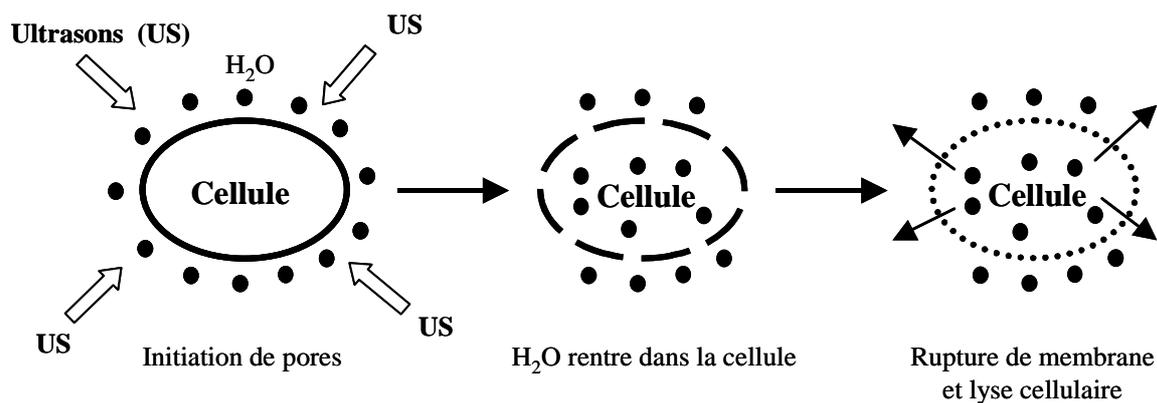


Figure 47 : Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons

4.1.4.3 Les ultrasons en technologies d'extraction

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction sur les matrices végétales ou alimentaires est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements ou/et d'accélérer les cinétiques d'extraction. Ces améliorations peuvent être attribuées à l'amélioration de la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction. Les premières applications ont été liées à la détermination des métaux dans les aliments. Les applications couvrent aujourd'hui l'extraction de nombreux autres composés comme les arômes, les antioxydants, les huiles et les colorants (Chemat, 2009).

- **Extraction des huiles essentielles et des arômes**

Les arômes et senteurs sont des mélanges complexes de composés volatiles qui sont généralement présents en faible concentration dans les plantes aromatiques. Ces concentrations sont variables en fonction de la plante considérée et de la partie de la plante (fleur, feuille, tige, racine...). Les techniques conventionnelles d'extraction de molécules aromatiques sont souvent longues et posent un réel problème pour l'extraction de molécules thermosensibles puisque le plus souvent ces extractions se font par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur. En plus d'être longues et destructives pour les molécules sensibles, ces techniques sont également coûteuses car il faut porter puis maintenir à ébullition de grands volumes d'eau pendant de longues périodes. La technologie ultrasonore permet de pallier à certains de ces problèmes et est par conséquent de plus en plus utilisée (Tableau 27).

Tableau 27 : Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes

Matrice	Analytes	Conditions d'extraction
Brandy et vin rouge	Composés aromatiques	US, 20 °C, 3-étapes d'extraction CH ₂ Cl ₂ . TS : 3x10 min. valeurs moyennes (µg/L) : 291 (linalol), 248 (α-terpinéol), 397 (citronellol).
Graines de carvi	Carvone & Limonène	US, 20 kHz, 150 W, 20 °C, <i>n</i> -hexane. TS: 60 min. Rd (mg/g): 17 (carvone) 16 (limonène).
Vanille	Vanilline	US, 20 kHz, 750 W, 25 °C, EtOH or EtOH/H ₂ O. TS: 1 - 2 min.
Safran	Safranal	US, 35 kHz, 25 °C, H ₂ O : Et ₂ O. TS: 5x10 min. Rd : Safranal entre 40.7 and 647.7 mg/100g safran
Miel	Composés aromatiques	US, 25 °C, H ₂ O, <i>n</i> -pentane : Et ₂ O, TS : 2x10 min.
Moût de vin	Composés aromatiques	US, 48 kHz, 20 °C, 3-étapes d'extraction avec CH ₂ Cl ₂ . TS : 3x10 min.

- Vin et spiritueux : la composition du vin dépend de nombreux facteurs tels que la région de production, le sol, le climat et les pratiques pour la préparation du vin. L'extraction assistée par ultrasons des composés aromatiques du vin a été comparée à l'extraction en phase solide et en immersion en phase solide (Cabredo-Pinillos, 2006 ; Pena, 2005). L'extraction par ultrasons permet de meilleurs rendements en un temps réduit et 37 composés aromatiques ont pu être quantifiés dans le vin grâce à cette technique.
- Huile essentielle : l'extraction assistée par ultrasons a été utilisée sur de nombreuses variétés de plantes aromatiques telles que les feuilles de menthe, l'artémise ou la lavande (Da Porto, 2009 ; Asfaw, 2005 ; Shotipruk, 2001). Les rendements en huile essentielle ont pu être légèrement augmentés pour l'artémise et la menthe (12 % pour ce dernier), quant à la lavande, des quantités deux à trois fois supérieures ont été obtenue par utilisation des ultrasons. Le second avantage des ultrasons pour l'extraction de l'huile essentielle est le fait de travailler à froid, ce qui réduit la dégradation des composés volatiles. Cet aspect est très intéressant pour les secteurs de la nutraceutique et de l'agroalimentaire car dans les deux cas des huiles très pures sont nécessaires.

- Epices : concernant les épices on peut citer l'extraction de vanilline à partir de gousses de vanille. Les rendements en vanilline étaient similaires après 1 h d'extraction assistée par ultrasons et 8 h d'extraction conventionnelle (Jadhav, 2009). La carvone peut également être extraite des graines de carvi de façon plus pure lors d'une extraction aux ultrasons (pas de présence de matières grasses comme dans l'extraction classique par Soxhlet) (Kanakis, 2004).

- Extraction des antioxydants

Les antioxydants sont capables de piéger les radicaux libres et ils peuvent donc protéger les aliments de la peroxydation lipidique qui est l'une des causes de la détérioration des produits alimentaires. Les fruits et légumes sont connus pour être riches en ces antioxydants et sont par conséquent intéressants dans un but nutritionnel mais ils peuvent aussi bien l'être dans un but de préservation des aliments. Dans l'industrie agroalimentaire, de plus en plus d'attention est portée au recyclage des coproduits, eux-mêmes source intéressante d'antioxydants. Comme pour les arômes, l'extraction assistée par ultrasons des antioxydants peut être un outil avantageux dans le but d'optimiser le rendement et la pureté des extraits (Tableau 28).

- Fruits et légumes : grâce à la richesse en antioxydants de ces matrices, de nombreux essais ont été menés sur différentes plantes et différentes parties de chaque plante. L'extraction assistée par ultrasons permet notamment de réduire grandement le temps d'extraction des antioxydants. C'est le cas pour l'extraction du lycopène de la tomate, des anthocyanes de la framboise (3 min comparé à 53 min) ou encore pour les composés phénoliques de la fraise (2 min comparé à 20 h) (Liangfu, 2008 ; Chen, 2007 ; Herrera, 2005). L'action des ultrasons peut différer en fonction de la partie de la plante étudiée, ainsi ils sont plus intéressants pour extraire des composés des pépins de raisin que sur le fruit entier (Palma, 2002). Les ultrasons permettent une meilleure diffusion du solvant dans les pépins ce qui augmente l'extraction de l'acide malique et de l'acide tartarique.

Tableau 28 : Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants

Matrice	Analytes	Conditions d'extraction
Peaux de citron	Composés phénoliques	Bain US, 60kHz, 15 et 40°C dans méthanol. Plus grand des quantités avec US, les basses températures permettent un meilleur rendement
Noix de coco	Composés phénoliques	Bain US, 25 kHz, 150 W, 30°C. 22.44 mg de composés phénoliques extraits par gramme de noix de coco
Raisin et pépins de raisin	Acides tartarique et malique	Sonde US, 24 kHz, 200 W, 70°C. 194.3 ppm d'acide tartarique et 37.4 ppm d'acide malique. US plus efficaces sur pépins que sur le fruit
Feuille d'olivier	Oleuropéine	Sonde US, 20 kHz, 450 W, 40°C. Même quantité d'oleuropéine après 25 min d'extraction par US que 24h par méthode conventionnelle
Fraise	Composés phénoliques	Sonde US, 20 kHz, 100 W. Même efficacité en 2 min que 20 h par technique conventionnelle ou 3 h au CO ₂ supercritique
Framboise	Anthocyanes	Sonde US, 22 kHz, 650 W, 40°C. Même rendement après 200 sec avec US que 53 min par méthode conventionnelle
Romarin	Acide carnosique	Sonde et bain US, 20 kHz, 50°C. 15mg d'acide carnosique par gramme de feuille. Réduction de la dépendance au solvant d'extraction
Tomate	Lycopène	Bain US, 40 kHz, 300 W. 90% du lycopène total extrait en 29 min, amélioration avec couplage micro-ondes
Son de blé	Composés phénoliques	Bain US, 40 kHz, 250 W, 60°C. 3.12 mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait

- Feuilles : les antioxydants ne sont pas simplement présents dans les fruits, mais ils peuvent également être présents dans les feuilles des plantes aromatiques ou encore dans les feuilles de certains arbres. L'une des plantes

les plus étudiées est le romarin, à la fois pour ses propriétés organoleptiques et pour son activité antioxydante. Les ultrasons permettent non seulement d'augmenter le rendement de l'extraction mais rend celle-ci moins dépendante du solvant : on peut donc obtenir les mêmes extraits en utilisant des solvants moins dangereux pour l'environnement lorsque l'on utilise des ultrasons (Albu, 2004). L'oleuropéine peut également être extraite des feuilles d'olivier et l'utilisation des ultrasons permet d'obtenir le même rendement en 25 minutes qu'après 24 h de macération classique (Japon-Lujan, 2008).

- Divers : les coproduits de l'industrie des jus de fruits ne sont pas seulement intéressants pour leur richesse en huiles essentielles, mais des composés phénoliques peuvent aussi être extraits des peaux d'agrumes (Ma, 2009). Dans cette étude, les ultrasons ont permis de réduire le temps d'extraction et l'augmentation de la quantité de composés phénoliques extraits est justifiée par son auteur comme étant due aux plus faibles températures d'extraction utilisées. Cette faible température est particulièrement intéressante lors de l'extraction des antioxydants car ces molécules sont thermosensibles. D'autres bons rendements d'extraction de composés phénoliques ont été trouvés à partir ce coque de noix de coco et de son de blé montrant la largeur de gamme d'applications potentielles des ultrasons (Rogrigues, 2008 ; Wang, 2008).

4.1.5 Réglementation et sécurité

Les outils de gestion de la qualité dans les industries chimiques ou agroalimentaires prennent de plus en plus d'importance afin d'assurer un produit sûr dans des conditions de travail appropriées. Diverses méthodes existent pour identifier l'apparition des risques qui peuvent se produire (Mortimore *et al.* 1994). Les concepts d'analyse des risques et l'étude des points critiques (HACCP) et de l'analyse des risques et d'opérabilité (HAZOP) sont employés pour garantir la sécurité alimentaire et pour optimiser l'efficacité et la gestion des risques liés à la fabrication, aux personnes et à l'environnement.

Dans l'industrie chimique, il est commun d'adapter le processus de fabrication afin d'y introduire une technologie nouvelle telle que les ultrasons. A l'inverse dans l'industrie agroalimentaire, l'image du produit, l'étendue du marché et les risques alimentaires sont tels

que c'est la technologie innovante qui doit s'adapter au processus de fabrication et au delà à toute la chaîne de l'usine. La conception d'un procédé agroalimentaire assisté par ultrasons doit être basée sur les concepts de l'HACCP et de l'HAZOP. Il faut noter que ce sont des étapes importantes dans l'approbation des produits et des procédés alimentaires par les organismes de normalisation et de certification. Une des exigences majeures pour un programme de sécurité alimentaire est qu'il doit être basé sur les principes de l'analyse du risque et l'étude des points critiques, comme mentionné dans l'édition courante du *Codex Alimentarius*.

- Analyse des risques et étude des points critiques (HACCP)

La méthode HACCP a été mise au point dans les années 1960 par la compagnie Pillsbury pour la NASA dans le cadre d'un programme spatial concernant la sécurité alimentaire des astronautes lors des premières missions habitées dans l'espace. Dans l'industrie agroalimentaire, cette méthode a été appliquée pour la première fois aux aliments appertisés, puis, elle s'est étendue à tous les secteurs de l'agroalimentaire. Le système HACCP et les directives de son application ont été définis par la Directive 43/93/CEE du 14/06/1993. La démarche HACCP est basée sur les sept principes suivants :

Principe 1 : Analyse des dangers à tous les stades de la vie des produits.

Principe 2 : Détermination des points critiques (Critical Control Point : CCP) à maîtriser.

Principe 3 : Détermination des limites critiques pour chaque CCP.

Principe 4 : Elaboration d'un système de surveillance pour la maîtrise des CCP.

Principe 5 : Détermination et mise en place des mesures correctives lorsque la surveillance révèle qu'un danger n'est pas maîtrisé.

Principe 6 : Définition et application des procédures de vérification et de validation du système HACCP.

Principe 7 : Constitution d'un système documentaire et d'enregistrements.

- Analyse des risques et d'opérabilité (HAZOP)

La méthode HAZOP a été utilisée et développée principalement dans l'industrie chimique et l'industrie pétrolière. L'analyse HAZOP a été conçue pour contrôler les risques identifiables encourus par les personnes, les schémas de procédés et l'environnement. La

technique a été conçue dans le but d'optimiser au maximum le procédé afin d'obtenir un meilleur rendement. La finalité de l'étude permet de fournir une liste de points et recommandations pour la prévention de chaque problème. La démarche HAZOP est basée sur les huit principes suivants :

Principe 1 : Identifier les conditions de risques et les problèmes d'efficacité liés aux opérations.

Principe 2 : Etablir des actions correctives pour prévenir les conditions de risques et les problèmes d'efficacité.

Principe 3 : Mettre en place des actions correctives pour modifier la procédure utilisée dans l'opération.

Principe 4 : Etablir une procédure de pilotage pour vérifier l'efficacité de l'action corrective.

Principe 5 : Etablir un programme d'entraînement du personnel.

Principe 6 : Etablir un système d'enregistrement de données effectives.

Principe 7 : Etablir une procédure de contrôle pour vérifier l'efficacité de l'action corrective.

Principe 8 : Mettre à jour un schéma du procédé avec les actions correctives.

Ces deux techniques d'analyse de risque ont permis de mettre en évidence les principaux points critiques de l'utilisation des ultrasons dans l'industrie. Ceux-ci se situent au niveau de la corrosion des appareils, des résidus de sonde ou encore au niveau des risques électriques liés aux hautes tensions utilisées par les appareils à ultrasons. Des panneaux d'avertissement appropriés doivent être mis en place, les opérations d'entretien doivent être décrites précisément et chaque ouvrier doit être formé en fonction des tâches précises qui lui sont attribuées. Le port de protections auditives et de gants est également rendu obligatoire afin de protéger tous les membres du personnel (Chemat, 2004).

4.1.6 Coût, investissement et impact environnemental

En général, un procédé d'extraction assisté par ultrasons possède un optimum compris entre 15 et 30 minutes de traitement à température ambiante, alors que les extractions conventionnelles (macération, distillation...) sont très longues et/ou réalisées à la température d'ébullition de solvant pendant plusieurs heures. Pour un réacteur de 1 litre, la consommation énergétique de l'extraction conventionnelle est de 5 kilo Watt heure alors que l'extraction assistée par ultrasons ne nécessite que 0.25 kW h. Les essais ont été réalisés à l'aide d'un Wattmètre à l'entrée du système de chauffage pour l'extraction conventionnelle et

à l'entrée du générateur à ultrasons pour l'extraction assistée par ultrasons. Ceci se répercute directement sur l'impact environnemental du procédé. Alors que le procédé d'extraction par US ne dégage que 200 g de CO₂ dans l'atmosphère, le procédé conventionnel en rejette plus de 4000 g de CO₂. Ceci a été calculé selon la règle que pour obtenir un kWh d'électricité, il faut brûler soit du gaz naturel, du pétrole ou du charbon, et ça en résulte un dégagement de 800 g de CO₂.

Les prix des réacteurs à ultrasons industriels varient entre 7000 euros (3 litres) et 200 000 euros (1000 litres). Le choix dans un réacteur à ultrasons n'induit que 25% d'investissement en plus par rapport à un réacteur conventionnel. Mais si on prend en compte les temps du procédé qui sont divisés par un facteur allant de 10 à 100, et une diminution énergétique et de pollution d'un facteur de 10, les procédés assistés par ultrasons ont un coût de production bien inférieure par rapport aux procédés conventionnels.

4.2 Extraction de β -carotène par ultrasons

Le β -carotène est une molécule liposoluble connue pour son activité antioxydante et son rôle de provitamine A. Grâce à ces propriétés elle est utilisée dans de nombreux compléments alimentaires et dans le domaine de la nutraceutique. Un des freins majeurs à son développement est la difficulté d'extraction de cette molécule. En effet, les entreprises travaillant avec le β -carotène ont souvent recours à l'utilisation de solvants nocifs pour permettre de bons rendements d'extraction. Cela pose ensuite de nombreux problèmes car d'un point de vue sanitaire, aucune trace de ces solvants ne peut être retrouvée dans le produit final, ce qui implique l'utilisation de techniques de purification souvent très coûteuses. Une difficulté supplémentaire à son développement est la très forte sensibilité de cette molécule, tant à la lumière qu'aux fortes températures.

4.2.1 Essais préliminaires

Avant d'avoir recours à un plan d'expérience, des essais préliminaires doivent être menés afin de déterminer les bornes à appliquer à ce plan. Différents paramètres sont à prendre en compte dans notre analyse :

- La puissance ultrasonore : celle-ci peut être divisée en deux sous catégories, la première est la puissance délivrée par le générateur, la seconde la densité de puissance c'est-à-dire la puissance appliquée par gramme de matière. Cette dernière nous oblige à réaliser une étude de concentration optimale en carotte sèche dans l'huile d'olive
- La température : travaillant dans l'huile d'olive, la température ne peut pas être descendue au dessous de 10°C car sinon une partie de cette huile peut figer ce qui altérerait l'homogénéité de notre mélange. Le β -carotène étant une molécule sensible à la température et étant connue pour commencer à se dégrader avant 40°C, nous avons décidé de nous arrêter à 34°C afin d'éviter cette dégradation et donc de ne pas influencer le résultat du plan
- Le temps d'extraction : ce paramètre doit être également testé lors des études préliminaires afin de déterminer les bornes temporelles d'extraction

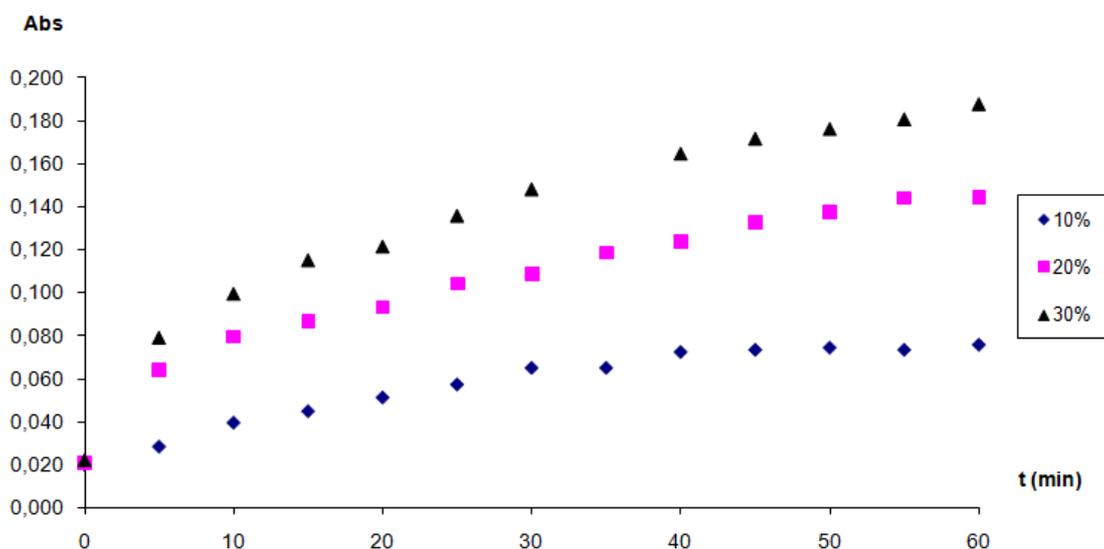


Figure 48 : Cinétiques d'extraction du β -carotène dans l'huile d'olive en fonction du ratio carotte-huile à 20°C

Dans un premier temps nous avons donc testé différentes concentrations de carottes sèches dans l'huile et suivi la cinétique d'extraction du β -carotène. Ces résultats sont présentés dans la figure 48. Cette figure nous apporte plusieurs informations : tout d'abord, la plus importante est que nous pouvons extraire du β -carotène dans l'huile d'olive puisque

l'absorbance de la solution augmente. Des essais menés en parallèles comparant l'extraction assistée par ultrasons et une simple macération montre que très peu de β -carotène peut être extrait par macération passive dans l'huile d'olive (absorbance finale d'environ 0.025). La seconde information est que le ratio carotte-huile a son importance. En effet lorsque la proportion de carotte passe de 10 à 20 % (m/v) la concentration de la solution en β -carotène est doublée. Cette augmentation n'est cependant pas linéaire puisque l'absorbance augmente de façon plus limitée lorsque le ratio passe de 20 à 30 %. 20 % a donc été choisi comme ratio de référence pour les expériences suivantes, soit 200 g de carotte sèche par litre d'huile d'olive. Nous pouvons également remarquer sur la figure que la concentration en β -carotène continue d'augmenter après une heure d'extraction, mais que 80 % de l'extraction a été réalisée après 30 minutes d'extraction. Nous avons donc choisi de placer cette durée dans le plan d'expérience et de la plafonner à 35 minutes d'extraction. La durée minimale d'extraction a quant à elle été placée à 5 minutes.

Le générateur d'ultrasons possède un régulateur permettant de délivrer différentes puissances au mélange d'extraction. Des essais ont été menés afin de calculer non pas la puissance délivrée par le générateur mais la puissance réelle absorbée par la solution. Ces résultats montrent qu'un litre d'huile d'olive absorbe des puissances allant de 10 à 60 W par notre générateur. Pour des raisons pratiques, les bornes du plan d'expérience ont été placées à 20 et 60 W afin de tester une large gamme de puissances ultrasonores.

4.2.2 Présentation du plan d'expérience

Le logiciel Statgraphics nous a permis de développer un plan d'expérience de type composite centré. Dans ce type de plan trois paramètres peuvent être testés et sont schématiquement représentés sur un graphique en trois dimensions (Figure 49). Chaque paramètre étant borné, l'ensemble du domaine d'analyse peut être représenté dans un cube virtuel, les angles de ce cube correspondant aux bornes des paramètres. Dans ce type de plan, 20 manipulations doivent être menées afin de tester les trois paramètres ainsi que la fiabilité du système :

- 6 au centre du cube
- 8 aux extrémités du cube
- 6 au centre des faces du cube

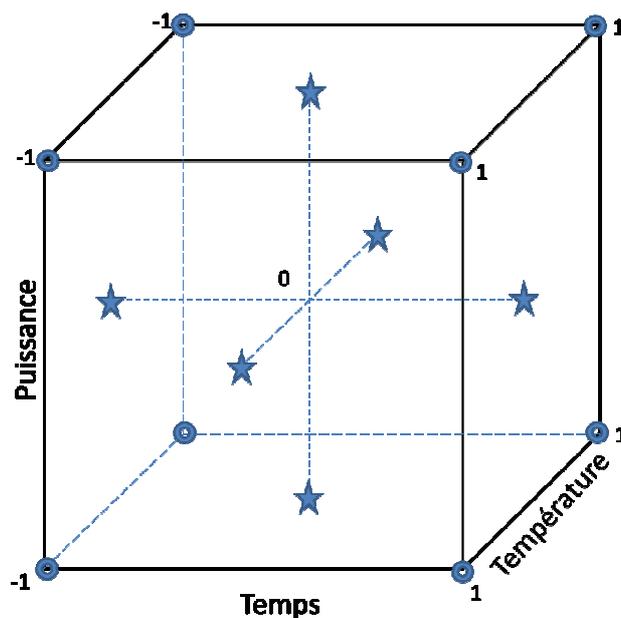


Figure 49 : Représentation du plan d'expérience sous forme d'un cube virtuel

Tableau 29 : Tableau récapitulatif des expériences et résultats du plan d'expérience

	Temps (min)	Puissance (W)	Temperature (°C)	Absorbance	C carotène (mg/L d'huile)
1	20	60	22	0,077	160
2	5	20	10	0,048	100
3	5	20	34	0,068	141
4	5	40	34	0,066	137
5	5	40	22	0,055	114
6	20	40	22	0,079	164
7	20	40	34	0,109	226
8	20	40	22	0,079	164
9	35	60	10	0,088	183
10	20	40	22	0,081	168
11	20	40	22	0,084	174
12	35	20	34	0,131	272
13	20	40	10	0,057	118
14	20	20	22	0,064	133
15	5	60	10	0,046	95
16	35	60	34	0,133	276
17	35	40	22	0,102	212
18	20	40	22	0,080	166
19	35	20	10	0,071	147
20	20	40	22	0,081	168

L'ordre de ces manipulations est attribué de façon aléatoire par le logiciel Statgraphics. La variable analysée dans notre cas est la concentration finale en β -carotène dans l'huile d'olive. Nous avons donc mesuré chaque absorbance en fin d'extraction, puis calculé la concentration correspondante en β -carotène (grâce à l'aide d'une courbe d'étalonnage) et reporté ces valeurs dans le tableau de résultats (Tableau 29).

4.2.3 Traitement des données par Statgraphics

Une fois calculées, les concentrations en β -carotène sont intégrées par Statgraphics qui va estimer l'importance de chacun des paramètres de l'étude. Le premier résultat est le diagramme de Pareto qui permet de déterminer quels sont les paramètres influençant de façon significative la concentration finale en β -carotène (Figure 50).

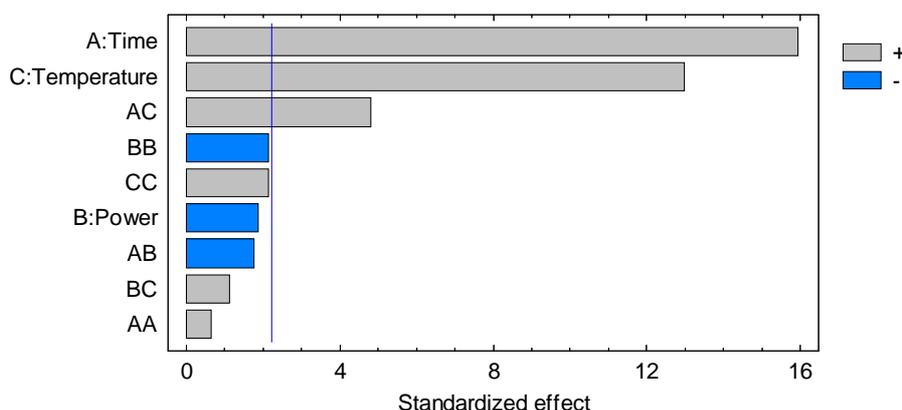


Figure 50 : Diagramme de Pareto pour la concentration en β -carotène

Comme le montre la figure 50, le paramètre le plus influençant est le temps d'extraction devant la température. Ce qui nous a surpris ici est de voir que la puissance ultrasonore n'a pas d'influence significative sur l'extraction. Nous avons constaté lors des études préliminaires que l'application des ultrasons permettait de beaucoup mieux extraire le β -carotène qu'une simple macération, mais la puissance ultrasonore appliquée ne semble pas avoir de grande influence sur son extraction. Ces premiers résultats sont ensuite repris plus en détails (Figure 51). Nous pouvons remarquer que le temps et la température d'extraction influencent de façon quasi linéaire l'extraction du β -carotène alors que la puissance ultrasonore atteint un maximum dans la partie basse de la gamme de puissance testées (Figure 51a).

L'optimum de température et de temps d'extraction se situe au maximum de ces deux critères soit 34°C et 35 minutes. Pour ce qui est de la puissance ultrasonore, l'optimum se situe à 33,5 Watts.

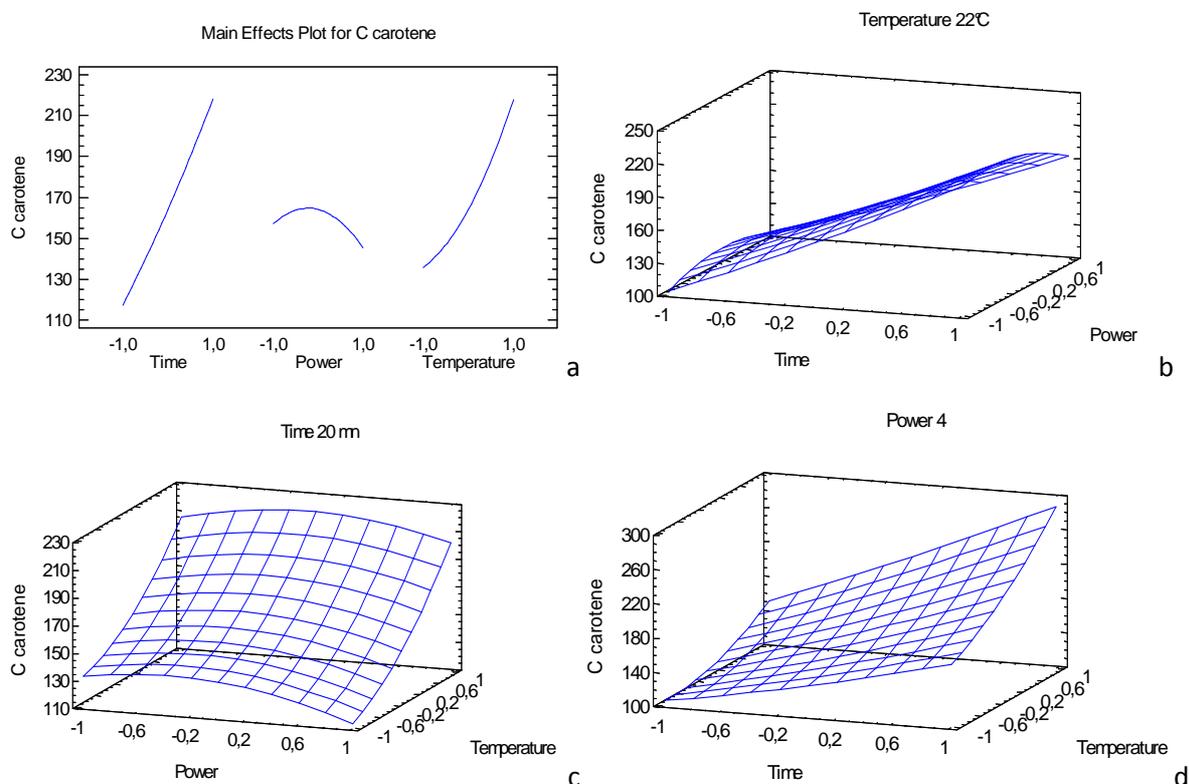


Figure 51 : Interprétations graphique des résultats par Statgraphics : ^a effet général des variables, ^b influence du temps et de la puissance à 22°C, ^c influence de la température et de la puissance après 20 minutes, ^d influence du temps et de la température à 40 Watts

4.3.4 Bilan du plan d'expérience

Lors des études préliminaires nous avons avant tout cherché à préserver le β -carotène de la dégradation, à la fois en n'utilisant pas de trop fortes températures ni des temps d'extraction trop longs. Ces conditions devaient permettre de ne pas avoir de biais dû à une dégradation qui pourrait faire penser que le β -carotène n'a tout simplement pas été extrait. Les résultats donnés par le plan montrent que non seulement nous n'avons pas utilisé de conditions trop drastiques pour le β -carotène, mais que nous aurions probablement pu utiliser des conditions de température et des durées supérieures à celles employées ici afin d'observer un infléchissement de la courbe de concentration en carotène.

4.3 Aromatisation d'une huile d'olive assistée par ultrasons

L'huile d'olive est un des aliments les plus importants du régime méditerranéen puisqu'elle constitue la principale source de matières grasses de ce régime. Elle est aussi bien utilisée pour la cuisson des aliments que nature en assaisonnement des salades. De nombreux scientifiques se penchent depuis quelques décennies sur les effets d'une alimentation riche en huile d'olive. Il apparaît que sa composition en acides gras et en composés phénoliques permettent de réduire l'apparition de nombreuses maladies. Malgré ces atouts naturels et son arôme particulier qui plait aux habitants du bassin méditerranéen, les producteurs d'huile d'olive ont cherché à diversifier leur gamme de produits. L'aromatisation des huiles par des plantes aromatiques fait partie de ce processus de diversification.

Tout comme l'huile d'olive, les plantes aromatiques possèdent souvent des activités antioxydantes non négligeables. C'est notamment le cas du romarin et du thym (Erkan, 2008 ; Youdim, 1999) et à plus faible échelle certains composés du basilic ont également démontré une activité antioxydante et des capacités de préservation des aliments (Beric, 2008 ; Lee, 2005). Le basilic (*Ocimum Basilicum L.*) est néanmoins plus utilisé en cuisine ou en parfumerie pour ses caractéristiques aromatiques. Les arômes et les activités antioxydantes sont généralement plus importants dans l'huile essentielle des plantes aromatiques. La distillation de ces plantes permet l'obtention d'extraits très riches en antioxydants, ce qui explique pourquoi de nombreuses techniques ont été développées afin d'extraire au mieux ces composés et de les préserver les molécules antioxydante de la dégradation ensuite (Farhat, 2009 ; Araus, 2009). L'une de ces techniques est l'extraction assistée par ultrasons car ils permettent une extraction rapide et efficace des antioxydants (Ma, 2009 ; Japon-Lujan, 2008).

En 2006, Hamed a été le premier à proposer l'utilisation de l'huile de table comme bio-solvant pour l'extraction des essences de plantes aromatiques. Ce travail présente une combinaison de la méthode proposée par Hamed et de la technologie des ultrasons. Des feuilles de basilic ont été directement plongées dans l'huile d'olive et soumises aux ultrasons afin d'augmenter la cinétique de macération et ce à température ambiante, afin d'empêcher la dégradation thermique et de proposer un procédé simple pour les mouliniers.

Ces travaux ont été valorisés par une communication orale internationale au « 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management » du 31 août au 2 septembre 2009 à Potsdam (Allemagne), un poster présenté aux « 5^{ème} journées franco-italiennes de la chimie » du 26 au 27 avril 2010 à Gênes (Italie) ainsi que par une publication dans Food Chemistry (Veillet, 2010b).

4.3.1 Analyse de la composition de l'huile essentielle de basilic

Tableau 30 : Composition de l'huile essentielle de basilic

Composé	N° pic	Temps de retention	Indice de rétention	Aire	% total
Limonene	5	7,158	201	95218	0,39
Eucalyptol	6	17,475	1207	323702	1,32
β-Ocimène	8	19,933	1258	554976	2,26
Terpinolène	9	21,392	1288	153452	0,62
Camphre	11	32,317	1523	216068	0,88
Linalol	12	33,583	1551	6175480	25,12
Bornyl acétate	14	35,100	1585	458114	1,86
α-guaiène	15	35,550	1595	250995	1,02
4-terpinéol	16	36,042	1607	413597	1,68
β-farnesène	17	38,642	1672	1221338	4,97
δ-terpinéol	18	38,958	1679	483403	1,97
α-terpinéol	19	39,942	1704	85989	0,35
Bornéol	20	40,117	1708	225458	0,92
α-cubébène	21	40,558	1719	342587	1,39
δ-guaiène	22	40,792	1725	107393	0,44
Elixene	24	41,550	1744	223563	0,91
γ-muuroène	25	42,567	1769	136158	0,55
méthyl-eugénol	26	51,858	2020	3729694	15,17
Eugénol	30	57,142	2177	9102251	37,03
Total					98,85

Le rendement en huile essentielle obtenue des plants de basilic est de 0,3% (m/m). L'analyse en chromatographie gazeuse a permis de déterminer la composition de cette huile essentielle (Tableau 30).

Cette étude a permis d'identifier 19 composés qui représentent près de 99% de la totalité de la fraction volatile. Les trois composés majoritaires sont l'eugénol (37 %), le linalol (25%) et le méthyl-eugénol (15%). L'eugénol le méthyl-eugénol et le linalol étant très facilement reconnaissables sur le chromatogramme (Figure 52), ils serviront de marqueurs d'aromatisation par la suite. Les concentrations de linalol et d'eugénol seront également déterminées dans les huiles afin d'estimer leur niveau d'aromatisation.

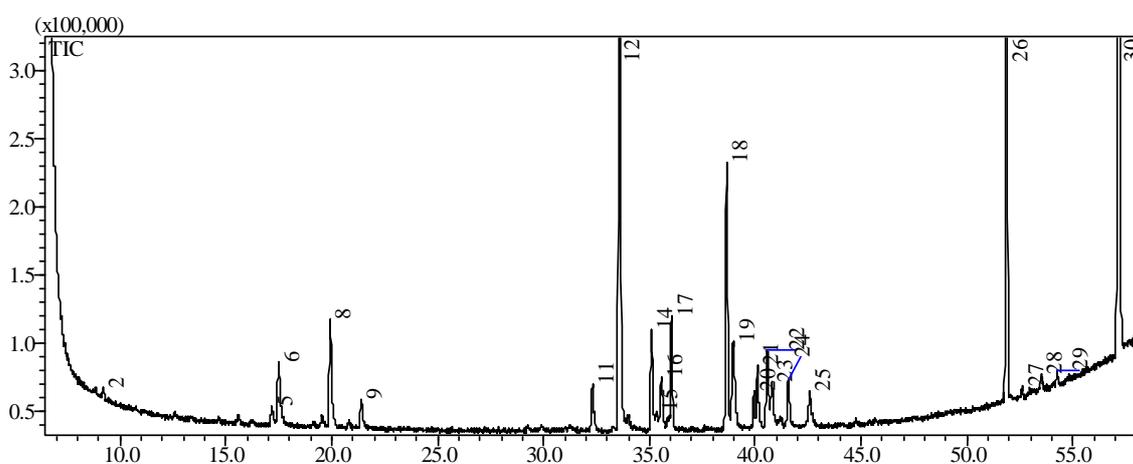


Figure 52 : Chromatogramme des composés volatiles de l'huile essentielle de basilic ; ¹² linalol, ²⁶ méthyl eugénol, ³⁰ eugénol

4.3.2 Cinétiques d'aromatisation de l'huile

Afin d'évaluer l'avancement de l'aromatisation, les concentrations de linalol et d'eugénol dans l'huile ont été suivies dans les différentes huiles. Les quantités de ces deux composés ont été déterminées grâce à des courbes d'étalonnage préparées à partir de solutions étalon de linalol et d'eugénol injectées en chromatographie gazeuse (Figure 53).

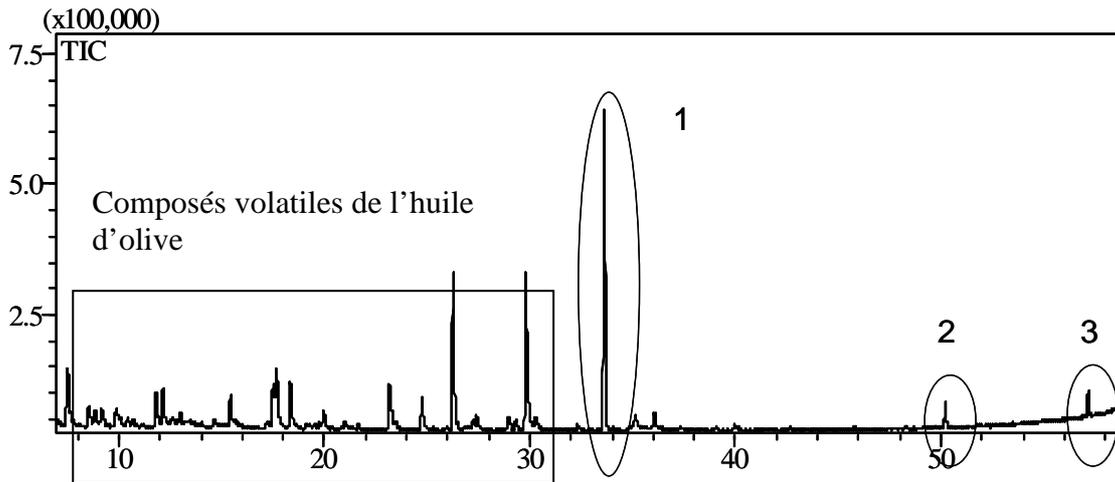


Figure 53 : Chromatogramme des composés volatiles de l'huile d'olive aromatisée par ultrasons. ¹ linalol, ² méthyl-eugénol, ³ eugénol

Des prélèvements ont été réalisés à différents intervalles de temps afin de suivre la cinétique d'aromatisation des huiles. Ce suivi a permis de constater que les ultrasons augmentaient très fortement la cinétique d'aromatisation de l'huile (Figure 54).

Dans les deux cas, les huiles d'olive ont été aromatisées avec 150 grammes de feuilles de basilic fraîches par litre d'huile. Après seulement 15 minutes d'extraction assistée par ultrasons nous avons pu observer des concentrations de 3,68 et 1,34 mg/L d'huile respectivement pour le linalol et l'eugénol. Dans les mêmes conditions expérimentales mais sans ultrasons (macération traditionnelle), seulement 1,66 et 0,31 mg de linalol et d'eugénol ont été détectés par litre d'huile d'olive. Des essais visant à diminuer la quantité de matrice de départ ont été menés et les résultats obtenus sont très satisfaisants dans la mesure où les rendements en marqueurs restent supérieurs à ceux obtenus par macération classique en divisant par trois la quantité de matière et cela toujours en seulement 15 min (Tableau 31).

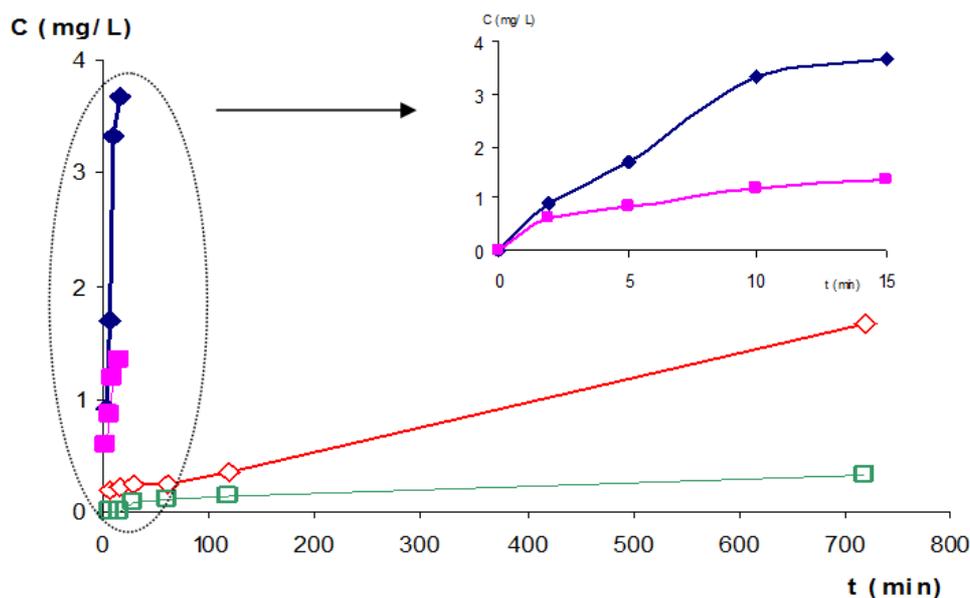


Figure 54 : (a) étude cinétique de l'aromatisation par macération assistée par ultrasons (150 g de feuilles de basilic dans un 1 L d'huile d'olive), (♦) linalol, (■) eugénol; (b) étude cinétique de l'aromatisation par macération conventionnelle (150 g de feuilles de basilic dans 1 L d'huile d'olive), (□) eugénol par macération (◇) linalol par macération, (■) eugénol par extraction assistée par ultrasons, (♦) linalol par extraction assistée par ultrasons

Tableau 31 : Paramètres de calibration et de calcul des concentrations de linalol et d'eugénol dans les huiles d'olive ainsi que les résultats correspondants

	Linalol	Eugénol
<i>Paramètres de Calibration</i>		
tr (min)	33,58	57,14
RI	1551	2177
Equation de la courbe de calibration	$y = 100018543x + 605525$	$y = 18759486x + 103409$
Coefficient de corrélation (R^2)	$R^2 = 0,992$	$R^2 = 0,967$
<i>Concentration dans l'huile d'olive (mg/L)</i>		
12 h macération + 150 g basilic /L	1,66	0,31
15 min ultrasons + 150 g basilic /L	3,68	1,34
15 min ultrasons + 50 g basilic /L	1,94	0,79

4.3.3 Effet de la sonication sur les glandes d'huile essentielle

Afin de mieux appréhender le phénomène au niveau cellulaire lors de l'extraction assistée par ultrasons, des fragments de feuilles de basilic ont été prélevés après macération et après sonication. Ces fragments ont ensuite été observés par microscopie électronique à balayage et comparés à des fragments de feuilles fraîches (Figure 55).

Lorsque les feuilles sont fraîches nous pouvons facilement observer que les glandes d'huile essentielle se retrouvent à la surface de la feuille de basilic, dans un léger renforcement de cellules. Ces glandes apparaissent sous forme sphérique et il en existe de différentes tailles partout sur la feuille (Figure 55.1 et 55.2).

Lors du processus de macération (Figure 55.3 et 55.4), ces glandes d'huile essentielle vont progressivement se vider de leur contenu, mais à un rythme lent. En effet l'huile essentielle sort de la glande par un phénomène de diffusion passive ce qui fait qu'après 12 heures de macération traditionnelle, ces glandes ne sont toujours pas complètement vidées de leur contenu. A l'inverse, lors d'une extraction assistée par ultrasons, les bulles de cavitation générées par les ultrasons permettent l'explosion des glandes (Figure 55.5 et 55.6). Cette explosion va permettre une aromatisation plus rapide puisque le contenu de la glande est directement libéré dans le milieu environnant (ici l'huile d'olive). Cette différence fondamentale entre un procédé de diffusion passive et un procédé qui faisant exploser les glandes d'huile essentielle permet d'expliquer les différences de cinétiques observées précédemment.

L'aromatisation par extraction assistée par ultrasons est donc une technique innovante et intéressante tant d'un point de vue qualitatif que d'un point de vue efficacité de la méthode. Ceci s'explique par la cavitation qui induit une forte intensité du transfert de matière dans le milieu et une crevaisson rapide et totale des glandes d'huiles essentielles. Ces deux phénomènes permettent une aromatisation plus rapide de l'huile ou/et de réduire les quantités de matrices végétale nécessaires à l'aromatisation.

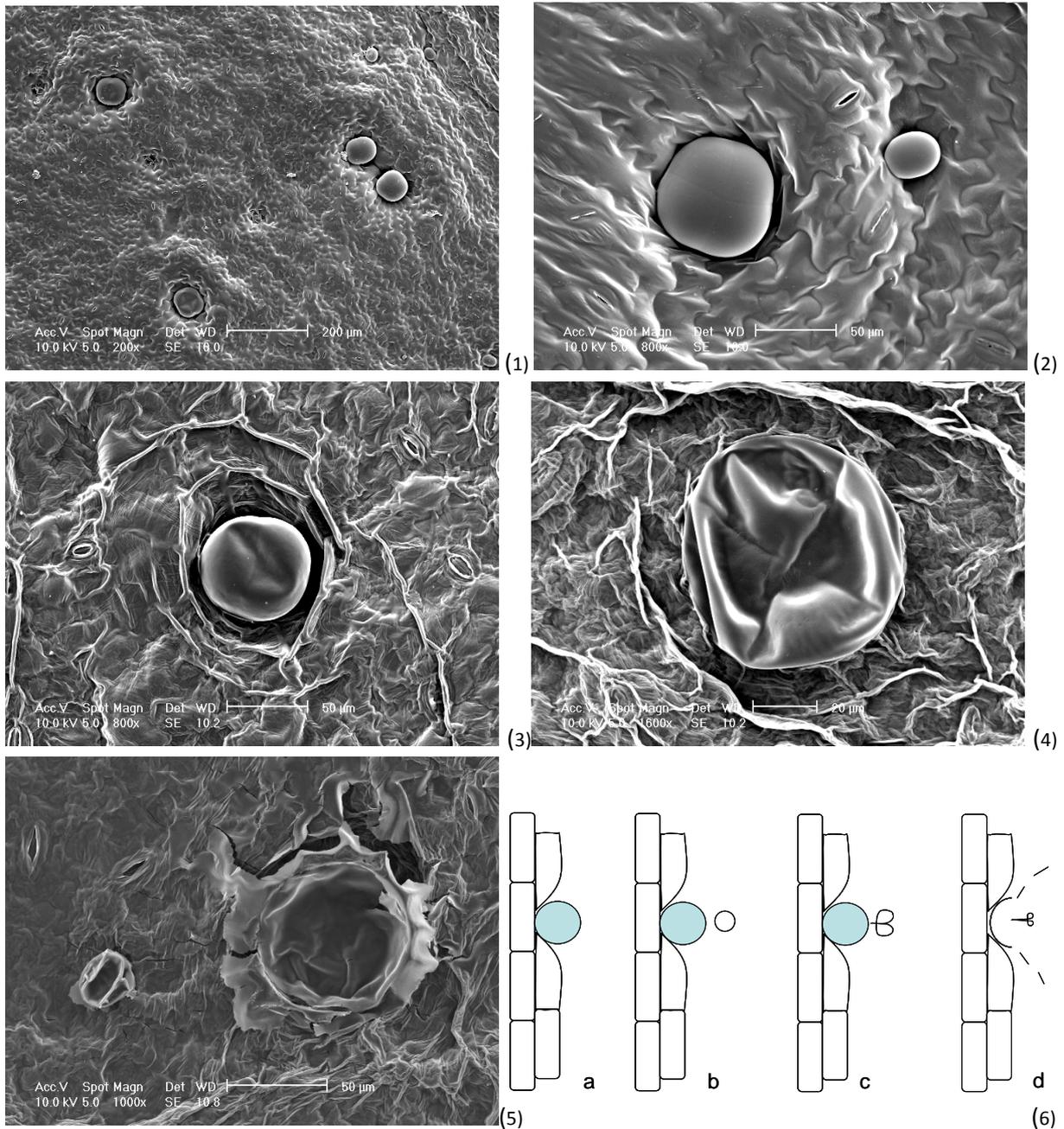


Figure 55 : Photographies de microscopie électronique à balayage de feuilles de basilic : (1-2) feuilles fraîches de basilic, rapport optique (x 200 et x 800), (3) feuilles de basilic, macération de 6h (rapport optique X 800), (4) feuilles de basilic : macération de 12h (rapport optique X 1600, (5) feuilles de basilic macération sous ultrasons de 15 min (rapport optique X 1000), (6) Représentation d'une bulle de cavitation implosant à la surface d'une poche d'huile essentielle, a) schéma en coupe de profil de la surface d'une feuille avec une glande d'huile essentielle, b) création d'un bulle de cavitation, c) implosion de la bulle de cavitation générant un micro jet orienté vers la poche à essence, d) destruction de la glande et diffusion de l'huile essentielle dans le milieu

4.4 Conclusions sur l'enrichissement exogène de l'huile par ultrasons

L'enrichissement post récolte de l'huile permet tout d'abord d'élargir la gamme de produits disponibles sur la marché, mais elle est surtout intéressante pour le secteur oléicole car il abouti à la création de produits à forte valeur ajoutée. Ces produits peuvent être orientés vers deux grands secteurs : celui de la nutraceutique et celui de l'agroalimentaire. Côté nutraceutique l'huile peut être utilisée comme solvant « vert » d'extraction et ainsi remplacer une partie des solvants pétroliers. En agroalimentaire, l'enrichissement organoleptique de l'huile permet d'apporter de nouveaux attributs gustatifs à l'huile.

L'idée d'utiliser de l'huile végétale en tant que solvant d'extraction a notamment été énoncée par Hamed en 2006. Nous avons donc adapté son étude à l'extraction de β -carotène dans de l'huile d'olive. Après des études préliminaires nous avons mis en place un plan d'expérience afin de déterminer les paramètres optimum d'extraction. L'extraction par ultrasons permet d'obtenir des concentrations en β -carotène de l'ordre de 300 mg/L d'huile après seulement quelques minutes, le tout sans utilisation d'aucun solvant nocif pour l'homme ou pour l'environnement.

L'aromatisation de l'huile d'olive n'est pas un procédé récent et de nombreuses huiles aromatisées existent sur le marché. Ce qui est très innovant ici c'est la technologie d'obtention de ces huiles. En effet ces huiles sont traditionnellement obtenues par simple macération des plantes aromatiques dans l'huile. Ce procédé présente l'avantage d'être très simple, cependant les temps de macération sont très longs donc ils posent de nombreux problèmes de stockage et les volumes de matériel végétal sont également très importants. L'extraction assistée par ultrasons permet une amélioration très nette de ces paramètres. En effet nous avons pu voir ici qu'il est possible d'obtenir des huiles parfaitement aromatisées en seulement quelques minutes et nous avons également démontré qu'il était possible de réduire le volume de matériel végétal utilisé pour l'aromatisation. Ce nouveau procédé peut s'appliquer à de nombreuses matrices végétales afin d'obtenir de grandes variétés d'huiles d'olive aromatisées de façon rapide, efficace et en réduisant les quantités de matières premières.

Chapitre 5 : Conception et développement de procédures de Dean Stark innovantes

Un sérieux problème rencontré par les mouliniers utilisant une chaîne de production traditionnelle une fois par an lors de la production de l'huile d'olive est le phénomène dit « de boues ». Lors de ce phénomène la coalescence ne se fait pas correctement lors du malaxage ce qui induit des consistances de pâte d'olive différentes d'une pâte classique : la pâte est moins épaisse et n'a pas exactement les mêmes propriétés qu'une pâte normale. Cela perturbe fortement la tenue de l'empilement de scourtins au niveau de la presse hydraulique (utilisée lors de l'étape de séparation des phases solides et liquides) et les matières solides de cette pâte ne sont pas retenues correctement dans les scourtins. Beaucoup de matières solides se retrouvent donc en suspension dans le mélange de margines et d'huile. Cela provoque un second problème majeur à l'étape de séparation liquide-liquide. En effet l'huile et l'eau sont très difficiles à séparer et beaucoup de margines se retrouvent dans l'huile, ce qui lui donne un aspect boueux. Outre l'impact visuel négatif sur l'huile finale, ce phénomène ajoute de nombreuses contraintes aux mouliniers :

- Les temps de séparation étant plus longs, le moulinier utilisant la séparation par décantation gravitationnelle aura besoin de plus d'espace de stockage et de plus de cuves pour permettre cette séparation,
- Le nettoyage des scourtins doit être fait beaucoup plus régulièrement,
- En cas d'utilisation d'une centrifugeuse pour la séparation liquide-liquide, celle-ci s'embourbe rapidement et doit donc être démontée et nettoyée au jet plusieurs fois par jour.

Ce phénomène se produit au milieu de la saison de production de l'huile d'olive donc au moment où les olives sont en pleine mutation au niveau de leur composition chimique. Nous avons également constaté que le principal problème se situe au niveau de la séparation liquide-liquide donc nous avons décidé de nous intéresser à la teneur en eau dans les olives.

Dans les derniers stades du développement du fruit, l'olive perd de l'eau et la proportion d'huile a tendance à augmenter (Nergiz, 2009 ; Brescia, 2007). Ces deux paramètres sont décisifs pour la récolte des olives et donc pour la fabrication de l'huile d'olive. Cette analyse est généralement laissée à l'appréciation visuelle des oléiculteurs,

mais dans le but d'optimiser la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive nous pourrions nous pencher sur l'optimisation de la période de récolte des olives. La détermination de valeurs de référence en eau et en huile dans le fruit pourrait constituer une aide à la décision pour la récolte des fruits et éviter ce phénomène des boues.

Le sujet de la thèse était basé sur l'amélioration des qualités nutritionnelles de l'huile d'olive et elle était conjointement financée par la région PACA et la FEMOS. Le développement de techniques analytiques innovantes ne faisait pas partie du projet original, cependant, avec l'accord des membres de la FEMOS nous nous sommes intéressés au développement de méthodes rapides de détermination de la teneur en eau car ce paramètre nous semblait important. C'est ainsi que nous avons développé au cours de cette thèse une technique de Dean Stark accélérée par micro-ondes. Ces travaux ont été valorisés par une publication scientifique dans *Analytica Chimica acta* (Veillet, 2009a)

Dans le but de développer des techniques analytiques plus respectueuses de l'environnement et plus faciles à mettre en place en dehors d'un laboratoire de chimie, nous avons testé des agro-solvants sur cette même technique. Un Dean Stark utilisant un solvant vert (le *d*-limonène) a ainsi également été développé au cours de cette thèse. Ces travaux ont été valorisés par une communication par poster à la 21^{ème} journée de la chimie SFC-PACA le 16 avril 2009 à Marseille, ainsi que par une publication scientifique dans *Analytica Chimica Acta* (Veillet, 2010b).

5.1 Le Dean Stark accéléré par micro-ondes

Pour les industries agroalimentaires comme pour les laboratoires de recherche, la réduction des coûts et du temps d'un procédé ou d'une analyse sont des enjeux majeurs. En effet de la rapidité des procédés peut dépendre l'efficacité de l'entreprise, donc la rapidité des analyses est tout d'abord un atout économique. Le second avantage se situe au niveau consommation énergétique. Les analyses longues comme le Dean-Stark (2h) sont très gourmandes en énergie (donc beaucoup de CO₂ dégagé), une accélération de ce procédé permettra de réduire l'impact environnemental. Ainsi, au cours de ces recherches le chauffe-ballon électrique a été remplacé par un chauffage par micro-ondes dans le but de réduire le temps d'analyse

5.1.1 Etudes préliminaires

Dans un premier temps, des études préliminaires visant à optimiser les performances du nouvel appareillage ont été menées. Le toluène n'est pas totalement transparent aux micro-ondes mais sa montée en température sous l'effet de l'énergie micro-ondes reste longue (près de 40 min) pour atteindre le point d'ébullition. L'ajout d'un barreau aimanté en Weflon™ permet de pallier le problème et la température d'ébullition est ainsi atteinte en moins de 5 min (Figure 56).

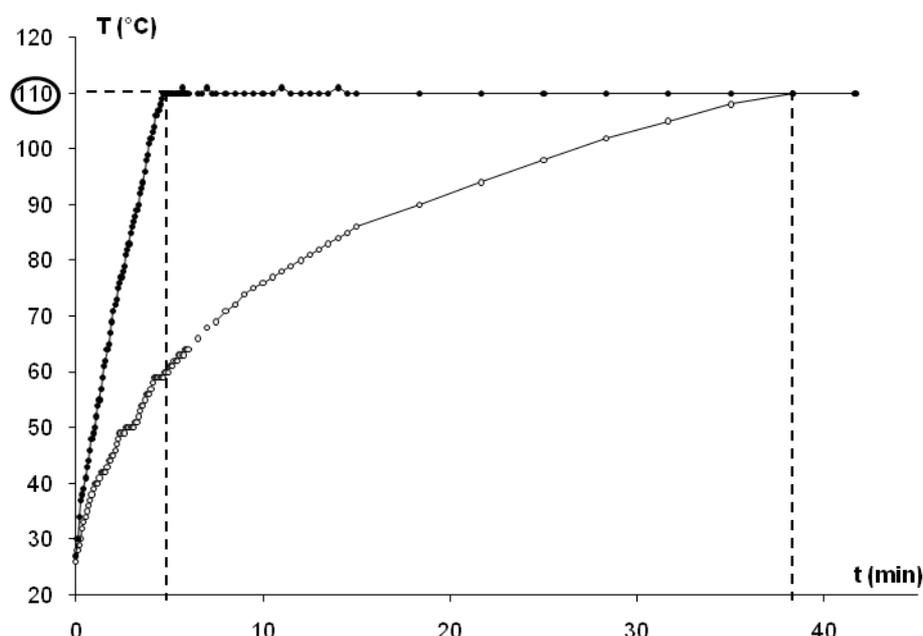


Figure 56 : Evolution de la température du toluène soumis aux micro-ondes en fonction du temps et de la présence ou non d'un barreau de weflon (●) Toluène + weflon + 700 W et (○) Toluène + 700 W

D'autre part, l'étude menée sur la cinétique de la distillation azéotropique (Figure 57) définissant les différentes phases nous a permis d'avoir des points de comparaison pour les deux types de procédure.

Les résultats montrent que la distillation se trouve nettement accélérée et que la puissance optimale choisie de 700 W permet de déterminer la teneur en eau des olives en moins de 400 secondes à comparer à 7200 secondes de façon conventionnelle.

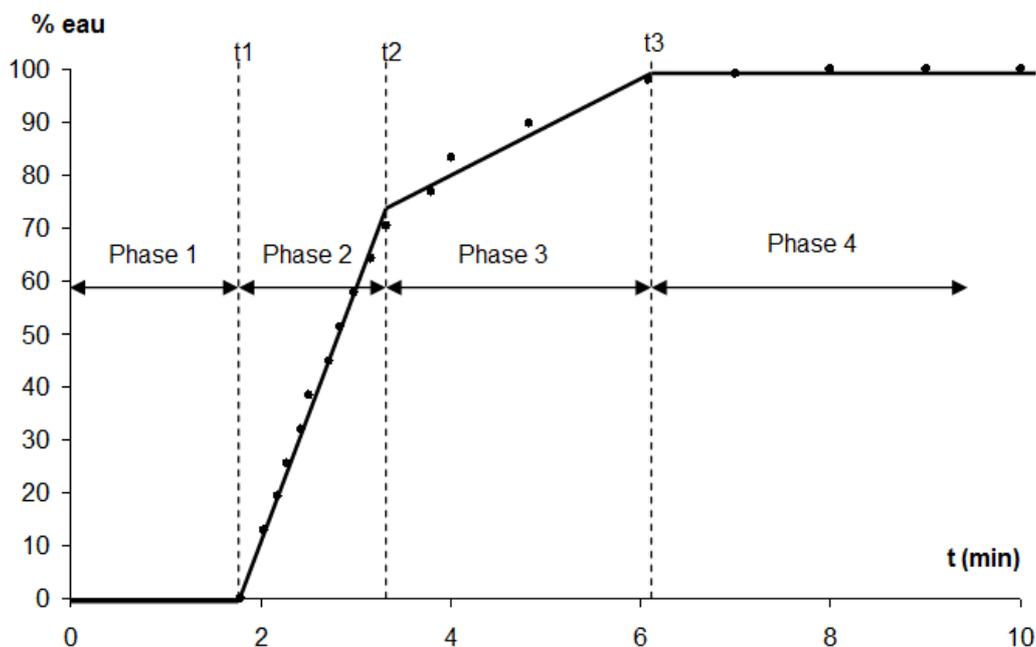


Figure 57 : Phases de distillation : % d'eau en fonction du temps. Les différentes phases correspondent à (1) la montée de la température dans le réacteur jusqu'à 84°C, (2) : eau de la matrice facile à extraire, (3) : eau intrinsèque plus difficile à extraire

5.1.2 Généralisation de la méthode

Afin de généraliser la méthode, une gamme étendue d'échantillons alimentaires a été testée selon les conditions optimisées (Tableau 32).

Tableau 32 : Généralisation de la méthode pour différentes matrices alimentaires

Matrices alimentaires	Dean Stark conventionnel (% eau)	Dean Stark assisté par micro-ondes (% eau)
Echalote	80,1 ± 0,6	80,0 ± 1,2
Ail	63,5 ± 0,8	63,6 ± 2,2
Camembert	52,6 ± 0,4	51,6 ± 0,4
Romarin	60,4 ± 2,5	61,8 ± 1,4
Viande	64,6 ± 0,60	63,5 ± 0,5
Olive	43,4 ± 1,3	43,5 ± 1,4

Les résultats montrent que les teneurs en eau sont équivalentes quelle que soit la méthode employée. La distillation azéotropique sous micro-ondes se trouve ainsi accélérée par différents facteurs : le chauffage sélectif des micro-ondes sur l'eau et par leur application au cœur de la matrice et la présence du barreau magnétique en Weflon™ (Téflon-Graphite) positionné dans le réacteur permettant le chauffage du solvant par conduction.

5.1.3 Bilan

La technique de Dean-Stark assistée par micro-ondes a permis d'obtenir des résultats hautement reproductibles en moins de 10 min, la technique s'avère être une alternative innovante, originale et efficace pour la détermination du taux d'humidité contenue dans les olives fraîches. La nette réduction de la durée de la procédure de 10 min au lieu de 120 min pour la méthode conventionnelle a un impact non négligeable sur l'environnement. La détermination de la teneur en eau par micro-ondes a nécessité une énergie de 0,15 kWh à comparer avec 0,45 kWh pour la méthode conventionnelle à laquelle, il faut ajouter l'énergie nécessaire pour les réfrigérants. Le calcul de la quantité de CO₂ rejeté dans l'atmosphère totalise 176 g de CO₂ pour la détermination de la teneur en eau assistée par micro-ondes et 800 g pour la méthode conventionnelle.

5.2 Le Dean Stark utilisant un agro-solvant : le *d*-limonène

Dans le domaine de la chimie, deux sortes de solvants peuvent être utilisés : les solvants issus de l'industrie pétrolière et les biosolvants issus de matières premières renouvelables et en particulier de la biomasse. Ils présentent l'avantage d'offrir, d'une part, une alternative aux ressources fossiles et, d'autre part, un bilan environnemental positif. Depuis des décennies, le toluène est utilisé pour la détermination de la teneur en eau dans les matrices alimentaires. Cependant de nombreux travaux traitent des effets toxiques et délétères de ce solvant sur le système nerveux et le système auditif (Lammers, 2005 ; McWilliams, 2000 ; Hass, 1999). En dépit de son classement dans les solvants toxiques, le toluène est toujours le solvant de choix pour la détermination de la teneur en eau. L'étude proposée consiste en la mise au point et le développement d'une approche verte et originale pour la détermination de la teneur en eau dans les matrices alimentaires.

5.2.1 Cinétiques de distillation

Les études de cinétique de distillation azéotrope pour les deux solvants montrent des allures sensiblement équivalentes malgré l'obtention de la première goutte d'eau légèrement retardée (3 min) en présence de *d*-limonène. Ceci peut s'expliquer par une durée de chauffage plus longue nécessaire pour atteindre la température d'ébullition du mélange azéotrope *d*-limonène-eau de 97,4°C contre 84°C pour le mélange toluène-eau (Figure 58).

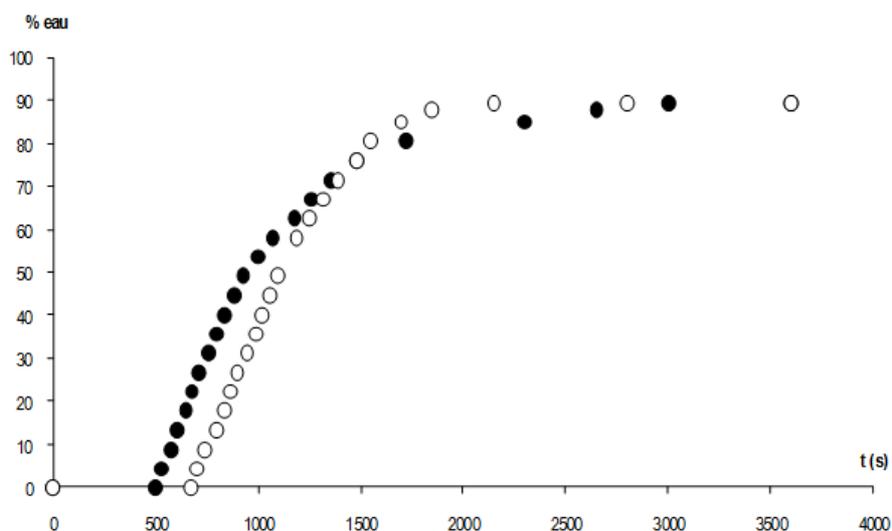


Figure 58 : Pourcentage d'eau issue de carottes obtenu par distillation azéotrope en fonction du temps : (o) *d*-limonene, (●) toluene

Tableau 33 : Répétabilité et tests statistiques de comparaison

	Expériences ^a										Moy.	ET	DSR (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
<i>Répétabilité</i>													
DSC	90,6	90,9	86,4	88,8	88,3	87,7	87,9	87,0	88,5	87,4	88,4	1,5	1,6
DSL	89,9	89,9	89,8	89,6	89,9	89,9	90,4	86,5	88,5	89,5	89,4	1,1	1,3
<i>Comparaison statistique</i>													
	S^2_{CDS}		S^2_{LDS}		F_{CAL} ^b		F_{TAB} ^c		T_{CAL} ^d		T_{TAB} ^e		
	2,10		1,59		1,32		3,18		1,62		2,10		

^a Teneur en eau dans les oignons en %

^b F calculée par le test de Fisher-Snedecor

^c F de la table pour $\alpha=0.05$

^d t value calculée par le test de Student

^e t value de la table pour $\alpha= 0.05$

ET Ecart-type

DSR Déviation standard relative

La comparaison des moyennes sur 10 expériences réalisées pour chaque solvant (Tableau 33) montre des teneurs en eau (exprimées en % m/m) quasiment équivalentes : $88,4 \pm 1,5$ pour la teneur en eau obtenue par le Dean-Stark conventionnel (DSC) contre $89,4 \pm 1,1$ pour celui utilisant du *d*-limonène (DSL). La déviation standard relative montre une très faible dispersion autour de la valeur moyenne : 1,6 % et 1,3 % respectivement pour le *d*-limonène et le toluène ce qui a été confirmé par le test de Fisher Snedecor qui donne une valeur de F calculée de 1,32 à comparer à une valeur de F théorique de 3,18 pour un seuil de confiance de 0,95. Le test de Student effectué pour tester l'homogénéité des moyennes a permis de mettre en évidence que les deux moyennes ne sont pas statistiquement différentes. La valeur de T calculée est de 1,62 donc inférieure à la valeur du T donnée par la table de Student pour un seuil de confiance de 0,95 (2,10).

5.2.2 Généralisation de la méthode

L'utilisation du *d*-limonène pour la détermination de l'eau a été généralisée à différents types de matrices alimentaires (Tableau 34). Les résultats obtenus montrent qu'aucune différence significative n'est observable pour les différentes matrices testées et ce pour des durées équivalentes.

Tableau 34 : Teneur en eau des différentes matrices obtenue par distillation avec le toluène ou le *d*-limonène

Matrices alimentaires	Toluène (% eau)	<i>d</i> -limonène (% eau)
Oignons	$88,4 \pm 1,5$	$89,4 \pm 1,4$
Carottes	$89,3 \pm 0,5$	$89,5 \pm 0,7$
Ail	$68,0 \pm 0,7$	$68,6 \pm 1,9$
Mozzarella	$61,7 \pm 1,9$	$61,8 \pm 1,5$
Viande	$64,1 \pm 0,5$	$64,0 \pm 0,3$
Romarin	$64,1 \pm 0,6$	$65,1 \pm 1,8$
Poireaux	$90,6 \pm 1,3$	$88,0 \pm 1,0$
Sauge	$71,1 \pm 1,0$	$70,4 \pm 2,2$
Menthe	$88,2 \pm 1,8$	$87,6 \pm 1,7$

5.2.3 Bilan

Cette étude montre que le *d*-limonène peut être considéré comme une alternative originale et intéressante en réponse au toluène, solvant habituellement employé pour la détermination de la teneur en eau.

5.3 Conclusions sur le Dean Stark

Les deux techniques de Dean Stark développées au cours de ces travaux de thèse permettent d'effectuer un suivi de la teneur en eau dans les olives au cours de leur maturation. Cependant aucun résultat ne permet d'affirmer qu'il existe un lien direct entre le phénomène de boues observé et une teneur particulière en eau. Le problème doit donc probablement avoir une autre origine (changement de structure cellulaire après un gel sur l'arbre...) ou est la résultante de plusieurs facteurs. Si la solution au problème des boues n'a pas pu être trouvée par un simple dosage de l'eau, ces recherches nous ont amenés à développer des techniques intéressantes dans le domaine de la chimie analytique.

En effet nous avons démontré que des techniques alternatives permettent d'obtenir les mêmes résultats que les méthodes conventionnelles, mais en réduisant l'impact environnemental et/ou en réduisant le temps d'analyse. D'autres solvants verts tels que l' α -pinène sont actuellement en cours d'essai et la combinaison des deux techniques, micro-ondes et agro-solvant, est également en cours de développement.

Conclusion générale

L'huile d'olive fait partie de la culture méditerranéenne, tant d'un point de vue historique que d'un point de vue alimentaire. Ses propriétés organoleptiques sont en effet reconnues par les grands chefs cuisiniers mais si elle se retrouve dans les cuisines depuis la civilisation grecque, c'est bien pour ses propriétés nutritionnelles. En effet elle est composée à 85 % d'acides gras insaturés (l'acide gras majoritaire étant l'acide oléique) dont une bonne proportion d'acides gras poly-insaturés (10 %). Parmi eux on retrouve des oméga 6 tels que l'acide linoléique (C18:2 n-6) et des oméga 3 tels que l'acide α -linoléique (C18:3 n-3). Ces acides gras sont dits « acides gras essentiels » car ils ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain et doivent donc être apportés par l'alimentation. Le principal atout nutritionnel de l'huile d'olive réside cependant dans sa richesse en composés phénoliques ayant des propriétés antioxydantes. S'ils sont capables de prévenir l'oxydation de l'huile d'olive et de prolonger sa conservation, les scientifiques ont surtout cherché à déterminer leur impact sur la santé humaine et notamment sur les maladies dégénératives. L'intérêt est de déterminer dans quelle mesure ces molécules peuvent ralentir l'apparition de ces maladies ou réduire leur impact une fois apparues. L'huile d'olive contient toujours une certaine quantité de composés phénoliques, mais cette quantité peut être très variable d'une huile à une autre.

La première partie de la thèse a donc été focalisée sur le travail de terrain au sein même des moulins fabricant de l'huile d'olive. La première étape dans la fabrication de celle-ci est le broyage des olives. Dans les moulins, deux grands types de procédés existent : le broyage à la roue de granit et le broyage par des systèmes métalliques. Lors du broyage à la meule tournante, le poids des roues de granit va écraser les olives et leur rotation va déchirer la pulpe de ces dernières. Ainsi, au niveau cellulaire, nous retrouvons des empilements de couches de cellules où une partie de l'huile peut être retenue, ce qui justifie en partie les rendements plus faibles que ceux observés lors d'un broyage métallique. Dans ce dernier, les bras métalliques situés sur un axe fixe sont entraînés dans une rotation à environ 3000 tr/min. Cela va provoquer l'éclatement des olives et des coupes franches au niveau cellulaire. Ces deux phénomènes vont permettre une libération facilitée de l'huile d'olive de la pulpe de l'olive. Le broyage plus fin permet également une meilleure extraction des composés phénoliques et les huiles d'olive sont plus riches en antioxydants en fin de chaîne. Le système de broyeurs métalliques est donc à privilégier par rapport à un système à meules tournantes dans un but d'amélioration de la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive.

Le second facteur influençant la teneur finale en composés phénoliques est le type de procédé de séparation des phases liquides utilisé. En effet, deux types de procédé peuvent être utilisés : la décantation et la centrifugation. Lors de la décantation gravitationnelle, le mélange d'eau et d'huile est placé dans de grandes cuves en inox et la séparation entre les deux phases se fait par simple différence de densité. Les composés phénoliques sont alors séparés en fonction de leur affinité à l'une ou l'autre des phases : la majorité des composés phénoliques sont éliminés dans les margines car ce sont des composés polaires, mais une bonne proportion se retrouve également dans l'huile. Lors de l'utilisation d'une centrifugeuse, ce coefficient de partage entre les deux phases est modifié et le passage des composés phénoliques dans la phase aqueuse est accentué. L'huile d'olive provenant des systèmes utilisant une centrifugation en fin de chaîne est donc moins riche en composés phénoliques qu'une huile ayant subi une simple décantation. Ces observations posent cependant un certain nombre de problèmes techniques puisque le broyage à marteaux génère trop d'émulsion pour que les phases liquides puissent se séparer par simple décantation. Les avancées technologiques ont permis le développement de systèmes dits à deux phases pour faciliter le travail des mouliniers, mais nous avons pu constater que ce système constitue également une avancée sur le plan nutritionnel.

En effet, d'un point de vue technologique, le moulinier a moins de manipulations à réaliser, notamment au niveau des coproduits générés lors de la trituration des olives. Les centrifugeuses horizontales à deux phases n'ont pas ou très peu besoin d'eau pour fonctionner contrairement aux systèmes à trois phases. La première conséquence est une réduction des coûts pour le moulinier, à la fois en entrée et en sortie de production puisque le faible ajout d'eau en entrée génère moins de coproduits à traiter en sortie. L'impact qui nous intéressait le plus dans ces travaux était orienté sur l'effet éventuel sur la qualité nutritionnelle de l'huile et là encore ce système constitue un atout. En effet, les fortes quantités d'eau ajoutées dans les systèmes à trois phases ont pour effet de diluer les composés phénoliques et perturbent également leur coefficient de partage entre l'huile et l'eau. En plus de cet effet de dilution, les huiles issues d'un système à trois phases doivent être centrifugées afin d'être séparées des margines. Dans un système à deux phases, l'huile d'olive est directement extraite de la centrifugeuse horizontale donc cette étape de centrifugation n'est pas nécessaire ce qui préserve les composés phénoliques. La chaîne de fabrication utilisant un broyeur métallique couplé à une centrifugeuse horizontale à deux phases semble donc être le meilleur compromis dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive dans les moulins.

Une fois sortie des moulins, l'huile d'olive doit être commercialisée. Cette commercialisation ne posait pas de problèmes jusqu'à récemment car la production oléicole française restait faible et même marginale au niveau européen. Cependant, l'arrivée de jeunes oliviers à pleine maturité pour la production d'olives a permis d'augmenter fortement la production française. Ainsi, les volumes produits au cours de la campagne 2008/2009 ont été extrêmement élevés et le secteur oléicole a dû faire face à un problème d'écoulement de stocks. Certains groupements de producteurs avaient demandé la mise en place d'Appellations d'Origine Contrôlée et d'Appellations d'Origine Protégée de façon à ce que leurs pratiques soient reconnues. Même si ces appellations ne faisaient en aucun cas référence à une qualité supérieure de l'huile d'olive, elles ont tout de même permis une meilleure reconnaissance et une meilleure valorisation de ces produits. Cependant les excédents générés au cours de cette campagne 2008/2009 n'ont pas pu être absorbés par de simples appellations.

Au cours de cette thèse nous avons donc cherché d'autres applications potentielles à l'huile d'olive. Dans un premier temps nous avons donc choisi d'utiliser l'huile d'olive en tant que solvant « vert » d'extraction. Sa composition chimique permet en effet de solubiliser les molécules liposolubles et la charge en composés antioxydants permet une bonne protection de ces molécules vis-à-vis de l'oxydation une fois extraites. L'une des molécules les plus difficiles à extraire est le β -carotène notamment présent dans les carottes. Cette molécule est très utilisée dans le domaine de la cosmétique et des compléments alimentaires car elle possède une double particularité, celle d'être une provitamine et celle d'être un antioxydant puissant. Le problème est que cette molécule nécessite l'utilisation de solvants pétroliers toxiques pour son extraction. Cela implique de grands coûts de purification ensuite pour éliminer toute trace de solvant. L'autre difficulté est la forte sensibilité de la molécule à la lumière et à la température. Nous pouvons donc imaginer que plus les temps d'extraction et de purification sont longs, plus il sera difficile d'obtenir de bon rendements d'extraction. L'utilisation d'une extraction assistée par ultrasons est l'une des voies d'étude pour permettre un plus fort rendement d'extraction. Nous avons donc cherché à optimiser les paramètres d'une extraction du β -carotène assistée par ultrasons. Trois paramètres ont été testés après optimisation de la proportion entre huile et poudre de carotte utilisée : le temps d'extraction, la température et la puissance ultrasonore appliquée. Afin de protéger le β -carotène de l'oxydation, nous avons volontairement choisi des conditions d'extraction douces : temps inférieur à 35 minutes et température inférieure à 34°C. Ces conditions permettaient d'éviter une dégradation du β -carotène. Nous avons ainsi pu obtenir

des résultats très encourageants puisque l'extraction assistée par ultrasons a permis d'obtenir des concentrations de β -carotène de l'ordre de 300 mg/L d'huile sans utilisation de solvant pétrolier.

Nous avons ensuite décidé d'utiliser ces propriétés d'extraction assistée par ultrasons dans l'huile à un autre domaine : celui de l'aromatisation. En effet depuis quelques années il y a un regain d'intérêt pour ce procédé car il permet de diversifier la gamme de produits oléicoles disponibles. L'aromatisation de l'huile d'olive se fait très majoritairement par des plantes méditerranéennes telles que le thym, le romarin et le basilic. Ces produits sont très prisés des consommateurs, notamment ceux d'Europe du Nord et ils permettent aux oléiculteurs non seulement de diversifier leur gamme mais surtout d'avoir des produits à forte valeur ajoutée qui se vendent donc plus facilement. L'aromatisation des huiles se fait habituellement par de longues macérations d'huiles mises en contact avec la plante désirée ou par ajout d'arômes extraits séparément. Les principaux problèmes généralement soulevés par la macération sont ceux des grands volumes nécessaires, du temps de diffusion des arômes de la plante vers l'huile d'olive et celui du volume de plante nécessaire. Afin de répondre en partie à ces problèmes, une aromatisation assistée par ultrasons a été développée au cours de ces travaux de thèse. Lors de ces expériences nous avons réussi à démontrer que des niveaux d'aromatisation élevés pouvaient être atteints après seulement 15 minutes d'extraction contre plusieurs heures ou plusieurs jours nécessaires par simple macération.

Les travaux de recherche entrepris au cours de cette thèse sur l'amélioration des qualités nutritionnelles de l'huile d'olive ont donc permis d'apporter des avancées sur deux plans. Tout d'abord sur celui d'une meilleure compréhension des phénomènes régissant l'extraction de l'huile d'olive dans les moulins en ciblant les étapes clés dans l'extraction de l'huile d'olive. L'utilisation de ces données permettra dans le futur d'extraire des huiles d'olive naturellement plus riches en antioxydants ce qui leur permettra une meilleure valorisation. La seconde avancée importante concerne l'enrichissement post récolte assisté par ultrasons. Cette technologie permet l'aromatisation de l'huile d'olive ou son enrichissement en molécules bioactives de façon rapide et peu onéreuse. Ces méthodes sont donc facilement utilisables par les mouliniers et peuvent leur permettre d'élargir leur gamme de produits issus de l'huile d'olive.

Références

- Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P. & Mason T.J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11 (3-4) pp 261-265.
- Amirante P., Clodoveo M. L., Dugo G., Leone A. & Tamborrino A. (2006) Advance technology in virgin olive oil production from traditional and de-stoned pastes: Influence of the introduction of a heat exchanger on oil quality. *Food Chemistry*. 98 (4) pp 797-805.
- Andrews P., Busch J. L. C. H., Joode T. D., Groenewegen A. & Alexandre H. (2003) Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside agglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (5) pp 1415-1420.
- Angerosa F. (2000) Sensory quality of olive oil. Dans J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), Handbook of olive oil: analysis and properties. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publications, Inc.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C. & Vito R. (2000b). Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*. 68 (3) pp 283-287.
- Angerosa F. (2002) Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104 (9-10) pp 639-660.
- Aparicio R., Morales M. T. & Alonso V. (1997) Authentication of European virgin olive oils by their chemical compounds, sensory attributes, and consumers' attitude. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (4) pp 1076-1083.
- Aparicio R., Roda L., Albi M. A. & Gutiérrez F. (1999) Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (10) pp 4150-4155.
- Araus K., Uquiche E. & Del Valle J. M. (2009) Matrix effects in supercritical CO₂ extraction of essential oils from plant material. *Journal of Food Engineering*. 92 (4) pp 438-447.

Asfaw N., Licence P., Novitskii A. A. & Poliakoff M. (2005) Green chemistry in Ethiopia: the cleaner extraction of essential oils from *Artemisia afra*: a comparison of clean technology with conventional methodology. *Green Chemistry*. 7 (5) pp 352-356.

Association Française Interprofessionnelle de l'Olive - UGO - UNIGC (2009) Graphique : Huile d'olive extraite des olives de production française dans les moulins à huile de France depuis 1980.

Barbero G. F., Liazid A., Palma M. & Barroso C. G. (2008) Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*. 75 (5) pp 1332-1337.

Bascetta E., Gunstone F. D. & Walton J. C. (1983) Electron spin resonance study of the role of vitamin E and vitamin C in the inhibition of fatty acid oxidation in a model membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*. 33 (2) pp 207-210.

Beric T., Nikolic B., Stanojevic J., Vukovic-Gacic B. & Knezevic-Vukcevic B. (2008) Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 46 (2) pp 724-732.

Bianchi F., Careri M., Mangia A. & Musci M. (2007) Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of Separation Science*, 30 (4) pp 563-572

Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., & Saila A. (1999) On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 31 (8) pp 971-974.

Boskou D. (Ed.) (1996) Olive oil: chemistry and technology (1st edition). Champaign Illinois: American oil chemists society. USA. 268 pages.

Boskou D., Blekas G. & Tsimidou M. (2006) Olive oil composition. Dans D. Boskou (Ed.), Olive oil, chemistry and technology (2nd edition). Champaign Illinois: American oil chemists society. USA. pp 41-72.

Box J.D. (1983) Investigation of the Folin–Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water research*. 17 (5) pp 511-525.

Brenes M., Hidalgo F. J., Garcia A., Rios J. J., Garcia P., Zamora R. & Garrido A. (2000) Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American oil Chemist's Society*. 77 (7) pp 715-720.

Brenes M., Garcia A., Rios J. J., Garcia P. & Garrido A. (2002) Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *The International Journal of Food Science and Technology*. 37 (6) pp 615-625.

Brescia M. A., Pugliese T., Hardy E. & Sacco A. (2007) Composition and structural investigations of ripening of table olives, *Bella della Daunia*, by means of traditional and magnetic resonance imaging analyses. *Food Chemistry*. 105 (1) pp 400-404.

Brook R. D., Franklin B., Cascio W., Hong Y., Howard G., Lipsett M., Luepker R., Mittleman M., Samet J. & Tager I. (2004) Air pollution and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation*. 109 (21) pp 2655-2671.

Burton G. W. & Ingold K. U. (1986) Vitamin E: Application of the principles of physical organic Chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*. 19 pp 194-201.

Cabredo-Pinillos S., Cedron-Fernandez T., Gonzalez-Briongos M., Puente-Pascual L. & Saenz-Barrio C. (2006) Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method. *Talanta*. 69 (5) pp 1123-1129.

Caponio F., Alloggio V. & Gomes T. (1999) Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*. 64 (2) pp 203-209.

Charbonnier, A. (1982). Main conclusion drawn from the International Symposium on the recent medical researches on the value of the olive oil to health (pp. 1-4) Paris, 17 Novembre.

Chemat F. & Hoarau N. (2004) Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) for an ultrasound food processing operation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11 (3-4) pp 257-260.

Chemat F. (2009) Essential oils: green extraction and applications, *HKB*, New Delhi, Inde.

Chen F., Sun Y., Zhao G., Liao X., Hu X., Wu J. & Wang Z. (2007) Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14 (6) pp 767-778.

Codex alimentarius (1989) Norme codex pour les huiles d'olive vierges et raffinées et pour l'huile de grignons d'olive raffinée. Codex STAN 33-1981 (Rév. 1-1989).

Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement (2005) Accord international de 2005 sur l'huile d'olive et les olives de table. Nations Unies TD/OLIVE.OIL.10/6.

Conseil Oléicole International (1997) Encyclopédie Mondiale de l'Olivier. Plaza and James Editors S. A.

Conseil Oléicole International (2007) Analyse sensorielle de l'huile d'olive: méthode d'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge. COI/T.20/Doc.n°15/Rev.2. septembre 2007.

Conseil Oléicole International (2009a) Production mondiale d'huile d'olive, tableau 1. Novembre 2009.

Conseil Oléicole International (2009b) Consommation mondiale d'huile d'olive, tableau 4. Novembre 2009.

Da Silva T. M., Munhoz R. P., Alvarez C., Naliwaiko K., Kiss A., Andreatini R. & Ferraz A.C. (2008) Depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty acid supplementation. *Journal of Affective Disorders*. 111 (2-3) pp 351-359.

Del Caro A., Vacca V., Poiana M., Fenu P. & Piga A. (2006) Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits. *Food Chemistry*. 98 (2) pp 311-316.

Da Porto C., Decorti D. & Kikic I. (2009) Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L., to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*. 112 (4) pp 1072-1078.

- Del Rio D., Stewart A. J. & Pellegrini N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 15 (4) pp 316-328.
- Di Giovacchino L., Sistili S. & Di Vincenzo D. (2002) Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and technology*. 104 (9-10) pp 587-601
- Doll R., Payne P. & Waterhouse J., (Eds.) (1966) *Dans: Cancer Incidence in Five Continents Vol. I*, Geneva, UICC, Berlin: Springer Verlag. Germany.
- Erkan N., Ayranci G. & Ayranci E. (2008) Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*. 110 (1) pp 76-82.
- Esti M., Contini M., Moneta E. & Sinesio F. (2009) Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage. *Food Chemistry*. 113 (4) pp 1095-1110
- Farhat A., Ginies C., Romdhane M. & Chemat, F. (2009) Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: Experimental and theoretical study. *Journal of Chromatography A*. 1216 (26) pp 5077-5085.
- Fedeli E., (1977) Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. 15 pp 57-74.
- Ficarra P., Ficarra R., De Pasquale A., Monforte M. T. & Calabro M. L. (1991) HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Il farmaco*. 46 (6) pp 803-809.
- Floyd R. A. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 4 (9) pp 2587–2597.
- Food and Agriculture Organization (2001) Rapport du comité du codex sur les graisses et les huiles – Annexe IV : Projet de norme pour les huiles d'olive et les huiles de grignons d'olive. Archives de documents de la FAO.
- Franceschi S., Favero A., Decarli A., Negri E., La Vecchia C., Ferraroni M., Russo A., Salvini S., Amadori D. & Conti E. (1996) Intake of macronutrients and risk of breast cancer. *Lancet*. 347 (9012) pp 1351-1356.

- Franceschi S., La Vecchia C., Russo A., Favero A., Negri E. & Conti E. (1998) Macronutrient intake and risk of colorectal cancer in Italy. *International Journal of Cancer*. 76 (3) pp 321-324.
- Frankel E. N., Garwood R. F., Khambay B. P. S., Moss G. P. & Weedon B. C. L. (1984) Stereochemistry of olefin and fatty acid oxidation. Part 3. The allylic hydroperoxides from the autoxidation of methyl oleate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* (10) pp 2233-2240.
- Garcia A., Brenes M., Garcia P., Romero C. & Garrido A. (2003) Phenolic content of commercial olive oils. *European Food Research and Technology*. 216 (6) pp 520-525.
- Garcia-Villalba R., Carrasco-Poncorbo A., Oliveras-Ferraro C., Vasquez-Martin A., Menéndez J. A., Segura-Carretero A. & Fernandez-Gutiérrez A. (2010) Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51 (2) pp 416-429.
- Gardner C. D. & Kraemer H. C. (1995) Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids: a meta-analysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 15 (11) pp 1917-1927.
- Gilbert D. L. & Colton C. A. (1999) Chemistry of reactive oxygen species. Dans Gilbert D. L. & Colton C. A. (Eds) *Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach*. Springer Dordrecht. ND. pp 33-73.
- Gilbert D. L. & Colton C. A. (1999) Environmental pro- and antioxidants. In Gilbert D. L. & Colton C. A. (Eds) *Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach*. Springer Dordrecht. ND. pp 317-393.
- Gille L., Rosenau T., Koslov A. V. & Gregor W. (2008) Ubiquinone and tocopherol: Dissimilar siblings. *Biochemical Pharmacology*. 76 (3) pp 289-302.
- Gimeno E., Castellote A. J., Lamuela-Raventos R. M., De la Torre M. C. & Lopez-Sabater M. C. (2002) The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*. 78 (2) pp 207-211.

Gomez-Rico A., Fregapane G. & Desamparados M. S. (2008) Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*. 41 (4) pp 433-440.

Gomez-Rico A., Desamparados M. S. & Fregapane G. (2009) Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to Etc in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. *Cornicabra* and *Morisca*). *Food Research International*. 42 (8) pp 1067-1076.

Gutierrez F., Jimenez B., Ruiz A & Albi M. A. (1999) Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties pictual and hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (1) pp 121-127.

Gutierrez-Rosales F., Rios J. J. & Gomez-Rey M. L. (2003) Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line highperformance liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (20) pp 6021-6025.

Gutteridge J. M. C. & Halliwell B. (Eds) (1994) Metals and oxygen: respiration, oxidation, and oxygen toxicity. Dans *Antioxydants in nutrition, health, and disease*. Oxford University Press, USA. pp 24-39.

Harel S. & Talmi A. (1957) Estimation of Moisture and Water of Crystallization by Azeotropic Distillation. *Analytical Chemistry* 29 (11) pp 1694-1697.

Harwood J. L. & Aparicio R. (Eds.) (2000) *Handbook of olive oil : analysis and properties*. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publications, Inc. 620 pages.

Hashim Y. Z. H. Y., Rowland I. R. McGlynn H., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S., Montedoro G. F., Kaisalo K. & Gill C. R. I. (2008) Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro*. *International Journal of Cancer*. 112 (3) pp 405-500.

Hass U., Lund S. P., Hougaard K. S. & Simonsen L. (1999) Developmental Neurotoxicity After Toluene Inhalation Exposure in Rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 21 (4) pp. 349-357.

- Herrera M. C. & Luque de Castro M. D. (2005) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 1100 (1) pp 1-7.
- Jadhav D., Rekha B. N., Gogate P. R., & Rathod V. K. (2009) Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound-assisted extraction, *Journal of Food Engineering*. 93 (4) pp 421-426.
- Japon-Lujan R., Luque-Rodriguez J. M. & Luque de Castro M. D. (2006) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of chromatography A*. 1108 (1) pp 76-82.
- Judd J. T., Clevidence B. A., Muesing R. A., Wittes J., Sunkin M. E. & Podczasy J. J. (1994) Dietary trans fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 59 (4) pp 861-888.
- Kalua C. M., Allen M. S., Bedgood D. R., Bishop A. G., Prenzler P. D. & Robards K. (2007) Olive oil volatile compounds, flavour development and quality : A critical review. *Food Chemistry*. 100 (1) pp 273-286.
- Kanakis C. D., Daferera D. J., Tarantilis P. A. & Polissiou M. G. (2004) Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexane-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52 (14) pp 4515-4521.
- Keys A. (1980) Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart diseases. Cambridge, Massachusetts, USA. Harvard University Press.
- Kiritsakis A. K. (1998) Flavor of olive oil – a review. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 75 (6) pp 673-681.
- Kohyama N., Nagata T., Fujimoto S. & Sekiya K. (1997) Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61 (2) pp 347-350.
- Kratz M., Cullen P., Kannenberg F., Kassner A., Fobker M., Abuja P. M., Assmann G. & Wahrburg U. (2002) Effect of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low density lipoprotein. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56 (1) pp 72-81.

- Kris-Etherthon P. M. (1999) Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 100 (11) pp 1253-1258.
- Lammers J. H. C. M., Van Asperen J., de Groota D. & Pels Rijckena W. R. (2005) Behavioural effects and kinetics in brain in response to inhalation of constant or fluctuating toluene concentrations in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19 (3) pp 625–634.
- Le Tutor B. & Geudon D. (1992) Antioxidative activities of *Olea europaea* L. leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*. 31 (4) pp 286-292.
- Lee S. J., Umamo K., Shibamoto T. & Lee K. G. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 91 (1) pp 131-137.
- Liangfu Z. & Zelong L., Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15 (5) pp 731-737.
- Logan A. (2004) Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional. *Lipids in Health and Disease*. 3 pp 25-32.
- Ma Y. Q., Chen J. C., Liu D. H. & Ye X. Q. (2009) Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16 (1) pp 57-62.
- Macheix J. J., Fleuriet A. & Billot J. (1990) Fruit phenolics. CRC press. Boca Raton. USA. pp 1-126.
- Manna C., Galletti P., Cucciola V., Montedore G. F. & Zappia V. (1999) Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 10 (3) pp 159-165.
- Marnett L. J. (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*. 424 (1-2) pp 83–95.
- Mason T. J. & Lorimer J. P. (2002) Applied Sonochemistry. *Wiley-VCH*. Weinheim, Allemagne.

Mason T. J., Paniwnik L. & Chemat F. (2003) Chapter 16: Ultrasound as a preservation technique, dans *Food preservation techniques*. P. Zeuthen & L. Bogh-Sorensen (Ed), *CRC Press*. Cambridge, Grande Bretagne.

Mason T. J., Vian M. & Chemat F. (2010) Chapter 11: Ultrasonic processing, dans *Alternatives to Conventional Food Processing*, A. Proctor (Ed.), *RSC*, London, Grande Bretagne.

Mazza G. & Miniati E. (1993) Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. *CRC press*. Boca Raton, USA. pp 64-67.

McWilliams M. L., Chen G. D. & Fechter L. D. (2000) Low-Level Toluene Disrupts Auditory Function in Guinea Pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 167 (1) pp 18–29.

Menendez J. A., Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C., Garcia-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., Fernandez-Gutierrez A. & Segura-Carretero A. (2009) Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (*erbB-2*)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: Relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *International Journal of Oncology*. 34 (1) pp 43-51.

Mercury M., Tschan W., Kehoe R. & Kuechler A. (2007) The presence of depression and anxiety in Parkinson disease. *Disease-a-Month*. 53 (5) pp 296-301.

Morales M. T., Rios J. J. & Aparicio R. (1997) Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: Flavors and off-favors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (7) pp 2666-2673.

Moreno J. J. (2003). Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophage raw 264.7. *Free Radical Biology and Medecine*. 35 (9) pp 1073-1081.

Motard-Bélanger A., Charest A., Grenier G., Paquin P., Chouinard P. Y., Lemieux S., Couture P. & Lamarche B. (2008) Study on the effects of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 87 (3) pp 593-599.

Murkovic M., Lechner S., Pietzka A., Bratacos M. & Katzogiannos E. (2004) Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 61 (1-2) pp 155-160.

Nergiz C. & Ergönül P. G. (2009) Organic acid content and composition of the olive fruits during ripening and its relationship with oil and sugar. *Scientia Horticulturae*. 122 (2) pp 216-220.

Nkondjock A., Shatenstein B., Maisonneuve P. & Ghadirian P. (2003) Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal :a case-control study. *International Journal of Epidemiology*. 32 (2) pp 200-209.

Noltingk B. E. & Neppiras E. A. (1950) Cavitation produced by Ultrasonics. *Proceeding of the Physical Society. Section B*. 63 (9) pp.674-685.

Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B. & Korel F. (2009) Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*. 15 (2) pp 401-410.

Official Method Ca 5a-40 (1989) Free Fatty Acids. *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL, USA.

Official Method Cd 8-53 (1989) Peroxyde Value: Acetic Acid-Chloroform Method. *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL, USA.

Official Method Ce 2-66 (1989) Preparation of Methyl Esters of Long-Chain Fatty Acids. *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL, USA.

Official Method Ce 8-89 (1989) Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by HPLC. *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL, USA.

Official Method Ja 2a-46 (1989) Moisture. *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL, USA.

Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J. P. & Guérère M. (2003) Triacylglycerol and fatty acid compositions of French virgin olive oils. Characterization by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (19) pp 5723-5731.

- Owen R. W., Giacosa A., Hull W. E., Haubner R., Spiegelhalder B. & Bartsch H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*. 36 (10) pp 1235-1247.
- Pala V., Krogh V., Muti P., Chajès V., Riboli E., Micheli A., Saadatian M., Sieri S. & Berrino F. (2001) Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer : a prospective italian study. *Journal of the National Cancer Institute*. 93 (14) pp 1088-1095.
- Palma M. & Barroso C. G. (2002) Ultrasounds-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analitica Chimica Acta*. 458 (1) pp 119-130.
- Pena M. R., Barciela J., Herrero C. & Garcia-Martin S. (2005) Comparison of ultrasound-assisted extraction and direct immersion solid-phase microextraction methods for the analysis of monoterpenoids in wine. *Talanta*. 67 (1) pp 129-135.
- Petroni A., Blasevich M., Salami M., Servili M., Montedoro G. F. & Galli A. (1995) Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*. 78 (1) pp 151-160.
- Pincemail J. & Defraigne J. O. (2003) Le CoEnzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*. 8 (2) pp 55-60.
- Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Vincieri F. F., Cimato A. & Romani A. (2003) Minor polar compounds and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*. 80 (3) pp 331-336.
- Psomiadou E., Tsimidou M. & Boskou D. (2000) α -tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (5) pp 1770-1775.
- Pryor W. A. & Stanley J. P. (1975). A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *The Journal of Organic Chemistry*. 40 pp 3615-3617.
- Reaven P. & Witztum J. L. (1996) Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Annual Review of Nutrition*. 16 pp 51-71.

- Rodrigues S., Pinto G. A. S. & Fernandes F. A. N. (2008) Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15 (1) pp 95-100.
- Romero C., Brenes M, Garcia P. & Garrido A (2002) Hydroxytyrosol 4- β -D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruit and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (13) pp 3835-3839.
- Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 362 (6423) pp 801–809.
- Ross R. (1999) Atherosclerosis, an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 340 (2) pp 115-126.
- Rotondi A., Bendini A., Cerretani L., Mari M., Lercker G. & Gallina Toschi T. (2004) Effect of Olive Ripening Degree on the Oxidative Stability and Organoleptic Properties of Cv. Nostrana di Brisighella Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (11) pp 3649-3654
- Rotondo S. & De Gaetano G. (2000) Protection from cardiovascular disease by wine and its derived products. Epidemiological evidence and biological mechanisms. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 87 pp 90-113.
- Ruther J. (2000) Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 890 (2) pp 313-319.
- Ryan D. & Robards K. (1998) Phenolic compounds in olives. *The Analyst*. 123 (5) pp 31R-44R.
- Ryan D., Prenzler P. D., Lavee S., Antolovich M. & Robards K. (2003) Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (9) pp 2532-2538.
- Saadatian-Elahi M., Toniolo P., Ferrari P., Goudable J., Akhmedkhanov A., Zeleniuch-Jacquotte A. & Riboli E. (2002) Serum fatty acids and risk of breast cancer in a nested case-control study of New York University Women's Health Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 11 (11) pp 1353-1360.

- Salvador M. D., Aranda F., Gomez-Alonso S. & Fregapane G. (2003) Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry*. 80 (3) pp 359-366.
- Serbinova E., Kagan V. E., Han D. & Packer L. (1991) Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radical Biology and Medicine*. 10 (5) pp 263-275.
- Shasha B. & Leibowitz J. (1961) On the oleuropein, the bitter principle of olives. *Journal of Organic Chemistry*. 26 (6) pp 1948-1954.
- Sherwin E. R. (1976) Antioxidants for vegetable oils. *Journal of the American Chemical Society*. 53 pp 430-436.
- Shotipruk A., Kaufman P. B. & Wang H. Y. (2001) Feasability study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha x piperata* using ultrasonic extraction. *Biotechnology progress*. 17 (5) pp 924-928.
- Sinolea (1991) European Patent No. 0252025@, Munich, 2 January 1991. Property of Rapanelli Co., Foligno, Italy
- Soler-Rivas C., Espin J. C. & Wichers H. J. (2000) Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (7) pp 1013-1023.
- Suslick K. S. (1988) Ultrasound : chemical and physical and biological effects, *Wiley-VCH*, Londres, Grande Bretagne.
- Taepavarapruk P. & Song C. (2010) Reduction of acetylcholine release and nerve growth factor expression are correlated with memory impairment induced by interleukin-1beta administrations: effects of omega 3 fatty acid EPA treatment. *Journal of Neurochemistry*. 112 (4) pp 1054-1064.
- Timonen M., Horrobin D., Jokelainen J., Laitinen J., Herva A. & Rasanen P. (2004) Fish consumption and depression: the northern Finland 1966 birth cohort study. *Journal of Affective Disorders*. 82 (3) pp 447-452.
- Topallar H., Bayrak Y. & İşcan M. (1997) A Kinetic Study on the autoxidation of sunflowerseed oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*. 74 (10) pp 1323-1327.

- Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S. & La Guardia M. (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*. 18 (1) pp 98-112.
- Tuck L. K. & Hayball P. J. (2002) Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of nutritional biochemistry*. 13 (11) pp 636-644.
- Tura D., Gigliotti C., Pedo S., Failla O., Bassi D. & Serraiocco A. (2007) Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea L.*) and correlation with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*. 112 (1) pp 108-119.
- Tura D., Failla O., Bassi D., Pedo S. & Serraiocco A. (2008) Cultivar influence on virgin olive (*Olea europaea L.*) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae* 118 (2) pp 139-148.
- Van Dyke B. R. & Saltman P. (1996) Hemoglobin: a mechanism for the generation of hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*. 20 (7) pp 985-989.
- Veillet S., Tomao V., Visinoni F. & Chemat F (2009a) New and rapid analytical procedure for water content determination: Microwave accelerated Dean–Stark. *Analytica Chimica Acta*. 632 (2) pp 203-207.
- Veillet S., Tomao V., Bornard I., Ruiz K. & Chemat F (2009b) Chemical changes in virgin olive oils as a function of crushing systems: Stone mill and hammer crusher. *Comptes Rendus de Chimie*. 12 (8) pp 895-904.
- Veillet S., Tomao V. & Chemat F. (2009c) Ultrasound Assisted Extraction of aromas and antioxidants. Dans F. Chemat (Ed) *Essential oil and aromas green extractions and applications*, HKB, New Delhi, Inde.
- Veillet S., Tomao V. & Chemat F. (2010a) Ultrasounds assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*. *Publication acceptée*.
- Veillet S., Tomao V., Ruiz K. & Chemat F. (2010b) Green procedure using limonene in the Dean Stark apparatus for water determination in food products. *Analytica Chimica Acta*. *Publication acceptée*.

- Venkateshwarlu G., Let M. B., Meyer A. S & Jacobsen C (2004) Modeling the sensory impact of defined combinations of volatile lipid oxidation products on fishy and metallic off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (6) pp 1635-1641.
- Viera O., Laranjinha J., Madeira V. & Almeida L. (1998) Cholesteryl ester hydroperoxyde formation in myoglobin-catalysed low density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. *Biochemical Pharmacology*. 55 (3) pp 333-340.
- Vierhuis E., Servili M., Baldioli M., Schols H. A., Voragen A. G. J. & Montedoro G. F. (2001) Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49 (3) pp. 1218–1223.
- Vinha A. F., Ferreres F., Silva B. M., Valentao P., Gonçalves A., Pereira J. A., Oliveira M. B., Seabra R. M. & Andrade P. B. (2005) Phenolic profile of Portuguese olive fruits (*Olea europaea L.*): Influence of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*. 89 (4) pp 561-568.
- Viola P. (1987) Olive oil and health, International Olive Oil Council, Madrid, Spain.
- Virost M., Tomao V., Colnagui G., Visinoni F. & Chemat F. (2007) New microwave-integrated Soxhlet: an advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A*. 1174 (1-2) pp 138-144.
- Virost M., Tomao V., Ginies C., Visinoni F. & Chemat F. (2008) Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *Journal of Chromatography A*. 1196-1197 (4) pp 57-64.
- Visioli F. & Galli C. (1998) The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Reviews*. 56 (5) pp 142-147.
- Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y. & Li X. (2008) Optimisation of ultrasounds-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*. 106 (2) pp 804-810.
- Westhuyzen J. (1997) The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Annals of Clinical and Laboratory Sciences*. 27 (1) pp 1-10.
- Witte J. S., Ursin G., Siemiatycki J., Thompson W. D., Paganini-Hill A. & Haile R.W. (1997) Diet and premenopausal bilateral breast cancer: a case-control study. *Breast Cancer Research and Treatment*. 42 (3) pp 243-251.

Yang D. P., Kong D. X. & Zhang H. Y. (2007) Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*. 104 (3) pp 1269-1271.

Youdim K. A. & Deans S. G. (1999) Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mechanism of Ageing and Development*. 109 (3) pp 163-175.

Zingg J. M. & Azzi A. (2004) Non-antioxidant activities of vitamin E. *Current Medicinal Chemistry*. 11 (9) pp 1113-1133.

Liste des figures

Figure 1 : Récolte des olives à la main (a) et au peigne manuel (b)

Figure 2 : Meule de granit à deux roues

Figure 3 : Marteaux à 6 bras métalliques

Figure 4 : Broyeurs à marteaux

Figure 5 : Image au MEB de coalescence de gouttelettes d'huile (x150 sur l'image d'origine, prise à 5 kV)

Figure 6 : Bacs de malaxage (a) unique, (b) trois bacs en série

Figure 7 : Presse hydraulique

Figure 8 : Grignons secs à la sortie de la presse

Figure 9 : Centrifugeuse 3 phases

Figure 10 : Sortie d'une centrifugeuse 3 phases, à droite les grignons humides, à gauche l'émulsion huile/eau

Figure 11 : (a) système à 2 phases ouvert, (b) huile d'olive à la sortie du système

Figure 12 : Représentation de l'intérieur d'un système à deux phases et réglage de l'aiguille de prélèvement

Figure 13 : Cuve de décantation en inox

Figure 14 : Centrifugeuse. A droite sortie de l'huile d'olive, à gauche sortie des margines

Figure 15 : Avantages et inconvénients des systèmes de broyage

Figure 16 : Avantages et inconvénients des systèmes de séparation solide/liquide

Figure 17 : Avantages et inconvénients des systèmes de séparation huile/eau

Figure 18 : Exemples d'huiles d'olive présentes sur le marché français

Figure 19 : Hydrolyse du glycérol et libération des acides gras

Figure 20 : Auto-oxydation d'acide linoléique (Frankel, 1984)

Figure 21 : Structure de l'oleuropéine (a) et du ligstroside (b)

Figure 22 : Structure du pinorésinol et de l'acétoxy-pinorésinol

Figure 23 : Structure de la lutéoline et de l'apigénine

Figure 24 : Structure de deux alcools phénoliques : l'hydroxytyrosol et le tyrosol

Figure 25 : Structure de deux acides phénoliques : l'acide vanillique et l'acide caféique.

Figure 26 : Structure des tocophérols

Figure 27 : Structure chimique des composés volatiles majoritaires

Figure 28 : Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol (Tripoli, 2005)

Figure 29 : Dean-Stark par micro-ondes, photo (a) et schéma (b) du montage

Figure 30 : Bac à ultrason de laboratoire de 3 L (R.E.U.S.)

Figure 31 : Prélèvements pour la campagne 2007-2008

Figure 32 : Prélèvements pour la campagne 2008-2009

Figure 33 : Prélèvements pour la campagne 2009-2010

Figure 34 : Vase florentin expérimental

Figure 35 : Séparation des composés phénoliques

Figure 36 : Chromatogramme de la composition en acides gras de l'huile d'olive déterminée par CPG/FID

Figure 37 : Chromatogramme de CPG/SM représentant les composés de la fraction volatile d'une huile d'olive.

Figure 38 : Photographies de microscopie électronique à balayage à 10 kV: (a) et (b) après broyage à marteaux, (c) et (d) après broyage à meule.

Figure 39 : Dosage des tocophérols : chromatogramme (a) et spectre d'absorption correspondant au pic identifié (b)

Figure 40 : Domaines d'utilisation des Ultrasons en fonction de la fréquence

Figure 41 : Propagation de l'onde sonore dans un milieu

Figure 42 : Cycles de compression et de raréfaction induits par une onde sonore

Figure 43 : Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (a) et d'une cellule végétale (b)

Figure 44 : Schéma de dispositifs à ultrasons : bac et sonde

Figure 45 : (A) réacteur d'extraction assistée par ultrason de 3L, (B) équipement à l'échelle pilote : cuve de 50 L et (C et D) équipement à l'échelle industrielle : cuves de 500 et 1000 L

Figure 46 : Avantage de la filtration assistée par ultrasons

Figure 47 : Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons

Figure 48 : Cinétiques d'extraction du β -carotène dans l'huile d'olive en fonction du ratio carotte-huile

Figure 49 : Représentation du plan d'expérience sous forme d'un cube virtuel

Figure 50 : Diagramme de Pareto pour la concentration en β -carotène

Figure 51 : Interprétations graphique des résultats par Statgraphics

Figure 52 : Chromatogramme des composés volatiles de l'huile essentielle de basilic

Figure 53 : Chromatogramme des composés volatiles de l'huile d'olive aromatisée par ultrasons

Figure 54 : Etude cinétique de l'aromatisation par macération assistée par ultrasons

Figure 55 : Photographies de microscopie électronique à balayage de feuilles de basilic

Figure 56 : Evolution de la température du toluène soumis aux micro-ondes en fonction du temps et de la présence ou non d'un barreau de weflon

Figure 57 : Phases de distillation : % d'eau en fonction du temps.

Figure 58 : Pourcentage d'eau issue de carottes obtenu par distillation azéotropique en fonction du temps : (o) *d*-limonene, (●) toluene

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition de la production mondiale d'huile d'olive (campagne 2009/2010) (COI, 2009a)

Tableau 2 : Répartition de la consommation mondiale d'huile d'olive (campagne 2009/2010) (COI, 2009b)

Tableau 3 : Répartition géographique de la production française (campagne 2008/2009) (AFIDOL, 2009)

Tableau 4 : Données physico-chimiques de classification des huiles (Food and Agriculture Organization (FAO), 2001 et Codex Alimentarius, 1989)

Tableau 5 : Caractéristiques complémentaires des huiles d'olive (Codex Alimentarius, 1989)

Tableau 6 : Composition en acide gras d'une huile d'olive selon les résultats d'Ollivier *et al.* (2003) et selon la norme du codex alimentarius

Tableau 7 : Solvants et réactifs utilisés au cours des travaux

Tableau 8 : Mode opératoire pour l'utilisation du kit de dosage des polyphénols

Tableau 9 : Gradient de solvants pour le dosage des phénols par CLHP

Tableau 10 : Programmation des expériences par Statgraphics

Tableau 11 : Impact du broyage sur les caractéristiques physicochimiques des huiles

Tableau 12 : Concentrations en composés phénoliques déterminées par CLHP

Tableau 13 : Composition en acides gras des huiles issues d'un broyage à meule traditionnelle ou d'un broyeur à marteaux

Tableau 14 : Composition de la fraction volatile de l'huile d'olive déterminée par CPG/SM

Tableau 15 : Paramètre physicochimiques des huiles d'olive en fonction du procédé de séparation huile/eau

Tableau 16 : Concentration en tocophérols en fonction du procédé de séparation des phases liquides

Tableau 17 : Composition phénolique des huiles en fonction du système de séparation eau/huile

Tableau 18 : Composition en acides gras en fonction du procédé de séparation eau/huile

Tableau 19 : Composition de l'espace de tête des huiles en fonction de leur procédé de fabrication

Tableau 20 : Caractéristiques physicochimiques des huiles obtenues par un système à deux ou trois phases

Tableau 21 : Dosage des tocophérols en fonction du type de séparateur utilisé

Tableau 22 : Composition phénolique des huiles d'olive en fonction du type de centrifugeuse utilisé

Tableau 23 : Composition des huiles en acides gras en fonction du type de séparateur utilisé

Tableau 24 : Composition de la fraction volatile des huiles en fonction du type de séparateur utilisé

Tableau 25 : Caractéristiques et effets des ultrasons selon le type de cavitation induit

Tableau 26 : Applications des ultrasons dans les technologies de transformation

Tableau 27 : Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes

Tableau 28 : Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants

Tableau 29 : Tableau récapitulatif des expériences et résultats du plan d'expérience

Tableau 30 : Composition de l'huile essentielle de basilic

Tableau 31 : Paramètres de calibration et de calcul des concentrations de linalol et d'eugénol dans les huiles d'olive ainsi que les résultats correspondants

Tableau 32 : Généralisation de la méthode pour différentes matrices alimentaires

Tableau 33 : Répétabilité et tests statistiques de comparaison

Tableau 34 : Teneur en eau des différentes matrices obtenue par distillation avec le toluène ou le *d*-limonène

Résumé

L'huile d'olive est un produit ancestral largement reconnu pour ses effets bénéfiques sur la santé humaine. Sa technique de fabrication a beaucoup évolué au cours des siècles, notamment ces dernières années avec l'automatisation croissante des chaînes de production. La première partie de ce manuscrit fait le bilan de ces différentes évolutions, puis la seconde partie détaille l'impact de chacune des étapes de fabrication sur la composition nutritionnelle de l'huile. Nous avons ainsi étudié l'influence du broyage, des séparations liquide-liquide et solide-liquide. L'optimisation de ces étapes permet l'obtention d'une huile enrichit de façon endogène puisque tous les nutriments étaient présents dans l'olive. En complément nous avons également développé des méthodes d'enrichissement exogène de l'huile. Dans ce cas des molécules bioactives issues de plantes ou de légumes sont ajoutées à l'huile d'olive. Afin de limiter les étapes d'extraction et de bannir l'utilisation de solvants organiques, l'huile est utilisée en tant que solvant d'extraction et l'enrichissement se fait de façon directe dans l'huile. Pour accélérer des cinétiques d'extraction qui pourraient être très longues, nous avons utilisé des ultrasons. Les résultats obtenus sont très encourageants et ils permettent d'imaginer un élargissement de la gamme de produits oléicoles disponibles.

Mots-clés : huile d'olive, composition nutritionnelle, enrichissement endogène, enrichissement exogène, ultrasons

Abstract

Olive oil is an ancestral product widely known for its benefic effects on human health. Its processing has changed a lot through centuries, especially these past few years with the increasing automation of the production lines. The first part of this manuscript describes these evolutions while the second part gives details on the influence of each processing step on the nutritional composition of the olive oil. We have studied the influence of the crushing systems, liquid-liquid and solid-liquid separations. The optimization of each of these steps allows the endogenous enrichment of the oil with nutrients extracted from the olive fruit. Then, we have also developed exogenous olive oil enrichment methods by bioactive compounds issued from plants and vegetables. In order to restrain the number of extraction steps and avoid the use of petroleum solvents, the olive oil is used as the extraction solvent so the enrichment is directly performed in the oil. To accelerate extraction kinetics that could be very long we developed ultrasound accelerated extraction techniques. The results obtained in this work are very promising and extensions of olive oil available product ranges are possible.

Keywords: olive oil, nutritional composition, endogenous enrichment, exogenous enrichment, ultrasounds