

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université A. MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de biologie physico-chimique
Filière : Biologie
Option : Pharmacologie moléculaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
Master

Thème

**Enrichissement de l'huile de soja
raffinée avec des extraits phénoliques
issus de feuilles d'olivier sauvage et
cultivé**

Présenté par :

BENMAMAR Salem & TIRANE Nassima

Soutenu le : 15 Juin 2015

Devant le jury composé de :

M^r .TAMANDJARI
M^{me} BOUCHEFFA
M^{me} ATMANI

Professeur
MAA
MCA

Président
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2014/2015

REMERCIEMENT

On remercie tout d'abord le bon dieu, le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce modeste travail.

*C'est au sein du laboratoire de biochimie que l'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire on été réalisés. Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et nos remerciements les plus sincères en premier lieu à notre promotrice **M^{me} HAMMOUCHE née BOUCHEFFA** enseignante à l'université de Bejaia qui nous a accordé sa confiance, son soutien et qui nous a voué toute sa gentillesse et nous a permis grâce à sa permanente présence à nos cotés de réaliser ce travail de recherche.*

*Nos remerciements aux membres de jury: Professeur **A. TAMANDJARI** qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et de nous faire bénéficier de ses compétences et de ses connaissances.*

*On souhaite également remercier **M^{me} ATMANI** qui a bien accepté d'examiner ce travail.*

*Sans oublier **M^r HADJAL Samir** et **M^r ALIANE Khellaf** qui nous ont offert leurs services durant notre stage pratique au laboratoire de recherche et de développement de Cevital.*

Nos remerciements vont également à tous nos enseignants qui nous ont transmis leur savoir durant notre cursus universitaire.

Nous adressons enfin, et surtout, notre plus profonde gratitude à nos parents, nos sœurs et nos frères, qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous nos proches amis qui ont toujours été avec nous avec leur soutien et encouragement même dans les périodes les plus difficiles.

***** MERCI *****

À celles et à ceux qui nous ont aidés d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, on les remercie du fond du cœur.

Dédicace

Je remercie dieu tout puissant d'avoir pus achever ce modeste travail que je dédier;

À mes chères parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur aide m'ont portent, leur amour, leur soutient et encouragement. Que dieu les protège

À mon frère : Nourddine

À ma sœur : Assia

À ma grande mère : Dacuia

À la mémoire de ma grande mère paternelle

À la mémoire de mes grands pères

À mes cousins et cousines

À mes oncles, mes tantes et leurs familles

À mes chère amis de loin ou de près spécialement: mon collègue Salem, Houria, Kenza, Meriem, Nabila, Nouriya, Lisi, Souhila et Wissam.

À toute ma promotion pharmacologie moléculaire.

JRANE Nassima

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail:

A mes chers parents

A mes frères

"Toufik, Mohamed, Salim, Noureddine, Malek et Foudil"

A ma sœur "Nouria" et toute sa famille

A mes belles sœurs "Belaid Hadjira et Amara Djahida"

A mes neveux "Yanis et Lamine" et nièces "Dihya et Melissa"

A ma collègue "Tirane Nassima"

A tous mes ami(e)s spécialement:

"Arezki Bachir et Hocine, Idjouadiene Farid, Issad Nassim, Boudjou Adel,
Khelifa Faouzi, Adjoud Ahcene, Ouzani Samir, Amraoui Lyacine, Abdelli
Jugurta, Tighremt Mustapha, Bellir Malek, Hadji Houria, Mohammedi
Wissam, Mredj Nassima, Redjal Hamidouche, Nait Amara Saïd,
Belkacemi Yougourthen et Rabah et toutes les étudiantes de la promotion
Master 2 Pharmacologie Moléculaire 2014-2015 "

BENMAMAR Salem.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Titre.....page

Introduction.....1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I : Oxydation des huiles alimentaires et rôle des antioxydants

I.1- Oxydation des huiles alimentaires.....3

I.2- Antioxydants et stabilité oxydative des huiles alimentaires.....4

I.2.1- Utilisation d'antioxydants dans les aliments.....5

I.2.2- Mécanisme d'action des antioxydants.....5

I.3- Enrichissement d'aliments par les antioxydants.....6

I.3.1- Par des antioxydants synthétiques.....6

I.3.2- Par des antioxydants naturels.....7

II : Huile de soja et effets du raffinage

II.1- Le soja.....8

II.2- L'huile de soja.....8

II.2.1- Composition de l'huile de soja.....8

II.2.2- Composition en acides gras.....8

II.2.3- Constituants mineurs de l'huile de soja.....9

II.3- Le raffinage.....9

II.3.1- Définition et but du raffinage.....9

II.3.2- Etapes de raffinage de l'huile de soja.....10

II.3.2.1- Démucilagination.....10

II.3.2.2- Neutralisation.....10

II.3.2.3- Décoloration.....	10
II.3.2.4- Désodorisation.....	10
II.3.3- Constituants éliminés au cours du raffinage.....	11
III : L'olivier et feuilles d'olivier	
III.1- Historique sur l'olivier.....	12
III.2- Classification botanique de l'olivier.....	12
III.3- Répartition géographique de l'olivier.....	13
III.4- L'olivier méditerranéen.....	13
III.4.1- L'olivier cultivé.....	13
III.4.2- L'olivier sauvage.....	14
III.5- Caractéristiques des feuilles d'olivier	14
III.6- Composés phénoliques de feuilles d'olivier.....	15
III.7- Intérêts thérapeutiques des feuilles d'olivier.....	16
III.8- Utilisation des feuilles d'olivier comme source d'antioxydants dans l'industrie agroalimentaires.....	17

PARTIE PRATIQUE

Présentation de l'organisme d'accueil.....	19
--	----

I : Matériel et méthodes

I.1- Matériel végétal.....	21
I.1.1 - Huiles végétales utilisées pour l'enrichissement.....	21
I.1.2 - Feuilles d'olivier sauvage et cultivé utilisées pour extraire l'extrait phénolique.....	21
I.1.2.1- Récolte.....	21
I.1.2.2- Séchage et broyage.....	21
I.2- Extraction et dosage des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier.....	22
I.2.1- Extraction des composés phénoliques a partir des feuilles d'olivier.....	22
I.2.2- Dosage des polyphénols totaux des extraits de feuilles d'oliviers.....	23
I.3- Enrichissent de l'huile de soja avec l'extrait phénolique.....	23

I.4- Extraction et quantification des polyphénols des huiles enrichies.....	24
I.4.1- Extraction des polyphénols à partir des huiles enrichies.....	24
I.4.2- Quantification des polyphénols totaux des huiles enrichies.....	24
I.5- Etudes de l'activité antioxydante des huiles enrichies.....	25
I.5.1- Activité antiradicalaire de l'huile contre le radical DPPH.....	25
I.5.2- Activité antiradicalaire des extraits phénoliques contre le radical DPPH.....	25
I.5.3- Pouvoir réducteur FRAP des extraits phénoliques.....	26
I.6 - Stabilité oxydative des huiles.....	27
I.7- Test d'efficacité des antioxydants ajoutés en condition de friture.....	27
I.8- Analyse statistique.....	29

II- Résultats et Discussion

II.1- Teneurs en polyphénols des feuilles d'oliviers.....	30
II.2- Teneurs des polyphénols des huiles après enrichissement.....	31
II.3- Activité antiradicalaire des huiles contre le radical DPPH.....	32
II.4- Activité antiradicalaire des extraits méthanoliques des huiles enrichies contre le radical DPPH.....	34
II.5- Pouvoir réducteur des extraits phénoliques (FRAP).....	35
II.6- Stabilité oxydative des huiles.....	37
II.7- Efficacité des antioxydants ajoutés en condition de friture.....	38
Conclusion.....	41
Références bibliographiques.....	43

Annexes

Liste des abréviations

Abréviation.....	Signification.
BHA	Hydroxy anisole butyle.
BHT	Hydroxy toluène butyle.
Cu	Cuivre.
C.O.I	Conseil Oléicole Internationale.
EAC	Equivalent Acide Caféique.
DPPH	Diphényl-1-picrylthydrazyl.
EAG	Equivalent Acide Gallique.
EC50	Concentration Efficace Mediane.
FRAP	Ferric Reducing Antioxydant Power.
g/100 MS	Grammes par cent gramme de matière sèche.
Hcl	Acide Chloridrique.
LDL	Low Density Lipoprotéine (Lipoprotéine de basse densité).
MG	Matière Grasse.
MS	Matière Sèche.
NDGA	Acide Norditydroguaiaretique.
OG	Gallate d'oxyle.
PAL	<i>L-Phenylalanine ammonia lyase</i>
PG	Gallate de Propyle.
PPM	Partie Par Million.
Rpm	Rotation par minute.
TBHQ	Butylhydroquinone tertiaire .
THBP	Tetrahydroxybenzophénone.
TPTZ	Tripyridyl-s-triazine.
4HR	4-heyxylresorcinol.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Changements physiques et chimiques de l'huile pendant la friture	04
02	Action préventive des antioxydants.	05
03	Distribution des formes sauvages et cultivée de l'olivier dans le bassin méditerranéen.	13
04	Rameau d'olivier contenant les feuilles utilisées.	21
05	Séchage et broyage des feuilles d'oliviers.	22
06	Schéma d'extraction des polyphénols.	22
07	Testeur d'huile (Optifry).	28
08	Teneurs en polyphénols totaux des feuilles d'olivier de l'oléastre et de la variété <i>Chemlal</i> .	30
09	Quantification des polyphénols des huiles enrichies avec des extraits de feuilles d'oléastre et <i>Chemlal</i> .	31
10	Activité antioxydante des huiles (soja raffinée et enrichie aux extraits de feuilles d'olivier sauvage et cultivé) utilisant le radical DPPH°.	32
11	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH° des extraits phénoliques des huiles (soja non enrichie, soja enrichies avec <i>Chemlal</i> , soja enrichie avec Oléastre) et leur EC_{50} .	34
12	Pouvoir réducteur (FRAP) des extraits d'huiles de soja (non enrichie et enrichis aux extraits de feuilles d'olivier "Oléastre et <i>Chemlal</i>).	35
13	Temps d'induction (h) des huiles enrichies comparés à l'huile de soja non enrichie.	36

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Principales voix d'altération des huiles alimentaires.	03
II	Teneur en acides gras de l'huile de soja en%.	09
III	Constituants mineurs de l'huile de soja.	09
IV	Constituants éliminés durant le raffinage.	11
V	Constituants phénoliques de la feuille d'olivier.	15
VI	Principales actions pharmacologiques des feuilles d'olivier.	17
VII	Capacité de production de Cevital spa.	20
VIII	Taux des composés polaires et contrôle visuel des huiles (soja non enrichie et enrichie en extraits phénoliques de feuilles d'olivier) durant la friture.	38

INTRODUCTION

Les huiles végétales sont des sources privilégiées de macronutriments essentiels, d'acide linoléique « oméga 6 » et d'acide alpha-linolénique « oméga 3 », et de micronutriments (vitamine E, phytostérols). Leur chauffage durant les cuissons (en poêle, en four et surtout en friture) entre 150 à 200°C, est à l'origine des réactions de polymérisation, d'hydrolyse et essentiellement d'oxydation formant ainsi des produits d'oxydation qui sont néfastes sur la santé humaine (Combe et *al.*, 2010). Parmi ces huiles, figure l'huile de soja qui est sensible à l'oxydation pour sa composition majoritaire en acides gras polyinsaturés (Cahuzac-Picaud, 2010).

Dans certains cas, en particulier dans les produits formulés, quand la teneur en antioxydants endogènes n'est pas suffisante, même si l'on s'efforce de limiter la détérioration oxydative de l'huile, les moyens de prévention s'avèrent parfois insuffisants ou difficiles à mettre en œuvre. On a alors recours à une approche qui consiste à ajouter un agent antioxydant qui ralentit l'activité des catalyseurs de l'oxydation ou limite la propagation des radicaux libres (Cuvelier et *al.*, 012).

Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments (huiles alimentaires) est une technique complètement nouvelle. Depuis 1980, les antioxydants synthétiques sont largement utilisés dans ce domaine. Cependant, leurs inconvénients ont été bien montrés et cela en contribuant à beaucoup de problèmes de santé tels que les cancers et la formation d'agents mutagènes (Antolovich et *al.*, 2004). Pour cette raison, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par le consommateur (Kristiina Pelli et *al.*, 2003).

Les feuilles d'olivier, une matière première abondante considérée comme un déchet d'extraction d'huile d'olive et peuvent atteindre jusqu'à 10% du poids total d'olives destinés à l'extraction. Leur déplacement, stockage et élimination entraînent plus de dépenses. Des études récentes suggèrent que la feuille d'olivier est une source significative de composés phénoliques bioactifs supérieure à celle de l'huile d'olive (Paiva-Martins et *al.*, 2007 ; Lee et *al.*, 2009). Ces feuilles peuvent être utilisées comme stabilisateurs efficaces pour les huiles végétales (Chiou et *al.*, 2007 ; Sanchez de Medina et *al.*, 2012 ; Malheiro et *al.*, 2013).

Dans la présente étude, des extraits phénoliques ont été extraits à partir des feuilles d'olivier cultivé (*Chemlal*) et sauvage afin d'enrichir l'huile de soja raffinée produite par Sarl Cevital spa dans le but d'augmenter sa stabilité et de comparer l'efficacité des composés phénoliques extraits des feuilles d'olivier sauvage (Oléastre) à celle de la variété *Chemlal*, et cela en réalisant différents tests :

- ✓ Activité antiradicalaire contre le radical DPPH ;
- ✓ Le pouvoir réducteur (FRAP) ;
- ✓ Test de stabilité au Rancimat ;
- ✓ Test de friture en conditions domestiques.

I : OXYDATION DES HUILES ALIMENTAIRES ET LEUR ROLE ANTIOXYDANTS

I.1- Oxydation des huiles alimentaires

1. Peroxydation lipidique et rancissement des huiles

Les huiles végétales, du fait de leur richesse en acides gras mono- et/ou polyinsaturés, sont sujettes à des réactions chimiques telles que l'isomérisation et l'oxydation des acides gras. La peroxydation lipidique, quant à elle, est un ensemble complexe de réactions qui se produisent en présence d'oxygène et conduisent à ce que l'on appelle le rancissement (Cuvelier et Maillard, 2012).

Le rancissement oxydatif est un phénomène purement chimique et spontané dès lors que des acides gras insaturés sont en présence d'oxygène atmosphérique ; notons à ce stade que la lumière ou la température sont des facteurs accélérateurs mais ne sont pas des éléments nécessaires et suffisants pour déclencher des phénomènes d'oxydation. Ce phénomène chimique se caractérise également par son caractère évolutif, irréversible et altératif (JUDDE, 2004).

Au plan nutritionnel, l'oxydation des huiles conduit peu à peu à une perte de leur qualité, en raison notamment de la dégradation partielle des acides gras indispensables et des vitamines E et A (Cuvelier et Maillard, 2012).

2. Altérations des huiles alimentaires

À des températures élevées, en présence d'eau et d'oxygène, les triglycérides subissent un grand nombre de réactions complexes qui peuvent être classées en trois grandes familles : oxydation, polymérisation et hydrolyse (Tableau I).

Tableau I : Principales voies de d'altération des huiles alimentaires (Dobarganes, 1998).

Type d'altération	Origine	Composé formé
Oxydation	Oxygène de l'air	-Monomères oxydés -Dimères -Composés volatils
Thermique	Température du bain de friture	-Monomères cycliques -Dimères non polaire
Hydrolyse	Eau des aliments	-Acides gras libres -Di glycérides

Les huiles subissent des dégradations plus ou moins importantes lors d'un chauffage. Celles qui sont riches en acides gras monoinsaturés, comme l'huile d'olive et l'huile d'arachide, sont plus stables et peuvent être réutilisées plusieurs fois après avoir été chauffées, à l'inverse des huiles riches en acides gras polyinsaturés telles que l'huile de maïs et l'huile de soja.

Lors de la friture des huiles, de nouveaux composés chimiques se forment. En effet la friture est le siège de réactions chimiques innombrables sollicitant l'oxygène de l'air, les chaînes grasses des triglycérides et les aliments présents dans les huiles. Une température élevée et une présence d'air favorisent des réactions de polymérisations créant des polymères, dimères, triglycérides oxydés et aussi des di-glycérides et acides gras libres (Figure 1). Tous ces composés sont hautement polaires et peuvent être mesurés afin d'évaluer la dégradation des huiles (Combe et Rossignol, 2010).

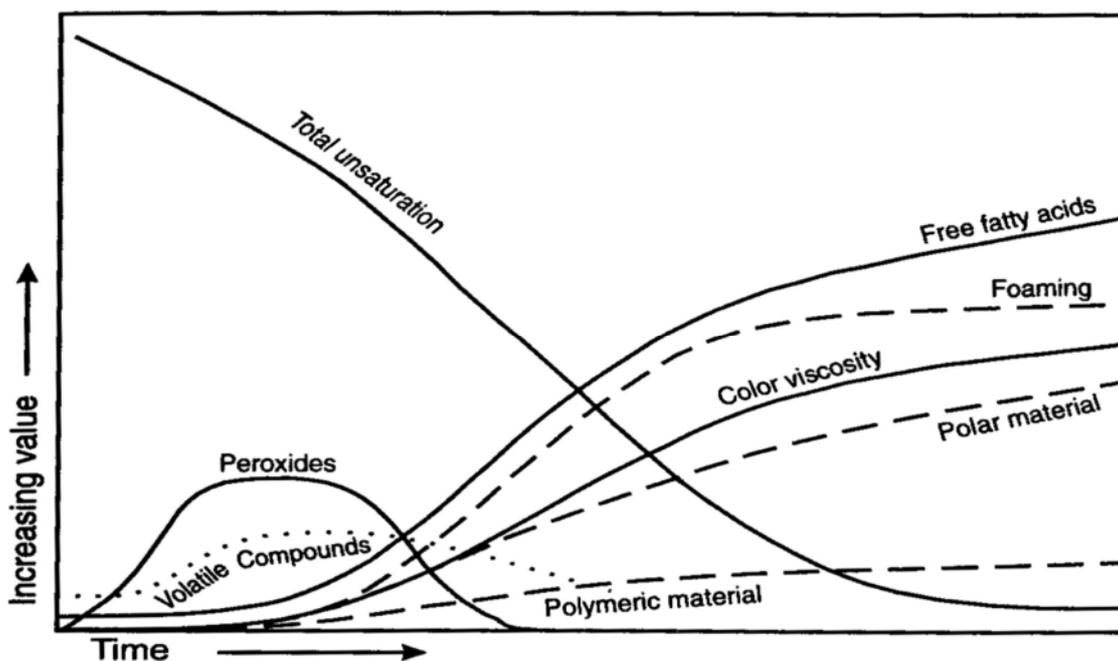


Figure 1 : Changements physiques et chimiques de l'huile pendant la friture (CHOE et Min, 2007).

II.2 - Antioxydants et Stabilité oxydative des huiles alimentaires

Garantir la durée de vie des aliments sensibles à l'oxydation demeure ainsi parfois une gageure, même en ayant recours de façon massive aux antioxydants (Villière et Genot, 2004).

La stabilité oxydative des huiles dépend en particulier de leur teneur et de leur composition en acides gras insaturés (AGI). Ainsi, les huiles les plus insaturées sont les moins stables à l'oxydation, et ce d'autant plus que le nombre de doubles liaisons sur les acides gras est élevé. Cette stabilité sera également dépendante de la teneur en tocophérols dans l'huile (dont vitamine E), susceptibles d'exercer une action protectrice antioxydante (Frankel, 2007 ; Graille, 2003).

II.2.1. - Utilisation d'antioxydants dans les aliments

Les antioxydants sont utilisés dans des industries très diverses et jouent un rôle prépondérant dans l'industrie alimentaire. Certains d'entre eux, sont présents de façon naturelle dans les huiles et corps gras, mais le plus souvent il est nécessaire d'en ajouter pour améliorer la conservation des aliments, en particulier celle des corps gras (Alais et *al.*, 2003).

Il s'agit, en fait, d'agents de prévention ou de terminaison capables d'éviter ou de piéger les radicaux libres. Ils constituent un groupe de substances chimiques largement utilisées pour prolonger la durée de conservation d'une grande variété de produits alimentaires (Finely et *al.*, 2011).

II.2.2 - Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants sont des réducteurs qui ralentissent et inhibent l'oxydation des lipides agissant sur différentes étapes de l'auto oxydation et d'oxydation. Ils réagissent généralement sur les radicaux libres issus de l'initiation et la propagation et les rendent moins actifs. Leur action préventive bloque l'initiation (Figure 2), en complexant les catalyseurs et en réagissant avec l'oxygène ou en déviant de l'aliment les effets d'autres agents initiateurs (Marc et *al.*, 2004).

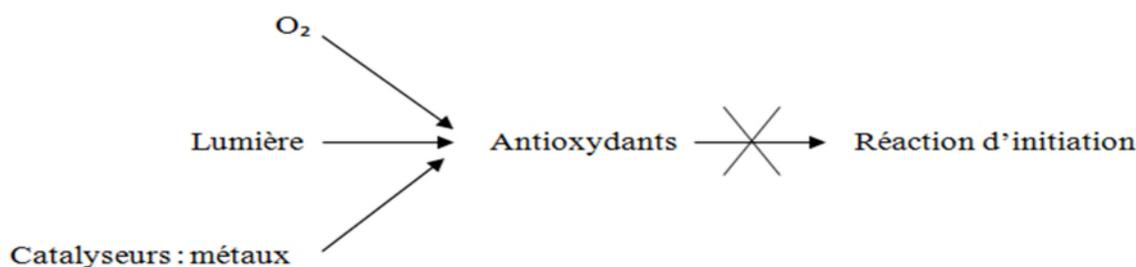
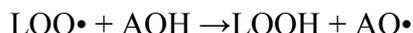


Figure 2 : Action préventive des antioxydants (Marc et *al.*, 2004).

Les antioxydants peuvent être classés en deux groupes selon leur mode d'action :

- Les antioxydants primaires, également appelés antiradicalaire, sont des molécules capables de bloquer les radicaux lipidiques L•, LO• et LOO• par transfert d'un hydrogène. L'antioxydant devient alors lui même porteur d'un radical. mais à la différence des radicaux lipidiques, il est peu réactif, ce qui stoppe la propagation radicalaire (Cuvelier et Maillard, 2012).



- Les antioxydants secondaires agissent par des mécanismes indirects tels que la chélation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène. On les appelle aussi antioxydants préventifs car ils viennent compléter les moyens de prévention de l'oxydation, ou encore synergistes car ils sont souvent employés en combinaison avec les antiradicalaires dont ils renforcent l'action. (Cuvelier et Maillard, 2012).

II.3- Enrichissement d'aliments par les antioxydants

II.3.1- Par des antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Plusieurs antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA), le tertiarybutylhydroquinone (TBHQ), le 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), le di-tertbutyl-4-hydroxyméthylphénol (IONOX-100), le gallate de propyle (PG), le gallate d'octyle (OG), l'acide nordihydroguaiaretique (NDGA) et le 4-hexylresorcinol (4HR), sont utilisés dans les cosmétiques et les huiles végétales (Guo et *al.*, 2006). Le gallate de propyle et le butylhydroxyanisole sont des antioxydants phénoliques synthétiques hautement actifs qui agissent en inhibant la chaîne de réaction d'initiation et en réduisant la peroxydation des acides gras insaturés (Xiang et *al.*, 2007).

Des antioxydants synthétiques tels que le BHA, le BHT, et le TBHQ, ont été utilisé comme des additifs, pour surmonter les problèmes d'instabilité des nourritures dues à leur huile et teneurs en graisse, mais le point en question est que quelques antioxydants synthétiques sont très volatils et thermosensibles. Ces composés peuvent être à l'origine de beaucoup de problèmes de santé tels que les cancers et formation d'agents mutagènes. En raison de ces soucis, une stratégie alternative des industries est l'utilisation de sources

naturelles des antioxydants qui pourraient remplacer les synthétiques ou diminuer au moins leurs utilisations comme additifs (Antolovich et *al.*, 2004)

II.3.2- Par des antioxydants naturels

Il est bien évident qu'une alimentation saine et équilibrée assure un apport considérable en antioxydants naturels pour le bon fonctionnement de l'organisme humain, surtout lors de la consommation de fruits, de végétaux, de céréales, de la viande et du poisson. Ils existent d'autres sources de composés antioxydants bien intéressantes, dont l'application peut s'étendre à des domaines comme la pharmacologie, la microbiologie médicale et clinique, la phytopathologie et la conservation des aliments (Daferera et *al.*, 2000).

Les antioxydants naturels apportés de l'alimentation comprennent, généralement, de l'ascorbate, des tocophérols, des caroténoïdes et des phénols végétaux bioactifs. Les bénéfices santé des végétaux sont largement dus aux vitamines antioxydantes présentées par un grand nombre de composés phytochimiques. En effet, les sources de tocophérols, de caroténoïdes et de l'acide ascorbique et leurs bénéfices sur la santé sont bien connus et investigués dans un surplus de publications de recherches scientifiques bien variées. Mais, les phénols végétaux n'ont pas été complètement étudiés en raison de la complexité de leur nature chimique et leur énorme abondance dans plusieurs matières végétales. De nombreuses constatations, liées à la présence de phénols antioxydants dans des sources végétales, étaient établies dans le but de mieux les étudier et les évaluer tels que les produits traditionnels, les sous-produits agricoles, les tisanes, les huiles végétales pressées à froid et d'autres moins connues (Daferera et *al.*, 2000).

II : L'HUILE DE SOJA ET EFFETS DU RAFFINAGE

II.1- Le soja

Le soja, *Glycine max* (L) Merr, est une plante de la famille des légumineuses, sous famille des *papilonoideae*, tribu des *phaseoleae*, largement cultivée pour ces graines oléagineuses qui fournissent la principale huile alimentaire consommée dans le monde (Pouzet, 1992).

II.2- Huile de soja

L'huile de soja représente entre 17 et 22 % du poids sec de la graine. C'est une huile très digeste de grande qualité qui possède de la vitamine E, des phytostérols mais c'est surtout une huile alpha-linolénique qui contient une majorité d'acides gras essentiels polyinsaturés dont le pourcentage en acide alpha-linolénique est significatif (Cahuzac-Picaud, 2010).

Etant donné que les acides gras mono-insaturés et polyinsaturés sont sensibles à la chaleur et se transforment en acides gras saturés, l'huile de soja doit donc de préférence être utilisée comme huile de table, de préférence une huile obtenue par pression à froid pour ne pas perdre certains composés ayant un intérêt biologique tels que la vitamine E (Massy et *al.*, 2008).

L'huile de soja contient aussi de la lécithine qui a une action hypocholestérolémiante. Sa richesse en lécithine la rend précieuse pour la reconstitution des cellules nerveuses et cérébrales, elle peut remplacer l'huile d'olive en raison de sa bonne digestibilité pour ceux qui ne peuvent pas tolérer cette dernière (Cossut et *al.*, 2002).

II.2.1- Composition de l'huile de soja

II.2.2- Composition en acides gras

L'huile de soja est pauvre en acides gras mono-insaturés et saturés (Tableau II). Elle fait partie des huiles les plus riches en acides gras polyinsaturés totalisant 54 à 72 % des lipides totaux (Lecerf, 2011). Parmi ces acides gras polyinsaturés, l'acide linoléique (oméga 6) et alpha-linolénique (oméga 3) qui sont parmi les principaux acides gras essentiels pour l'organisme (Ward et Singh, 2005).

Tableau II: Teneurs en acides gras de l'huile de soja (en %) (Lecerf, 2011).

Acides gras saturés	11-21	Acide oléique	17-26
Acide stéarique	3-6	Acides gras polyinsaturés	54-72
Acide palmitique	8-13	Acide linoléique	50-62
Acides gras monoinsaturés	17-27	Acide alpha-linolénique	4-10

II.2.3- Constituants mineurs de l'huile de soja

Les constituants mineurs de l'huile de soja, dont certains doivent être obligatoirement éliminés durant le raffinage, sont regroupés dans le tableau III.

Tableau III : constituants mineurs de l'huile de soja. (Rohani Binti, 2006).

Nature	Composés
Lipidique	-Phosphatides hydratables et non hydratables. -Glycérides partielles. -Acides gras libres.
Glucidique	-Sucre libres et glycolipides.
Ions métalliques	-fer (Fe), cuivre (Cu), calcium, magnésium.
Pigments colorants	-Caroténoïdes, chlorophylles et autres pigments.
Produits oxydés	-Aldéhydes, cétones, peroxydes.
Autres	-Composés odorants. -matières insaponifiables (tocophérols, stérols, hydrocarbonés... etc.).

II.3- Le raffinage

II.3.1- Définition et but du raffinage

Le raffinage est l'ensemble des opérations qui servent à transformer l'huile brute en un produit comestible en éliminant les impuretés qui le rendent impropres à la consommation en l'état (Ayerdi et *al.*, 2007).

Le raffinage d'un corps gras met en œuvre une série d'étapes qui présentent chacune ses objectifs (Xavier, 2012).

II.3.2- Etapes de raffinage de l'huile de soja

II.3.2.1- Démucilagination

Les phospholipides peuvent être partiellement ou totalement supprimés à partir d'huiles végétales par différents moyens connus. Les processus les plus couramment utilisés dans l'industrie sont: le dégommeage à eau, le dégommeage acide et le dégommeage enzymatique cette étape est faite avec l'injection de l'acide phosphorique (Dayton et *al.*, 2008).

II.3.2.2- Neutralisation

La neutralisation ou la désacidification consiste à éliminer les acides gras libres de l'huile démuilaginée. Les techniques de neutralisation des huiles végétales les plus utilisées sont: la neutralisation chimique ou alcaline par l'utilisation de la soude ou la chaux et la neutralisation physique par distillation. (Xavier, 2012).

II.3.2.3- Décoloration

La décoloration succède à l'étape de neutralisation au cours du raffinage. C'est une opération qui vise à éliminer les pigments colorés, caroténoïdes et chlorophylles que la neutralisation n'a que partiellement détruits. Elle fait intervenir un phénomène physique : l'adsorption sur des terres décolorantes, du charbon actif, des silices spéciales ou des combinaisons de ces substances (Berk, 1993).

II.3.2.4- Désodorisation

Si l'huile obtenue après décoloration est utilisée comme huile à salades, elle doit subir un processus de désodorisation pour permettre d'enlever les odeurs et les arômes indésirables causés par un nombre de composants toujours présents dans l'huile. Ces composants sont relativement volatiles, et peuvent être éliminés en dégageant de la vapeur ou de l'azote. Ainsi, la désodorisation est effectuée sous vide pour faciliter le dégagement de ces composants volatiles, éviter l'oxydation et l'hydrolyse de l'huile, et tirer le maximum de profit de la vapeur. Après désodorisation, l'huile est refroidie, et stockée (Xavier, 2012).

II.3.3- Constituants éliminés au cours du raffinage

Les constituants éliminés au cours du raffinage sont résumés dans le **Tableau IV**.

Les phosphatides ou phospholipides	Ils peuvent représenter 2 % de l'huile de soja (30 % de lécithine, 30 % de céphaline et 40 % d'inositol).	Denise, (1992).
Les acides gras libres	Ils sont naturellement présents dans la graine. Ils proviennent également de réactions d'hydrolyse enzymatique qui se produisent dans les huiles brutes au cours de leur obtention ou leur stockage. Leur présence dans un corps gras peut être assimilée à celle d'un catalyseur d'oxydation.	
Sucres libres et glycolipides	Ils proviennent des glucides présents dans les graines au moment de la récolte. Certains de ces composés forment avec l'eau des solutions colloïdales communément appelées «mucilages», ces derniers sont éliminés au cours de la neutralisation chimique.	
Glycérides partiels	Ils portent généralement la fonction ester, souvent considérés comme des agents émulsifiants très gênants, ils peuvent entraîner des pertes importantes lors des centrifugations qui entrent dans le procédé de raffinage.	
Colorants	Le β -carotène se rencontre dans toutes les huiles végétales, c'est un colorant particulièrement sensible à la chaleur et à l'oxydation. La chlorophylle est présente à un degré moindre, dans les huiles de soja.	
Substances d'origine externe	Il s'agit la plupart du temps de pesticides qui se trouvent à la surface des graines au moment de la récolte. Ils sont facilement détruits par hydrolyse lors de la neutralisation à la soude, ou par entraînement à la vapeur lors de l'opération de désodorisation	
Tocophérols et Stérols	La partie insaponifiable de l'huile représente 1,6 % de l'huile brute et 0,6 % à 0,7 % de l'huile raffinée. Elle se compose essentiellement de stérols et de tocophérols.	Pouzet, (1992).

III : OLIVIER ET FEUILLES D'OLIVIER

III.1- Historique sur l'olivier

La culture de l'olivier est très ancienne, son histoire se confond avec celle du bassin méditerranéen. Son origine se situe en Asie mineure depuis six milles ans avant J.C. Il est apparu en premier temps en Palestine, la Syrie et le Liban. La culture de l'olivier a poursuivi son expansion en dehors de la Méditerranée avec la découverte de l'Amérique en 1492. En 1560, l'olivier est trouvé en Mexique, puis en Pérou, en Californie, en Chili et enfin en Argentine. Au cours de périodes plus récentes, l'olivier est connu en Afrique de sud, en Australie, au Japon et en Chine. L'olivier reste cependant une culture méditerranéenne par excellence (COI, 2006).

III.2- Classification botanique de l'olivier

L'olivier est classé dans la famille des oléacées où l'on rencontre aussi le frêne et le lilas. Le genre est appelé *Olea* et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce qui est cultivée dans le bassin méditerranéen est l'*Olea europea*, dans laquelle on rencontre l'olivier cultivé (*Olea europea* var. *europea*) et olivier sauvage ou l'oléastre (*Olea europaea* var. *oleaster* ou *sylvestris*) (Hannachi et al., 2010).

Selon Ghedira, (2008), l'olivier est classé comme suit

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre: *Olea* L.

Espèces: *Olea europea* L.

Sous-espèces : *Olea europaea* L. ssp. *Oleaster* Hoffm. et Link (= *O. europea* L. ssp. *Sylvestris* Miller).

III.3- Répartition géographique de l'olivier

L'olivier est aujourd'hui cultivé dans toutes les régions du globe se situant entre les latitudes 30° et 45° des deux hémisphères (Figure 3), des Amériques (Californie, Mexique, Brésil, Argentine, Chili), en Australie et jusqu'en Chine, en passant par le Japon et l'Afrique du Sud (Benhayoun et Lazzeri, 2007). Pour les botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est synonyme de "région méditerranéenne" (Gaussorgues, 2009 ; Carrion et *al.*, 2010). En effet l'olivier couvre environ 8 millions d'hectares de la superficie de la méditerranée, presque 98% de la récolte oléicole du monde (Pereira et *al.*, 2007).

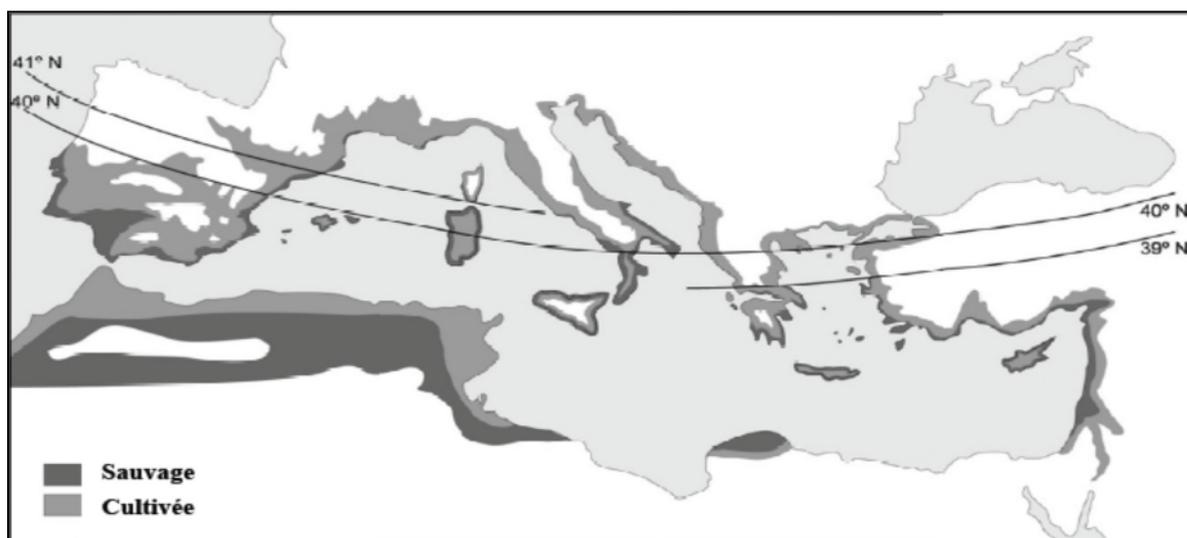


Figure 3 : Distribution des formes sauvage et cultivée de l'olivier dans le bassin méditerranéen (Carrion et *al.*, 2010).

III.4. L'olivier méditerranéen

III.4.1- Olivier cultivé

L'olivier cultivé « *Olea europaea subsp. Europaea var. sativa* » présente un port plus vigoureux que l'oléastre, peut atteindre 15 à 20 m de hauteur sans l'intervention de l'Homme par la taille. Les branches sont tortueuses, à feuilles oblongues, lancéolés. Il fleurit en mai-juin-juillet selon les variétés, donnant des fruits plus gros, de formes variées (Pagnol, 1996).

On reconnaît maintenant des milliers de cultivars d'olivier différenciés par leurs ports ainsi que la phénologie et la morphologie des feuilles et des fruits et ils sont caractérisés par des formes locales (Breton et *al.*, 2006). Les cultivars d'olivier peuvent être considérés comme d'origine inconnue, actuellement propagés végétativement par marcotte ou greffage, la plupart d'entre eux ont une zone locale de diffusion très limitée, alors que d'autres se

répandent tout au long de l'agroenvironnement (Besnard et *al.*, 2001; Bronzini de Caraffa et *al.*, 2002; Rotondi et *al.*, 2003). Ces cultivars existent à la fois pour répondre aux exigences des microclimats et territoires variés, ainsi que pour satisfaire les goûts des consommateurs (Besnard et *al.*, 2001).

III.4.2- Olivier sauvage

L'olivier sauvage est une espèce très rustique ayant une longévité plus grande que l'espèce cultivée. Appelé *Olea europaea subsp. Europaea var. Sylvestris*, l'oléastre se présente sous forme spontanée (sauvage) comme un buisson épineux, à fruits ordinairement petits et nombreux donnant une huile fine d'un gout amer (Lumaret et *al.*, 2004).

L'olivier sauvage se reproduit sexuellement, et est pollinisé par le vent et les oiseaux (Alcantara et Rey, 2003). Il est considéré comme le meilleur bio-indicateur de la flore de la région méditerranéenne (Rubio et *al.*, 2002). D'un point de vue écologique, les populations d'oliviers sauvages jouent un rôle dans la protection des sols contre la désertification à cause de leur grande résistance au vent et à la sécheresse, leur habilité de repousser après un feu ou un gel et particulièrement leur très grande longévité qui leur permet de vivre jusqu'à plusieurs milliers d'années (Mulas et Deidda, 1998).

III.5- Caractéristiques des feuilles d'olivier

La feuille est considérée comme l'emplacement primaire du métabolisme des plantes au niveau des produits de base et des produits secondaires de plante (Ryan et *al.*, 2002).

L'olivier se caractérise par des feuilles qui ne tombent jamais (durée de vie, trois ans). La face supérieure des feuilles est luisante vert foncé, tandis que la face inférieure présente un aspect argenté dû à la pruine. La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement et âge de plantation (Nefzaoui, 1991).

La matière sèche des feuilles d'olivier est de 50,6%, sa composition en matière azotée totale est basse, elle est de 7g/100 M.S. Généralement elles contiennent des quantités remarquables en arginine, leucine et valine, mais des teneurs faibles en tyrosine et cystéine. La teneur en matières grasses (MG) oscille autour de 5 à 7% (Garcia et *al.*, 2003).

III.6- Composés phénoliques des feuilles d'olivier

1. Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

2. Constituants phénoliques de la feuille d'olivier

Les feuilles d'olivier peuvent être considérées comme une source particulièrement riche en composés phénoliques ; car leur contenu polyphénolique peut atteindre jusqu'à 40g par kilogramme de tissu sec mais ces niveaux peuvent changer considérablement. Le profil et le contenu polyphénolique des feuilles d'olivier semblent fortement influencé par le potentiel génétique (Mylonaki et *al.*, 2008).

Les principaux polyphénols des feuilles d'olivier sont des secoiridoïdes parmi lesquels les composés amers tels que l'oleuropéine, ligstroside, dimethyloleuropein, et l'oleoside (Pereira et *al.*, 2007; Chiou et *al.*, 2009). Les principaux constituants phénoliques de la feuille d'olivier sont résumés dans le tableau V.

Tableau V: Constituants phénoliques de la feuille d'olivier (Ryan et *al.*, 2002 ; Skerget et *al.*, 2005 ; Khan et *al.*, 2007)

Flavonoïdes	Lutéoline, kaempferol, myricétine, quercétine, apigénine, rutoside, quercitrine et des glycosides de l'apigénine et de la lutéoline.
Secoiridoïdes	Oleuropéside, 11-déméthyl-oleuropéside, oléoside, dimethylester oléoside, ligustroside, oleurosides et des aldéhydes secoiridoïdiques non hétérosidiques (oléacéine).
Acides phénols	Acide caféique, acide caféoylquinique, (AC. Chlorogénique), acide p-coumarique, verbascoside.

III.7- Intérêts thérapeutiques des feuilles d'olivier

Depuis l'antiquité, les feuilles d'olivier sont employées en phytothérapie. A l'époque Grecque, elles ont été utilisées pour désinfecter les blessures cutanées. Les anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au XIXème siècle, on s'en servait pour combattre le paludisme. Elles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels comme des extraits, des tisanes, et des poudres. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète et préconisées pour le traitement l'hypertension artérielle modérée (Ghedira, 2008).

Selon Wainstein et *al.* (2013), les feuilles d'olivier contiennent plusieurs composés potentiellement bioactifs. Actuellement elles font l'objet de recherches dans de vaste domaine de la médecine et de la pharmacologie (Chebaibi et *al.*, 2007). De nombreuses activités (tableau VI) ont été attribuées a la plus part des composés phénoliques de feuilles d'olivier, ils agissent comme des antioxydants, anti-inflammatoire, antiviraux et anti-cancérogène (Visioli et Galli, 2002). Selon Savournin et *al.* (2001), les feuilles d'olivier possèdent la plus forte capacité a piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de d'olivier, et représente aussi une concentration importante en composants à haute valeur.

Tableau VI : Principales actions pharmacologiques des feuilles d'olivier.

Activité	Action/Propriété	Source
Activité antioxydante	L'oleuropéoside est responsable de propriétés antioxydantes exercées notamment vis-à-vis de l'oxydation des LDL cholestérols qui sont à l'origine de l'altération des tissus vasculaires au niveau des artères et, de ce fait, de l'athérosclérose.	(Benavent et Garcia <i>et al.</i> , 2000)
Activité hypotensive	Cette activité est due essentiellement à l'oleuropéoside qui présente un effet vasodilatateur coronarien : il augmente le débit sanguin au niveau coronarien. Il y a un effet vasodilatateur direct au niveau périphérique, notamment au niveau des artérioles périphériques.	(Khayyal <i>et al.</i> , 2002)
Action hypoglycémiant	L'effet hypoglycémiant pourrait s'expliquer par une potentialisation de la libération d'insuline par le glucose ou bien par une augmentation du recaptage du glucose au niveau périphérique.	(Satoa <i>et al.</i> , 2007).
Activité hypo-cholestérolémiant	Une décoction de feuilles entraîne des effets hypocholestérolémiants, hypoglycémiant, anti-hyperglycémiant significatifs. L'oleuropéoside diminue les produits de peroxydation des lipides plasmatiques.	(Andreado <i>et al.</i> , 2006)
Propriétés antiseptiques	Des activités antibactériennes et antivirales dues à des extraits de feuille d'olivier (l'oleuropéoside et l'hydroxytyrosol) ont été mises en évidence in vitro.	(Micol <i>et al.</i> , 2005).

III.8- Utilisation des feuilles d'olivier comme source d'antioxydants dans l'industrie alimentaire

L'olivier et ses dérivés peuvent être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels qui peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Savarese *et al.*, 2007). Ces feuilles sont considérées comme l'un des plus abondants sous-produits de l'industrie d'huile d'olive (10% du poids total des olives) et peuvent être utilisées en tant que source pas cher de composés phénoliques à haute valeur ajoutée (Bouaziz *et al.*, 2008, Salta *et al.*, 2007).

D'après les études, l'extrait de feuilles d'olivier a montré une activité antioxydante près de celle l'extrait de fruit d'olive, mais plus haut que celle de l'extrait de pulpe d'olive. L'addition de l'extrait de feuille d'olivier dans les huiles de table (huile d'olive, huile de tournesol, huile de palmier) peut sensiblement améliorer la capacité antioxydante et la stabilité oxydative de l'huile (Andricopoulos *et al.*, 2007 ; Chiou *et al.*, 2007).

L'enrichissement des huiles comestibles avec les polyphénols des feuilles d'olivier, peut être effectué de trois manières différentes: la première est de faire une extraction au solvant avant d'ajouter l'extrait à l'huile (extraction liquide-liquide). La deuxième méthode dans laquelle l'extrait purifié et séché, est partiellement dissout dans l'huile (extraction solide-liquide). La troisième est la combinaison de ces deux types d'extraction (Japon-Lujan *et al.*, 2008).

Présentation de l'organisme d'accueil : (Cevital 2015)

Cevital est une Société par Actions au capital privé de 68 ,760 milliards de DA. Elle a été créée en Mai 1998. Elle est implantée à l'extrême –Est du port de Bejaia.

Elle est l'un des fleurons de l'industrie agroalimentaire en Algérie qui est constituée de plusieurs unités de production équipées de la dernière technologie et poursuit son développement par divers projets en cours de réalisation. Son expansion et son développement durant les 5 dernières années, font d'elle un important pourvoyeur d'emplois et de richesses. CEITAL Food est passé de **500** salariés en 1999 à **3996 salariés en 2008**.

Activités de Cevital :

Le Complexe Agro-alimentaire est composé de plusieurs unités de production :

1. Huiles Végétales.
2. Margarinerie et graisses végétales.
3. Sucre blanc.
4. Sucre liquide.
5. Silos portuaires.
6. Boissons

À Bejaia :

Cevital a entrepris les installations suivantes :

- ✓ Raffinerie Huile
- ✓ Margarinerie
- ✓ Silos portuaires
- ✓ Raffinerie de sucre

A EL-Kseur :

Une unité de production de jus de fruits Cojek a été rachetée par le groupe Cevital dans le cadre de la privatisation des entreprises publiques algériennes en novembre 2006.

Un immense plan d'investissement a été consenti visant à moderniser l'outil de production de jus de fruits Cojek.

A Tizi Ouzou (Agouni Gueghrane):

Au cœur du massif montagneux du Djurdjura qui culmine à plus de 2300 mètres : L'Unité d'Eau Minérale Lalla Khedidja a été inaugurée en juin 2007.

Tableau VII: Capacité de production :

Matière	Production
Huiles de table	570 000 tonnes/an
Margarine et graisses végétales	180 000 tonnes/an
Sucre blanc	650 000 a 1 800 000 tonnes/an
Sucre liquide	219 000 tonnes/an
Boissons (Eau minérale Lalla Khedidja)	3 000 000 bouteilles/jour

I.1- MATÉRIEL VÉGÉTAL

I.1.1- L'huile végétale utilisée pour l'enrichissement

Dans cette étude, l'huile de soja brute importée et raffinée par CEVITAL a fait l'objet d'un enrichissement par les extraits phénoliques des feuilles d'olivier de la variété *Chemlal* et d'olivier sauvage.

I.1.2- Feuilles d'olivier sauvage et cultivé utilisées pour extraire les composés phénoliques

I.1.2.1. Récolte

Des feuilles fraîches d'olivier de la variété *Chemlal* (Figure 4a) de la région de Tazmalt (altitude de 400 m du niveau de la mer) et sauvage (Figure 4b) de la région de Targa Ouzemour (altitude de 51 m du niveau de la mer) sont cueillies en janvier 2015 à la main à partir de tous les étages de la frondaison des arbres. La collecte des feuilles est effectuée dans un intervalle d'une journée.



Figure 4 : Rameau d'olivier contenant les feuilles utilisées. **a** : *Chemlal*, **b** : Oléastre

I.1.2.2. Séchage et broyage

Les deux collectes sont séchées à l'abri de la lumière et d'humidité, à température ambiante pendant 1 mois (Figure 5), puis elles ont subi un deuxième séchage à l'étuve pendant 24h à 40°C.

Une fois séchée, la matière végétale a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique pour permettre l'obtention d'une poudre fine (Figure 5). Cette dernière a été tamisée à l'aide d'un tamis de 500µm de diamètre.

Les poudres ainsi obtenues sont conservées dans des récipients hermétiquement scellés et stockées à l'abri de la lumière.



Figure 5 : séchage et broyage des feuilles d'olivier.

I.2- EXTRACTION ET DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES A PARTIR DES FEUILLES D'OLIVIER

I.2.1- Extraction des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier

L'extraction des polyphénols a été effectuée selon le procédé décrit par Chiou et al, (2007), avec quelques modifications mineures (figure 6). Brièvement, 50 g de poudre de feuilles d'olivier ont été macérés dans du méthanol (250 ml) pendant 2 jours, à l'obscurité, à température ambiante. L'extrait a été filtré et puis évaporé. Le résidu a été redissout dans 50 ml d'acétone-eau (1:1), puis lavé avec de l'hexane (50 ml \times 3) et chloroforme (50 ml \times 3), suivi d'une extraction avec de l'éthyle acétate (50ml \times 4). Les extraits d'éthyle acétate ont été combinés et évaporés. Ensuite, le résidu, contenant principalement les polyphénols, a été redissout dans 10 ml méthanol. Les extraits phénoliques ont été maintenus à 4 C° jusqu'à l'analyse.

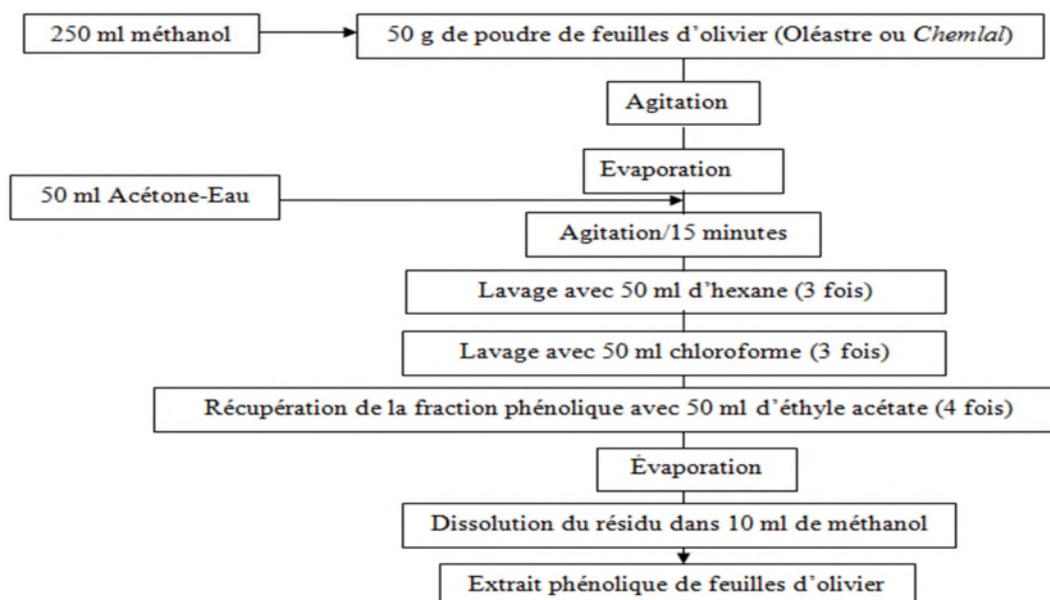


Figure 6 : Schéma d'isolement des polyphénols des feuilles d'olivier (Chiou et al., 2007).

I.2.2- Dosage des polyphénols totaux des extraits de feuilles d'oliviers

✓ *Principe*

Les teneurs en polyphénols totaux des deux extraits phénoliques sont déterminées selon le protocole de Malheiro et *al.* (2012), basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue.

Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé et *al.*, 2005).

✓ *Mode opératoire*

Un volume de 0,5 ml de réactif Folin-Ciocalteu est ajouté à 10 μ l de l'extrait concentré en polyphénols dilué à 1/10 avec du méthanol. Après 3 min, un volume de 1 ml d'une solution de carbonate de sodium (20%) est ajouté, puis ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à 20 ml. Après 90 min à l'obscurité, la solution est centrifugée et l'absorbance est réalisée à 765nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (Annexe 1).

I.3- ENRICHISSEMENT DE L'HUILE DE SOJA AVEC LES EXTRAITS PHENOLIQUES

✓ *Principe*

L'enrichissement de l'huile de soja avec les deux extraits phénoliques des feuilles d'olivier a été effectué selon le procédé décrit par Chiou et *al.* (2007), avec quelques modifications.

L'enrichissement a été effectué en utilisant trois concentrations pour chaque extrait. Les volumes d'enrichissement pour la variété *Chemlal* sont: 45 μ l, 95 μ l et 190 μ l correspondant respectivement à environ 25ppm, 50ppm, 100ppm pour 20 ml d'huile de soja raffinée. Pour l'oléastre les volumes sont: 35 μ l, 70 μ l, 140 μ l correspondant environ aux mêmes concentrations de celles de la variété *Chemlal*.

Les volumes d'enrichissement sont calculés à partir d'une analyse au Folin-Ciocalteux décrite dans la section précédente. Les volumes prélevés sont séchés et dissous dans des volumes différents de propandiol pour faciliter l'homogénéisation avec l'huile.

Chaque volume prélevé d'extrait phénolique dissous dans du propandiol est ajouté à 5 ml d'huile de soja raffinée puis agité au vortex pendant 5 minutes, puis ajusté jusqu'au volume final avec l'huile de soja. Les huiles enrichies obtenues sont vortexées pendant 20 minutes pour obtenir une meilleure homogénéisation.

I.4- EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES POLYPHENOLS DES HUILES ENRICHIES

I.4.1- Extraction des polyphénols à partir des huiles enrichies

Cette extraction a été réalisée selon le procédé décrit par Tsimidou et *al.* (1992). 10g de chaque huile (huile de soja, huile de soja raffinée enrichie à l'extrait de feuilles de *Chemlal*, huile de soja raffinée enrichie à l'extrait de feuilles d'oléastre), sont dissous dans 10ml d'hexane, puis lavées 3 fois avec 6 ml de méthanol/eau (60/40). Les volumes de méthanol/eau sont ensuite cumulés.

I.4.2- Quantification des polyphénols totaux des huiles enrichies

Les teneurs en polyphénols totaux contenues dans les différents extraits sont déterminées selon la méthode décrite par Favati et *al.* (1994).

Dans un flacon de 20 ml, un volume de 500 μ l de réactif Folin-Ciocalteux est ajouté à 500 μ l de l'extrait concentré en polyphénols. Après 4 min, un volume de 4 ml d'une solution de carbonate de sodium (20%) est ajouté, puis ajusté avec de l'eau distillée. Les absorbances sont mesurées à 765 nm après 90 min d'incubation à l'obscurité en présence d'un blanc contenant du méthanol/eau (60/40).

La quantification des polyphénols totaux des extraits des huiles a été réalisée en se référant à un étalon d'acide gallique (annexe 1).

I.5- ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES HUILES ENRICHIES

I.5.1- Activité antiradicalaire de l'huile contre le radical DPPH°

✓ *principe*

La réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par des antioxydants (Molyneux, 2004).

✓ *Mode opératoire*

L'évaluation de l'activité antiradicalaire des d'huiles est déterminée selon le protocole décrit par Ramadan et Moersel, (2006). Un volume de 3,9 ml de la solution DPPH° (2,2-diphényl-1-pecrylhydrazyle) préparée dans de l'éthyle acétate (10^{-4} M) est additionné d'un volume de solution d'huiles (soja enrichie avec les extraits phénoliques des feuilles d'oléastre et de *Chemlal* à 25ppm et l'huile de soja raffinée non enrichie) diluée dans de l'acétate d'éthyle à différentes concentrations : 0,125 – 2 g/ml pour l'huile de soja non enrichie, 0,03125–0,5 g/ml pour les huiles enrichies au extraits phénoliques d'olivier. Le mélange est agité pendant 10 secondes au vortex et l'absorbance est lue après 60 min d'incubation à 515 nm.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH° est calculé selon la formule suivante :

$$\text{(\% d'inhibition du DPPH}^\circ\text{)} = (\text{Ac} - \text{Ae} / \text{Ac}) \cdot 100$$

Ac : Absorbance du contrôle;

Ae : Absorbance de l'échantillon.

Les concentrations correspondant à 50% d'inhibition (EC₅₀) du radical DPPH° ont été déterminées à partir des graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration, puis comparées à celle de l'acide gallique (Annexe 1).

I.5.2- Activité antiradicalaire des extraits phénoliques contre le radical DPPH°

L'effet des extraits phénoliques de l'extrait d'huile de soja non enrichie et des extraits d'huile de soja enrichit avec l'extrait phénolique de *Chemlal* et celui de l'oléastre à 25ppm sur le radical libre DPPH est mesuré en utilisant le Protocol de Baiano et *al.* (2014). 250 µl

d'extrait phénolique sont ajoutés à 1,75 ml de la solution DPPH° préparée à 10^{-4} mM dans du méthanol.

L'absorbance est mesurée à 515 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité. Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH sont déterminés selon la formule suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition du DPPH}^\circ = (A_c - A_e / A_c) \cdot 100$$

A_c : Absorbance du contrôle;

A_e : Absorbance de l'échantillon.

Les concentrations correspondant à 50% d'inhibition (EC_{50}) du radical DPPH° ont été déterminées à partir des graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration.

I.5.3 - Pouvoir réducteur FRAP des extraits phénoliques.

✓ *Principe*

La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est basée sur la capacité réductrice des antioxydants évalués (Benzie et Strain, 1996). À pH 3,6 et à 37°C, les antioxydants réduisent stoechiométriquement le complexe ferrique de 2,4,6-tripyridyl-Striazine [Fe_{+3} -TPTZ] en un complexe ferreux stable de 2,4,6-tripyridyl-S-triazine [Fe_{+2} -TPTZ]. La réaction est accompagnée d'une augmentation de l'absorbance à 593 nm (Pereira-Caro et *al.*, 2009).

✓ *Mode opératoire*

Le protocole décrit par Szydłowska-Czerniak et *al.* (2008), est utilisé pour évaluer le pouvoir réducteur des extraits phénoliques des huiles. Une solution FRAP préalablement préparée, consiste en un mélange contenant : 2,5 ml d'une solution TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-striazine) à 10 mmole /L préparée dans du HCl à 40 mmole/l, 2,5 ml d'une solution $FeCl_3$ et 25 ml du tampon acétate à 0,1 mole /L (pH=3,6). Le mélange est incubé à 37°C pendant 10 mn.

Un volume de 300 μ l d'extrait phénolique est ajouté à 2 ml de la solution FRAP puis ajustée à 10 ml avec de l'eau distillé. La solution bleuâtre obtenue est mise à l'obscurité pendant 6 mn puis centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 mn. L'absorbance à 593 nm est mesurée contre un témoin contenant du méthanol /eau (60/40).

La concentration des composés réducteurs (antioxydants) dans l'extrait est exprimée en mg d'équivalent d'acide caféique/Kg en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe 1).

I.6- STABILITE OXYDATIVE DES HUILES

✓ principe

Pour évaluer l'effet d'ajout des extraits phénoliques dans l'huile de soja, il convient d'estimer de façon rapide et simple, leur stabilité et durabilité par un test d'oxydation accéléré.

Le Rancimat consiste à vieillir prématurément les huiles et graisses par décomposition thermique. Les composés volatils dégagés au cours du processus d'oxydation sont entraînés par l'air dans une fiole contenant de l'eau distillée dans laquelle est immergée une électrode de mesure de la conductivité électrique. L'électrode est connectée à un dispositif de mesure et d'enregistrement. La fin de la période d'induction est indiquée lorsque la conductivité se met à augmenter rapidement. Cette augmentation accélérée est provoquée par l'accumulation d'acides carboxyliques volatils produits au cours de l'oxydation (Läubli et Bruttel, 1986; Farhoosh, 2007).

✓ Mode opératoire

La stabilité de l'huile de soja raffinée et enrichie à différentes concentration avec les extraits de feuilles d'olivier de la variété *Chemlal* et d'olivier sauvage est déterminée selon ISO/6886/96, à l'aide d'un appareil Rancimat Metrohm n°743. Un flux d'air fixé à 10 l/h traverse un échantillon d'huile de 3 g chauffé à 98°C. La période d'induction exprimée en heures correspond au temps écoulé entre le début de la mesure et le moment où la formation de produits d'oxydation commence à augmenter rapidement (Point d'inflexion de la courbe de conductivité), entre autre le temps pendant lequel la matière grasse a résisté à un stress oxydatif.

I.7- TEST D'EFFICACITE DES ANTIOXYDANTS AJOUTES EN CONDITION DE FRITURE

✓ Principe

La vitesse de dégradation d'une huile de friture dépend de la température du bain ainsi que du type de produits frits. L'ajout d'additifs à base de produits naturels permet de prolonger la durée de vie de l'huile, mais une dégradation subsiste (SDD, 2009).

Afin de vérifier l'efficacité des extraits phénoliques ajoutés à l'huile de soja, la teneur en composés polaires des huiles soumise à une friture ménagère a été mesurée.

✓ Mode opératoire

L'effet des conditions de fritures a été étudié par la détermination du taux de la fraction polaire dans les huiles de soja enrichies à 25ppm d'extraits phénoliques de feuilles d'olivier sauvage et cultivé en présence d'un témoin (l'huile de soja non enrichie).

10 fritures successives ont été effectuées pour chaque échantillon en utilisant un volume 1 litre de chaque huile (huile de soja pure et enrichie avec 25ppm d'extraits de feuilles d'olivier sauvage et cultivé).

La friture est réalisée sans ajout ni substitution d'huile pendant les 10 fritures. Une quantité de 280 g de pomme de terre épluchée, lavée et séchée a été utilisée pour chaque friture, dans une friteuse en inox de 26 cm de diamètre. Des échantillons de 20 ml d'huile ont été prélevés avant et après les 1^{ères} et les 10^{èmes} fritures pour chaque huile, les échantillons sont conservés au réfrigérateur jusqu'à l'analyse.

Pour évaluer le taux de composés polaires, les échantillons sont mis dans un bain Maré à une température de 40°C.

Le taux en composés polaires est mesuré grâce à un testeur d'huile (Optifry, Figure 7) qui consiste à évaluer le degré de dégradation des matières grasses par la détection du taux de la fraction polaire dans un bain de friture (SDD., 2009).



Figure 7: Testeur d'huile (Optifry) (SDD, 2009).

I.8- ANALYSE STATISTIQUE

L'application ANOVA est utilisée pour effectuer l'analyse statistique des résultats obtenus suivie le test de Newman-keuls à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5. Le degré de signification des résultats est pris à la probabilité $p < 0,05$.

II.1- TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX DES FEUILLES D'OLIVIERS

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols des feuilles d'olivier sauvage et cultivé (Figure 8) sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 100g de matière sèche (mg EAG/ 100g MS) montrent que les teneurs en ces composé diffèrent significativement ($p < 0.05$)

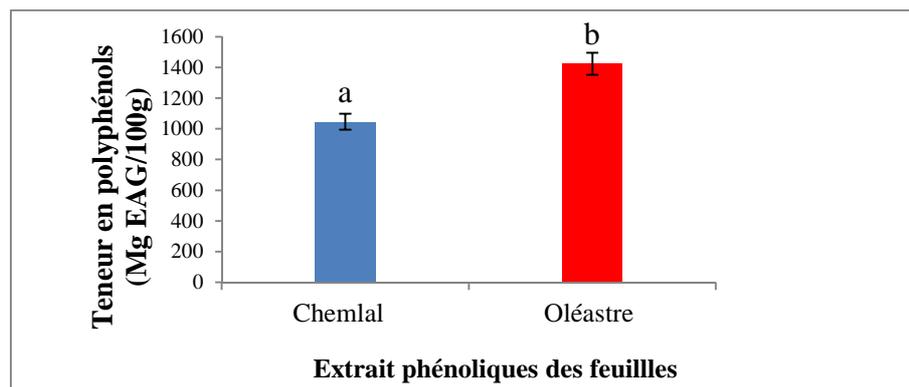


Figure 8: Teneur en polyphénols totaux des feuilles d'olivier de l'oléastre et de la variété *Chemlal*.

Les lettres "a" et "b" indiquent des résultats significativement différents ($p < 0.05$).

Les feuilles de l'olivier sauvage se caractérisent par la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (1424,59mg EAG/ 100g), la variété Chemlal quand à elle enregistre une teneur de 1047,19mg EAG/ 100g.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Boudhioua *et al.* (2008) qui ont estimé le taux en composés phénoliques des feuilles de variété tunisiennes (*Chemlali, Chétoui, Chemchali et Zarrazi*), qui varient entre 1380 et 2320 mg/ 100g ainsi que ceux obtenu par Bahloul *et al.* (2007) sur les feuilles de variétés *chemlali* et *chemchali* séchées à 40°C avec des taux respectifs de 972 mg EAC/100g et 1349 mg EAC/100g

Les teneurs en polyphénols des feuilles d'olivier dépendent significativement de la variété, de la zone géographique oléicole et la période de collecte des feuilles. Cette dépendance a été démontrée par Rotondi *et al.* (2004) qui ont aussi mentionné que la teneur maximale des feuilles en composés phénoliques est atteinte dans la phase terminale de la croissance de ces dernières (décembre-janvier).

Selon Francisca Ortega et al. (2009), le taux en composés phénoliques dans les feuilles est également lié à l'activité de l'enzyme *L-Phénylalanine Ammonia Lyase* (PAL) qui présente un facteur de résistance face aux stress climatiques comme le froid et le gel. Plus l'exposition au stress est importante, plus la présence des polyphénols est significative dans les feuilles, ce qui pourrait expliquer le taux élevé enregistré pour l'extrait de feuille d'oléastre, étant donné que ce dernier est connu pour sa résistance aux conditions du milieu.

II.2- TENEURS EN POLYPHENOLS DES HUILES APRES ENRICHISSEMENT

Après l'enrichissement des huiles de soja avec les extraits phénoliques des feuilles d'olivier sauvage et de la variété cultivée *Chemlal* à différentes concentrations (25ppm, 50ppm et 100ppm), le dosage des composés phénoliques des huiles enrichies ainsi que l'huile brute a permis l'obtention des résultats présentés dans la figure 9.

D'après ces résultats, on aperçoit la présence des composés phénoliques dans les huiles enrichies par rapport au soja pure. Des différences significatives ($p < 0,05$) sont notées entre les différents extraits dosés.

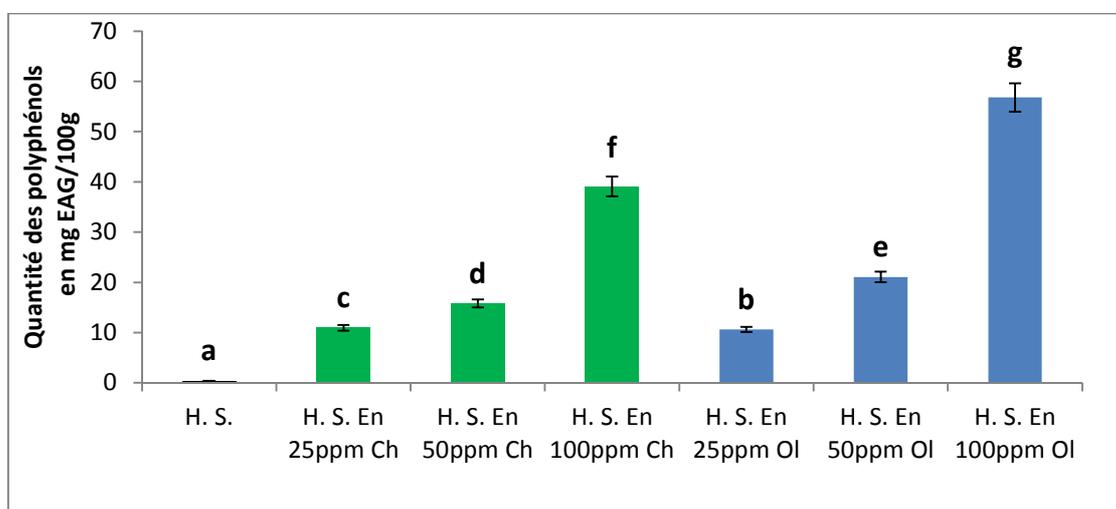


Figure 9: quantification des polyphénols des huiles enrichies avec les extraits de feuilles d'oléastre et *Chemlal*.

H.S: L'huile de soja non enrichie; **H. S. En Ch:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuilles de *Chemlal*; **H. S. En Ol:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuilles d'oléastre.

Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)

Les teneurs en polyphénols sont proportionnelles aux concentrations des extraits ajoutés. Les teneurs enregistrés pour les huiles enrichies avec les extraits de feuilles d'oléastres sont supérieures à celles enrichie avec les extraits de feuilles de la variété *Chemlal* excepté la concentration 25 ppm. La plus grande concentration en composés phénolique est notée pour l'oléastre à 100ppm avec 56,79 mg EAG/ 100 g, suivis de *Chemlal* 100ppm (39,09 mg EAG/ 100g). La plus faible concentration pour les huiles enrichies est exhibée par l'oléastre à 25ppm et *Chemlal* 25ppm avec 10,63mg EAG/100g et 10,95mgEAG/100g respectivement.

L'huile de soja non enrichie note la plus faible teneur en polyphénols totaux (0,37mgEAG/ 100g MS). Cette teneur pourrait être expliquée par la présence de quelques composés qui absorbent à la même longueur d'onde que les composés phénoliques étant donné que le processus de raffinage est à l'origine de l'élimination quasi-total de ces composés. L'effet du raffinage sur la composition de l'huile de soja a été étudié par Farhoosh et *al.* (2009) ou ils ont déterminé une quantité de $7,91 \pm 0,02$ mg EAG/100g de composés phénoliques dans l'huile de soja non raffinée, cette quantité est presque totalement éliminée au cours des étapes du raffinage.

La quantification des polyphénols totaux des huiles d'olives, de tournesol et de palme, enrichies à 120 et 240ppm d'extraits de feuilles d'olivier par Chiou et *al.* (2007) a montré des résultats similaires qui varient entre 8,2 et 20,2 EAC/ 100 g.

II.3- ACTIVITE ANTIRADICALAIRE DES HUILES ENRICHIES CONTRE LE RADICAL DPPH°

Pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire des huiles contre le radical DPPH les échantillons d'huile (huile de soja non enrichie, huile de soja enrichie au extraits de feuilles d'olivier sauvage et cultivé à 25 ppm) sont dilués dans de l'éthyle acétate. Cette procédure permet la contribution des antioxydants présents à l'activité antioxydante. Les résultats obtenus, exprimés en mg EAG/Kg, ainsi que les EC50 en mg/ml sont illustrés dans la figure 10.

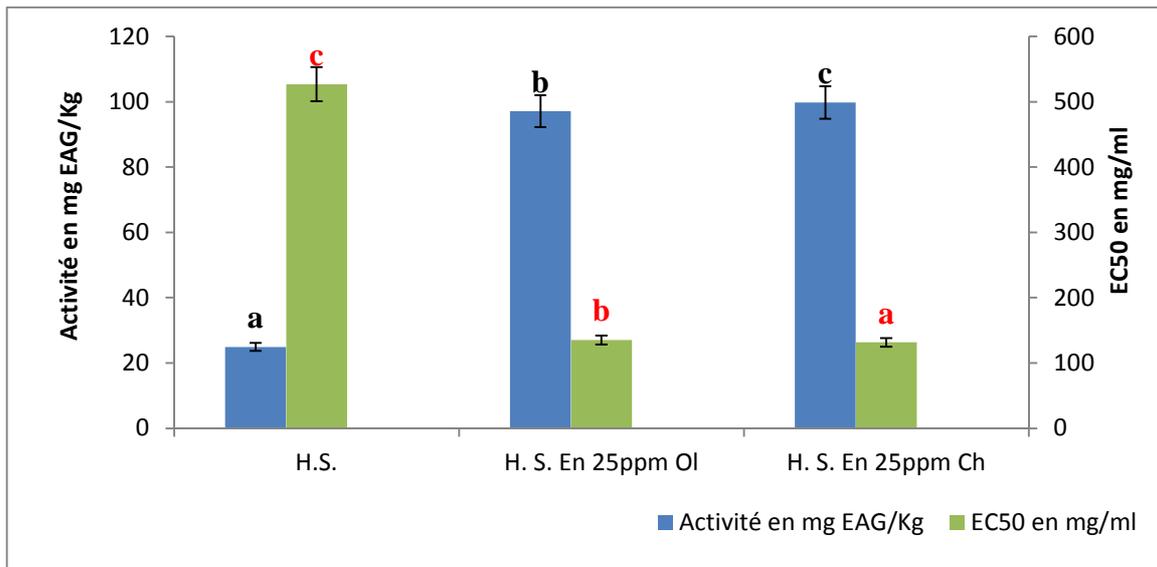


Figure 10: Activité antiradicalaire des huiles (soja raffinée et enrichie aux extraits de feuilles d'oléastre et *chemlal*) en EAG/Kg et leur EC50 en mg/ml.

H. S.: L'huile de soja non enrichie ; **H. S. En Ch:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuille de *Chemlal*; **H. S. En Ol:** L'huile de soja enrichie à l'extrait de feuilles d'oléastre.

Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)

D'après les résultats statistiques, les activités antioxydantes des huiles de soja enrichies avec les extraits de feuilles d'olivier sauvage et cultivé à 25 ppm ne montrent aucune différence significative ($p < 0,05$). Elles enregistrent des activités de 97,14 mg EAG/Kg et 99,97 mg EAG/Kg respectivement et des concentrations efficace médiane pour éliminer 50% du radical libre DPPH (EC50) de 135,26 mg/ml et 131,66 mg/ml pour l'huile de soja enrichie aux extraits phénoliques des feuilles d'olivier sauvage et cultivé respectivement.

L'huile de soja non enrichie, présente la plus faible activité (24,93 mg EAG/Kg) et par conséquent note l'EC 50 la plus élevée (527 mg/ml). Cependant, cette activité peut être expliquée par la présence des tocophérols à une concentration de 11mg/100g (annexe 3). Jiang et *al.* (2005) estiment la contribution des tocophérols à l'activité anti-DPPH d'environ 39 à 69%.

Par rapport à l'huile de soja non enrichie, les huiles enrichies présentent une activité augmentée de 74 à 75% pour l'enrichie à l'extrait d'oléastre et *Chemlal* respectivement. Cela est expliqué par la richesse de ces huiles en composés phénoliques issues de l'enrichissent. Un coefficient de corrélation positif ($p < 0,05$) de $r=1$ est enregistré entre l'activité antiradicalaire de l'huile contre le radical DPPH et les teneurs en polyphénols totaux

Nos résultats sont confirmés par les travaux de Bouaziz et *al.* (2008) sur l'extrait phénolique de feuille d'olivier. D'après ses résultats, l'huile d'olive raffinée enrichie aux polyphénols de feuilles de la variété tunisienne (*Chemlali*) a exercé une activité antiradicalaire importante comparable à celle obtenue par l'enrichissement avec un antioxydant synthétique (BHT), et selon Lee et *al.* (2009), l'huile de soja raffinée enrichie à l'extrait de feuille d'olivier a montrée une inhibition élevée du radical DPPH.

II.4- ACTIVITE ANTIRADICALAIRE DES EXTRAITS METHANOLIQUES DES HUILES ENRICHIES CONTRE LE RADICAL DPPH°.

L'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques des huiles enrichies avec 25 ppm d'extraits de feuilles d'olivier et l'huile de soja non enrichie exprimée en termes de pourcentages d'inhibition du radical DPPH et les EC50 ($\mu\text{g/ml}$) sont présentés dans la figure 11.

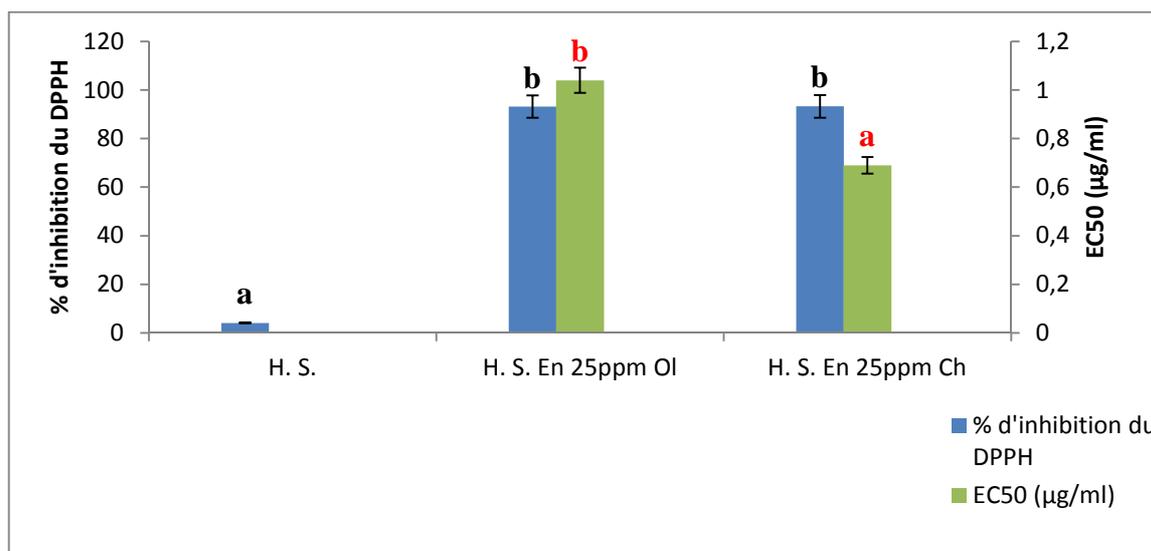


Figure 11: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH° des extraits phénoliques des huiles (l'huile de soja pure, soja enrichit avec *Chemlal*, soja enrichit avec *Oléastre*) et leur EC50.

H. S.: L'huile de soja non enrichie; **H. S. En Ch:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuilles de *Chemlal*; **H. S. En Ol:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique d'*oléastre*.

Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$)

Selon l'analyse statistique, aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est enregistré entre la capacité antiradicalaire des extraits d'huiles enrichies. La différence est notée entre ces derniers et l'huile de soja non enrichie qui se montre la moins performante à neutraliser le radical DPPH°.

Un pouvoir antiradicalaire élevé est observé pour les extraits d'huiles enrichies aux extraits phénoliques des feuilles d'oliviers sauvage (93,2%) et *Chemlal* (93,29%), avec des EC50 de 1,04 µg/ml et 0,69 µg/ml respectivement. Cela pourrait être expliqué par la richesse de ces derniers en composés phénoliques (10,95 mg/100g pour *Chemlal* et 10,63mg/100g pour Oléastre), ce qui reflète l'efficacité de l'ajout d'antioxydants naturels dans l'huile de soja. Une corrélation linéaire ($p < 0,05$) $r = 1$ est notée entre le pouvoir antiradicalaire des extraits méthanoliques et les teneurs en composés phénoliques.

L'extrait phénolique de l'huile de soja non enrichie n'inhibe que 4,03 % du radical DPPH° et représente ainsi le plus faible pouvoir scavenger, ce qui confirme la faible teneur de cette huile de soja pure en composés phénoliques qui sont éliminés au cours du raffinage chimique.

L'enrichissement a permis une augmentation de l'activité antiradicalaire estimée à 89,17% et 89,26% pour des extraits d'huiles enrichies de feuille de *Chemlal* et oléastre par rapport à l'huile non enrichie respectivement.

II.5- POUVOIR REDUCTEUR DES EXTRAITS PHENOLIQUES (FRAP)

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits phénoliques des huiles enrichies avec 25 ppm d'extraits de feuilles d'olivier (sauvage et *Chemlal*) et l'huile de soja non enrichie exprimées en mg équivalent acide caféique par 100 grammes de matière sèche (mg EAC/100g MS) sont représentés dans la figure 12. Des différences significatives ($p < 0,05$) sont observées entre les extraits d'huile étudiés, cependant, une différence peu importante est notée entre les extraits d'huile enrichies.

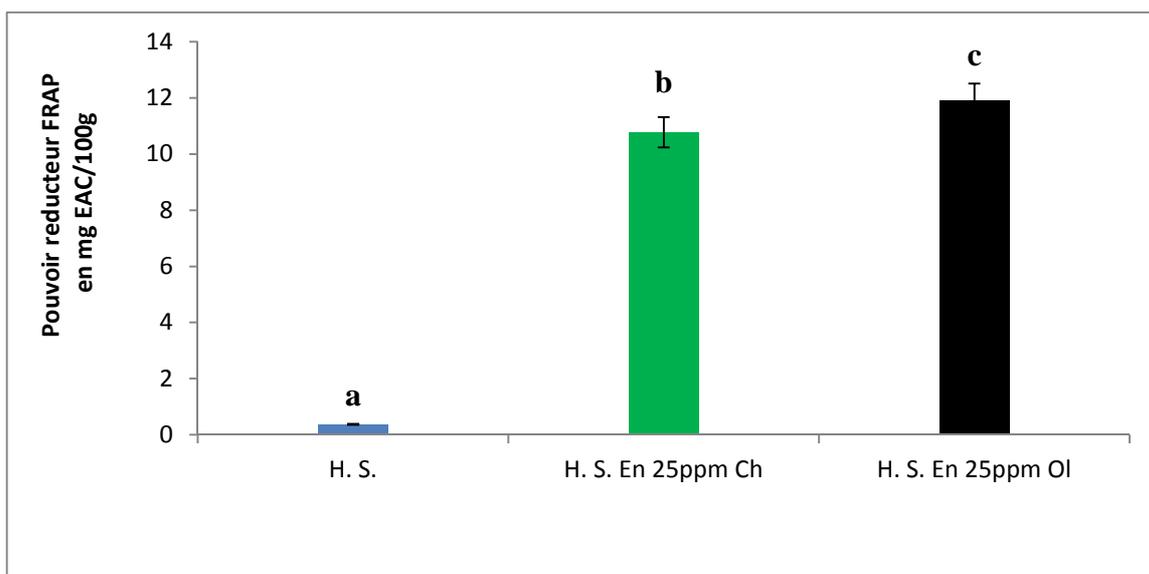


Figure 12: Pouvoir réducteur (FRAP) des extraits d'huiles de soja (non enrichie et enrichis aux extraits de feuilles d'olivier 'oléastre et *chemlal*')

H.S: L'huile de soja non enrichie **H. S. En Ch:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuilles de Chemlal; **H. S. En Ol:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuilles d'oléastre.

Les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$).

Les extraits d'huile de soja enrichis avec les extraits phénoliques ont montré un pouvoir réducteur assez important qui pourrait être liée aux teneurs appréciable de ces derniers en polyphénols. La meilleure capacité réductrice du Fe^{3+} (fer ferrique) en Fe^{2+} (fer ferreux) est enregistrée pour l'extrait d'huile enrichie avec l'extrait d'oléastre avec une activité de 11,91mg E.A.C/100g et une augmentation de 96,89% par rapport à l'huile non enrichie, suivi de l'extrait *Chemlal* avec une activité de 10,77 mg E.A.C/100g et une augmentation de 96,56% par rapport à l'huile non enrichie.

Les résultats obtenus montrent que l'activité des extraits d'huile enrichis est plus élevée que celle du témoin non enrichie qui n'enregistre que 0,37 mg E.A.C/100g en raison de sa teneur négligeable en composés phénoliques (0,376 mg EAG/100 g). Une corrélation positive ($P < 0,05$) a été obtenue pour le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des huiles et leur teneurs en composés phénoliques totaux ($r=0,99$) qui indique une grande dépendance entre le pouvoir réducteur des extraits et leur teneurs en polyphénols issus des feuilles d'olivier. Une corrélation moindre a été obtenue par Szydłowska-Czerniak et al. (2008) qui a enregistré un coefficient $r=0,94$ entre la capacité réductrice (FRAP) et la teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique de l'huile de colza.

II.6- STABILITE OXYDATIVE DES HUILES

Pour confirmer que nos huiles ont été bien enrichies en composés phénoliques des feuilles d'olivier sauvage et cultivé, un test d'oxydation accélérée a été appliqué sur l'huile de soja (non enrichie et enrichie) sous des conditions standardisées à l'aide d'un appareil Rancimat Metrohm n°743. Les résultats obtenus (Figure 13) sont exprimés en temps d'induction (heures), déterminés grâce à une courbe de conductivité (annexe 2).

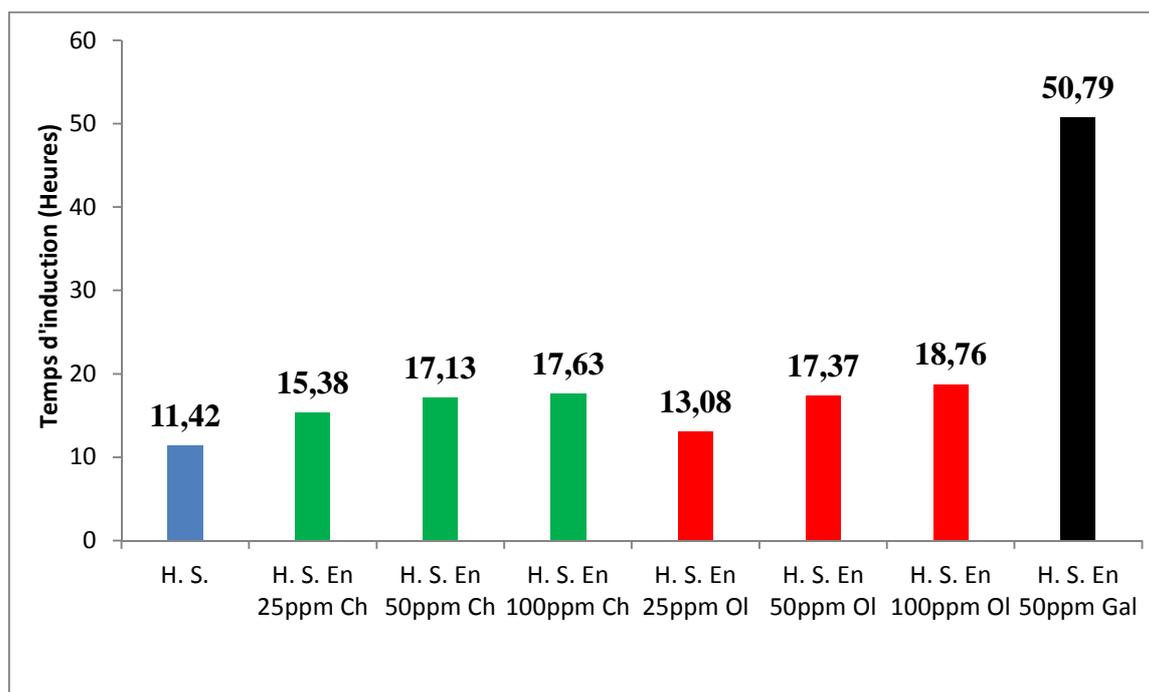


Figure 13: Temps d'induction (h) des huiles enrichies comparés à l'huile de soja non enrichie.

H. S.: Huile de soja non enrichie; **H. S. En Ch:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuilles de Chemlal; **H. S. En Ol:** L'huile de soja enrichie à l'extrait phénolique de feuilles d'oléastre.

Les valeurs du temps de résistance à l'oxydation accélérée obtenues sont hétérogènes, elles oscillent entre 11,42 et 18,76 heures. Les temps notés par les huiles enrichies sont nettement supérieurs à celui enregistré par l'huile de soja non enrichie (11,42 h) avec une augmentation de 39,13% pour l'oléastre et 35,22% pour *Chemlal* à 100 ppm. Cependant toutes les huiles ont exhibées des temps d'inductions inférieures à celui de l'huile enrichie avec l'acide gallique à 50 ppm (50,79 heures) qui a montré l'augmentation la plus importante. Cette différence entre le pouvoir stabilisateur entre les antioxydants naturels et celui de l'acide gallique est due à la composition chimique de ce dernier qui est purement constitué de

composés phénoliques de forme assez simple présentant un seul noyau benzénique (C6-C1) (Chira et *al.*, 2008).

On constate que la stabilité est proportionnelle aux concentrations des extraits phénoliques de feuilles d'olivier et le pourcentage d'augmentation du temps d'induction, plus l'extrait est plus concentrée en composés phénolique plus le temps d'induction est élevé. Pour l'extrait des feuilles ''Chemlal'', les concentrations « 25, 50 et 100ppm » qui présentent respectivement les teneurs 10,93 - 15,81 et 39,09 mg EAG /100g en polyphénols totaux, induisent des augmentations du temps d'induction de : 25,75 , 33,33 et 35,22% respectivement. Les extraits de feuilles « d'oléastre » aux mêmes concentrations avec des teneurs en polyphénols totaux de : 10,63 , 21,06 et 56,79 mg EAG/100g induisant des améliorations de 12,69 , 34,25 et 39,13% respectivement.

Une corrélation positive ($p < 0,05$) a été obtenue entre la stabilité et les teneurs des huiles en polyphénols totaux, le coefficient de corrélation est estimé à ($r = 0,99$), ce qui signifie que la stabilité oxydative de l'huile est hautement influencée par sa teneur en composés phénoliques qui sont responsable du ralentissement de l'activité radicalaire des AGI par transfert d'un H^+ sur le radical libre (Cuvelier et Maillard, 2012).

Des résultats similaires ont été obtenus par Bouaziz et *al.* (2008) sur huiles d'olives raffinées enrichies avec l'extrait phénolique de feuilles d'olivier à une concentration de 400 ppm utilisant un appareil Rancimat (120°C, 20L/h), où ils ont observé un gain de 46,9% du temps d'induction par rapport à l'huile non enrichie.

II.7- EFFICACITE DES ANTIOXYDANTS AJOUTES EN CONDITION DE FRITURE

La réglementation européenne et française impose des valeurs limites en termes de composés polaires dans les huiles de friture. Les valeurs seuils à 25 % de composés polaires totaux (décret n° 2008-184 du 26-02-2008) pour garantir l'alimentarité des huiles chauffées (Combe et Rossignol, 2010). Pour ces différentes raisons, il est judicieux de contrôler l'état de l'huile pendant la friture.

La qualité des huiles de soja enrichies avec les extraits phénoliques de feuilles d'olivier sauvage et cultivé en présence d'un témoin d'huile de soja non enrichie a été vérifiée grâce à la mesure du taux de composés polaires formés au cours des fritures. Les résultats obtenus

(Tableau VIII) indiquent que l'apparition de la fraction polaire est proportionnelle au temps de chauffage autrement dit au nombre de fritures.

Tableau VIII: Taux des composés polaires et contrôle visuel des huiles (enrichie et non enrichie) durant la friture.

Huile	Taux des composés polaires durant les Fritures		Observation
Huile de Soja raffinée (non enrichie)	Avant la friture	0%	<ul style="list-style-type: none"> • Couleur de l'huile: jaune doré
	1ère friture	3,7%	<ul style="list-style-type: none"> • Frites croustillantes • Couleur de l'huile: reste inchangée • L'huile ne fume pas
	10ème friture	10,4%	<ul style="list-style-type: none"> • Frites croustillantes • Couleur de l'huile : Jaune orangée avec un aspect (trouble) • Peu de fumée
Huile de Soja raffinée enrichit avec 25ppm d'extrait de feuilles de <i>Chemlal</i> .	Avant la friture	0%	<ul style="list-style-type: none"> • Couleur de l'huile : jaune doré
	1ère friture	0%	<ul style="list-style-type: none"> • Frites croustillantes • Couleur de l'huile : reste inchangée • L'huile ne fume pas
	10ème friture	0%	<ul style="list-style-type: none"> • Frites croustillantes • Couleur de l'huile : Jaune clair • Peu de fumée
Huile de Soja raffinée enrichit avec 25ppm d'extrait de feuilles d'Oléastre.	Avant la friture	0%	<ul style="list-style-type: none"> • Couleur de l'huile: jaune doré
	1ère friture	0%	<ul style="list-style-type: none"> • Frites croustillantes • Couleur de l'huile : reste inchangée • L'huile ne fume pas
	10ème friture	0%	<ul style="list-style-type: none"> • Frites croustillantes • Couleur de l'huile : Jaune clair • Peu de fumée

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que les huiles enrichies en extraits phénoliques n'ont pas subi beaucoup de changement, que ce soit pour la couleur, l'apparence de l'huile et même pour les taux de composés polaires qui sont nuls durant toutes les fritures, à part les 10^{ème} fritures où on a observé un dégagement léger de fumée qui est à l'origine des composés volatils (aldéhydes, hydrocarbures) issus de la catalyse thermique des hydroperoxydes formés durant l'oxydation des acides gras insaturés et polyinsaturés (Combe et Rossignol, 2010). Ce qui explique que l'enrichissement de l'huile de soja avec les extraits phénoliques de feuilles d'olivier à une concentration de 25 ppm a ralenti les réactions d'oxydation de l'huile.

Grâce à la stabilité apportée par leur cycle aromatique, les polyphénols bloquent les radicaux lipidiques par transfert d'un proton H^+ sur ces derniers, ainsi, ils deviennent eux-mêmes porteurs d'un radical, mais contrairement au radicaux lipidiques, qui deviennent peu actifs, ce qui diminue la propagation (Cuvelier et Maillard, 2012).

L'huile de soja non enrichie a marqué des changements remarquables, surtout en termes de composés polaires issus de l'oxydation des acides gras de l'huile, qui sont présents dès la 1^{ère} friture et qui atteignent une valeur de 10,4% à la 10^{ème} friture avec une couleur qui tend vers le jaune orangé et un aspect trouble. Ces modifications indiquent que le phénomène oxydatif est prononcé sans qu'il y ait un ralentissement comme précédemment mentionner en présence d'extrait phénoliques qui sont supposés ralentir les réactions de dégradation et de polymérisation de l'huile. Sachant que cette huile présente des tocophérols à une concentration de 11mg/100g, ces derniers n'ont pas été efficace pour ralentir le processus d'oxydation. En effet à des températures relativement élevées, les tocophérols ne sont pas des antioxydant primaire idéal (Deiana et *al.*, 2002; Rahmouini et *al.*, 2006).

D'après Combe et Rossignol. (2010), après un certain temps de chauffage, les acides gras insaturés de l'huile chauffée peuvent se polymériser, se couper ou se cycliser formant ainsi des polymères cycliques ou non cycliques. Les composés de la partie insaponifiable subissent aussi des dégradations ainsi que les tocophérols qui perdent un taux important de leur valeur initiale. Tous les produits formés à partir des polymérisations et des dégradations citées sont responsables du changement des caractères de l'huile (l'huile devient plus dense, plus visqueuse, plus colorée, plus trouble et émet des fumées et le gout se modifie).

CONCLUSION

La réalisation de cette présente étude était dans l'objectif d'estimer l'effet d'un enrichissement d'une huile alimentaire (soja raffinée), par des antioxydants naturels issus de feuilles d'olivier sauvage et cultivé sur la stabilité oxydative de cette huile.

Au cours de ce travail, il a été démontré que les polyphénols des feuilles d'olivier ont augmenté la résistance de l'huile de soja face à l'oxydation. Une optimisation du temps d'induction de 39,13 % a été obtenue par l'enrichissement avec 25ppm d'extrait de feuilles de l'oléastre.

Le dosage des polyphénols totaux des feuilles d'olivier (Oléastre et *Chemlal*) a révélé que les feuilles d'oléastre présentent 15% de plus de ces composés par rapport aux la feuilles de *Chemlal*, ce qui a été aussi observé après la quantification des composés phénoliques dans les huiles enrichies ou on a constaté les taux de : 56,79 mg EAG/100 g et 39,09 mg EAG/100 g pour les huiles enrichies avec 100ppm d'extrait de feuilles d'oléastre et *Chemlal* respectivement.

L'activité antiradicalaire des huiles contenant 25ppm d'extrait phénolique de feuilles de *Chemlal* et d'oléastre contre le radical DPPH a révélée les améliorations respectives de :75% et 74% par rapport a l'huile de soja non enrichie, ce qui est valable aussi pour les extraits méthanoliques de ces huiles dont on a enregistré des pourcentages d'inhibition élevés (93,2 %, 93,29 %) du radical DPPH contre seulement 4,03 % pour l'huile de soja non enrichie. Ces résultats sont confirmés par le pouvoir réducteur de ces extraits qui a augmenté de : 96,56% et 96,89% respectivement par rapport au non enrichi.

Toutes ces améliorations reflètent l'absence des composés polaires pendant les dix fritures réalisées avec les huiles enrichies à 25ppm d'extraits phénoliques des feuilles d'olivier, contrairement a l'huile non enrichie qui présentait 10,4% de composés polaires à la fin de 10^{ème} friture.

Malgré que les composés phénoliques des feuilles d'olivier étudiées aient apportés un plus pour la stabilité oxydative de l'huile de soja raffinée avec une certaine similarité, il est important de souligner que les polyphénols extraits des feuilles d'oléastre ont marqué un meilleur rendement en termes de teneur en composés phénoliques, pouvoir réducteur et aussi l'optimisation de durée d'utilisation d'un bain de friture. Alors que les composés phénoliques des feuilles de *Chemlal* ont exercé une meilleure activité contre le radical libre DPPH, ce qui

met en perspective l'importance de réaliser une analyse qualitative des extraits phénoliques issus des feuilles des deux variétés.

Dans la perspective d'enrichir et d'apporter plus de détails sur les résultats obtenus, il sera idéal de :

- Faire une analyse qualitative (HPLC) pour les extraits des feuilles de l'oléastre et celle de *Chemlal* pour déterminer la composition phénolique.
- Etudier d'autres activités biologiques de ces extraits (antimicrobienne, antifongique).
- Elargir l'échantillonnage d'olivier.
- Utiliser d'autres protocoles d'extraction des composés phénoliques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Alais, C., Linden, G. et Midlo, L. (2003).** Biochimie alimentaire. Ed: Dunod, 245 (5):51-71.
- Alcantara, J.M. et Rey, P.J. (2003).**Conflicting selection pressures on seed size: evolutionary ecology of fruit size in a bird-dispersed tree, *Olea europaea*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 1168–1176. 5.
- Almeck, K., ABOUBAKAR,D., Clergé, C. et Michel, P. (2008).**Evolution de quelques paramètres de qualité physico–chimique de l’huile de la pulpe des fruits de *Canarium schweinfurthii* Engl. Au cours du stockage. *Inr. J.Biol.Chem. Scic*, 2(3): 249-257.
- Andreadou, I., Iliodromitis,E.K., Mikros, E., Constantinou,M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L, Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A. et Kremastinos, D.T. (2006).**The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *Jr. Nut*, 136: 2213-9.
- Andricopoulos, N. K., Salta, F. N., Mylona, A., Chiou, A. et Boskou, G. (2007).** Oxydative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food .Sci. and Tech. Intl*, 13(6): 413-421.
- Antolovich, M., Bedgood, D. J. R., Bishop, A., Jardine, D., Prenzler, P. et Robards, K. (2004).** LC–MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Compounds. *J. Agr. Food Chem*, 52: 962–971.
- Ayerdi Gotor, A., Berger, M., Labalette F., Centis S., Dayde J. et Calmon A. (2007).** Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil from a multi-local study. In: Current Advances in the Biochemistry and Cell Biology of Plant Lipids. Proceedings of the 17th International Symposium on Plant Lipids. Edts : C. Benning and J. Ohlrogge, 248-252.

B

- Baiano, A., Terracone C., Viggiani I. et Del Nobile M.A. (2014):** Changes produced in extra-virgin olive oils from cv. Coratina during a prolonged storage treatment. *Czech. J. Food. Sci*, 32: 1–9.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., v Ortuno, A. et Del Rio, J.A . (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*, 68: 457-62.
- Bahloul, N., Boudhrioua, N, Kouhila, M. et Nabil Kechaou. (2007).** Effect Of Convective Solar Drying Of Olive Leaves On Colour, Total Phenols Content And Radical Scavenging Activity.

- Benhayoun, G. et Lazzeri, Y.** (2007). L'olivier en Méditerranée : du symbole à l'économie. *Editions L'Harmattan*. Paris, p137- PP17.
- Berk, Z.**, (1993). Les opération d'extraction d'huile de soja . In: "Technologie de production de farines alimentaires et de produits protéines issus du soja". Instituts de Tech. Israel". pp:27-55.
- Benzie, I.F.F. et Strain, J.J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Besnard, G., Baradat, P., Breton, C., Khadari, B. et Bervillé, A.** (2001).Olive domestication from structure of wild and cultivated populations using nuclear RAPDs and mitochondrial RFLPs. *Gen Sel E vol (33) (Suppl 1): S251-S268*.
- Binti, R M. Z.** (2006). Process design in degumming and bleaching of palm oil. *Centre of lipids engineering and applied research: 9-45*.
- Bouaziz, H., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M. et Sayadi, S.** (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidant from Chemlali olive leaves. *Food Chem*, 108: 253–262.
- Boudhioua, N., Ben Slimen, I., N. Bahloul, N et Kechaou, N.** (2008). Etude du séchage par infrarouge de feuilles d'olivier d'origine tunisienne. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger*,111 – 116.
- Boizot, N. et Charpentier,J.P.** (2006).Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de L'Inra*, pp: 79-82.
- Breton, C., Médail, F., Pinatel, C. et Bervillé, A.** (2006). De l'olivier à l'oléastre: origine et domestication de l'Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen. *Cahiers Agricultures*, 15(4): 329-336.
- Bronzini de Caraffa, V., Giannettini, J., Gambotti, C. et Maury, J.** (2002a).Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica*, 123:263–271.

C

- Cahuzac-Picaud, M.** (2010). Les huiles végétales, intérêt diététique et gastronomique. *Phytothérapie(8)*, pp. 113-117.
- Carrion, Y., Ntinou, M. et Badal, E.** (2010).Olea europaea L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacialand the Early–Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews*, 29 : 952–968.
- Chebaibi, A., Rhazi, F., Lahlou amine, I., Chahlaoui, A. et H. L' kassmi, H.** (2007).Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier (Olea europaea L.). *J. Sci*

«Ressources Naturelles et Antibiothérapie», 22 Juin 2007, Faculté des Sciences – Kenitra.

Chiou, A., Salta, F.F., Kalogeropoulos, N., Mylona, A., Ntalla, I. et Rikopoulos, N.K. (2007). Retention and Distribution of Polyphenols after Pan-Frying of French Fries in Oils Enriched with Olive Leaf Extract. *J. FOOD. SCI*, Vol (72): Nr. 8.

Chiou, A., Kalogeropoulos, N., Salta, F.N., Efstathiou, P. et Andrikopoulos, N.K. (2009). Pan-frying of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. *LWT - Food Science and Technology* 42, 1090–1097.

Chira, k., Suh, J.H., Saucier, C., P.-L. (2008). Teissédre. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75–82.

Choe, E. And Min,D.B. (2007). Chemistry of deep-fat frying Oils. *J. food. Sci.* Vol (72), Issue 5, 77–86.

Conseil Oléicole International. (2006). *L'olivier*, p.1-2.

Combe, N. et Rossignol-Castera, N. (2010). Vegetable oils and frying. *Cahiers de nutrition et diététique*, 45: S44-S51.

Cossut, J., Defrenne, B., Desmedt, C., Ferroul, S., Garnet, S., Roelstraete, L., Vanuxeem, M. et Vidal, D. (2002). Les Corps Gras: Entre Tradition et Modernité. Gestion de la Qualité Nutritionnelle et Marketing des Produits Alimentaires. pp: 2 1-64.

Cuvelier, M.E. et Maillard, M.N. (2012).Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *OCL*; 19(2) : 125-132. doi : 10.1684/ocl.2012.0440.

D

Daferera, D.J., Ziogas, B.N, Polissiou, M.G. et Agric,J. (2000).Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. *Food. Chem*,48: 2576-2581.

Denis, J. (1992) .Raffinage des corps gras. In: "*Manuel des corps gras* ".Tome 2.Ed. Tech et Doc, Lavoisier: Paris ,1992.Isbn 2-8520662-(9):1571-1578.

Deiana, M., Rosa, A., Cao, C. F., Pirisi, F. P., Bendini, G. et Dessi, M. A. (2002). Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: importance of α -tocopherol concentration. *J. Agri and Food Chem*, 50: 4342-4346.

Dobarganes, C. (1998). Formation and analysis of high molecular-weight compounds in frying fats and oils. *nOCL*, Vol (5), n°1, p. 41-47.

Dayton, C., Christopher, L.G. et Flavio, G (Manteno, IL,US). (2008). Enzyme Degumming Utilizing a Mixture of PLA Phospholipases. pp:4_26.

ƒ

Farhoosh, R. (2007). The Effect of Operational Parameters of the Rancimat Method on the Determination of the Oxidative Stability Measures and Shelf-Life Prediction of Soybean Oil. *J. American. Oil. Chem. Soc.*, 84: 205-209.

Farhoosh, R., Einafshar, S. et Sharayei, P. (2009). The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. *Food. Chem.*, 115:933–938.

Frankel, EN. (2007) .Antioxidants in food and biology. *Dundee : The Oily Press LTD.*

Favati, F., Caporale, G. et Bertuccioli, M. (1994). Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil. *Grasas y Aceites*, 45: 68-70.

ƒ

Gaussorgues, R. (2009). L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique ? *Revue française d'allergologie*, 49 : 2–6.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P. et Amiot, J.M. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agr Food. Chem.*, 53: 1370-1373

Ghedira, K. (2008). *L'olivier. Phytothérapie* .6: 83–89.

Graille, J. (2003). Lipides et corps gras alimentaires. Collection Sciences&Techniques agroalimentaires, Ed. Tech & Doc, Paris : Lavoisier.

Guo, L., Xie, M. Y., Yan, A. P., Wan, Y. Q., et Wu, Y. M. (2006). Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386(6): 1881-1887.

ƒ

Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, S., El Gazzah, M. et Bervillé, A. (2010). Genetic Relationships between Cultivated and Wild Olive Trees (*Olea Europaea* L. Var. *Europaea* and Var. *Sylvestris*) Based on Nuclear and Chloroplast SSR Markers. *Nat. Res.* 1: 95-103.

Hayes, J.A., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M. N. et Kerry, J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food. Chem.*, 126: 948–955.



Japon-Lujan, R., Janeiro, P. et Luque de Castro, M.D. (2008). Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasound-assisted approach. *J. Agr. Food Chem*, 56: 7231–7235.

Jiang, L., Yamaguchi, T., Takamura, H. et Matoba, T. (2005). Characteristics of Shodo Island Olive Oils in Japan: Fatty Acid Composition and Antioxidative Compounds. *Food sci and tech rese*, 11(3): 254-260.

Judde, A. (2004). Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? *OCL, VOL* (11) N° 6:414-418.



Khan, M.Y., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A., Kumar, V. (2007) .*Olea europaea*. *Phyto-Pharmacol Review*, 1(1): 114-118.

Khayyal, M.T., El-Ghazaly, M.A., Abdallah, D.M, Okpanyi, S.N., et Kreuter, M.H. (2002) .Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME Hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*, 52(11): 797-802.



Läubli, M.W. et Bruttel P.A. (1986). Determination Of The Oxydative Stability Of Fats And Oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 63(6): 792-795.

Lecerf, J.-M. (2011). Vegetable oils: Particularities and usefulness. *Médecine des maladies Métaboliques*, 5(3): pp. 257-262.

Lee, H.O., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, B.H., Son, J.Y., Park, C.S., Shetty, K. et Kim,C.Y. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, 100:6107–6113.

Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F. et Di Giusto, F. (2004) .Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92: 343–351.

m

- Malheiro, R., Casal, S., Lamas, H., Bento, A et Pereira, A.J.** (2012). Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating?. *Food Research. Inter* 48-148–154.
- Marc, F., Davin, A., Delgène-Brenbrahim, L., Ferrand, C, Baccaunaud, M. et Fritsch, P.** (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel d'antioxydant dans les aliments. *Médecine/sciences*, 20: 458-463.
- Martin-Garcia, A.I., Moumen, A., Yanez Ruiz, D.R. et Molina, A.E.** (2003). *Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. Animal. Feed Sci. Techn.* Vol (107), p. 61-74.
- Massy, Z., Brazier, M., Housieaux, E., Kamel, S. et Wattel, A.** (2008). Le Cholestérol. *Le Moniteur des pharmacies*(2747).
- Micol, V., Caturla, N., Perez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., Estepa, A.** (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res*, 66(2-3): 129-36.
- Molyneux, P.** (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH^o) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin ; Journal of Sciences and Technologies*, 26 (2): 211-219.
- Mulas, M. et Deidda, P.** (1998) .Domestication of woody plants from Mediterranean maquis to promote crops for mountain lands. *Acta*, 457: 295–301.
- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D. P., et Kefalas, P.** (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. and Bioanal. Chem*, 392(5): 977-985.

n

- Nefzaoui, A.** (1991). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *Options méditerranéens*, 153-173.

o

- Ortega-Garcia, F. et Peragon, J.** (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphénol oxydase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *J. Sci. Food. Argic* ,89: 1565- 1573.

P

- Pagnol, J.** (1996) : *l'olivier*. Edition: Aulbanel .180p.
- Paiva-Martins, F., Correia, R., Felix, S., Ferreira, P. et Gorden, M.H.** (2007). Effects of Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4139–4143.
- Pereira, A-P., Ferreira, I., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P-B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. et Pereira, J-A.** (2007). Phenolic compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molécules*, vol(12), pp. 1153-1162.
- Pereira-Caro, G., Madrona, A., Bravo, L., Espartero, J.L., Alcudia, F., Cert, A. et Mateos, R.** (2009). Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chem*, 115: 86-91.
- Pouzet, A.** (1992). Sources et monographies des principaux corps gras. *In Manuel des corps gras*. Volume (1). Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Pp. 131-136.

R

- Rahmouini, K., Bouhafa, H., Labidi A., Nafti, A. et Hamdi, S.** (2006). Oxydation de l'huile d'olive : relation entre l' α -tocophérol et l'indice de peroxyde. *Olivae*, 106: 24-31.
- Ramadan, M.F. et Moersel, J.T.** (2006). *Screening* of the antiradical action of vegetable oils. *J. Food. Compo and Anal*, 19: 838.
- Rotondi, A., Magli, M., Ricciolini, C. et Baldoni, L.** (2003). Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica*, 132: 129–137.
- Rubio de Casas, R., Balaguer, L., Manrique, E., Perez-Corona, M.E. et Vargas, P.** (2002). On the historical presence of the wild olive *Olea europaea* L. var. *sylvestris* (Miller) Leh. In the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Anales Jardín. Botan*, 59: 342–344.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. et Lavee, S.** (2002). Biotransformation of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci Hort* 92: 147-76.

S

- Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G et Andrikopoulos, N.K.** (2007). Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and technology International*, 13:413-421.

- Sanchez de Medina, V., Priego-Capote, F. et M. D. Luque de Castro, M.D.** (2012). Characterization of Refined Edible Oils Enriched with Phenolic Extracts from Olive Leaves and Pomace. dx.doi.org/10.1021/jf301161v. *J. Agric. Food Chem*, 60, 5866–5873.
- Satoa, H., Genet, C, Strehle, A., Thomas C, Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J. et Saladin, R.** (2007). Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 362(3, 4): 793-8.
- Savarese, TM., Strohsnitter, W.C., Low, H.P., Liu, Q., Baik, I., Okulicz, W, Chelmow, D.P., Lagiou, P., Quesenberry, P.J., Noller, K.L. et Hsieh, C.C.** (2007) .Correlation of umbilical cord blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal origin of breast cancer hypothesis. *Breast Cancer Res*, 9: R29.
- Savourni, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef K., Balansard, G. et Agric, J.** (2001). Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *Food Chem*, 49. p 618.
- SDD: SARL développement durable.** (2009). Mesure des composés polaires. frottino. Mode d'emploi.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, AR., Simonic, M. et Knez, Z.** (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, 89:191–198.
- Szydłowska-Czerniak, A., Karlovits Gy., Dianoczki C., Recseg K. et Szlyk, E.** (2008). *Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed and olive oils.* *Journal of American Oil Chemist's Society*, 85:141–9.
- 7
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G et Boskou, D.** (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil part I. laboratory of food chemistry and technology, faculty of chemistry. Aristotle university, thessaloniki 54006. greece. food chem.
- v
- Villière, A. et Genot C.,** (2006). Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. INRA-France, 152-159.
- Visioli, F. et Galli, C.** (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Revue Food. Sci. Nut.* 2002, 42, pp 209-210.
- w
- Wainstein, J., Ganz, T., Boaz, M., Bar Dayan, Y., Dolev, E., Kerem, Z. et Madar, Z.** (2013). Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Nat. medic*, 01-477.

X

Xavier-Pagès-Xatart-Parès. (2012). Technologies des corps gras (huiles et graisses végétales). *Techn. l'Ingénie* . F 6 070 – 10.

Xiang, Q., Gao, Y., & Xu, Y.H. (2007). Capillary electrophoresis-amperometric determination of antioxidant propyl gallate and butylated hydroxyanisole in foods. *Anal. Sci*, 23(6): 713-717.

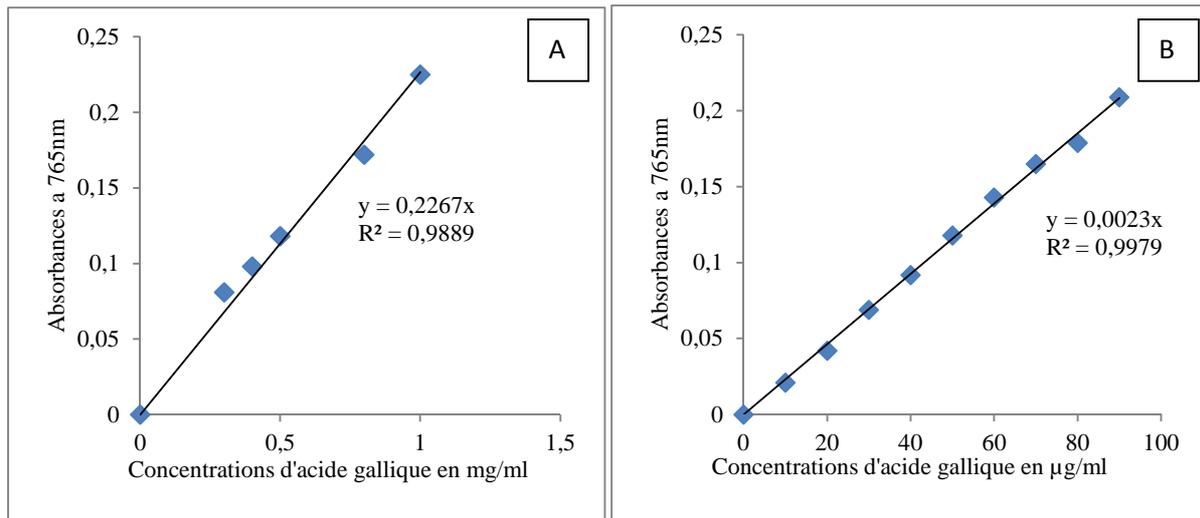


Figure 01 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux des extraits des feuilles d'olivier (A) et des huiles enrichies en polyphénols des de feuilles d'olivier (B).

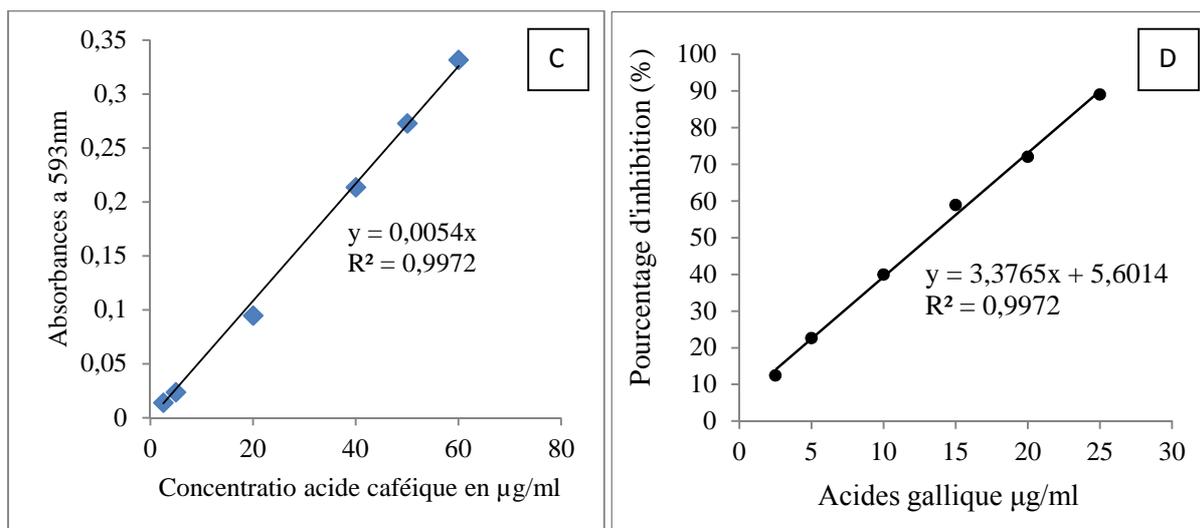


Figure 02: Courbes d'équivalence pour le pouvoir réducteur FRAP des extraits méthanoliques (C), activité antiradicalaire de l'huile contre le DPPH (D).

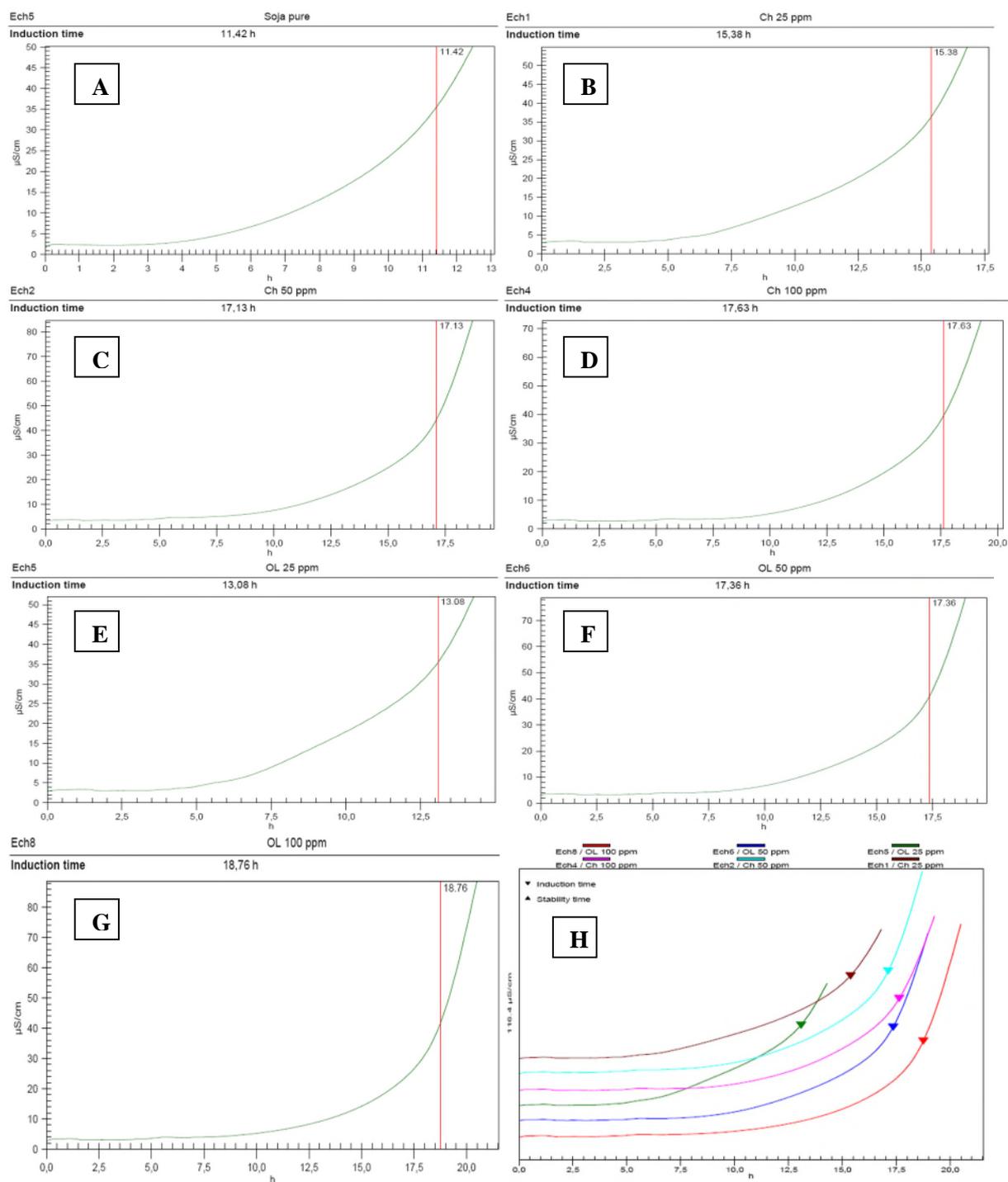


Figure 03 : Courbes de conductivité du Rancimat (98°C, 10 l/h) des échantillons d'huile de soja (pure (A), enrichie à l'extrait de feuilles de *Chemlal* 25ppm (B), 50ppm (C), 100ppm (D) et à l'extrait de feuilles d'oléastre 25ppm (E), 50ppm (F) et 100ppm (G) et une courbe comparative (H).

Tableau I : Matrice de corrélation

	Pouvoir réducteur FRAP	polyphénols totaux	Activité antiradicalaire de l'huile contre le DPPH	Activité antiradicalaire des extraits phénoliques des huiles contre le DPPH
Pouvoir réducteur FRAP	1,00			
Teneur en polyphénols totaux	0,99	1,00		
Activité antiradicalaire de l'huile contre le DPPH	0,99	1,00	1,00	
Activité antiradicalaire des extraits phénoliques des huiles contre le DPPH	0,99	1,00	1,00	1,00

Tableau II : Matrice de corrélation

	Stabilité oxydative	Polyphénols totaux
Stabilité oxydative	1,00	
Polyphénols totaux	0,99	1,00

Tableau III : Composition de l'huile de soja raffinée de Cevital en acides gras et en vitamine E

Profil en acides gras de l'huile de soja raffinée								Vitamine E (mg/100g)
C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	
0	0	10,59	4,13	23,53	53,22	7,66	0,1	11

Résumé

Ce travail est réalisé afin d'enrichir l'huile de soja raffinée avec les extraits phénoliques de feuilles d'olivier cultivé et sauvage (*Chemlal* et oléastre). Le dosage des polyphénols des feuilles a révélé des teneurs importantes en polyphénols totaux : 1047,19 mg EAG/100g pour *Chemlal* et 1424,59 mg EAG/100g pour l'oléastre. Ces extraits ont été utilisés à 3 concentrations : 25, 50 et 100ppm pour enrichir l'huile de soja raffinée. Les résultats ont montré que les huiles enrichies avec l'extrait phénolique de l'oléastre sont plus concentrées en terme de quantité en polyphénols par rapport à celles enrichies avec *Chemlal* et largement supérieures ($p<0,05$) par rapport à l'huile de soja raffinée (0,37mg EAG/100g). Le pouvoir antioxydant contre le radical libre DPPH° a révélé que les polyphénols ont une grande capacité antioxydante. Les huiles enrichies et leurs extraits correspondants présentent une meilleure activité antiradicalaire et réductrice (FRAP), les extraits d'huiles enrichies avec les feuilles de *Chemlal* et Oléastre à 25 ppm présentent un pourcentage d'inhibition du radical DPPH° de 93,29%, 93,20% et des EC50 de 1,04µg/ml, 1,56µg/ml et une activité réductrice de 11,91 mg EAC/100g et 10,77mg EAC/100g respectivement. L'huile de soja raffinée n'a noté que 4,03% d'inhibition du radical DPPH°. L'activité antiradicalaire des huiles enrichies a révélée des améliorations 75% et 74% pour l'huile enrichie avec les extraits phénoliques de feuilles d'olivier (*Chemlal* et oléastre) respectivement par rapport à l'huile de soja non enrichie. La stabilité des huiles est proportionnelle aux concentrations des extraits phénoliques, les temps d'induction des échantillons enrichis sont supérieurs à celui enregistré par l'huile de soja raffinée (11,42h). Le test de friture des huiles enrichies à 25ppm (Oléastre et *Chemlal*) a marqué l'absence de composés polaires pendant les dix fritures. Les résultats de cette étude montrent l'efficacité de l'ajout des polyphénols des feuilles d'olivier pour augmenter la qualité de l'huile de soja raffinée.

Mots clés: feuilles d'olivier, *Chemlal*, Oléastre, enrichissement, polyphénols, huile de soja, stabilité oxydative.

Abstract

This work was achieved to enrich refined soybean oil with phenolic extract of cultivated and wild olive leaves (*Chemlal* and oleastre). The leaves polyphenols assay showed significant levels of total polyphenols: 1047, 19mg EAG / 100g for *Chemlal* and 1424, 59mg EAG / 100g for oleastre. Three concentrations 25, 50 and 100 ppm of extract were used to enrich soybean oil. The result showed that the oil enriched with phenolic extract are more concentrated in teams of the compound of polyphenols compared with chemlal is considerably higher ($p<0,05$) compared to refined soybean oil (0,37mg EGA/100G). The antioxidant against free radical DPPH° revealed that polyphenols have great antioxidant capacity. The enriched oils and their corresponding extracts have the best antiradical and reducing activity (FRAP), the extracts oils enriched with *chemlal* leaves and oleastre to 25ppm presents inhibition percent of DPPH° radical of 93,29%, 93,20% and EC50 1.04µg/ml, 1.56µg/ml respectively. Refined soybean oil noted 4, 03% inhibition of DPPH° radical. The activity of enriched oils revealed amelioration of 75% and 73% for enriched oil with phenolic extracts of olive leaves (*chemlal* and oleastre) respectively compared to non enriched soybean oil. The stability of oils is proportional to the concentrations of phenolic extracts. Induction times of the samples are superior to that registered by soybean oil (11.42h). The test frying enriched oil to 25ppm (Oléastre and *Chemlal*) marked absence of polar compounds in the then fries. The results of this study show the efficacy of adding polyphenols olive leaves to increase the quality of refined soybean.

Keys words: olive leaves, oleastre, *Chemlal*, enrichment, polyphenols, soybean oil, oxidative stability.

خلاصة

إن هذا العمل قد تم إنجازه من أجل تدعيم زيت الصويا المكرر بمستخلصات المركبات الفينولية الموجودة في أوراق الزيتون (المغروس و البري). إن كميات المركبات الفينولية في هذه الأوراق قد بينت تركيزا هاما من هذه الفينولات: 1047,19 مغ م ح غ/100 غ (مليغرام مكافئ حمض الغليك) بالنسبة لأوراق المغروس صنف (أشمال) و 1424,59 مغ م ح غ/100 غ بالنسبة لأوراق الزيتون البري. هذه المستخلصات قد تم إستعمالها في ثلاثة تركيزات: 25, 50, 100 ج م م (جزء من المليون) لدعم زيت الصويا المكرر. أظهرت النتائج أن الزيوت المدعمة بواسطة المستخلص الفينولي لأوراق الزيتون البري مركزة أكثر من ناحية كمية المركبات الفينولية بمقارنة مع التي تم تدعيمها بواسطة المستخلص الفينولي لأوراق الزيتون المغروس (أشمال) و أكبر بكثير ($p<0,05$) مقارنة بزيت الصويا المكرر (0,37 مغ م ح غ/100 غ). القدرة المضادة للأكسدة ضد الجذر الحر (DPPH° Radical libre) قد أظهر أن المركبات الفينولية لها قدرة كبيرة ضد الأكسدة. الزيوت المدعمة و مستخلصاتها الموافقة هي أحسن حركة ضد الجذور (antiradicalaire) و إرجاعية (FRAP). مستخلص الزيوت المدعمة بواسطة أوراق الزيتون المغروس و البري بتركيز 25 ج م م تمثل نسبة تثبيط الجذر (DPPH°) يعادل 93,29% , 93,20% و EC50 يمثل 1,04, 1,56 مغ/مل (ميكروغرام/ المليلتر) و حركة إرجاعية ب 11,91 مغ م ح ك/100 غ و 10,77 مغ م ح ك/100 غ (مكافئ حمض الكافيك) بهذا الترتيب. زيت الصويا المكرر لم يسجل سوى 4,03% تثبيط جذر DPPH°. الحركة ضد الجذرية للزيوت المكررة بينت تحسينات ب 75% و 74% للزيت المدعم بواسطة المستخلصات الفينولية لأوراق الزيتون المغروس و البري بهذا التسلسل مقارنة بزيت الصويا غير المدعم. إستقرار الزيوت ترتبط بتركيزات المستخلصات الفينولية و أزمنة تحريض العينات المدعمة أكبر من المسجلة بالنسبة لزيت الصويا المكرر (11,42 سا). إن تجربة القلي للزيوت المدعمة بتركيز 25 ج م م (لأوراق الزيتون المغروس و البري) سجلت غياب مركبات قطبية في القلي 10 مرات. نتائج هذه التجارب تظهر النجاعة في إضافة المركبات الفينولية لأوراق الزيتون للزيادة في جودة زيت الصويا المكرر.

الكلمات المفتاحية: أوراق الزيتون, الزيتون المغروس, الزيتون البري, دعم, المركبات الفينولية, زيت الصويا, الإستقرار الأكسدي.