

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires

# *Mémoire de Fin de Cycle*

En vue de l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat  
Option : Contrôle de Qualité et Analyse



**Optimisation de l'enrichissement de l'huile  
d'olive par les principes actifs des margines**

**Présenté par :**

M<sup>lle</sup> DJAOUZI Souzi  
M<sup>lle</sup> DJERROUD Nadjoua

**Membres du Jury :**

**Président :** M<sup>r</sup> MADANI Khodir

**Promotrice :** M<sup>lle</sup> ACHAT Sabiha

**Examineurs:** M<sup>r</sup> KATI Djamel Eddine

M<sup>me</sup> SMAIL Leila

**2012-2013**

## *Remerciements*

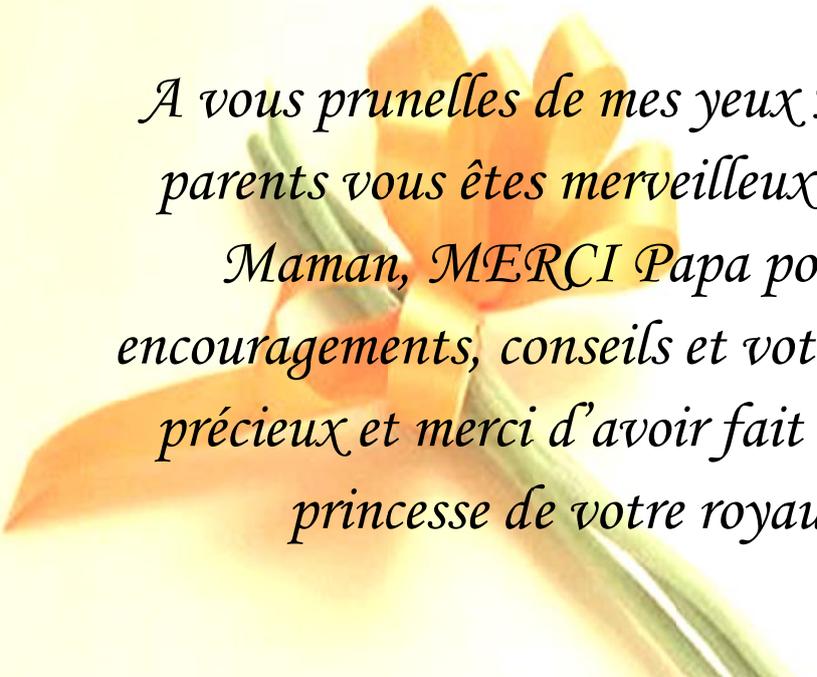
*En préambule à ce mémoire, Nous tenons à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné force, courage foie.*

*Au terme de Ce travail nous tenons à exprimer nos remerciements et nos sincères gratitudes à notre promotrice **M<sup>lle</sup> Achat. S.** qui a dirigé ce travail et nous a fait bénéficier de son expérience et de ses conseils.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à Monsieur **K. Madani**, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence du jury, qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.*

*Nous adressons également nos grands remerciements au Monsieur **D.E Kati** et madame **L. Smail** qui ont bien voulu faire partie du jury et d'apporter leurs vives contributions à l'enrichissement de ce travail.*

# *Dédicaces*



*A vous prunelles de mes yeux Mes chers  
parents vous êtes merveilleux MERCI  
Maman, MERCI Papa pour vos  
encouragements, conseils et votre amour si  
précieux et merci d'avoir fait de moi la  
princesse de votre royaume*



*A mon cher mari qui a su se montrer patient,  
compréhensif et encourageant*

*A mes chers frères*

*A mes adorables sœurs*

*A mes sœurs de chambre*

# *Dédicaces*

*A vous prunelles de mes yeux Mes chers parents vous  
êtes merveilleux MERCI Maman, MERCI Papa  
pour vos encouragements, conseils et votre amour si  
précieux et merci d'avoir fait de moi la princesse de votre  
royaume*

*A mon unique frère et son épouse Karima  
A mes adorables sœurs : Massika, Dalila, Mounira,  
Djidji*

*A mes beaux-frères : Hacene et Halim  
A mes très chères nièces : Clara et Eléna*

*A mon neveu Axime  
A mes sœurs de chambre*



## Liste des abréviations

**ANOVA** : Analyse of variance.

**ATP** : Adénosine Tri Phosphate.

**E.A.G** : Equivalent d'Acide Gallique.

**BBBS** : Biochimie Biomathématique Biophysique et Scientométrie.

**BHT** : Hydroxy Toluène Butylé.

**BHA** : Hydroxy Anisol Butylé.

**CN** : Coefficient Négatif.

**CP** : Coefficient Positif.

**COI** : Conseil Oléicole International.

**CEE** : Communauté Economique Européenne.

**DPPH** : 1,1 Diphényl-2-Picryl Hydrazyl.

**EOR** : Espèces Oxygénées Réactives.

**FC** : Folin Ciocalteu.

**HOV** : Huile d'Olive Vierge.

**MSR** : Méthode des Surfaces de Réponse

**pH**: Potentiel Hydrogène.

**rpm** : round per minute.

**PT** : Polyphénols Totaux.

**rpm** : round per minute.

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Processus d'extraction de l'huile d'olive	02
02	Structure du noyau phénol	05
03	Principaux acides phénoliques des margines	06
04	Structure chimique d'hydroxytyrosol (a) et tyrosol (b)	07
05	Structure de base des flavonoïdes	07
06	Structures chimiques des flavonoïdes des margines	08
07	Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidol) et (b) d'un tanin gallique	09
08	Réacteurs de laboratoire d'extraction assistée (a) par ultrasons et (b) par micro-ondes	13
09	Représentation schématique des étapes de l'étude réalisée	17
10	Procédé d'extraction des composés phénoliques de l'huile	18
11	Méthode d'extraction des polyphénols à partir des margines	19
12	Étapes du dosage des polyphénols totaux	20
13	Représentation du plan d'expérience sous forme d'un cube virtuel	23
14	Étapes du test de DPPH°	24
15	Diagramme de Pareto pour la concentration en polyphénols totaux	32
16	Effet général des facteurs (température, temps et ration) sur les polyphénols totaux	33
17	Surfaces de réponse de l'effet des différents facteurs: (a): Influence de la température et du ratio à 4,25 H, (b): Influence de la température et du temps à 14,5%, (c) : Influence du temps et du ratio à 25°C.	34
18	Activité scavenger du radical DPPH° de l'huile d'olive avant et après enrichissement	36
19	Structure du radical 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl et de sa forme réduite	37

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
I	Les travaux antérieurs de l'enrichissement d'huile d'olive.	
II	Teneur en composés phénoliques des huiles étudiées (huile d'olive, margine)	27
III	Taux de polyphénols totaux dans d'huile d'olive de différent travaux	27
IV	Taux de polyphénols totaux de l'huile enrichie en fonction du temps	29
V	Tableau récapitulatif des expériences et résultats du plan d'expérience	30
VI	Analyse de la variance des polyphénols totaux	31
VII	Conditions optimales d'enrichissement de l'huile d'olive avec les margines	35
VIII	Résultats du test d'analyse sensorielle des huiles étudiées	38

## Sommaire

### Introduction

## Synthèse bibliographique

### *I. Margine et Enrichissement d'huile d'olive*

I.1. Secteur oléicole en Algérie.....	01
I.2. Technologie d'extraction de l'huile d'olive.....	01
I.2.1. Procédé discontinu ou système à presse.....	01
I.2.2. Procédé continu ou par centrifugation.....	01
I.3. Sous-produits de l'oléiculture.....	03
I.3.1. Grignons.....	03
I.3.2. Margines.....	03
I.4. Caractéristiques microbiologiques et chimiques.....	04
I.4.1. Caractéristiques microbiologiques.....	04
I.4.2. Caractéristiques chimiques.....	04
I.5. Composées phénoliques des margines.....	04
I.5.1. Monomères phénoliques.....	05
I.5.1.1. Acides phénoliques.....	05
I.5.1.2. Alcool phénoliques.....	07
I.5.2. Polymères phénoliques.....	07
I.5.2.1. Flavonoïde.....	07
I.5.2.2. Tanins.....	08
I.6. Effets biologiques des margines.....	09
I.6.1. Activité antioxydante.....	09
I.6.1.1. Pouvoir antioxydant des polyphénols.....	10
I.6.1.2. Mode d'action des polyphénols.....	10

I.6.2. Activité antimicrobienne.....	11
I.6.3. Activité cytotoxique .....	11
I.7. Valorisation des margines.....	11
I.7.1. Production de biogaz .....	12
I.7.2. Production d'antioxydants.....	12
I.7.3. Production d'enzyme .....	12
I.7.4. Production de compost.....	12
I.8. Enrichissement d'huile d'olive.....	12

## *Etude expérimentale*

### *II. Matériels et méthodes*

II.1. L'échantillon biologique.....	16
II.1.1. Margine.....	16
II.1.2. Huile d'olive.....	16
II.2. Procédure d'enrichissement d'huile d'olive.....	17
II.2.1.Extraction des composés phénoliques.....	18
II.2.1.1.l'huile d'olive.....	18
II.2.1.2. margine.....	19
II.2.2.Quantification des polyphénols.....	20
II.3. plan d'expérience théorie et application .....	21
II.4.Mesure du pouvoir antioxydant.....	24
II.5. Evaluation sensorielle.....	25

## *II. Résultats et discussions*

III. Résultats et discussions.....	26
III.1. Extraction des composées phénoliques.....	26
III.2 Quantification des polyphénols totaux.....	26
III.3 Enrichissement de l'huile d'olive.....	28
III.3.1 Etude préliminaire.....	28
III.4. Conditions optimales.....	29
III.5. Traitement des données par Statgraphics.....	30
III.5.1. Analyse de la variance des polyphénols totaux.....	30
III.5.2 Analyse de surface.....	32
III.6 Mesure du pouvoir antioxydant.....	36
III.7 Analyse sensorielle.....	37

### **Conclusion**

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

# *Introduction*

## **Introduction**

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. Ce type de régime a souvent été associé à une meilleure résistance à certaines maladies: cardio-vasculaires et dégénératives [1].

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, sensibles au phénomène d'oxydation, et ses composés minoritaires tels que les composés phénoliques ou polyphénols. L'intérêt de ces substances actives réside dans leur forte capacité antioxydante, qui pourrait avoir un rôle majeur dans l'amélioration de la stabilité de l'huile d'olive [2]. Cependant, ils sont présents en faible quantité, puisque 98% de ses composés phénoliques sont perdus lors du procédé de fabrication. Ces pertes sont dues d'une part à leur faible affinité pour la fraction lipidique [3], mais aussi aux procédés de blanchiment appliqués aux olives avant le broyage et le pressurage.

L'oxydation des lipides d'huile d'olive est considérée comme l'une des réactions majeures correspondantes à la dégradation de sa qualité organoleptique, non seulement par la formation d'odeurs rances mais également par la diminution de sa qualité nutritionnelle. Cette dernière se manifeste à travers la formation de radicaux libres [4].

De ce fait, la lutte contre l'oxydation d'huile d'olive au cours de la transformation technologique, du stockage et de la distribution s'impose. Parmi les diverses solutions possibles, l'addition d'agents antioxydants aux huiles et aux aliments riches en lipides [5] est pratiquée depuis fort longtemps. Toutefois, les antioxydants synthétiques comme le butylhydroxytoluène (BHT) et butylhydroxyanisole (BHA), présentent des effets néfastes sur la santé humaine [6]. L'ampleur de ce problème a fait que des antioxydants naturels deviennent de plus en plus recommandés. Dans cette démarche, la stabilisation des huiles végétales (huile d'olive, tournosol, soja...etc.) [5], a fait l'objet de nombreuses recherches ayant opté pour l'enrichissement de ces huiles à base de matrices végétales: l'origan, la sauge, le romarin, les épinards, le chou, les feuilles d'olivier...etc. [7]

*D*ans cette perspective nous sommes intéressés à un déchet liquide du secteur oléicole (margines), pour le valoriser en tant que source d'antioxydants naturels, vu sa richesse en composés phénoliques, par incorporation directe dans l'huile d'olive vierge.

*A*fin de mieux cerner cet objectif, notre étude est subdivisée en deux parties :

- *L*e premier volet est consacré à une revue bibliographique, décrivant les données essentielles sur les margines, ainsi qu'un aperçu des travaux antérieurs sur la supplémentation de l'huile d'olive ;
- *L*e deuxième volet est voué à l'étude expérimentale, traitant l'optimisation de l'enrichissement de l'huile d'olive vierge par les molécules bioactives des margines. A cet égard trois paramètres ont été analysés l'effet de la température, du ratio ainsi que du temps d'agitation. Pour ce faire la méthode des plans d'expériences du type surfaces de réponse (RSM), a été appliquée en se basant sur la détermination quantitative des polyphénols totaux. Enfin la mesure du pouvoir antioxydant des huiles étudiées (brutes et enrichies) et un test d'analyse sensoriel ont été effectués.

*A* la lueur des résultats recélés, proposer différentes investigations et perspectives de recherche.

*Revue  
bibliographique*

## **I.1. Secteur oléicole en Algérie**

L'industrie oléicole dont l'activité principale est la production d'huile d'olive, est concentrée principalement dans les pays du bassin méditerranéen, qui tiennent approximativement 95% de la production mondiale [8], dont 1% produit par l'Algérie en 2001 [9].

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est des plus propices à la culture de l'olivier. Elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie qui sont par ordre d'importance, les plus gros producteurs d'huile d'olive [10]. Le patrimoine oléicole Algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. La production annuelle en huile a atteint 35.000 tonnes et celle de l'olive de table 80.000 tonnes [11].

## **I.2. Technologie d'extraction de l'huile d'olive**

L'extraction d'huile d'olive se fait par des moyens purement mécaniques (par pression ou centrifugation). Il existe en général deux procédés (**Fig. 01**):

### **I.2.1. Procédé discontinu ou système à presse**

Ce sont les systèmes classiques par pression avec broyeurs. Le broyage des olives suivi du malaxage se font sous des meules. Une pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ, Elle est composée de grignon et un moût contenant l'huile et les margines. La séparation des deux phases solide-liquide se fait par simple pression, alors que l'huile est séparée des margines par décantation naturelle [6].

### **I.2.2. Procédé continu ou par centrifugation**

Cette conception moderne d'extraction remplace le pressage traditionnel. Elle utilise des centrifugeuses horizontales appelées «décanteurs», qui permettent l'amélioration des rendements et de la productivité des huileries.

On distingue deux systèmes :

- Le système à deux phases ;
- Le système à trois phases.

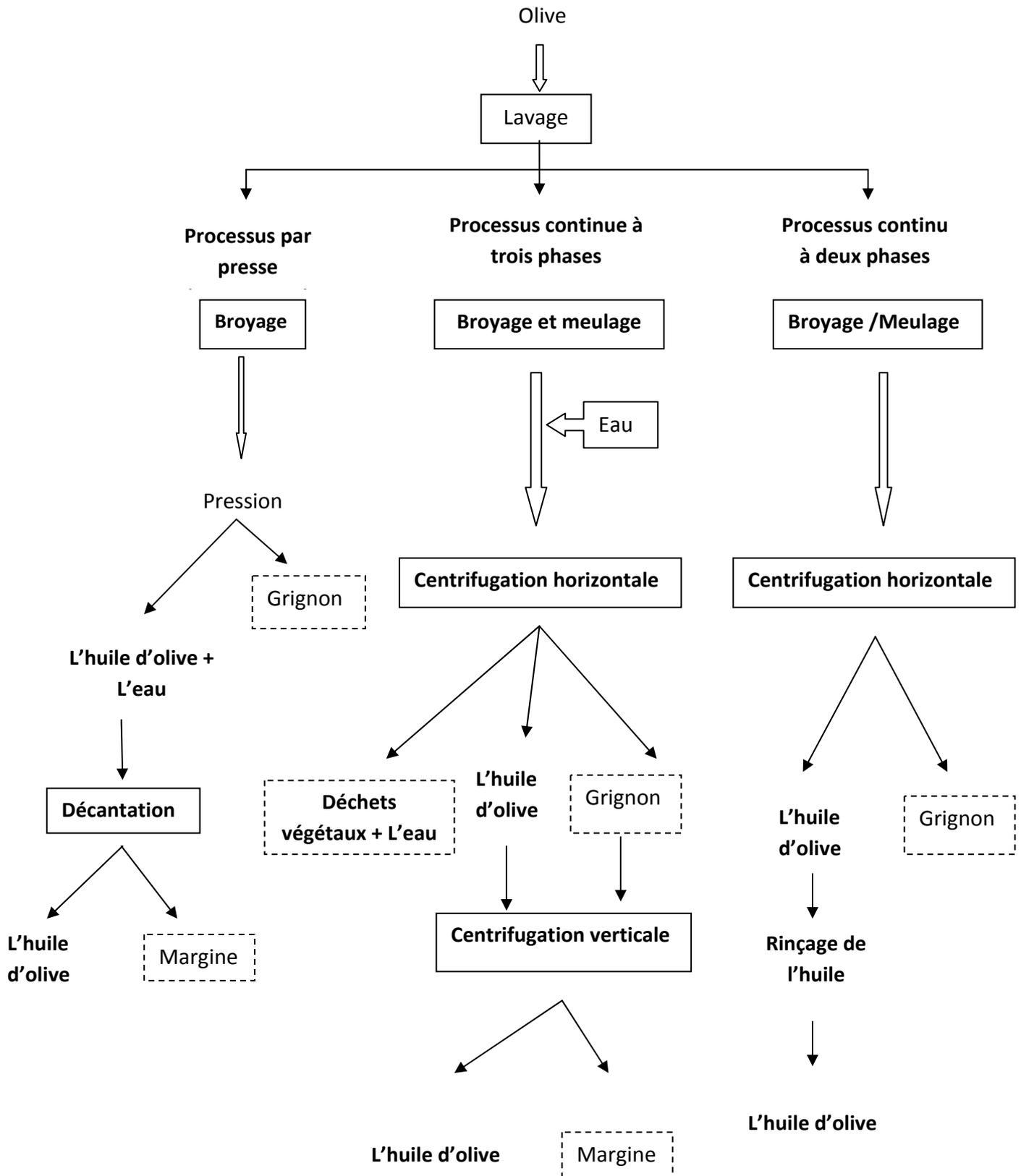


Figure 01 : Processus d'extraction de l'huile d'olive [13].

### **a). Système à deux phases**

Ce système appelé également système écologique, il permet l'élaboration de l'huile d'olive sans qu'il soit nécessaire d'ajouter de l'eau dans le décanteur, ce qui fait que ce dernier sépare l'huile et le mélange grignon-eau de végétation en une unique phase de consistance pâteuse appelée grignon humide ou grignon a deux phases, ce qui limite la production de margine [12].

### **b). Système à trois phases**

Les centrifugeuses horizontales à trois phases ont été les premières à être développées. La pâte, une fois malaxé, modérément fluidifiée avec de l'eau tiède, passe dans une centrifugeuse horizontale où s'effectue la séparation entre l'huile, la phase aqueuse et les grignons. Pour une bonne séparation huile-eau et margine-huile, la phase huileuse et la phase aqueuse subissent chacune une centrifugation verticale [12].

## **I.3. Sous-produits de l'oléiculture**

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon), engendre la production de deux résidus: margines et grignons [14].

### **I.3.1. Grignons**

Les grignons ou tourteaux d'olive sont des résidus solides issus de la première pression ou centrifugation, ils sont formés des pulpes et des noyaux d'olives. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite: grignons d'olive après extraction chimique [15,16].

### **I.3.2. Margines**

Les margines ou eaux de végétation, parfois nommés alpechine, sont des effluents liquides générés lors de la fabrication de l'huile d'olive. Généralement 40 % à 50 % de ces eaux provient du fruit et le reste de l'eau ajoutée lors de la trituration [14].

A l'origine, les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre, qui se transforme en margine de couleur noir en fonction de l'état de dégradation de ses substances chimiques notamment les composées phénoliques [12,17]. Elles présentent un aspect trouble, une odeur spécifique d'huile et elles sont caractérisées par un pH acide (4,5- 5,5) [18,19] et une très grande conductivité électrique [20,21].

## **I.4. Caractéristiques microbiologiques et chimiques**

### **I.4.1. Caractéristiques microbiologiques**

Dans les margines, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer. Ce sont essentiellement des levures et des moisissures. Dans la plupart des cas, il y a absence de bactéries pathogènes et ils ne posent alors aucun problème de point de vue sanitaire [14].

### **I.4.2. Caractéristiques chimiques**

En général, les composés fondamentaux des margines sont l'eau (83%) et une variété de composés organiques (15%) et minéraux (1,8%), de nature et de concentration très différentes. Cette variation est due essentiellement aux facteurs suivants :

- La qualité et le degré de maturité des olives;
- Le système d'extraction;
- Les conditions climatiques;
- La durée de stockage des olives avant la trituration;
- La qualité d'eau rajoutée lors de la phase d'extraction de l'huile [22,23, 24].

#### **a)- Fraction minérale**

La margine contient des quantités significatives de sels minéraux [20], dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). Les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) [25,26].

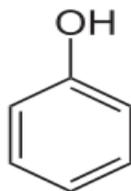
#### **b)- Fraction organique**

La margine est très riche en substances organiques composées essentiellement de sucres, lipides, composés azotés, vitamines, acides organiques et composés phénoliques [27]. Cette composition résulte de la dégradation des tissus de l'olive au cours de la trituration et de l'extraction [28]. Cette richesse en matières organiques explique les demandes chimiques et biologiques en oxygène relativement élevées ( $DCO = 50$  à  $200$  g d' $O_2/L$  et  $DBO_5 = 12$  à  $60$  g d' $O_2/L$ ) [29]

## **I.5. Composés phénoliques des margines**

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires du règne végétal [30,31]. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Fig.02) [32,33]. La structure des polyphénols naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques

simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) [34], Ils résultent bio-génétiquement de deux voies synthétiques principales: la voie des shikimates et d'acétate [35].



**Figure 02:** Structure du noyau phénol [36].

- Près de 10000 structures phénoliques identifiées [37,38]. Ils sont divisés en plusieurs catégories [39] :

- Les acides phénoliques et les alcools phénoliques (monomères phénoliques);
- Les flavonoïdes et les tanins (polymères phénoliques).

Le fruit de l'olive est très riche en composés phénoliques mais seulement 2% du contenu total du fruit passe dans la phase huileuse. Le reste se trouve dans la phase liquide (53%) et dans le grignon (45%) [40,41].

La richesse des margines en polyphénols, de nature humique [42], plus grande que celle de la phase huileuse, résulte des propriétés amphiphiles, mais essentiellement hydrophiles de ces composés [43]. Ce qui explique leur concentration élevée dans les margines (5,5 à 12 g/L de margine) [44,45]. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucosides et des esters de la pulpe des olives, au cours d'extraction de l'huile [46]. Plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés [47, 48].

### **I.5.1. Monomères phénoliques**

Plusieurs monomères ont été identifiés dans les margines. Ils sont représentés par des acides et des alcools phénoliques ce qui explique leur acidité élevée.

#### **I.5.1.1. Acides phénoliques**

Ce terme s'applique à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique [49]. Ils appartiennent à deux groupes [50]:

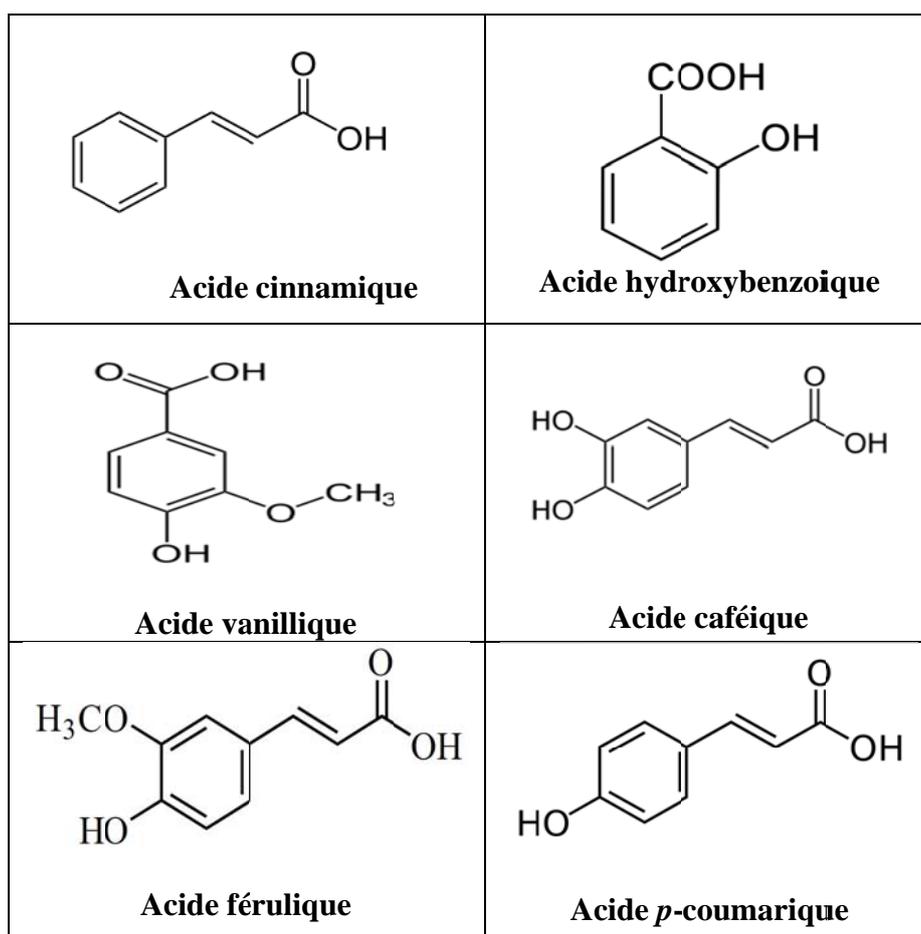
➤ **Les acides hydroxybenzoïques**

Les acides phénoliques en dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque (**Fig.03**) sont très commun aussi bien sous forme libre que combinée, à l'état d'ester ou d'hétéroside [51, 52].

➤ **Les acides hydroxycinnamiques**

La plus part des acides phénoliques en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> sont dérivés de l'acide cinnamique (**Fig.03**), ils ont une distribution très large, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique [53, 54].

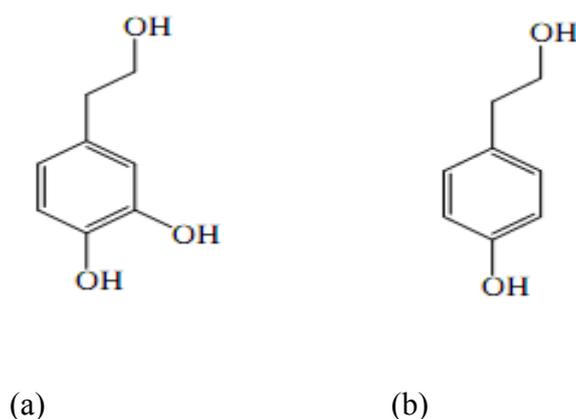
Les principaux acides phénols des margines sont: acide cinnamique (105 mg/L), acide p-coumarique (117 mg/L), acide caféique (140 mg/L) [40], acide férulique (95 mg/L) [55, 56] acide vanillique (20 mg/L) [57]. Ces composés sont représentés dans la figure ci-dessous:



**Figure 03:** Principaux acides phénoliques des margines [55, 56]

### I.5.1.2. Alcools phénoliques

Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) (**Fig.04**), sont les principales molécules des margines avec une concentration de 210.6 mg/L et 315.9 mg/L respectivement [40].

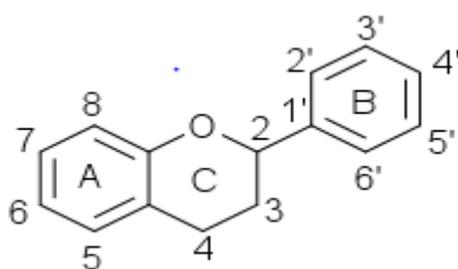


**Figure 04:** Structure chimique d'hydroxytyrosol (a) et tyrosol (b) [55, 56]

### I.5.2. Polymères phénoliques

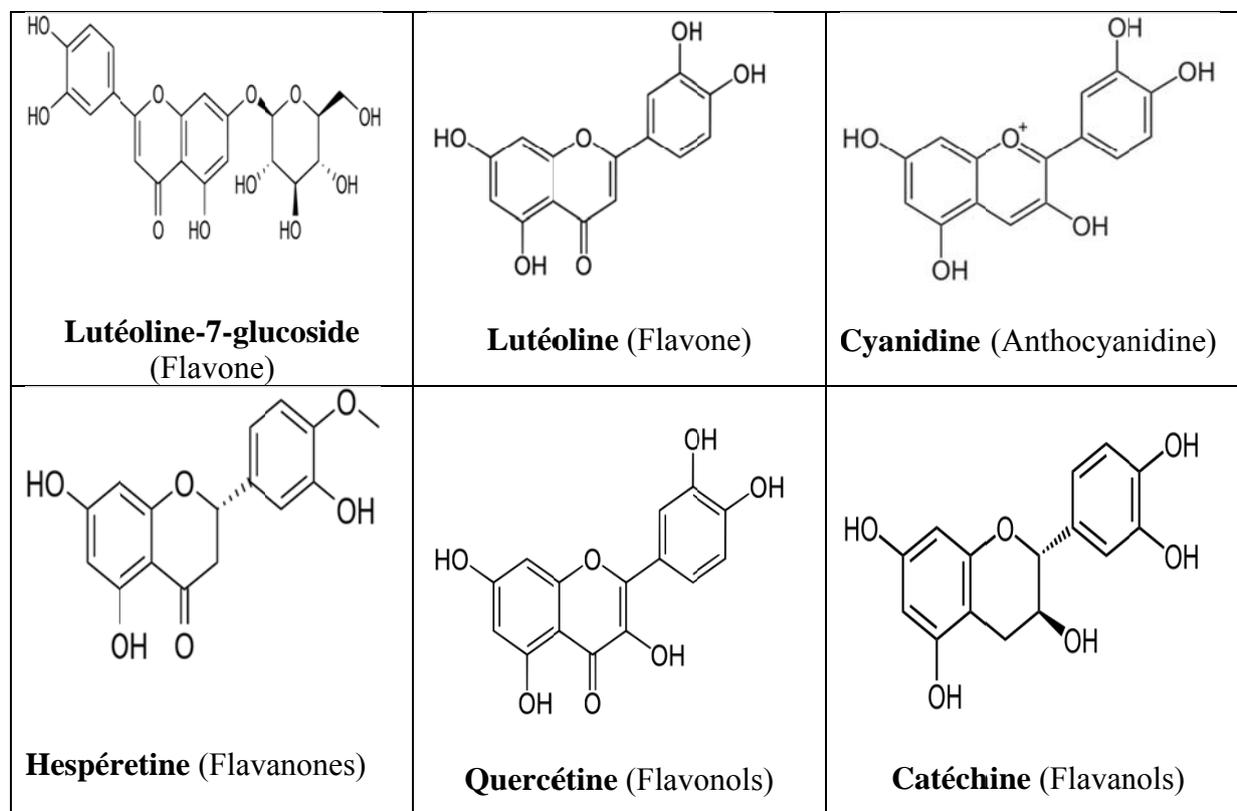
#### I.5.2.1. Flavonoïde

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavus* (jaune) [58]. Ils ont tous la même structure chimique de base (**Fig.05**), un carbone de propane diphényliques et deux noyaux aromatiques (benzéniques), liés entre eux par une chaîne linéaire de trois carbones. La chaîne de trois carbones forme un noyau de pyrane fermé avec l'un des deux noyaux benzéniques un «O-heterocycle» (C) [59, 60].



**Figure 05:** Structure de base des flavonoïdes [59]

- Il a été montré que les margines contiennent un ensemble de flavonoïdes tel que : Lutéoline, lutéoline-7-glucoside [40], l'hésperidine, la catéchine, les glycosides de cyanidine [48]. Ces derniers sont représentés dans la figure ci-après:



**Figure 06:** Structures chimiques des flavonoïdes des margines [61]

### I.5.2.2. Tanins

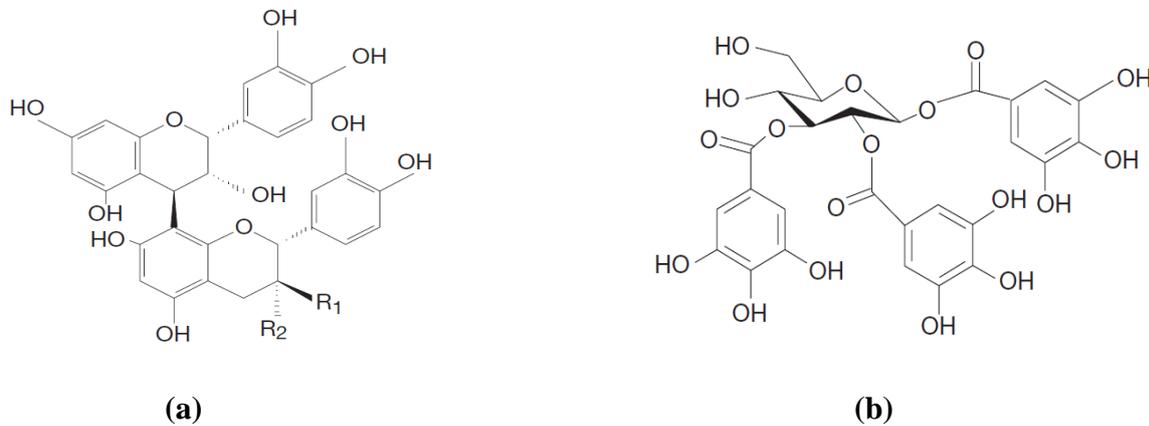
Les tanins sont des composés résultant de la condensation de certaines formes simples évoquées précédemment. De ce fait, toute classification chimique des tanins est forcément arbitraire. Cependant, on se réfère souvent à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés [62].

#### ➤ Tanins hydrolysables

Ils sont constitués par une molécule de sucre estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés (Fig.07). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

### ➤ Tanins condensés

Ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols et flavan-3,4-diols (**Fig.07**). Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de «tanins catéchiques» et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides [45,63].



**Figure 07:** Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidol) et (b) d'un tanin gallique (1,2,3-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose) [64, 65].

- Le pigment catécholmélanique est un « flavotanin », il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines. Ce composé ne se retrouve pas dans les olives mais se forme pendant le broyage des olives à partir des ortho-diphénols dont la pulpe est riche, sous l'action des polyphénol-oxydases (enzymes inactives dans les drupes entières) [66].

## I.6. Effets biologiques des margines

Les margines possèdent des propriétés thérapeutiques diverses: antioxydante antimicrobienne, cytotoxique, neurotoxique...etc.

### I.6.1. Activité antioxydante

Le monde des sciences biologiques et médicales, est envahi par un nouveau concept, celui des antioxydants. Le terme "antioxydant" recouvre un ensemble d'activités diverses où plusieurs espèces sont habiles à ralentir ou à empêcher l'oxydation des substrats biologiques [67]. La plupart des antioxydants sont synthétisés au moyen de processus physiologiques naturels, tandis que les autres proviennent de l'alimentation, notamment les composés phénoliques [68]

### **I.6.1.1. Pouvoir antioxydant des polyphénols**

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année une attention et un engouement considérable et plusieurs de leurs propriétés biologiques font l'objet de nombreuses études [69, 70] particulièrement l'effet antioxydant, par leur implication dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydatif (maladies cardiovasculaires, cancers...etc.) [71]

### **I.6.1.2. Mode d'action des polyphénols**

Leurs intervention se fait assez souvent à plusieurs niveaux : piégeages de radicaux libres [72] chélation de métaux prooxydants par les groupements hydroxyles et par inhibition de certains enzyme [73]

#### **➤ Piégeage des radicaux libres**

Les perspectives de recherche sur les polyphénols ce sont associées aux Espèces Oxygénées Réactive (EOR), tels peroxydes ( $\text{ROO}^\circ$ ), alcoxydes ( $\text{RO}^\circ$ ) superoxydes ( $\text{O}_2^\circ$ ) et hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ). Les EOR peuvent attaquer des cibles bioactives telles les protéines (alternant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes), glucides, lipides et les acides nucléiques favorisant la survenue de mutation délétères (l'origine de divers cancers) [74]. Les EOR peuvent apparaitre lors du métabolisme oxydatif de l'oxygène, l'inflammation et l'auto-oxydation des lipides [75].

#### **➤ Chélation des ions métalliques**

Les polyphénols ont la capacité de chélater les ions métalliques (tels les ions du fer et du cuivre) largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport. Ces ions métalliques renforcent les effets nocifs du stress oxydant en stimulant la production des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ) [76]. Les polyphénols en chélatant ces ions, forment des complexes insolubles empêchant, leurs interactions avec les intermédiaires lipidiques [77]

#### **➤ Inhibition des enzymes**

Les composés phénoliques sont capables d'affecter et d'inhiber le système enzymatique de nombreux enzymes ; décarboxylase, l'aldose réductase, la NADPH oxydase, la protéine kinase C, des enzymes de l'inflammation telles la cyclooxygénase, la lipooxygénase et la phospholipase A<sub>2</sub> [78].

- Plusieurs travaux ont mis en évidence l'activité antioxydante des polyphénols des margines, elle est due essentiellement à l'hydroxytyrosol et au tyrosol [79, 80]

### I.6.2. Activité antimicrobienne

Le pouvoir antimicrobien des margines est lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns ou catécholmélaninique [81]. Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes [82]. Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en inhibant l'activité des enzymes [83]. Les substances phénoliques contenues dans les margines sont potentiellement toxiques et inhibent le développement des bactéries tel que : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, les bactéries Gram<sup>+</sup> sont plus sensibles que les Gram<sup>-</sup> [84].

### I.6.3. Activité cytotoxique

Des études épidémiologiques indiquent qu'un régime riche en métabolites secondaires, comme les polyphénols, réduit le risque neuro-dégénératif lié à l'âge. En effet une étude est réalisée pour déterminer l'effet cyto-protecteur des polyphénols de margine (hydroxytyrosol) ; des neurones de rat ont été émergés dans un extrait d'hydroxytyrosol, après une durée de 30 minutes, ces derniers ont été exposés à un stress oxydatif (facteur de stress Fe<sup>2+</sup>) pendant 18h. La cytotoxicité a été évaluée en mesurant l'activité déshydrogénases, les niveaux d'ATP cellulaires et le potentiel membranaire mitochondriale en absence et en présence de l'hydroxytyrosol. Les résultats ont révélé que cette molécule est fortement corrélée à la protection des cellules nerveuses par piégeage de l'ion métallique (Fe<sup>2+</sup>) [85].

### I.7. Valorisation des margines

Les margines sont des eaux considérées très polluantes car fortement chargées en matières organiques, elles affectent particulièrement la qualité des eaux dans lesquelles elles sont déversées. Ces rejets liquides causent de sérieux dégâts environnementaux. Les mauvaises odeurs, introduites par les margines, provoquent une pollution considérable de l'air par les gaz produits surtout lors du traitement. Ainsi la teneur élevée en polyphénols dans les margines participe fortement à la pollution de l'environnement [86], d'où la nécessité de les valoriser.

Compte tenu de la richesse des margines en substances chimiques. Enrichies, mélangées à d'autres résidus agricoles, concentrées, séchées et/ou purifiées, elles

peuvent être valorisées et employées pour la production de certains composants de valeur ajoutée. Elles peuvent faire l'objet de plusieurs types de valorisation:

### **I.7.1. Production de biogaz**

L'application de processus de digestion anaérobie effectuées par deux types de bactéries acidogènes et méthanogènes aux margines a permis de transformer par des réactions biochimiques environ de 80% des substances organiques en biogaz pour donner 65- 70% de méthane [87]

### **I.7.2. Production d'antioxydants**

La récupération des polyphénols des margines pour les valoriser en tant qu'antioxydants naturels; parmi les composés les plus récupérés on distingue l'acide caféique, le tyrosol et l'acide 4-hydroxybenzoïque. Ces derniers sont des précurseurs très utilisés dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques [89].

### **I.7.3. Production d'enzyme**

Les margines peuvent servir aussi comme milieu favorable pour la production d'enzymes par des micro-organismes. Les principales enzymes sont: pectinases [90] et laccases [91].

### **I.7.4. Production de compost**

Le compost s'obtient principalement par dégradation aérobie-anaérobie de margines qui a pour but essentiel de fixer les éléments fertilisants sur un substrat carboné pour les restituer au sol en fonction des plantes. L'avantage du compost formé à partir des margines est l'absence des métaux lourds et des microorganismes pathogènes avec des concentrations élevées en éléments minéraux nutritifs [92].

## **I.8. Enrichissement d'huile d'olive**

L'huile d'olive est considérée la meilleure de toutes les huiles comestibles par rapport à ses caractéristiques organoleptiques et sa composition chimique, mais ne renferment que de faibles teneurs en antioxydants [93]. De ce fait, elle est instable et sujette à une oxydation rapide durant le stockage ou lors des préparations culinaires [94]. En effet, sa faible résistance à la détérioration oxydative est due à l'élimination d'une grande quantité de composées phénoliques (98%) durant le processus d'extraction [3]. Cette résistance à l'oxydation peut être améliorée par ajout des antioxydants synthétiques, tels que le BHA et le BHT, ayant

été employés comme additifs alimentaires [89]. Cependant ces composés ont révélé des effets néfastes sur la santé humaine (cancer) [95], d'où la nécessité de rechercher des molécules naturelles. L'une des approches les plus appropriées est l'enrichissement de l'huile d'olive avec des extraits végétaux : thé vert, thym, feuille d'olivier, romarin, tomate, origan... [96, 79, 98, 99].

L'enrichissement de l'huile d'olive est réalisé selon trois manières différentes: la première est l'extraction par solvant, où l'extrait est ajouté dans l'huile (extraction liquide-liquide) [96] l'autre méthode dans laquelle l'extrait purifié et séché est partiellement dissous dans l'huile (extraction solide-liquide) [100], la troisième est la combinaison de ces deux procédures.

Le développement de méthodes rapides pour enrichir l'huile d'olive avec les polyphénols peuvent être aussi d'un grand intérêt. A cet égard, le processus phénol-transfert peut être accéléré par des énergies auxiliaires comme les ultrasons et les micro-ondes (**Fig.08**), qui permettent d'augmenter le rendement, diminuer la quantité de solvant nécessaire et /ou le temps de traitement [100, 101].



(a)



(b)

**Figure 08:** Réacteurs de laboratoire d'extraction assistée par (a) ultrasons et (b) par micro-ondes [100, 101].

Plusieurs études d'enrichissement des huiles végétales avec différentes matrices ont été proposées, en utilisant différentes techniques. Le tableau I résume quelques travaux.

**Tableau I :** Les travaux antérieurs de l'enrichissement de l'huile d'olive

Matrice végétale	Analyte	Conditions d'enrichissement
<b>Thym et grignon</b>	Composés phénoliques	-Extraction liquide-liquide 2,5g d'extrait /100g d'huile - PT de l'huile d'olive vierge (74 mg /kg d'huile). - PT l'huile enrichie grignon (365 mg /kg d'huile). - PT l'huile enrichie thym (268 mg/100g d'huile) Le pouvoir antioxydant du thym sec est de $131.10^3$ à $139,4.10^3$ $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ . calculé par le test de rancissement [96]
<b>Feuilles d'olivier</b>	Composés phénoliques	Extraction (liquide-solide) Les feuilles d'olivier séchées à 22°C puis émergés dans l'eau (1%,5%,10%, Variant les températures de 40 à 70°C pendant 24h). l'optimum est (10%, 22°C, 24h) - Oleuropeine: 539 mg/kg d'extrait. - Hydroxytyrosol : 200 mg/kg d'extrait [102]
<b>Romarin, le thym et l'origan</b>	Composés phénoliques	Enrichissement direct de la matière végétale 5g/ 100 ml huile avec agitation à des T° (de 35 à 40°C)/ 190 jours Les analyses sont effectuées à chaque 1, 8, 30, 51, 77, 165, 246h. la méthode électrophorèse capillaire permet la séparation et la détermination des composés phénoliques. l'optimum de l'acide rosmarinique à T° ambiante et à 35°C est de : - 4,94mg/L (romarin). - 10,53mg/L (origan). - 0,86mg/L (thym) [97]
<b>Feuille d'olivier</b>	Composés phénoliques	Extraction (liquide-liquide) Macération 50mg/ 250ml de méthanol pendant 3 jours 100 $\mu\text{l}$ /10g d'huile d'olive/ 2 min - PT mg (94 $\rightarrow$ 299) CAE/kg d'huile, le % DPPH de l'huile d'olive est de 86 % [95]
<b>Feuille d'olivier</b>	Composés phénoliques	Enrichissement direct par méthode conventionnelle : 342,5 $\pm$ 1,7mg d'oleuropein/kg d'huile de polyphénols totaux (soit une augmentation de 60,5mg par rapport à l'huile témoin) et 50,7 $\pm$ 1,7mg d'O/kg d'huile d'oleuropein. Avec un %DPPH de 65,0 $\pm$ 0,8%.  - Enrichissement avec ultrasons (60w, 16°C, 45min) 414,3 $\pm$ 3,2mg O/kg d'huile de PT (soit une augmentation de 132mg par rapport à l'huile témoin) et 111,0 $\pm$ 2,2mg O/kg d'huile d'oleuropéine. Avec un %DPPH de 86,2 $\pm$ 0,2% [100]
<b>Tomate</b>	Caroténoïde	Enrichissement direct (solide-liquide). (0,5(E1) et 1,0 (E2) mg lycopène dans 100ml d'huile) Extraction (liquide-liquide): 2g d'huile d'olive (E3)

	(lycopène)	ajoutés dans le solvant méthanol/eau - PT (mg/kg d'huile): E1 (410), E2 (450), E3 (500) - Teneur $\alpha$ -tocophérol (mg/kg d'huile): E1 (116), E2 (119), E3 (119) -Concentration de lycopène (mg/100kg d'huile) : E1 (0,37 $\pm$ 0,01), E2 et 3(0,56 $\pm$ 0,02) % d'inhibition DPPH de E2 et E3 est plus élevé par rapport à E1 [98]
<b>Feuille d'olivier</b>	Composés phénoliques	Extraction (solide-liquide) : (méthode ultrason- irradiation 20 kHz. 450W) 14 mg/L oleuropeine et 2mg/L apigenine-7-glucoside, luteoline-7-glucoside et verbascoside [103]
<b>Thé vert Thé blanc</b>	Composés phénoliques	Enrichissement direct (liquide-liquide) par la méthode des micro-ondes Poudre de Thé vert/banc (2g/250ml d'eau distillé) additionné à l'huile d'olive (1mg/ml) : - PT huile (524.6 mg CAE/kg) - PT Huile enrichis thé blanc (580.55 mg CAE/kg) - PT huile enrichis thé vert (636.5 mg CAE/kg) - Le % DPPH de l'huile enrichie thé vert est de : 87,7% et 58.4% exposé au micro-onde pendant 1 et 5min respectivement [94].
<b>Feuilles de <i>Salvia officinalis L</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i></b>	Acide carnosique	Extraction (solide-liquide) (0.1, 0,01 mg E/100g d'huile d'olive), 60°C et 180°C - Tyrosol : 11.4 mg/kg - Hydroxytyrosol : 10.8 mg/kg - % DPPH est de 81,6 [104]
<b>Feuilles de basilic</b>	Huiles essentielles (Linalool, Eugenol)	Enrichissement direct (solide-liquide) - Méthode conventionnelle : 150g/1L $\rightarrow$ Linalool =1.66mg/L, Eugenol= 0.31mg/L - Méthode ultrason 1W/cm <sup>2</sup> , 25 kHz 150mL/L $\rightarrow$ Linalool = 3,68mg/L, Eugenol= 1,34 mg/L [109]
<b>Romarin, Lavande, Sauge, Menthe, Basilic, zeste de Citron et le thym</b>	Chlorophylle Polyphénol Carotène	Enrichissement direct (solide-liquide) 5g/100ml d'huile d'olive ,15 jours. - Chlorophylle (2.14 $\rightarrow$ 3.89 mg/kg d'huile) - Carotène (2,85 $\rightarrow$ 6,81mg/kg d'huile) - Polyphénol (50 $\rightarrow$ 1000mg/kg d'huile) [106]

*Etude expérimentale*

*Matériels  
et méthodes*

## II. Matériels et méthodes

Cette étude vise à valoriser un sous-produit d'oléicole « margine ». Cette valorisation s'est réalisée grâce à l'incorporation de ces substances, sous forme naturel, dans l'huile d'olive pour diminuer son oxydation.

Les margines sont considérées comme une source très riche en composées phénoliques (antioxydants), A cette raison, les chercheurs ont proposé de les extraire pour les valoriser en tant qu'antioxydants naturels. Parmi les composés les plus utilisés on peut citer l'acide caféique, le tyrosol et l'acide hydroxytyrosol. Ils ont, à cet effet, de très larges applications industrielles (pharmaceutique, cosmétique, alimentation, santé, cuisine) [89]. Par ce choix, on vise, d'une part, à remplacer l'utilisation d'antioxydants synthétiques par des antioxydants naturel, et d'autres part, à valoriser des margines, souvent rejetées dans la nature et rarement utilisées dans l'alimentation animale.

A cette égard, les margines peuvent être utilisé comme matrice pour enrichir l'huile d'olive, en utilisant une méthode toute naturelle qui est l'enrichissement direct par macération. Cette méthode a été testée afin d'éliminer l'utilisation des solvants et de faciliter sa mise en place pour les professionnels de l'huile d'olive.

### II.1. Echantillons biologiques

#### II.1.1. Margine

Les margines ayant fait l'objet de cette étude proviennent de la trituration des olives de la variété «Chemlal », récoltées au cours de la saison oléicole 2012/2013. Ces eaux de végétation ont été obtenues auprès d'une huilerie d'olive, moderne, située dans la région de Takarietz (Wilaya de Bejaia). Une fois au laboratoire, ils sont stockés à l'obscurité dans un environnement non oxygéné et au frais.

#### II.1.2. Huile d'olive

L'huile d'olive vierge est un jus obtenu par des moyens exclusivement mécaniques (pression), à partir du fruit de l'olivier (*Olea europaea L*), c'est l'un des types d'huiles ne nécessitant pas de raffinage, mais simplement lavage, filtration, décantation ou centrifugation, avant la consommation [108, 109].

## II.2. Procédure d'enrichissement d'huile d'olive par des substances actives des margines

Le but de notre étude est l'optimisation d'enrichissement de l'huile d'olive avec les molécules bioactives des margines (polyphénols), à cet égard trois paramètres ont été optimisés ; la température, ration et temps d'agitation en appliquant le plan d'expérience (Fig.09).

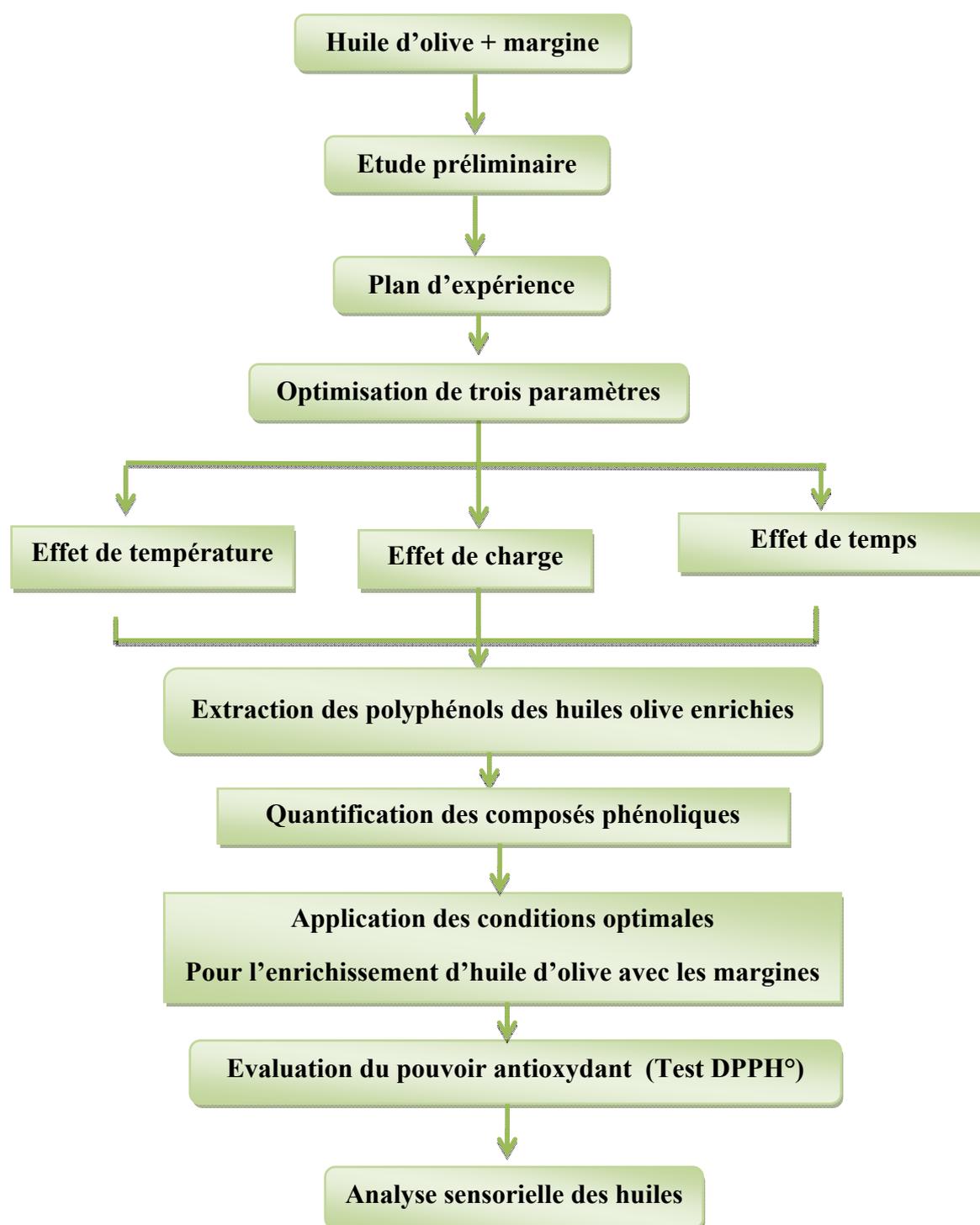


Figure 09 : Représentation schématique des étapes de l'étude réalisée.

### ➤ Etude préliminaire

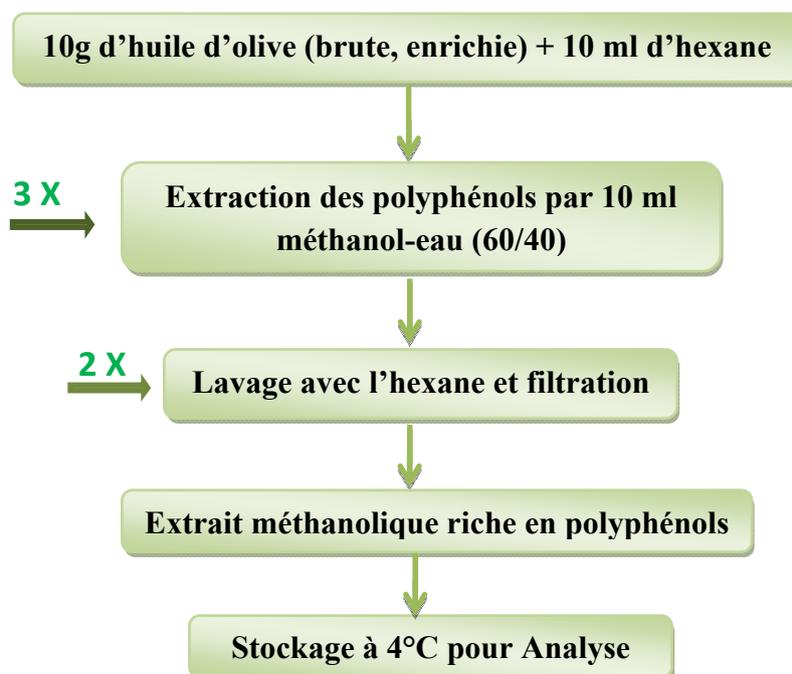
Avant de passer à l'enrichissement d'huile d'olive, des essais préliminaires ont été menés afin de déterminer les conditions nécessaires qui permettent d'accélérer le transfert des composés bioactives des margines à l'huile d'olive mais aussi pour déterminer les bornes à appliquer au plan d'expérience. Un ensemble de paramètres sont à prendre en compte dans notre étude : température, ratio et temps d'agitation. Le choix de ces paramètres n'est pas aléatoire, cela a été démontré par plusieurs auteurs [96, 97, 98]. Pour cela des enrichissements ont été réalisés sous des conditions différentes :

- ✓ Ration : 15%
- ✓ Température ambiante : 25°C
- ✓ Temps d'agitation : 1h, 2h, 4h et 8h.

## II.2.1. Extraction des composés phénoliques

### II.2.1.1. Huile d'olive

La méthode d'extraction des polyphénols totaux d'huile d'olive (brute et enrichies) est réalisée selon le protocole proposé par Tsimidou *et al* [115], c'est une extraction liquide-liquide (Fig.10).



**Figure 10** : Procédé d'extraction des composés phénoliques de l'huile [110].

### I.2.1.2. Margine

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont déterminés en utilisant le protocole proposé par Elena De Marco *et al* [40], c'est une extraction liquide-liquide (Fig.11)

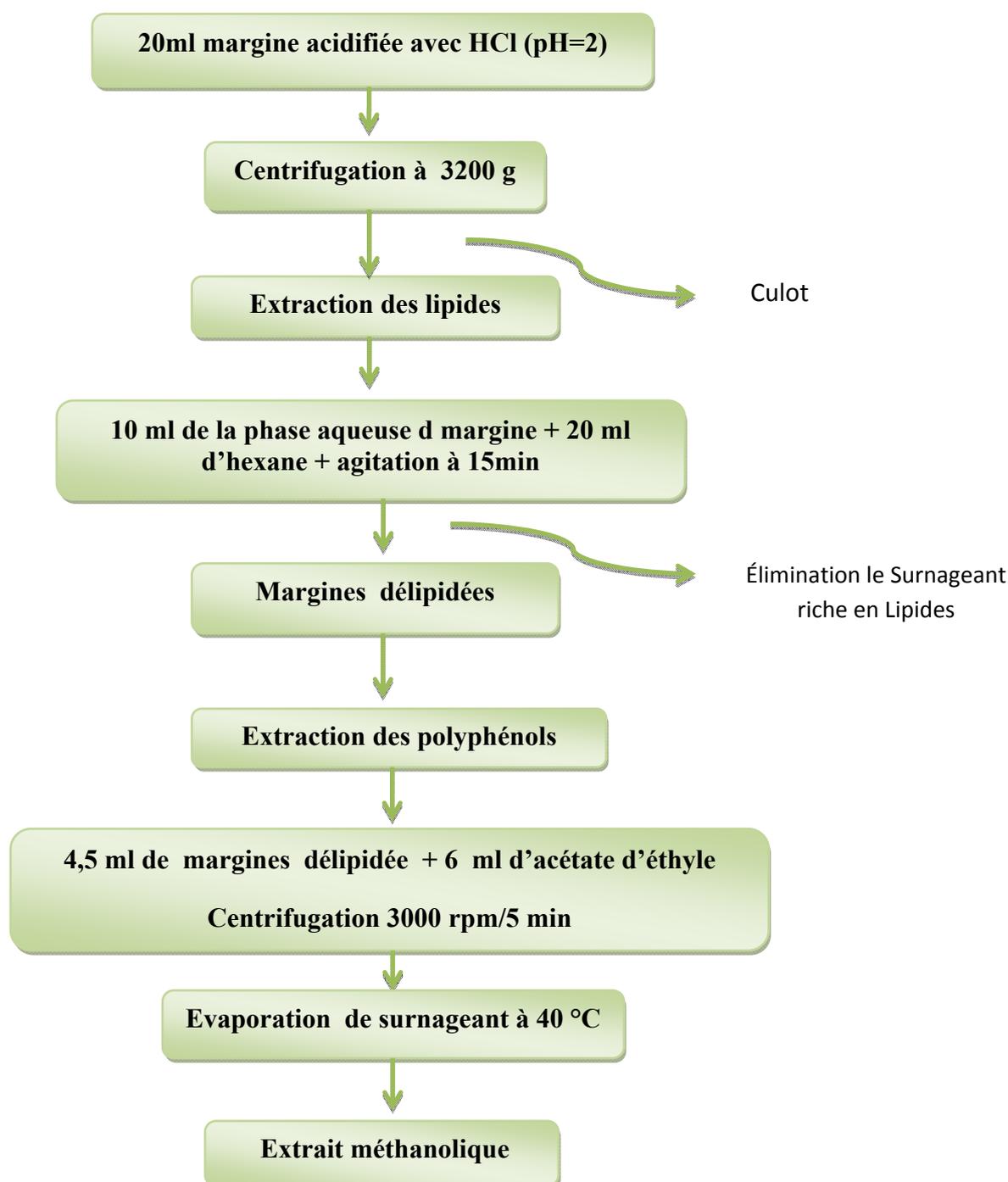


Figure 11 : Méthode d'extraction des polyphénols des margines [40].

## II.2.2. Quantification des polyphénols

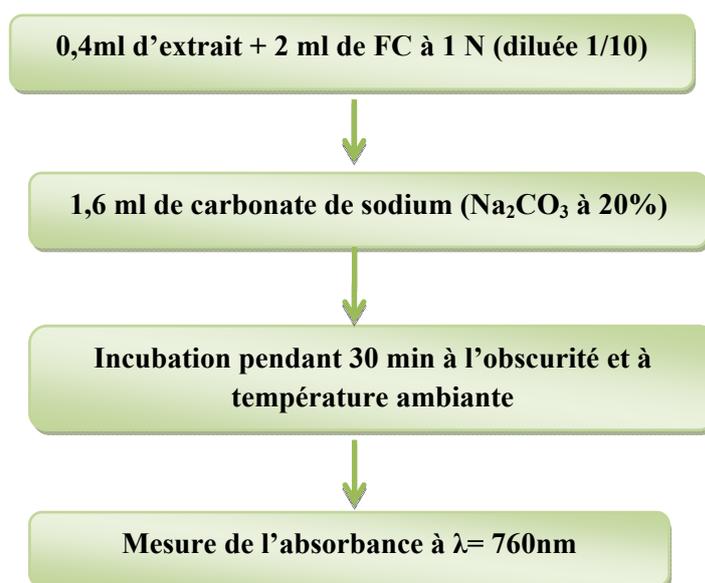
Les polyphénols présents dans les extraits méthanoliques étudiés, sont quantifiés par spectrophotométrie, basée sur des réactions d'oxydoréduction en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu (FC) comme oxydant [111].

### ➤ Principe

L'estimation quantitative des polyphénols, est réalisée à l'aide du réactif FC. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 760 nm. Elle est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans la solution [63].

### ➤ Protocole

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait des huiles d'olive (brute et enrichies) et de margine, a été déterminée par la méthode décrite par **Negi et al** [112] (**Fig.12**). La concentration des polyphénols dosés est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par kg d'huile (mg EAG/kg d'huile), en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe 01**).



**Figure 12:** Etapes du dosage des polyphénols totaux [112].

### II.3. Plan d'expérience théorie et application

Les plans d'expériences sont issus de méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation. Les premiers scientifiques, avoir posé le problème de l'organisation des essais, sont des agronomes. Ils avaient en effet beaucoup de paramètres à étudier et n'avaient pas la possibilité de multiplier le nombre d'expériences. De plus, la durée des expériences constituait une contrainte supplémentaire forte [113]. C'est Fisher qui, pour la première fois en 1925, proposa une méthode avec laquelle on étudiait plusieurs facteurs à la fois. Cette méthode fut reprise, puis développée par des statisticiens et des mathématiciens qui définirent des tables d'expériences permettant de réduire considérablement le nombre d'expériences à effectuer sans diminuer la pertinence de la campagne d'essais [114].

Les grandes entreprises se sont vite intéressées à cette méthodologie dans le cadre de l'approche qualité à la suite des travaux du Docteur Taguchi, qui a fortement contribué à l'expansion de l'utilisation des plans d'expériences en milieu industriel au Japon dans les années 1960. Au cours de ces dernières années, cette méthodologie, du fait de la pertinence des informations apportées, s'est développée dans la plupart des secteurs d'activités [115].

#### ➤ Principe

Il consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs, qui sont les variables, discrètes ou continues, à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse. L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise : « Obtenir un maximum d'information avec un minimum d'expériences » [115]. Il existe différents types de plans d'expérience, mais le plus utilisé est le plan de surface de réponse.

#### ➤ Terminologie

**Réponse :** Grandeur physique étudiée ;

**Facteurs :** Sont les variables qui peuvent modifier la réponse ;

**Niveau d'un facteur :** La valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience ;

**Domaine d'étude:** Domaine expérimental délimité par les niveaux inférieurs et supérieurs des facteurs étudiés;

**Plan d'expérimentation :** Matrice déclinant l'ensemble des conditions expérimentales, imposées aux variables naturelles pour la réalisation des différents essais, dans le cadre du plan d'expériences choisi;

**Matrice d'expériences :** Indique les niveaux pris par les variables codées aux différentes expériences.

### ➤ Plans de surface de réponse

La méthode des surfaces de réponse (MSR) est une technique d'analyse statistique puissante, bien adaptée à la modélisation des processus complexes où la réponse est influencée par plusieurs variables et dont l'objectif est d'optimiser cette réponse. Box et Wilson sont les premiers à avoir introduit la théorie de la MSR en 1951, et aujourd'hui elle est la méthode la plus couramment utilisée pour l'optimisation des processus.

Les MSR peuvent être utilisées pour modéliser et prédire l'effet des différents paramètres expérimentaux sur une réponse bien définie, ainsi que l'identification des interactions entre les paramètres expérimentaux que d'autres techniques peuvent négliger. La MSR a été largement employée dans le domaine de l'ingénierie et de la fabrication où de nombreux paramètres sont impliqués dans un processus. Pour ce modèle, il existe différents types de plans, dont les plus connus et les plus utilisés sont les plans composites centrés, les plans de Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans hybrides [115]

Le modèle mathématique utilisé dans la MSR est un modèle du second degré [115] :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Où

$y$  : La réponse (la grandeur d'intérêt).

$x_i, x_j$  : Les variables.

$\beta_0, \beta_i, \beta_j, \beta_{ii}$  : Les coefficients de régression

$\varepsilon$  : L'erreur aléatoire.

$n$  : Le nombre de facteurs

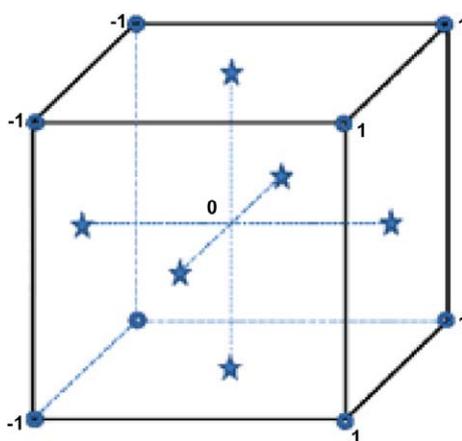
$i$  et  $j$  : Les indices des facteurs

- Le logiciel de calculs statistiques permet d'effectuer différentes opérations fondées sur l'analyse de la variance. Ce dernier permet d'évaluer si les valeurs obtenues pour une variable quantitative donnée sont significativement différentes. Un test de significativité des effets linéaires, quadratiques de chaque paramètre et des interactions est réalisé et représenté par le diagramme de Pareto. L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales est exprimée par un coefficient de régression  $R^2$ . Enfin, les représentations graphiques de cette équation sont réalisées sous forme de surfaces de réponse.

### ➤ Application du plan d'expérience

Le traitement des résultats est réalisé à l'aide du logiciel STATGRAPHICS. Le logiciel nous a permis de développer un plan d'expérience de type composite centré. Dans ce type de plan trois paramètres peuvent être testés, à savoir, la température, le temps d'agitation et le ratio et sont schématiquement représentés sur un graphique en trois dimensions (**Fig.13**). Chaque paramètre étant borné sur la base de l'étude préliminaire effectuée, 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 (température, temps d'agitation et le ratio) sur l'enrichissement d'huile ainsi que la fiabilité du système.

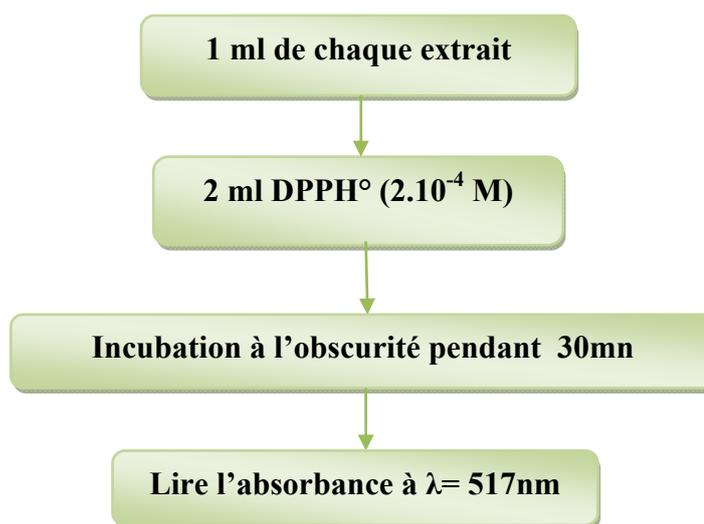


**Figure 13 :** Représentation du plan d'expérience sous forme d'un cube virtuel [115]

## II.4. Mesure du pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante des huiles brutes et enrichies est évaluée par la méthode « Test du DPPH° (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl) ».

La mise en évidence du pouvoir antiradicalaire des extraits obtenus, via le test DPPH° est effectuée par la méthode décrite par *Achat et al* [105] (Fig.14).



**Figure 14 :** Etapes du test de DPPH° [105].

### ➤ Principe

Le DPPH° est un radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible, qui provoque une couleur violette profonde [116]. Il réagit avec des groupements thiols, les amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques ...etc. Cette propriété est largement recommandée et utilisée dans la pratique analytique; quand la solution du DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, alors ceci provoque la forme réduite (1,1-diphényl-2-(2, 4,6-trinitrophenyl) hydrazine (DPPH<sub>2</sub>), avec la perte de la couleur violette et apparition d'une couleur jaune pâle résiduelle, due à la présence du groupement picryle. Le radical DPPH° a un maximum d'absorbance aux environs de 517 nm, qui diminue quand le radical est réduit. la méthode DPPH° est décrite comme étant simple, rapide et commode indépendante de la polarité d'échantillon [105]. Les absorbances ont été converties aux taux de radical-balayage de DPPH selon l'équation ci-après :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = (AC - AE / AC) \times 100$$

**AC** : Absorbance du contrôle

**AE** : Absorbance de l'échantillon

## II.6. Evaluation sensorielle

Actuellement l'analyse sensorielle est largement répandue et développée au sein des industries agroalimentaires. Elle repose sur la dégustation des produits et sur l'analyse des réponses sensorielles données par un groupe de sujets (jury), pour décrire le profil d'un produit en se basant sur une liste de vocabulaire [117].

Dans le but de déterminer les propriétés organoleptique de nos deux types d'huile d'olive vierge (HOV) codées respectivement 1 et 2 (HOV et HOV enrichie), nous avons opté d'établir à chacune d'elle un profil sensoriel (carte sensorielle) afin de mettre en évidence l'avis du consommateur (**Annexe 02**)

L'évaluation des propriétés sensorielles de l'HOV et de l'HOV enrichie a été réalisée selon la méthode de **Lalas et al** [102]. Le panel a été formé de douze dégustateurs, choisis à partir du personnel du laboratoire *BBBS*. Les sujets sont invités à se prononcer sur les caractéristiques : l'acceptabilité globale de chaque échantillon (tenant compte de tout mauvais goût), en utilisant une échelle numérique allant de 1 à 5 (1= non acceptable, 5= extrêmement bon), ainsi que l'amertume, le rancissement et autres (épreuve descriptive) et sur leur préférence [100].

*Résultats  
et discussion*

### III. Résultats et discussions

#### III.1. Extraction des composés phénoliques

- **Huile d'olive**

L'extraction par solvant est une technique très utilisée pour extraire les composés bioactifs à partir du matériel végétal. C'est un processus destiné à séparer les principes actifs solubles par diffusion [40]. L'extraction des polyphénols contenus dans les huiles étudiées, brute et enrichie, a été réalisée avec deux solvants, hexane et méthanol. D'après la littérature la solubilité des composés phénoliques dépend de la polarité du solvant utilisé, c'est pour cela que nous avons opté pour le méthanol étant plus polaire par rapport à l'éthanol, l'acétone...etc, qui présentent une faible affinité vis-à-vis de ces substances [118]. Après avoir libéré les phénols, l'hexane permet la bonne séparation des deux phases non miscibles; une phase hexanique, renfermant tout ce qui est lipidique et une phase, méthanolique, renfermant les polyphénols extraits de l'huile.

- **Margine**

L'extraction liquide- liquide avec l'acétate d'éthyle est l'une des techniques les plus efficace pour l'extraction des polyphénols des margines, l'acétate éthylique a été choisi pour sa grande puissance d'extraction des polyphénols par rapport à d'autre solvant, tels que méthyle, méthanol, éthanol.

Avant de procéder à l'extraction des composés phénoliques à partir des margines, elles doivent au préalable, subir une acidification par HCl dans le but d'augmenter la force ionique du milieu et empêcher l'oxydation des composés phénoliques [40]. En effet, les travaux d'**Elena De Marco et al** [40], ont révélé que l'acidification permet d'extraire un taux plus élevé de polyphénols : une concentration de 2702 mg/kg margine ave acidification contre seulement 1150 mg/kg de margine sans acidification.

#### III.2 Quantification des polyphénols totaux

La technique colorimétrique de Folin-Ciocalteu est l'une des méthodes désignées pour la détermination quantitative des composés phénoliques dans l'huile d'olive et aussi bien pour les margines. Une couleur bleu est observé après l'ajout du réactif de FC et du monohydrate de carbone sodique aux extraits méthanoliques des huiles, ce qui confirme la présence de

polyphénols dans les extraits. L'intensité de la coloration produite, est proportionnelle à la quantité totale des composés phénoliques présentes dans les échantillons [108]

Les résultats du dosage colorimétrique des extraits méthanoliques d'huile d'olive et de margine, sont consignés dans le tableau ci-après :

**Tableau II:** Teneur en composés phénoliques des huiles étudiée (brute et enrichie)

Matrice	Huile d'olive	Margine
Teneur des polyphénols totaux (mg EAG/kg)	<b>56 ± 4,3</b>	<b>3414 ± 22</b>

- Comme première appréciation, la concentration des polyphénols des margine est nettement très élevée, 62 fois plus grande, que celle d'huile d'olive. Ce qui confirme que sauf 2% du contenu total des phénols du fruit de l'olive passe dans l'huile, au cours de son extraction, le reste se trouve dans la margine (53%) et dans le grignon (45%) [40, 41]. Cependant la quantité des composés phénoliques des margines (3,414 g/L) est vraisemblablement proche de celles obtenues dans plusieurs études (2,7 à 12 g /L) [23, 40, 44, 45].

En revanche, pour la teneur en composés phénoliques de l'huile d'olive vierge (56±4,3 mg EAG/kg), reste difficile à la comparer à celle estimée dans des travaux antérieurs (Tableau III).

**Tableau III :** Taux de polyphénols totaux dans d'huile d'olive de différents travaux [118]

Teneurs en phénols (mg/kg d'huile)	Standard	λ (nm)
119-139	Acide gallique	765
73-265	Acide gallique	765
44-157	Acide caféique	725
52-356	Acide caféique	725
20- 339	Acide caféique	725

- En Effet, d'après ces résultats, nous constatons une variation importante du taux de polyphénols d'un échantillon à un autre. Cette différence est probablement due d'une part aux conditions expérimentales dans lesquelles la réaction de FC est réalisée, notamment la

nature des composés de référence utilisés. Pour le même échantillon, la concentration des phénols totaux de l'huile avec douze étalons différents, varient de **70 à 380 mg/kg [118]**.

- D'autre part la différence entre notre résultat et ceux du tableau ci-dessus, peut être expliquée aussi par le changement des conditions climatiques, la variété, le degré de maturation des olives et la durée de stockage de ce fruit avant la trituration ainsi que le procédé d'extraction de l'huile.

### **III.3 Enrichissement de l'huile d'olive**

La méthode d'enrichissement effectuée dans notre travail est un enrichissement direct [97, 100], où une quantité de margine est ajoutée à l'huile d'olive. L'ensemble est soumis à une agitation, une étape préliminaire de solubilisation directe des polyphénols, suivie d'une extraction au méthanol

L'enrichissement de l'huile d'olive par les margines présente un intérêt vu leur richesse en antioxydant naturels notamment les polyphénols [40]. A cet égard le processus de transfert des polyphénols peut-être amélioré en optimisant certains paramètres tels que le temps d'agitation, la température et la charge mais tout en préservant la qualité nutritionnel d'huile. Pour cela et avant la réalisation de cette étape, des essais préliminaires doivent être menés afin de déterminer les bornes à appliquer au plan d'expérience.

#### **III.3.1 Etude préliminaire**

Avant d'avoir recours à un plan d'expérience, différents paramètres sont à prendre en compte dans notre analyse: la température, le ratio et le temps d'agitation, qui sont éventuellement des conditions influençant le transfert des composés bioactive des margines vers l'huile d'olive :

##### **a)- Le choix du temps d'agitation**

Ce paramètre doit être testé lors des études préliminaires afin de déterminer les bornes temporelles du temps d'agitation. De ce fait une série d'essais à différents temps d'agitation est réalisée, à savoir 1 heure, 2 heures, 4 heures et 8heures (**Tableau IV**). Ceci a conduit à la conclusion suivante : plus on augmente le temps d'agitation, plus le transfert est meilleur mais à partir de 6 à 8 heures, on a tendance à avoir une constance, c'est pourquoi, les bornes du temps d'agitation sont prises entre 1 heure et 8 heures.

**Tableau IV:** Taux de polyphénols totaux de l'huile enrichie en fonction du temps

Température (°C)	Ratio (%)	Temps (H)	Taux de polyphénols (mg EAG/kg d'huile)
25	15	1	98 ± 6
25	15	2	184 ± 4
25	15	4	178 ± 16
25	15	8	148 ± 9

**b)- Le choix de 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. L'huile d'olive étant un produit sensible à la température, nous avons décidé de nous arrêter à 40°C afin d'éviter la détérioration et donc de ne pas influencer le résultat du plan [100, 105, 107].

**c)- Le choix du ratio**

Dans l'optique de ne pas avoir de problèmes de colmatage, qui gêne l'homogénéisation de l'huile, ni de perte d'huile par saturation, la charge est bornée entre 4% et 25% [100, 107]

- D'une part les résultats de l'étude préliminaire que nous avons mené pendant la première étape de notre travail et d'autre part les données des travaux rapportés dans la littérature, nous ont permis d'identifier comment les divers paramètres sélectionnés sont importants et d'estimer leur champ de variation que nous devrions étudier dans le plan d'expérience.

**III.4. Conditions optimales**

Les plans d'expériences sont très utilisés dans les études industrielles en recherche et développement. Ils permettent une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans la conception d'un nouveau produit et d'appréhender une variable réponse rapidement. Cette analyse statistique intervient dans de nombreux domaines industriels (chimie, pharmacie, agro-alimentaire...etc) afin d'étudier, d'optimiser, de comparer ou d'estimer divers critères. Les plans d'expériences s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité [35]. A cet effet une étude composée de 20 expériences, a été conduite et nous a permis d'avoir les résultats représentés dans le tableau V .

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

N° d'essai	Température (°C)	Temps (H)	Ratio (%)	polyphénols totaux (mg EAG/kg d'huile)
1	25	4	15	117 ± 2
2	25	4	4	96 ± 1
3	10	4	15	83 ± 1
4	16	2	21	85 ± 1
5	16	7	21	162 ± 2
6	34	7	21	91 ± 1
7	25	0,47	15	131 ± 1
8	34	2	21	70 ± 6
9	25	4	15	117 ± 2
10	34	2	9	87 ± 3
11	25	4	15	143 ± 3
12	25	4	25	95 ± 3
13	16	2	9	83 ± 2
14	25	4	15	116 ± 2
15	25	8	15	137 ± 1
16	25	4	15	162 ± 1
17	25	4	15	155 ± 9
18	25	7	9	142 ± 1
19	16	4	15	55 ± 1
20	40	7	9	75 ± 1

- Notons que l'ordre de réalisation de ces différentes manipulations est de façon aléatoire, comme il a été proposé par le logiciel Statgraphics. La variable analysée dans notre cas est la teneur en polyphénols totaux (PT) dans l'huile d'olive enrichie par les molécules bioactives des margines.

- D'après les résultats de la présente étude, la teneur en PT d'huile enrichie varie entre **55** et **162** mg EAG/kg d'huile, ce qui confirme l'influence des paramètres sélectionnés (temps, température et ratio) sur le taux d'enrichissement de l'huile par les polyphénols des margines.

### III.5. Traitement des données par Statgraphics

#### III.5.1. Analyse de la variance des polyphénols totaux

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur les résultats obtenus (**Tableau V**). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le model étudié, si les valeurs obtenues pour une variable quantitative donnée sont significativement

différentes, et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée, en l'occurrence la teneur des PT (**Tableau VI**).

**Tableau VI** : Analyse de la variance des polyphénols totaux

Source	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	Ratio-F	Valeur-p
<b>Effet linéaire</b>					
<b>A: Température</b>	2663,53	1	2663,53	8,30	<b>0,0164*</b>
<b>B: Temps</b>	1651,96	1	1651,96	5,15	<b>0,0467***</b>
<b>C: Ratio</b>	81,5443	1	81,5443	0,25	0,6252
<b>Effet d'interaction</b>					
<b>BC</b>	350,594	1	350,594	1,09	0,3206
<b>AB</b>	2227,79	1	2227,79	6,94	<b>0,0250**</b>
<b>AC</b>	60,5	1	60,5	0,19	0,6734
<b>Effet quadratique</b>					
<b>AA</b>	7848,39	1	7848,39	24,45	<b>0,0006 ****</b>
<b>BB</b>	0,167003	1	0,167003	0,00	0,9823
<b>CC</b>	2717,36	1	2717,36	8,46	<b>0,0156*</b>
<b>Total error</b>	3210,41	10	321,041		
<b>Total (corr.)</b>	20105,2	19			
<b>Lack-of-fit</b>	1008,41	5	201,682	0,46	<b>0,7942</b>

$R^2 = 84\%$ ,  $R^2$  (ajusté à Ddl) = **70%**

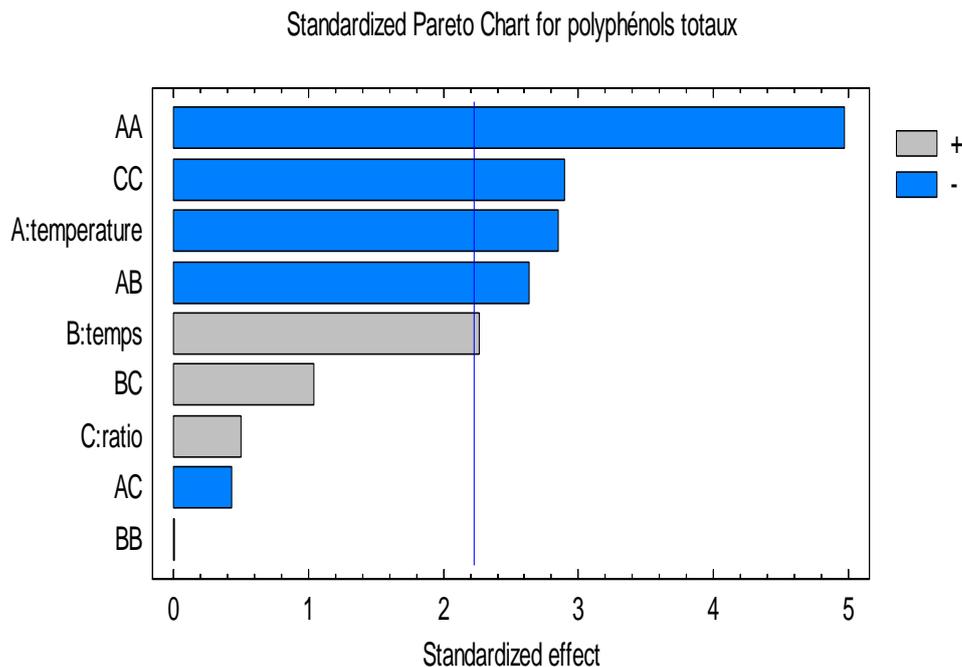
Erreur standard= 18; Erreur absolue = 11

- Les données de l'analyse de la variance (ANOVA), nous ont permis de déduire que les facteurs influents préférentiellement sur l'enrichissement de l'huile d'olive en antioxydants des margines, sont la température, le temps et le ratio avec une valeur- $p$  inférieure à 0,05 au niveau de confiance de 95%. Ceci est bien illustré dans le diagramme de Pareto (**Fig. 15**).

- L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de régression  $R^2$ , Dans la présente étude, la valeur de  $R^2$  est de **84%**, ce qui signifie que uniquement **16%** des variations ne sont pas expliquées par le modèle. De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté est élevée ( $R^2_{\text{ajusté}} = 70\%$ ), ce qui confirme la haute significativité du modèle. De plus  $p$ -value de **lack of-fit = 0,7942** est supérieur à 0,05 ce qui est témoin de la validité de ce plan et semble être suffisant pour nos résultats expérimentaux à un niveau de confiance 95%.

### III.5.2 Analyse de surface

A partir de l'analyse ANOVA, un diagramme de Pareto (**Fig. 15**) représentant les différents effets de manière standardisée, a pu être dressé afin de déterminer quels sont les paramètres influençants de façon significative, par ordre d'importance pour chaque variable (effets linéaires, interactions entre facteurs et effets quadratiques).

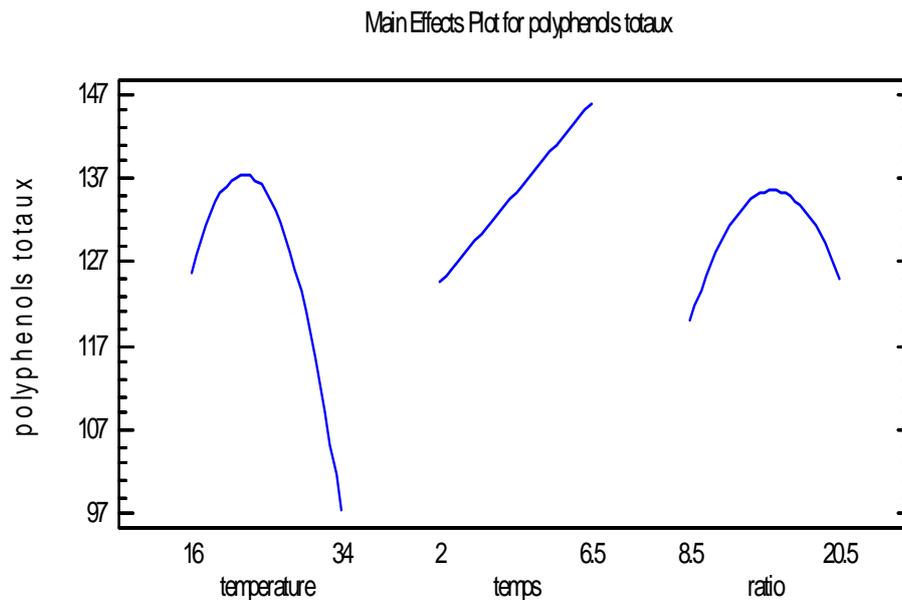


**Figure 15** : Diagramme de Pareto pour la concentration en polyphénols totaux.

- Il peut être remarqué sur ce diagramme que l'effet quadratique de la température ( $A^2$ ), est la variable quantitative présentant l'influence la plus importante sur la concentration de PT, avec une probabilité  $p = 0,0006$  et un coefficient négatif (CN) de l'ordre de - 48, qui est suivi par le facteur ratio ( $C^2$ ) ( $p = 0,0156$  et CN = -26). L'effet linéaire de la température (A), de l'interaction température-temps (AB) et l'effet linéaire du temps (B), ont montré aussi des effets significatifs, par ordre d'importance, qui sont respectivement :  $p = 0,0164$  et CN= -28;  $p = 0,025$  et CN= -30;  $p = 0,0467$  et CP = 21. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Achat et al. [100]**, ayant démontré l'influence significative de la température et du temps d'agitation sur l'enrichissement de l'huile d'olive avec les polyphénols (oleuropeine) des feuilles d'olivier. Par ailleurs les paramètres BC, C, AC et  $B^2$  n'ont révélé aucun effet

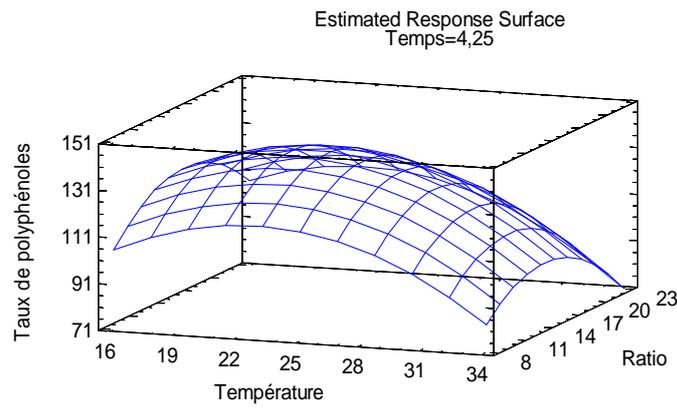
significatif. Ce Dernier suggère une absence totale d'interactions entre les variables dans le domaine expérimental étudié.

- La modélisation de la réponse, taux de PT, en fonction des variables testées (température, temps et ration) avec la MSR, a été réalisée afin de mieux élucider les conditions optimales de cette réponse (**Fig.16 et Fig.17**).

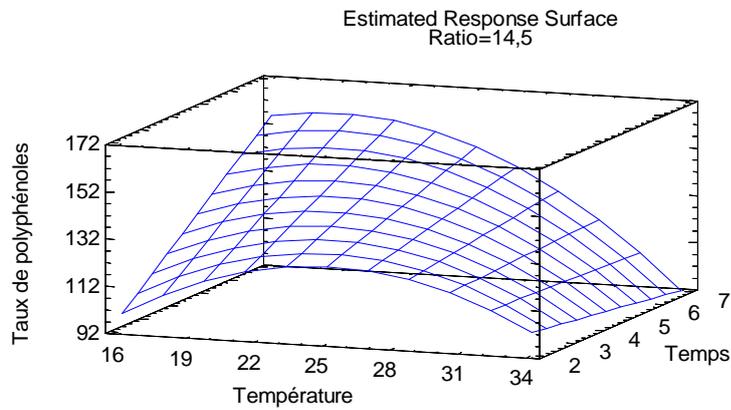


**Figure 16:** Effet général des facteurs (température, temps et ration) sur les polyphénols totaux

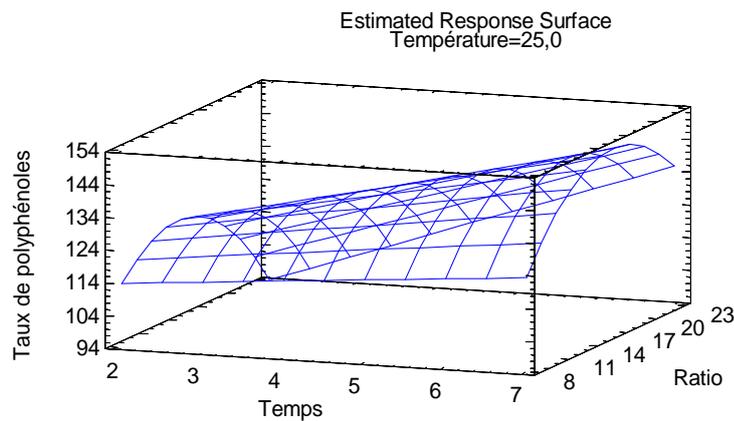
- A l'image de ce graphe, nous constatons clairement une linéarité pour le temps d'agitation ; plus on augmente le temps de contact huile d'olive-margines, le transfert de polyphénols s'accroît, qui est en accord avec le résultat obtenu au cours de l'étude préliminaire. Toutefois l'influence des variables températures et ratio sur la teneur en PT, a donné une allure sous forme de cloche ou de parabole, où la valeur crête représente l'optimum.



(a)



(b)



(c)

**Figure 17:** Surfaces de réponse de l'effet des différents facteurs: **(a):** Influence de la température et du ratio à 4,25 H, **(b):** Influence de la température et du temps à 14,5%, **(c) :** Influence du temps et du ratio à 25°C.

- Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux [106]. Le modèle prédit (optimum théorique) avec le plan d'expérience de type composite centré, opté dans la présente étude, a été décrit par une équation polynomiale du second degré ci-dessous:

$$Y = -179,624 + 16,9972 A + 16,8694 B + 10,0967 C - 0,293619 A^2 - 0,736738 AB - 0,0509259 AC - 0,0118047 A^2 + 0,437548 BC - 0,354562 C^2$$

Où:

Y: Concentration en PT (mg EAG/kg d'huile);

A: Température (°C);

B: Temps de sonication (H);

C: Ratio (%)

- De ce fait, les conditions optimales d'enrichissement identifiées, par l'exploitation des données traitées avec le logiciel Statgraphics, sont représentées dans le tableau ci-après :

**Tableau VII** : Conditions optimales d'enrichissement de l'huile d'olive avec les margines

Paramètre	Optimum
Température (°c)	17
Ration (%)	18
Temps (Heure)	8,0

- La valeur expérimentale, recelée lors de l'application de ces conditions (optimum), du taux polyphénols totaux est égale à **184 ±29** mg d'EAG/kg d'huile, qui est proche de la valeur prédite (**173** mg d'EAG/kg d'huile). Ce qui confirme, le degré de corrélation élevée entre les données observées et les valeurs prédites du modèle de régression ( $R^2 > 84$ ,  $R^2_{aj} > 70$ ). Ceci démontre l'adéquation du modèle pour les résultats expérimentaux, qui est confirmé par le test du lack of fit ou la valeur- $p > 0,05$  (**Tableau VI**).

A la lumière des résultats issus de cette analyse, il s'est avéré que :

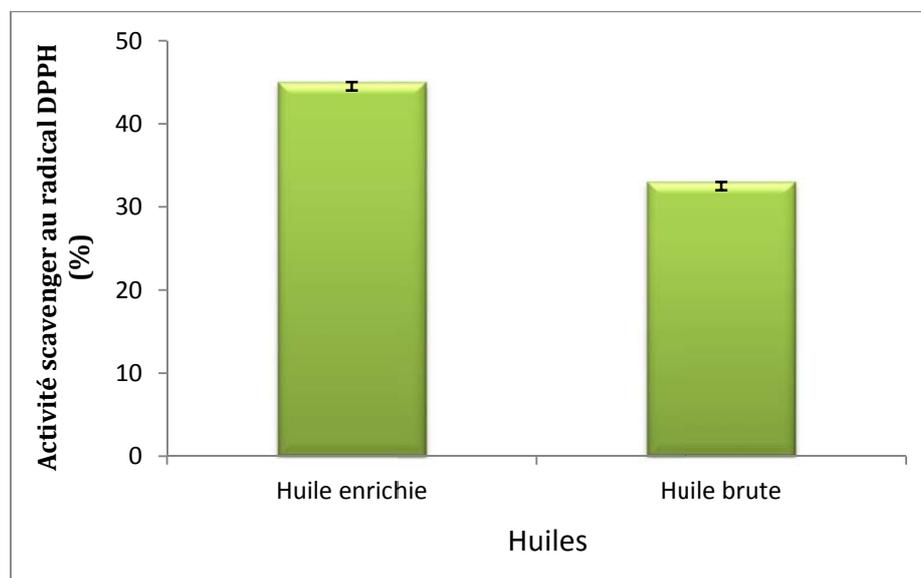
- Le modèle polynomial d'ordre deux peut modéliser correctement le phénomène étudié;

- Les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles conduisant au meilleur transfert des polyphénols des margines vers l'huile, sont obtenues au sein du domaine expérimental :

*Donc la modélisation des surfaces de réponse peut être effectivement appliquée, pour l'enrichissement de l'huile d'olive vierge par les principes actifs, particulièrement les composés phénoliques des margines.*

### III.6 Mesure du pouvoir antioxydant

Ces dernières années, un intérêt grandissant porté aux substances potentiellement antioxydantes est apparu, en vue de prévenir notamment les effets délétères des radicaux libres. Parallèlement à cela, de nombreuses méthodes se sont développées permettant d'évaluer les capacités antioxydantes des composés naturels, l'une de ces méthodes, couramment utilisée, est l'effet scavenger au radical libre et stable: le DPPH°. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances contenues dans les extraits d'huiles d'olive (enrichie et brute). Les résultats enregistrés sont représentés dans la figure ci-après :



**Figure18** : Activité scavenger du radical DPPH° de l'huile d'olive avant et après enrichissement

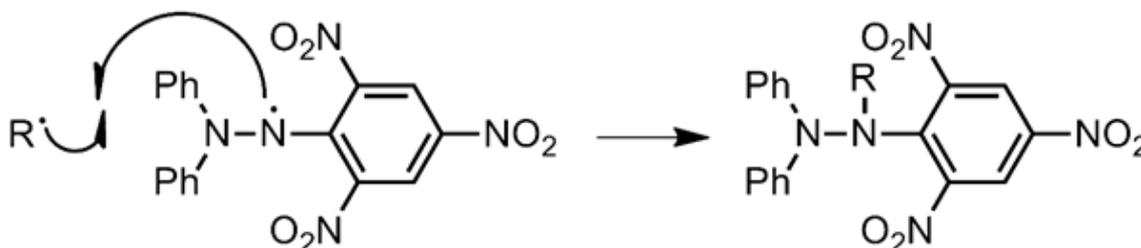
- Les données de la figure ci-dessus, montrent nettement que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH° par l'extrait méthanolique de l'huile d'olive enrichie est plus élevé (**45±0,02 %**) que celle d'huile d'olive brute (**33±0,01 %**). En se basant sur ces résultats, nous pouvons

conclure que cette variation pourrait principalement due à la présence de certaines molécules potentiellement actives notamment les polyphénols. En effet, d'après la littérature l'activité antioxydante de l'huile d'olive est liée à sa composition phénolique, le cas de l'hydroxytyrosol et du tyrosol mais aussi à la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) [107], par contre le pouvoir antioxydant important de l'huile enrichie peut être liée au transfert des polyphénols des margines vers l'huile brute de  $56 \pm 4,3$  mg/kg d'EAG/kg) à  $184 \pm 29$  mg d'EAG/kg. En effet la détermination du potentiel antioxydant des polyphénols des margines via le test DPPH°, a révélé une activité antiradicalaire importante [63, 64].

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

- ✓ la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ;
- ✓ la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) [3,18].

- Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH° alors transformé en une molécule stable DPPHH (Fig. 19) [30, 31] :



**Figure 19** : Structure du radical 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl et de sa forme réduite [30].

### III.7 Analyse sensorielle

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 ou bien durant son enrichissement, 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 Conseil Oleicole International (COI) et la Communauté Economique

Européenne (CEE). Les attributs sensoriels d'une huile ont été classés en deux catégories, les attributs positifs, le cas de l'amertume et les défauts comme le rancissement :

- **Amer**: Il est défini comme le goût élémentaire caractéristique de l'huile obtenue d'olives vertes ou au stade de la véraison ;
- **Rance** : Flaveur des huiles ayant subi un processus d'oxydation intense [9]
- Afin de recenser les propriétés organoleptiques de l'huile enrichie par les margines, nous avons réalisé une évaluation sensorielle en l'a comparant à l'huile d'olive vierge, comme référence, dont les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau VIII** : Résultats du test d'analyse sensorielle des huiles étudiées

Attributs	Huile brute	Huile enrichie
Amer	1	1
Rance	1	1
Autres	1	3
Acceptabilité totale	3	4
Préférence totale	3	4

- D'après les résultats présentés dans ce tableau, les caractéristiques sensorielles des huiles, brute et enrichie, indiquent l'absence de l'amertume et du rancissement pour les deux types d'huiles avec le même ordre de grandeur pour l'acceptabilité globale et la préférence totale. Par ailleurs la détection de sous-produits de l'olive a été perçue par les dégustateurs pour l'huile enrichie (Autres = 3), ce qu'est justifié par la présence de margine dans cette huile. Ceci n'a pas empêché l'appréciation de cette huile par le jury.

- Toutefois, l'évaluation de cette huile par un panel de jury qualifié (compétences bien particulières dans ce domaine et un environnement spécifique), est recommandée dans la perspective du développement de ce nouveau produit.

*Conclusion*



**Conclusion:**

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments, notamment les huiles végétales dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire. Les polyphénols sont des substances bioactives qui suscitent actuellement l'intérêt de plusieurs chercheurs en raison des bénéfices santé qu'ils procurent à l'Homme, effet antioxydant. Ces molécules pourraient lutter activement contre l'oxydation des lipides.

Ce modeste travail s'est attelé à l'investigation de l'optimisation de l'enrichissement de l'huile d'olive vierge avec les principes actifs (antioxydants) de son sous-produit, margine, par application d'une technique statistique, plan d'expérience. Elle est basée sur l'intégration d'une méthode qui est la MSR, qui permet d'obtenir un maximum d'informations, avec un minimum d'expériences.

La détermination quantitative des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge et des margines, a révélé la richesse de ce déchet liquide en ces molécules:  $3414 \pm 22$  mg EAG/ kg de margine contre  $56 \pm 4,3$  mg EAG/kg d'huile. Ce qui confirme que sauf 2% du contenu total des phénols du fruit de l'olive passe dans l'huile, au cours de son extraction, le reste se trouve dans la margine (53%). Ce résultat renforce davantage l'idée de l'enrichissement et l'utilisation des margines comme source naturelle d'antioxydants.

L'analyse des données de l'étude préliminaire effectuée, a indiqué que plusieurs facteurs (température, temps et ratio) semblent moduler, le taux d'extraction des polyphénols totaux du mélange huile d'olive-margine. Elle nous a permis aussi de déterminer les bornes du plan d'expérience adopté.

Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA), réalisée pour les PT issus à partir du plan d'expérience, ont confirmé les essais préliminaires. Ainsi les facteurs qui influencent significativement l'enrichissement de l'huile d'olive en polyphénols des margines, sont la température, le temps et le ratio avec une valeur- $p < 0,05$  au niveau de confiance de 95%.

La modélisation de la réponse, taux de PT, en fonction des variables testées (température, temps et ration) avec la MSR, a été réalisée afin de mieux élucider les conditions

expérimentales optimales de cette réponse. De ce fait l'optimum des paramètres est dicté comme suit :

- Température de 18°C ;
- Ratio solide-liquide de 18% ;
- Temps d'agitation de 8 heures.

Le taux de composés phénoliques obtenu, sous ces conditions est de **184±29** mg EAG/kg d'huile, qui s'aligne dans l'intervalle de prévision du plan d'expérience estimé à **173** mg EAG/kg d'huile. Ce qui confirme, le degré de corrélation élevée entre les données observées et les valeurs prédites du modèle de régression ( $R^2 > 84$ ,  $R^2_{aj} > 70$ ). Ceci démontre l'adéquation du modèle pour les résultats expérimentaux, qui est confirmé par le test du lack of fit où la valeur- $p > 0,05$ . Donc la modélisation des surfaces de réponse peut être effectivement appliquée, pour l'enrichissement de l'huile d'olive vierge par les polyphénols des margines

À la lueur de l'évaluation de l'activité antioxydante, par la méthode du DPPH°, il s'est avéré que l'huile d'olive enrichie détient la capacité la plus importante à piéger ce radical, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de **45±0,02%** par rapport à l'huile brute (**33±0,01%**). Ceci peut refléter la quantité élevée d'antioxydants présente dans l'huile enrichie. En effet le taux de polyphénols totaux était de **56±4,3** mg EAG/kg d'huile et atteint une concentration de **184±29** mg EAG/kg après enrichissement. Ce qui confirme la supplémentation de l'huile par les antioxydants naturels ;

Le test d'analyse sensorielle réalisé en vue de receler les propriétés organoleptiques de l'huile enrichie par les margines, a indiqué l'appréciation des dégustateurs de ce produit.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude ne constitue qu'une ébauche dans la recherche d'antioxydants naturels, afin de minimiser le processus d'oxydation des lipides, il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- ✓ L'isolement et l'identification des substances polyphénoliques présentes dans les huiles étudiées, qui sont responsables de l'activité antioxydante;
- ✓ L'évaluation des caractéristiques physicochimiques de l'huile d'olive vierge et enrichie (indice d'acide, iode, saponification, peroxyde, couleur,...etc.) ;

- ✓ *L*e suivi du processus oxydatif des huiles testées (test de friture, dosage des produits d'oxydation) ;
- ✓ *C*omparaison de la macération conventionnelle aux nouvelles technologies (ultrasons et micro-onde) ;
- ✓ *U*ne étude comparative de l'enrichissement de l'huile d'olive avec des margines lyophilisées, pour bien maîtriser le transfert solide-liquide;
- ✓ *A*pplication de l'enrichissement proposé aux huiles raffinées (soja, tournesol...etc.).

*Références  
bibliographiques*

1. **Ghedira K. (2008).** L'olivier. *Phytothérapie* 6: 83–89
2. **Petruciol M. Servili M. Montedero G.F. Federici F. (1988).** Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process. *Biotechnology Letters*.1, 55-60
3. **Hamdi M. Garcia J.L et Ellouz R. (1992).** Integrated biological process for olive mill wastewaters treatment. *Bioprocess. Eng.* 8, 79.10
4. **Kubow S. (1990).** Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends in Food Science and Technology.* 67-71
5. **Gertz C. Klostermann S. Kochhar S. P. (2000).** Testing and comparing oxidative stability of vegetable oil and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 102, 543-551
6. **Farag R.S. El-Baroty G.S. & Amany. Basuny M. (2003).** The influence of phenolic extracts obtained from the olive plants (cvs. Picual and Kronakii) on the stability of sunflower oil. *Journal of Food Science and Technology.* 38: 81-87
7. **Warner K. (2002).** Chemistry of frying fats. In: Akoh C and Min D.B. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology.* New York: Marcel Dekker, pp. 167-180
8. **Tsioulpas A. Dimou D. Iconomou D. Aggelis G. (2002).** Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotu* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresour Technol* 84: 251- 257
9. **International Olive Oil Council.** <http://www.internationaloliveoil.org/>
10. **Tsagariki E. Harris N. Lazarides. Konstantinos B. P. (2007).** Olive mill waste water treatment. *Springerlink.* 133-157
11. **Bensemmane A. (2009).** Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. *Premier forum méditerranéen de l'oléiculture.* 1111- 4762
12. **Roig A. Cayuela M.L. Sanchez-Monedero M.A. (2006).** An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26: 960–969
13. **Nefzaoui A. (1991).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale es sous-produits. *Option méditerranéennes.* 16 : 101-108

14. Galanakis C. M. Tornberg E. Gekas V. (2010). A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *Food Science and Technology*. 43:1009-1017
15. Chiofalo B. Liotta L. Zumbo A. Chiofalo V. (2004). Administration of olive cake for ewe feeding: effect on milk yield and composition. *Small Ruminant Research*. 55: 169–176
16. Martin-Garcia A.I. Moumen A. Yanez-Ruiz D.R. Molina-Alcaide E. (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*. 107: 61–74
17. Hamdi M. (1993). future prospects and constraints of olive mill waste use and treatment. A. Review. *Bioprocess Engineering*. 8: 209-214
18. Yalcuk A. Baldan Pakdil N. Yaprak Turan S. (2010). Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands Desalination. *Journal of agricultural Food Chemistry*. 262: 209–214
19. Hachicha R. Hachicha S. Trabelsi I. Steve Woodward B. Mechichi T. (2009). Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: *Maturity assessment of the end product*. *Chemosphere*. 75: 1382–1386
20. Tsagariki E. Harris N. Lazarides. Konstantinos B. P. (2007). Olive mill waste water treatment. *Springerlink*. 133-157
21. Hafidia M. Amira S. Revel J.C. (2005). Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and <sup>13</sup>C NMR. *Process Biochemistry*. 40: 2615–2622
22. Moussaoui R. Siziani D. Youyou A. Sharrock P and Fiallo M. (2010). Antioxidant effect of phenolic compounds recovered from olive mill wastewater of Chemlal variety cultivated in Kabylia (Algeria) on the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 8 (3&4): 86-89
23. Khoufi S. Feki F. Sayadi S. (2007). Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials* 142, 58-67
24. Ramos-Cormenzana A. Juirez-Jimenez B & Garcia-Pareja.M.P. (1996). Antimicrobial Activity of Olive Mill wastewaters (Alpechin) and Biotransformed olive oil Mill Wastewater. *Journal of agricultural Food Chemistry*. 58-67

- 25. Tsagariki E. Harris N. Lazarides. Konstantinos B. P. (2007).** Olive mill waste water treatment. *Springerlink*. 133-157
- 26. Fiestas Ros de Ursinos J.A. Borja R. (1992).** Use and treatment of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*. 2: 101-106
- 27. Obied H. Allen M. Bedgood D. Prenzler P. Robards K. Stockmann R. (2005).** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agrical Food Chemistry*. 53: 823-837.
- 28. Boulagui Z. Bouziz M. Junkyu H. Boukris M. FRIHA1 G, Hedy J. FKI 1. Ghorbeli H. Hiroko I and Sayadi S. (2012).** Valorization of Olive Processing By-Products: Characterization, Investigation of Chemico-Biological Activities and Identification of Active Compounds . *Journal of Arid Land Studies*. 22-1, 61 -64.
- 29. Panizza M. Cerisola G. (2006).** Olive mill wastewater treatment by anodic oxidation with parallel plate electrodes. *Water research*. 40 : 1179 – 1184.
- 30. Mompon B. Lemaire B. Mengal P et Surbel D. (1996).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. IN « Polyphénols 96 ». Ed INRA. 31-35.
- 31. He Z., Xia W et Chen J. (2008).** Isolation and structure elucidation of phénolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album L.*) fruit. *Eur Food Res Technol*. 226: 1191-1196.
- 32. Bruneton J. (1993).** Acides phénols. In : Phamacognosie, phytochimie et plantes médicinales. **Ed Tech et Doc**. 199-203pp.
- 33. Balasundram N. Sundram K et Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99 :191–203.
- 34. Macheix. J.J. Fleuriet A. Jay Allemand C. (2005).** Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In « Les composés phénoliques des végétaux ». *Ed Tech et Doc Lavoisier*. 01-15.
- 35. Lugasi A. Hovari J. Sagi. K V et Biro L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. 1-4, 119-125 pp.

- 36. Sarni-Manchado P et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Tec et Doc Lavoisier*. 02-11pp.
- 37. Martin S and Andriantsitohaina R. (2002).** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 51:304-315.
- 38. Druzyńska B. Stepnińska A et Wolosiak R. (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Technol Aliment*. 6(1): 27-36.
- 39. Archivio M. Filesi C. Di Benedetto R. Gargiulo R. Giovannini C et Masella R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 43(4): 348-361.
- 40. De Marco E. Savarese M. Paduano A. Sacchia R. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*. 104: 858–867.
- 41. Ahmad A. Deeb. Manar K. Fayyad. and Mahmoud A. Alawi. (2012).** Separation of Polyphenols from Jordanian Olive Oil Mill Wastewater. *Chromatography Research International* :10.1155-812127.
- 42. Hamdi M. Garcia J.L et Ellouz R. (1992).** Integrated biological process for olive mill wastewaters treatment. *Bioprocess. Eng*. 8:79-10.
- 43. Graille J. (2003).** Lipides et corps gras alimentaires. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*. 86pp.
- 44. Ben Sassi A. Boularbah A. Jaouad A. Walker G. et Boussaid A. (2006).** A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*. 41: 74-78.
- 45. Fenice M. Giovannozzi Sermanni G. Federici F. et D'Annibale A. (2003).** Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*. 100: 77-85.

- 46. Ranalli A. (1991).** The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37 : 30-39
- 47. Casa R. D'Annibale A. Pieruccetti F. Stazi S.R. Giovannozzi Sermanni G. Lo Cascio B. (2003).** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*. 50(8) : 959-66.
- 48. Lafka T. Lazou A.E. Sinanoglou V. J. Lazos E. S. (2010).** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*. 125: 92–98.
- 49. Robbins R.J. (2003).** Phenolics acids in food: An overview of analytical methodology. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 51:2866-2887.
- 50. Macheix J-J., Fleuriet A et Sarni-Mmachado P. (2006).** Composés phénoliques dans la plantes Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In « Les polyphénols en agroalimentaire ». *Ed Tec & Doc Lavoisier*. pp 1-25.
- 51. Richter G. (1993).** Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. *Ed Presse polytechnique et universitaire romande*. pp: 317-339.
- 52. Dietrich H and Pour-Nikfardjam M.S. (2009).** Influence of phénolic compounds and tannins on wine-related microorganisms in « Biology of microorganisms on grapes, in must and wine ». *Ed Springer-Verlag. Berlin*. 307-335pp
- 53. Ribéreau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod. Paris.173-201 pp.
- 54. Sarni-Manchado P et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Tec et Doc Lavoisier*. 02-11 pp.
- 55. Annibale A. Casa R. Pieruccetti F. Ricci M. et Marabottini R. (2004).** Lentinula edodes removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*. 54: 887-894.
- 56. Fki I. Allouche N. et Sayadi S. (2005).** The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*. 93: 197-204.

- 57. Azabou S. Najjar W. Gargoubi A. Ghorbel A. et Sayadi S. (2007).** Catalytic wet peroxidephoto-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants: Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in modeland real effluent. *Applied Catalysis B: Environmental*. 77: 166-174.
- 58. Richter G. (1993).** Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie.Ed Presse polytechnique et universitaire romande. 317-339 pp.
- 59. Aruoma O.I. Bahorun T. Jen L.S. (2003).** Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research*. 544 : 203–215.
- 60. Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 04: 162-169.
- 61. Rong Tsao (2010). Review Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients 2010, 2, 1231-1246; doi:10.3390/nu2121231**
- 62. Macheix. J.J. Fleuriet A. Jay Allemand C. (2005).** Nature et diversité des composés phénoliques des vegetaux. In « Les composés phénoliques des végétaux ». *Ed Tech et Doc .Lavoisier*. 01-15.
- 63. Ribéreau-Gayon P. (1968).**Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod. Paris. 173-201 pp.
- 64. Lee H. Lee J.Y. Hyun Suh M. Sim S-S. Lee M-W et Jong Kim J. (2010b).** Hydrolysable tannins depress cardiac papillary muscle contraction and propranolol-induced negative inotropism. *Fitoterapia*. Article in press.
- 65. Nicholson R. Vermerris W. (2006).** Phénolic compound biochemistry. Edition: *Springer*. New York. 01-48.
- 66. Bianco A. Bonadies F. Romeo G. Scarpati M. L. Soriero, A. & Uccella. (2006).** The recovery of biophenols from wastewaters of olive oil production. *Natural Product Research* 20 :259-264.
- 67. Ames B.N. Shigenaga M.K. and Hagen T. M. (1993).** Oxidants, Antioxydants and the degenerative diseases of aging. *Product Natural Academic Science of USA*. 90: 7915-7922

- 68. Marc F. Davin A. Deglène- Benbrahim L. Ferrand C. Baccaunanud M. Fritsch P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine science.* 20 (4):1-24.
- 69. Manach C. Scalbert A. Morand C. Rémésy C. Jiméney L . (2004).** Polyphenols: food source and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.* 79(5): 727-747.
- 70. Djeridane A. Yousfi M. Nadjemi B. Boutassouna D. Stocker P. Vidal N. (2006).** antioxydant activity of same Algeria medicinal plant extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry.* 97(4): 654-660.
- 71. Akagawa M. Suyama K. (2001).** Amine oxydase-like activity of polyphenols Mechansime and properties. *Journal of Biochemistry.* 268 :1953-1963.
- 72. Saint-Cricq N. Provost C. Vivas N. (1999).** Comparative Study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agriculral Food Chemistry.* 47:425-431.
- 73. Pulido R. Bravo L. Saura-Calixto F. (2000).** Antioxydant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxydant power assay. *Journalof agricultural Food Chemistry.* 48:3396-3402.
- 74. Ames B.N. Shigenaga M.K. Hagen T . M. (1993).** Oxidants, antioxydant, and the degenerative diseases of aging.Review: *Product Natural Academic Science of USA.* 90: 7915-7922.
- 75. Aurousseau B. (2002).** les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquence sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *Productions Animales.* 15: 67-82
- 76. Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as Antioxydants. *Journal of Nanural Product.* 63:1035-1042
- 77. Lee J. Koo N. Min D.B. (2004).** Reavtive Oxygen species, aging, and antioxydative Nutaceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety.* 3: 21-33.
- 78. Middleton E. JR. k andaswami C. Theharides T.C. (2000).** the Effects of Plant Flavonoides on Mammalian Cells: implication for inflammation , heart disease, and cancer. *Pharmacological Review.* 52(4):673-751

- 79. Hassan Azaizeh , Fares Halahlih , Naim Najami , Doris Brunner , Martin Faulstich , Ahmed Tafesh (2012).** Antioxidant activity of phenolic fractions in olive mill wastewater. *Food Chemistry* 134 (2012) 2226–2234
- 80. Filomena S . De Martino A . Capasso R . El Hadrami I. (2012).** Valorisation of organic matter in olive mill wastewaters: Recovery of highly pure hydroxytyrosol. *Journal of Geochemical Exploration*
- 81. Hamdi M. et Ellouz R. (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology*. 14 : 183-188.
- 82. Ranalli A. (1991).** The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*. 37 : 30-39
- 83. Hattenschwiler S. Vitousek P.M. (2000).** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Tree*. 15, 238-243.
- 84. Obied H.K. Bedgood Jr D.R. Prenzler P.D. Robards. K. (2007).** Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1238–1248
- 85. Schaffer S. Walter E. Müller. Gunter P. Eckert. (2010).** Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological Research*. 62: 322–327
- 86. Seraphim P. Maria G.P. Stylianos F. Michael K. George A. (2008).** Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*. 99: 2419–2428.
- 87. Khoufi S. Aloui F. Sayadi S. (2006).** Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion.
- 89. Knupp G. Rücker G. Ramos-Cormenzana A. Garrido Hoyos S. Neugebauer M. Ossenkop T. (1996).** Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 38, 277-282.

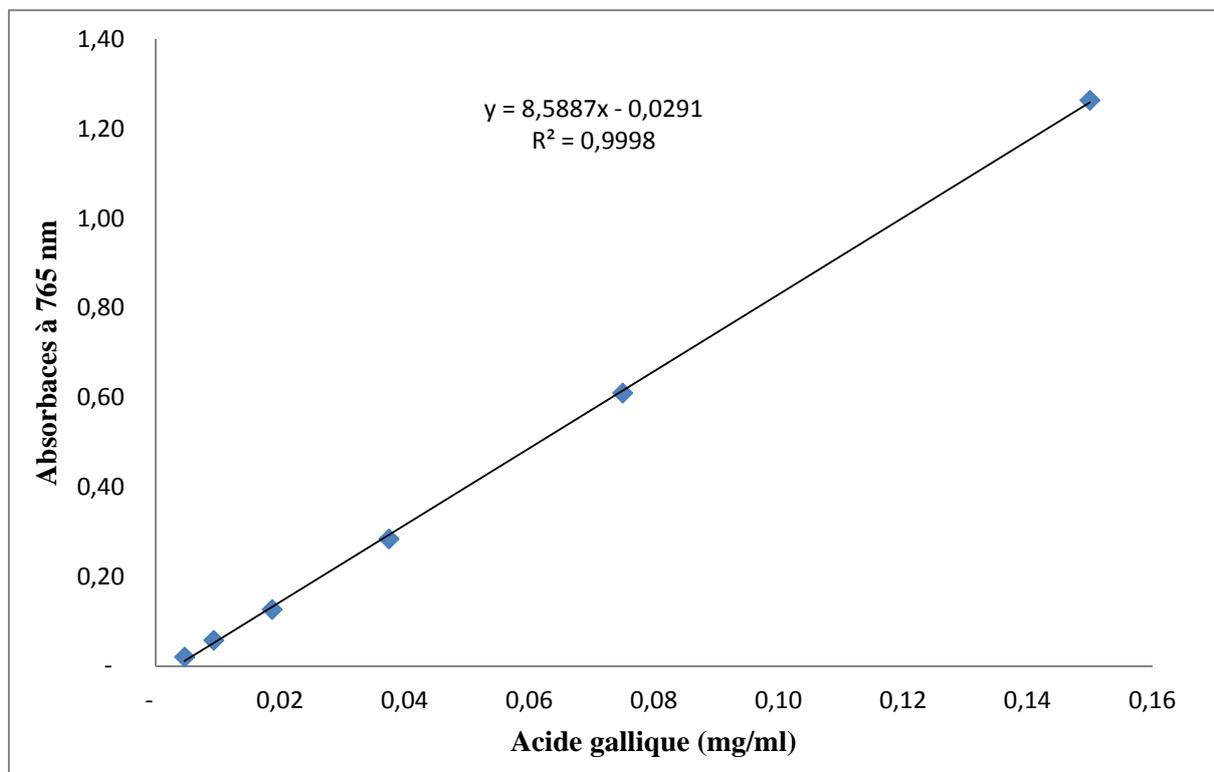
- 90. Petruccioli M. Servili M. Montedero G.F. Federici F. (1988).** Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process. *Biotechnology Letters*. 1: 55-60.
- 91. Kahramann S et Yesilada O. (2001).** Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot Fungi. *Folia microbial*. 46 (2). 133-136.
- 92. Sierra J. Marti E. Garau A. M et Cruanas R. (2007).** Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: Field experiment. *Science of the total environment*. 378,90-94.
- 93. Garcia A. Ruiz-Mandez V. Romero C et Brenes M. (2006).** Effect of refining on the phenolic composition of crude olive oils. *JAOCS*. 83: 159-164.
- 94. Ricardo M. Casal S. Hugo L, Bento A. Pereira J.A. (2012).** Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating. *Food Research International*. 48:148–154
- 95. Salta F.N. Mylona A. Chiou A. Boskou G and Andrikopoulos N.K. (2007).** Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology International*. 13: 413
- 96. Rubio L. Motilva M.J. Alba M. Ramo T. and Romero M.P. (2012).** Development of a Phenol-Enriched Olive Oil with Both Its Own Phenolic Compounds and Complementary Phenols from Thyme. *Food Chemistry*. 60: 3105–3112
- 97. Berzas Nevado J.J. Robledo V.R. Callado C.S.C. (2012).** Monitoring the enrichment of virgin olive oil with natural antioxidants by using a new capillary electrophoresis method. *Food Chemistry* 133: 497–504.
- 98. Domenico M. Cossignani L. Gilda D. Maria Stella Simonetti M.S. and Damiani P.(2006).** Pure Lycopene from Tomato Preserves Extra Virgin Olive Oil from Natural Oxidative Events During Storage. *Food Chemistry*. 83: 11
- 99. Giron M.V. Ruiz-Jimenez J et Luque de Castro M.D. (2009).** Dependence of fatty-acid composition of edible oils on their enrichment in olive phenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 2797-2802

- 100. Achat S. Tomao V. Madani K. Chibane M. Elmaataoui M. Dangles O. Chemat F. (2011).** Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*. 19: 777–786.
- 101. Vinatoru M. (2001).** An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8: 303-313
- 102. Lalas S. Aggelousis G. Gortzi O. Dourtoglou V. Tsaknis J, (2007)** Protection of traditional Greek foods using a plant extract, *Italian Journal of Food Science* 19 (03). 279–286.
- 103. Japon-Lujan R. Janeiro P. and Dolores M. Luque de Castro. (2008).** Solid- Liquid Transfer of Biophenols from Olive Leaves for the Enrichment of Edible Oils by a Dynamic Ultrasound-Assisted Approach. *Food Chemistry*. 56, 7231-7235 7231.
- 104. Zunin P. Leardi R. Bisio A. Boggia R. Romussi G. (2010).** Oxidative stability of virgin olive oil enriched with carnosic acid. *Food Research International*. 43: 1511–1516.
- 105. Veillet S. Tomao V. Chemat F. (2010).** Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. *Food Chemistry*. 123: 905–911
- 106. 107. Ayadi M.A. Grati-Kamoun N. Attia H. (2009).** Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and Chemical Toxicology* 47: 2613–2619
- 107. Ying Li Y. Fabiano-Tixier A.S. Tomao V. Cravotto G. Chemat F. (2013).** Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20: 12–18
- 108. Berzaz Nevado J.J. Penalo G.C. Robeldo V.R et Martinez G.V. (2009).** New CE-ESI-MS analytical method for the separation, identification and quantification of seven phenolic acids including three isomer compounds in virgin oil. *Talanta*. 79: 1238-1246.
- 109. Jarbouï R. Sellami F. Azri Ch. Gharsallah N et Ammar E. (2010).** Olive mill wastewater evaporation management using PCA method Case study of natural degradation in stabilization ponds (Sfax, Tunisia). *Journal of Hazardous Materials*. 176 :992-1005.
- 110. Tsimidou M. Papadopolus G et Boskou D. (1992).** Phenolic compounds and stability of vergin olive oil part 1. *Food Chemistry*. 45:141-144.

- 111. Owen P.L et Johns. T. (1999).**Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern north american plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*. 64 :149-160
- 112. Negi, PS., Jayaprakasha, GK., Jena, BS. (2003).** Antioxidant and mutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*. 80: 393-397.
- 113. Goupy J. (2006).** Les plans d'expériences. *Revue MODULAD*.
- 114. Goupy J. (2009).** Plans d'expériences, Manuel d'utilisation du logiciel JMP (Version 9). 24.
- 115. Tinsson W. (2010).** Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques, Mathématiques et Applications 67. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 532p.
- 116. Hakiman M et Maziah M. (2009).** Non enzymatic antioxidant activities in aqueous extract of different *Ficus deltoidea* accessions. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(3):120-131.
- 117. Cardinal M. Cornet J. Ouannari A et Oannapie M. (1994).** Performances d'un groupe d'évaluation sensorielle : exemple de traitement statistique des données, In sciences des aliments. *Ed. Lavoisier*. Paris. 14(3) : 251-263pp.
- 118. Denis O. Estelle B , Pinatel C. Souillol S. Guérère M. Artaud J. (2004).** Analyse de la fraction phénolique des huiles d'olive vierges. *Annales des falsifications de l'expertise chimique et toxicologique*. 965: 169-196 pp

# *Annexes*

**Annexe 1 : courbe d'étalonnage**



**Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux à partir de l'acide gallique**

## Annexe 2 : Feuille de l'analyse sensorielle

Nom et Prénom :

Date :

---

### Feuille de profil : Analyse sensorielle de l'huile d'olive

#### Echantillon 1

Attributs	Intensité de perception				
	1	2	3	4	5
Amer					
Autres					
Acceptabilité totale					
Rance					
Préférence totale					

#### Echantillon 2

Attributs	Intensité de perception				
	1	2	3	4	5
Amer					
Autres					
Acceptabilité totale					
Rance					
Préférence totale					

#### Notes explicatives :

**Rance** : Propre aux huiles ayant subi un processus d'oxydation

**Autres** : Un gout qui rappelle les sous-produits de l'olive (feuilles, margines et grignon)