

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.

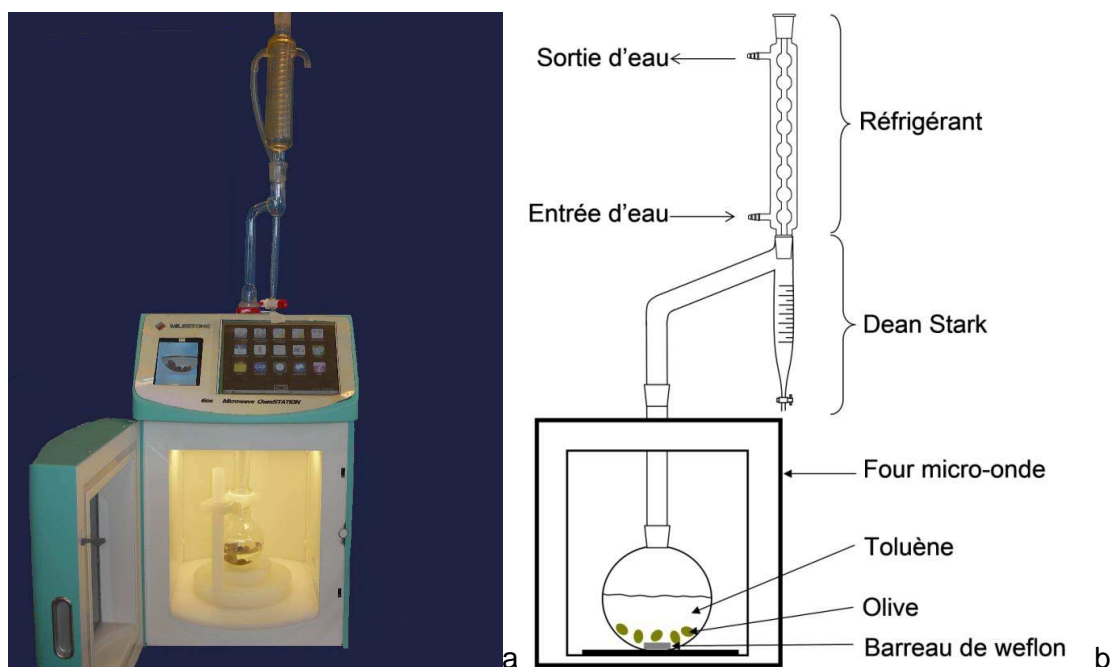


Figure 29 : Dean-Stark par micro-ondes, photo (a) et schéma (b) du montage

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.

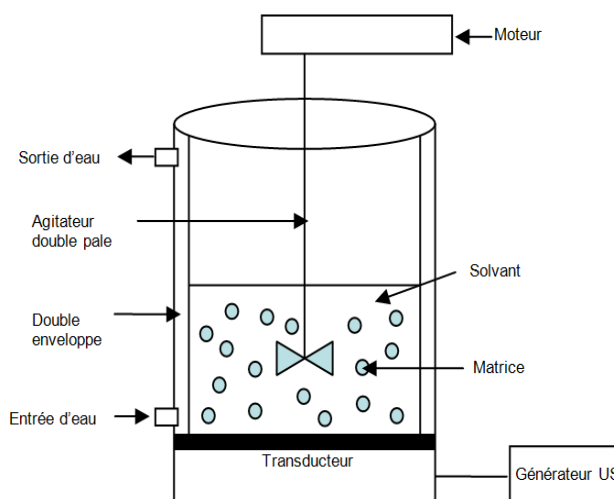


Figure 30 : Bac à ultrason de laboratoire de 3 L (R.E.U.S.)

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.

