

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires  
Filière : Sciences Biologique  
Spécialité : science alimentaire  
Option : corps gras



Réf :.....

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

**MASTER**

***Thème***

**Enrichissement de l'huile d'olive par les mûres sauvages.**

Présenté par :  
**M<sup>elle</sup> AYACHI Wassila & M<sup>elle</sup> BOUFKHED Diana**  
Soutenu le : 24 JUIN 2017

**Devant le jury composé de :**

<b>Mr. BOUKHALFA. F</b>	<b>President</b>
<b>Mme. FELLA. S</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mr . MADANI. K</b>	<b>Encadreur</b>
<b>Mr. DAIRI. S</b>	<b>Co-promoteur</b>

**Année universitaire : 2016 / 2017**

# *Remerciement*

*Au terme de ce modeste travail, on tient à remercier tout d'abord le Bon Dieu le tout puissant, qui nous a donné la volonté et la patience pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur **Mr K.MADANI** de nous avoir donné l'honneur de nous encadrer ainsi que pour ses conseils précieux.*

*Nos sincères remerciements vont également à **Mr F.BOUKHALFA** pour avoir accepté d'honorer le jury  
**Mme S.FELLA** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous voudrions aussi remerciée vivement **Mr S.DAIRI** pour les conseils et les orientations qu'il nous a prodigué.*

*Nos remerciements les plus sincères à tout le personnel de laboratoire **BBBS**.*

*Nos familles, ainsi que toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents en témoignage de ma reconnaissance pour leur  
Patience, leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études, que  
Dieux leur donne longue vie et leur prête sante.*

*A mon très cher frère Idir.*

*A ma sœur adorée Kenza.*

*Ames grands-parents paternels et maternels*

*A toute ma famille ancles, tantes, cousins et cousines.*

*A mon adorable binôme et amie Wassila et sa famille.*

*A tous mes amis(e) de prés ou de loin.*

# *Diana*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents en témoignage de ma reconnaissance pour leur  
Patience, leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études, que*

*Dieux leur donne longue vie et leur prête sante.*

*A mon très cher frère.*

*A mes chères sœurs*

*Ames grands-parents paternels et maternels*

*A toute ma famille ancles, tantes, cousins et cousines.*

*A mon adorable binôme et amie Diana et sa famille.*

*A tous mes amis(e) de près ou de loin.*

# *Wassila*



## ***SOMMAIRE***

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Annexes**

**Introduction.....1**

## ***Partie bibliographique***

### ***Généralité sur l'huile d'olive***

I.1. Définition.....3

I.2. Classification d'huile d'olive.....3

I.3. Technologie d'extraction d'huile d'olive.....4

    a- Système discontinu d'extraction par presse.....4

    b- Système contenu avec centrifugation à deux phases .....4

    c- Système contenu avec centrifugation a trois phases.....4

I.4 Composition de l'huile d'olive .....4

I.4.1 Fractions saponifiables.....4

    4.1.1. Les triglycérides.....4

        4.1.2. Les acides gras.....5

I.4.2. Fraction insaponifiable .....5

I.4.2.1. Tocophérols.....5

I.4.2.2. Les hydrocarbures.....6

I.4.2.3. Les stérols.....6

I.4.2.4-Les composés phénolique .....	6
I.4.2.5 Les pigments.....	7
I.5.Les bienfaits de l’huile d’olive pour la santé .....	7
I.6. Etat de l’art sur l’amélioration de la qualité d’huile d’olive.....	8
I.7.Procédure d’enrichissement d’huile d’olive.....	8
I. 7.1. Infusion.....	8
I.7.2. Extraction enrichissement.....	8
I.7.3. Co-traitement.....	10
I.7.4. Enrichissement assistée par ultrasons.....	11
I.7.4.1.Principe d’extraction par ultrasons.....	11

### ***Généralité sur les mûres sauvages***

II.1.Description botanique de la mure sauvage.....	13
II.2.Classification .....	13
II.3. Composition nutritionnelle de la mûre sauvage .....	13
II.4.Composition biochimique des mures sauvages.....	15
II.4.1.composés phénoliques.....	15
• Acide phénolique .....	15
• Les flavonoïdes .....	15
• Anthocyanines .....	15
II.4.2 .Caroténoïdes.....	16
II.4.3.Composé aromatique .....	16
II.5.Les bienfaits des mûres sauvages.....	16

## ***Partie expérimentale***

### ***Matériel et méthodes***

I. 1. Matériel végétal .....	17
I. 2. Préparation et caractérisation du matériel végétal.....	17
I.2.1 Préparation du matériel végétal.....	17
I.2.2. caractérisation du matériel végétal.....	18
I.2.2.1. Détermination de taux d'humidité.....	18
I.2.2.2. Détermination de l'activité de l'eau (AW).....	18
I.2.2.3. Extraction des composés phénolique totaux.....	19
I.2.2.4. Dosage des composés phénolique totaux .....	19
I.2.2.5. Dosage des flavonoïdes .....	19
I.2.2.6. Dosage des anthocyanes.....	20
I.2.2.7. Détermination de la teneur en caroténoïdes et en chlorophylle.....	21
I.2.2.8. Tests d'activité antioxydant.....	22
1-Test DPPH .....	22
2-Pouvoir réducteur .....	22
I.4 .Optimisation d'enrichissement assisté par ultrasons.....	23
I.4.1. Etude préliminaire.....	23
I.4.2. Méthodologie de surface de réponse (MSR).....	24
I.5. Extraction conventionnelle .....	24
I.6. Caractérisation phyto-chimique de l'huile d'olive enrichie .....	25
I.6.1. L'extraction des polyphénols de l'huile.....	25
I.6.2. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des huiles.....	25

I.6.3. mesure des activités anti oxydantes.....	26
I.6.4. Détermination des acides gras libres.....	26
I.6.5. Détermination de l'indice de peroxyde .....	27
I.6.6. Détermination de l'absorbance spécifique en rayonnement UV.....	28
I.7. Stockage accéléré de l'huile d'olive : stabilité oxydative.....	28

## ***Résultats et discussions***

II.1. Taux d'humidité et activité de l'eau.....	29
II.2. Analyse phytochimique des mures sauvages.....	29
II.3. Activités anti oxydantes des mures sauvages.....	30
II.3.1. Activité Scavenger du radical DPPH.....	30
II.3.2. Pouvoir réducteur.....	31
II.3.3. Optimisation d'enrichissement assisté par ultrasons.....	32
II.3.3.1. Etude préliminaire.....	33
a- Effet de l'amplitude.....	33
b- Effet du temps.....	35
II.3.3.2. Optimisation des conditions d'enrichissement assisté par ultrasons.....	37
a. Le plan d'expérience.....	37
b. Validation du modèle.....	38
c. Analyse de la variance.....	39
d. Condition optimale.....	43
V.3.3.3. Comparaison entre macération conventionnelle et assistée par ultrasons.....	44
a. Comparaison de la composition phytochimique.....	44
b. Comparaison phytochimique entre macération conventionnelle et assistée par ultrasons.....	45
c. Test de stockage accéléré à l'étuve .....	46



## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Structure des tocophérols	06
<b>2</b>	Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol	07
<b>3</b>	Fréquences des ondes sonores et leurs applications	11
<b>4</b>	La déformation d'un milieu suite au passage d'une onde sonore	12
<b>5</b>	Explosion de bulles de cavitation et libération du matériel végétal	12
<b>6</b>	Quelques acides phénoliques présents dans la mure sauvage.	15
<b>7</b>	structure chimique de la cyanidine-3-O-glucoside	16
<b>8</b>	Etape de préparation du matériel végétal	18
<b>9</b>	L'extraction assistée par microonde des CPT	19
<b>10</b>	Protocole pour la détermination du pouvoir réducteur	23
<b>11</b>	Les méthodes d'enrichissement de l'huile d'olive	25
<b>12</b>	Test de neutralisation du radical DPPH	31
<b>13</b>	Test du pouvoir réducteur de l'extrait des mures sauvages	32
<b>14</b>	Effet de l'amplitude sur l'enrichissement d'huile d'olive en PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles	34
<b>15</b>	Effet de temps sur l'enrichissement de l'huile d'olive en PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles.	36
<b>16</b>	Comparaison entre les valeurs prédites des TPC et les valeurs expérimentales	39
<b>17</b>	Les surfaces de réponses pour les PT (a), flavonoïdes (b), caroténoïdes (c) et chlorophylles (d).	43

<b>18</b>	Test DPPH (a) et pouvoir réducteur (b) des huiles obtenus par la méthode conventionnelle et ultrasons	46
<b>19</b>	Test de chauffage accéléré des huiles d'olives témoins et enrichies.	48

***Liste des Abréviation***

**ABS** : Absorbance

**ABTS**: 2, 2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

**AGL** : Acide Gras Libre

**ANOVA** : Analyse Of Variance

**AW** : Activité de l'eau

**C.O.I** : Conseil Oléicole International

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-pecrylhydrazyle

**EAG** : Equivalent d'Acide Gallique

**HE** : Huile enrichie

**HT** : Huile témoin

**IP** : Indice de Peroxyde

**KI** : Iodure de Potassium

**LDL** : Low Density Lipoproteine

**Meq** : Mill equivalent

**MSR** : Méthodologie de Surface de Réponse

**OOL** : Dioléolinoléine

**OOO** : Trioléine

**POL** : Palmitooléolinoléine

**POO** : Dioléopalmitine

**TP** : Polyphénols Totaux

**UV** : Ultra Violet

**Liste des tableaux**

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Différents types d'huile d'olives	03
<b>II</b>	Composition en triglycérides de l'huile d'olive	04
<b>III</b>	Composition en acide gras par chromatographie en phase gazeuse	05
<b>IV</b>	Résumé des travaux récents sur l'effet d'enrichissement de l'huile d'olive	09
<b>V</b>	Composition moyenne des fruits des mures sauvages	14
<b>VI</b>	Les teneurs en pigment et en composés phénoliques dans la poudre des mûres sauvage	29
<b>VII</b>	Plan d'optimisation de l'enrichissement de l'huile d'olive par les mures sauvages	38
<b>VIII</b>	. Analyse de la variance (ANOVA) pour l'estimation de l'effet des variables temps amplitude sur l'enrichissement de l'huile d'olive en PT et flavonoïdes	40
<b>IX</b>	Analyse de la variance (ANOVA) pour l'estimation de l'effet des variables temps et amplitude sur l'enrichissement de l'huile d'olive en caroténoïdes et chlorophylles	42
<b>X</b>	. Conditions optimales d'enrichissement assisté par ultrasons de l'huile d'olive par les mures sauvages	44
<b>XI</b>	Comparaison entre la méthode conventionnelle et ultrasons	45

## Introduction

L'huile d'olive vierge est l'ingrédient le plus important du «régime méditerranéen» ([Šarolić et al., 2014](#)), est une huile végétale du fruit de l'olivier (*Olea europaea* L.) obtenu uniquement par des méthodes mécaniques qui conserve ses propriétés nutritionnelles et organoleptiques. Huile d'olive vierge est largement produit et a été utilisé depuis des temps anciens dans la région méditerranéenne, où il est apprécié pour ses propriétés nutritionnelles, son goût fin et son arôme en raison de sa teneur en composés volatils et non volatils essentiels [Peñalvo et al. \(2016\)](#). La consommation d'huile d'olive vierge a été associée à une réduction des maladies cardiovasculaires, des désordres neurologiques et à certains types de maladies cancéreuses. ([Servili, 2014](#) ; [Manna, C2002.](#)). Ces bienfaits ont été liés l'un ou l'autre à sa composition en acide gras. En effet, elle est largement insaturée et contient une petite partie d'acides gras essentiels. En plus de cette composition particulière en acides gras, l'huile d'olive est aussi riche en composés antioxydants minoritaires tels que les polyphénols. L'intérêt nutritionnel de ces composés phénoliques présente un réel intérêt de santé publique. ([veillet.201](#)).

La qualité de l'huile d'olive dépend de plusieurs facteurs tels que la maturation, la méthode d'extraction, le type de sol, les conditions climatiques, les variétés et les conditions de stockage. l'évaluation de la qualité de l'huile d'olive est liée à une série importante de paramètres physico-chimiques comprenant l'acidité, l'indice de peroxyde et l'évaluation sensorielle [Gharbi et al., \(2015\)](#). Ces dernières années, différents procédés ont été proposés pour l'amélioration de la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive, entre autres l'enrichissement endogène en améliorant les conditions du procédé lui-même, et il y a aussi l'enrichissement exogène par l'incorporation de matières végétales. Ce dernier a fait l'objet récemment de plusieurs travaux et qui est assisté par certaines nouvelles techniques pouvant accélérer le relargage des substances d'intérêt dans l'huile, à savoir les ultrasons.

Les mûres sauvages sont actuellement promues comme étant une source riche de composés phénoliques, composés d'intérêt à cause de leur activité antioxydante et leurs effets bénéfiques pour la santé humaine, comme la réduction du risque de cancer, de maladies cardiovasculaires et d'autres pathologies...ect [Segantini et al.\(2015\)](#). Les composés bioactifs alimentaires ont

attiré l'attention des consommateurs pour leurs propriétés anti oxydantes connues (Gharby et al.(2014).

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail dont l'objectif est l'étude de l'effet des antioxydants des mûres sauvages sur la qualité nutritionnelle et la stabilité thermique de l'huile d'olive vierge pendant le stockage.

Les différentes étapes suivies sont :

- Optimisation d'un procédé d'enrichissement assisté par ultrasons
- Améliorer la qualité nutritionnelle de l'huile d'olive
- Etude de l'effet des antioxydants des mûres sauvages sur la stabilité d'huile d'olive vierge à la chaleur.

# *Partie bibliographique*

## I.1. Définition

L'huile d'olive est une composante unique de régime méditerranéen (Tripoli et al., 2005 ;Covas et al ., 2009). Elle provient uniquement du fruit de l'olivier (*Olea europaea*) avec un procédé physique à l'exclusion des huiles obtenues par solvant ou par des procédés de ré estérification et de tout mélange avec des huiles d'autre nature (COI, 2015).

## I.2. Classification d'huile d'olive

Différents paramètres à savoir l'acidité, l'indice de peroxyde, l'absorbance dans l'UV l'huile et les caractéristiques organoleptiques caractérisent la qualité et distinguent différentes catégories (Kalua, C. M. 2007, E Katsoyannos 2015). Le Conseil Oléicole International (COI, 2015) a classé l'huile d'olive en quatre catégories reportés dans le tableau 1.

**Tableau I. Différents types d'huile d'olives (COI, 2015)**

Huile d'olive vierge	Huile d'olive vierge propre à la consommation en l'état	Huile d'olive vierge extra	L'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 0,8 gramme pour 100 gramme
		Huile d'olive vierge	L'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 2 gramme pour 100 gramme
		Huile vierge courante	l'acidité libre exprimée en acide oléique est en maximum de 3,3 gramme pour 100 gramme
	Huile d'olive vierge non propre à la consommation en l'état (lampante)		L'acidité libre exprimée en acide oléique est en supérieur de 3,3 gramme pour 100 gramme
Huile d'olive raffinée	Huile obtenue des huiles d'olive vierges par des techniques de raffinage qui n'entraînent pas de modifications de la structure glycéridique initiale. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 0,3 gramme pour 100 gramme.		
Huile d'olive	Est l'huile constituée par coupage d'huile d'olive raffinée et d'huile d'olive vierges propres à la consommation en l'état .son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 1 gramme pour 100gramme .		

### I.3. Technologie d'extraction d'huile d'olive

Le traitement des olives en vue de l'extraction de l'huile, se fait par des moyens purement mécaniques (par pression ou centrifugation). Il existe en général trois systèmes d'extraction de l'huile d'olive. (Salomone et al., 2015 ; Chimi .H , 2006).

**a. Système discontinu d'extraction par presse :** c'est un système qui utilise des presses hydraulique ou tout simplement métalliques à vis pour l'extraction de l'huile. Il permet d'obtenir une huile non piquante et riche en métabolites secondaires, notamment les poly phénols.

**b. système continu avec centrifugation à deux phases :** comme son nom l'indique, la séparation de l'huile implique une centrifugation, mais elle ne nécessite pas l'ajout d'eau pour la séparation des phases huileuse et solide contenant les grignons et les margines (un seul déchet généré appelé marginions).

**c. système continu avec centrifugation à trois phases :** ce qui le caractérise du deuxième, c'est qu'il génère deux sortes déchets, liquides (margines) et solides (grignons), et utilise de l'eau pour la séparation de l'huile.

### I.4. Composition de l'huile d'olive

**I.4.1. Fractions saponifiables :** Elle est constituée généralement de 98% à 99% de triglycérides, de 1% à 2% d'acides gras libres ainsi que de composés mineurs de nature glycéridique tels que les cires, les mono et di-glycérides et les phospholipides (Ran. J, 2014 Viola. P, 2009 )

**4.1.1. Les triglycérides :** Ce sont des esters d'acides gras et du glycérol. Les glycérides constituent le principal composant de huile d'olive, le triglycéride majoritaire d'huile d'olive est la trioléine (OOO) . (Abaza. L et al,2002., Rouas, S., 2016 ).

**Tableau II.** Composition en triglycérides de l'huile d'olive Azadmard-Damirchi, S. (2007).

	Nature	Les glycérides(%)
O : Acide oléique	OOO	40-59
P : Acide palmitique	POO	12-20
L : Acide linoléique	OOL	12.5-20
S : Acide stéarique	POL	5.5-7
	SOO	3-7

**4.1.2 Les acides gras :** Selon [Benlemlih et Ghanam \(2012\)](#), les acides gras présents dans l'huile d'olive sont : l'acide palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique, linoléique et myristique. Les heptadécanoïques et ecosanoïques se trouvent en quantités infimes.

**Tableau III.** Composition en acide gras par chromatographie en phase gazeuse ([COI, 2015](#)).

Acide gras	Symboles	Norme en %(codex alimentaires)
Acide myristique	C14 :0	≤0,03
Acide palmitique	C 16 :0	7,5-20
Acide heptadécanoïque	C17 :0	≤0 ,3
acide palmitoléique	C16 :1n-7	0,3-3,5
Acide heptadécénoïque	C17 :1	≤0,3
Acide stéarique	C18 :0	0, 5-5
Acide oléique	C18 :1n-9	55-8 3
Acide linoléique	C18 :2n-6	2,5-21
Acide α-linolénique	C18 :3n-3	≤1
Acide arachidonique	C20 :0	≤0,6
Acide gadoléique	C20 :1n-9	≤0 ,4
Acide béhénique	C22 :0	≤0,2
acide lignocérique	C24 :0	≤0,2

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

#### **I.4.2. Fractions insaponifiables**

Cette fraction est dénommée également composants mineurs (0,4-1%). Ces composants en faible quantité sont majoritairement responsables de la qualité gustative de huile, notamment au niveau de l'amertume, de l'arrière-goût poivré et /ou pimenté, et de sa stabilité ([Šarolić et al., 2014](#)) on distingue :

**I.4.2.1. Tocophérols :** Les tocophérols sont reconnus pour leur double action bénéfique (**Figure 1**). En effet, ils ont tout d'abord l'atout d'être une vitamine liposoluble

(vitamine E) et ils ont également une forte activité antioxydant la teneur totale en tocophérols dans les huiles d'olives est très variable. (Boskou D. *et al.*, 2006., Haddam, M.2014).

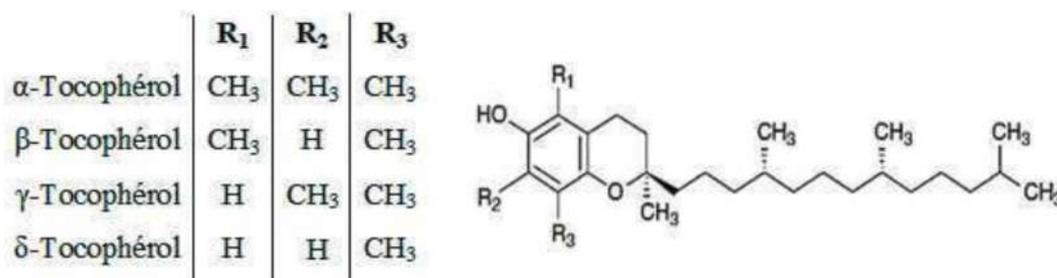
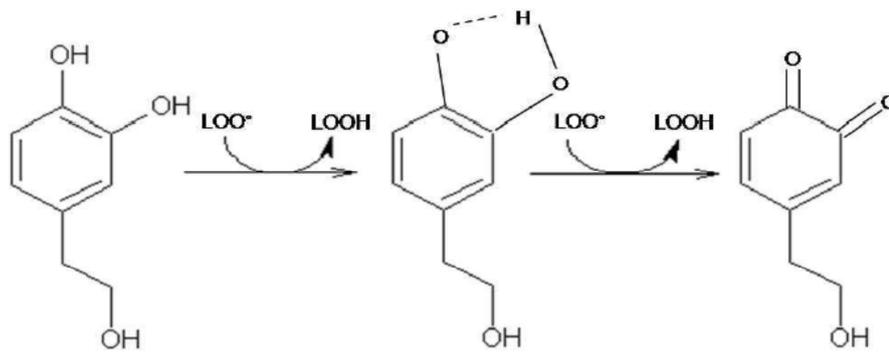


Figure 1. Structure des tocophérols (Chanforan, 2010).

**I.4.2.2. Les hydrocarbures :** Ce sont quantitativement les principaux composants de la fraction insaponifiable. Le composant majeur est le squalène qui constitue 30 à 50 % de cette fraction. Le squalène est un précurseur métabolique du cholestérol et d'autres stérols (Samaniego-Sanchez *et al*, 2010).

**I.4.2.3. Les stérols :** Ils représentent environ 15% de la fraction insaponifiable, et leur quantité totale varie suivant la variété des olives et leur degré de maturité, soit de 113 à 265 mg/100 g (Gutierrez *et al*, 1999) Dans l'huile d'olive, le principal stérol est le β-sitostérol, représentant jusqu'à 90-95% des stérols totaux, et qui a une action anti carcinogène (Awad *et al*, 1998 ; Awad *et al*, 2000). D'autres phytostérols sont également présents tels que le campestérol et le stigmastérol (Viola, 1997).

**I.4.2.4. Les composés phénoliques :** L'une des caractéristiques les plus importantes de l'huile d'olive est sa richesse en composés phénoliques, en particulier l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine possédant des propriétés anti oxydantes. Les quantités présentes dans des huiles d'olive dépendent du degré de maturité des olives (Talhoui *et al.*, 2016). Ces composés phénoliques contribuent fortement au goût piquant, à l'astringence et à l'amertume des huiles (Haddam *et al*, 2014).



**Figure 2.** Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol (Tripoli, 2005).

**I.4-2-5. Les pigments :** Les principaux pigments rencontrés dans l'huile d'olive sont :

- **Les chlorophylles :** Leur composition relative dans l'huile d'olive dérive

À partir de la composition pigmentaire initiale des olives et de toutes les transformations chimiques.

Les chlorophylles représentent un groupe de tétrapyrroles à magnésium responsables de la nuance verdâtre de l'huile d'olive. (Lazzerini et al., 2017).

- **Les caroténoïdes :** Les caroténoïdes sont des composés liposolubles associés aux à la fraction lipidique des organismes ou des matrices. Son taux dans l'huile d'olive est très variable, allant de 6,22 à 1,15 mg/kg (Manai-Djebali et al., 2012). Leur concentration dans l'huile d'olive est liée à la variété d'olive (Manai-Djebali et al., 2012), au degré de maturité du fruit et au procédé d'extraction de l'huile (Inarejos-García et al., 2011). Le caroténoïde le plus abondant de l'huile d'olive est le  $\beta$ -carotène (Provitamine A).

## I.5. Les bienfaits de l'huile d'olive pour la santé

De nombreuses recherches récentes ont confirmé les bienfaits de l'huile d'olive pour la santé, de par sa richesse en acides gras insaturés, principalement l'acide oléique, en antioxydants (polyphénols), en vitamine E et autres constituants. L'huile d'olive diminue le risque des maladies cardiovasculaires, le taux du mauvais cholestérol (LDL) dans le sang et protège contre la formation de cellules cancérogènes. (Benlemlih et Ghanam, 2012 ; Ghedira, 2008). Elle possède également des antioxydants qui s'opposent à l'oxydation des lipoprotéines LDL,

une des premières étapes importantes dans le développement de l'athérosclérose, et contribue à prévenir la perte de mémoire et le déclin des fonctions intellectuelles chez les personnes âgées sains avec faible incidence d'infarctus du myocarde dans les pays où l'huile d'olive est la principale source de matière grasse (Ghedira,2008).

### **I.6. Etat de l'art sur l'amélioration de la qualité d'huile d'olive**

L'apport journalier de composés phénoliques à partir d'huile d'olive vierge est variable due à l'influence de multiples facteurs agronomiques et technologiques. Afin d'assurer un apport optimal en polyphénols par l'alimentation habituelle est la production de l'huile d'olive enrichie avec des polyphénols bioactifs bien connus, différentes sources de substances bioactives naturelles peuvent être potentiellement utilisées pour enrichir l'huile d'olive principalement des feuilles d'olivier et des grignons d'olives, ou d'autres composés de plantes et de légumes, principalement des herbes et les épices (Patricia Reboledo-Rodríguez et al., 2017). Le développement de ces huiles d'olive fonctionnelles peut aider à prévenir les maladies chroniques et améliorer la qualité de vie de nombreux consommateurs réduisant les coûts des soins de santé (Rosa-M. Valls et al . 2017).

### **I.7. Procédure d'enrichissement d'huile d'olive**

Il existe différentes procédures d'enrichissement d'huile d'olive (Tableau IV) et on peut distinguer :

- Infusion
- Enrichissement par extraction
- Co-traitement
- Enrichissement assistée par ultrasons

**I.7.1. Infusion :** Également connue sous le nom de macération et d'extraction solide- liquide, et qui consiste à faire dissoudre la matière végétale solide dans la phase huileuse. Ce type d'enrichissement requiert beaucoup du temps pour permettre l'extraction des composés d'intérêt, à la fois saveurs et / ou bioactifs dans la phase huileuse dépendamment de la solubilité de chaque composé (Caponio, F et al., 2016).

**I.7.2. Extraction et enrichissement :** Le protocole d'enrichissement des huiles comestibles par extraction implique deux étapes principales : l'extraction des composés cibles

à partir de la matière première, par exemple les herbes ou feuilles d'olivier. Ensuite, l'enrichissement de l'huile avec l'extrait obtenu (Delgado-Adamez, J. et al., 2014). Ce type de procédure nécessite la dissolution de l'extrait dans un solvant généralement l'éthanol avant son incorporation dans l'huile.

**Tableau IV.** Résumé des travaux récents sur l'effet d'enrichissement de l'huile d'olive

Type d'huile d'olive	Procédure appliquée	Matière brute	Caractéristique ajouté	références
Huile d'olive vierge	Liquide-liquide Extraction ultrason	Olive cake Thyme ( <i>thymus zygis</i> )	Teneur plus élevé en flavonoïdes, activité antioxydant et la stabilité oxydative. Diminution de l'indice amer Améliorer l'acceptation du consommateur improuve.	Rubio et al. (2012)
Huile d'olive raffinée	Extraction liquide-liquide	Feuilles et grignon d'olive	Amélioration de la composition en composés phénoliques	Sanchez de et (2011)
Huile d'olive extra vierge	Macération assisté par ultrason	Feuilles d'olive	Radical de balayage à plus grande capacité. Une stabilité amélioré e à la dégradation thermique. Concentration plus élevé de l'oleuropein et a-tocophérol.	Achat al. (2012)
Huile d'olive	Macération assisté par ultrason	Basilique	Amélioration de la qualité sensorielle	Veillet al. (2010)

Huile d'olive raffinée	Extraction liquide-liquide	Feuilles d'olive	Amélioration de la qualité oxydative et le contenu en stérol	Bouaziz et al. (2008)
Huile d'olive	Trans-esterification à base de lipase liquide-liquide	Huile de graines de lin	Teneur plus élevée en acide gras polyinsaturé alpha linolenique (omega-3)	Rupani et al.(2014)
Huile d'olive	Liquide-liquide	- <i>Thymbra capitata</i>	Améliore la stabilité oxydative	Miguel et al. (2014)
Huile d'olive vierge	Liquide-liquide Et macro onde	Myrte <i>Myrtus communis</i>	Améliore la composition antioxydant et la stabilité à l'oxydation	Dairi et al. (2015)
Huile d'olive vierge	Agitation vertical	Feuilles d'origan	Améliorer l'enrichissement en vert de l'huile d'olive vierge par l'origan. Teneur plus élevée en antioxydant naturel. Augmenté la capacité antioxydant	Peñalvo et al. (2016)
Huile d'olive vierge	Macération assisté par agitation	épinard ( <i>Spinacia oleracea</i> )	Enrichi par la Zia-xanthine de lutéine, amélioré ses propriétés sanitaires et a conservé sa qualité organoleptique appréciée,	de Valle-Prieto et al. (2017)

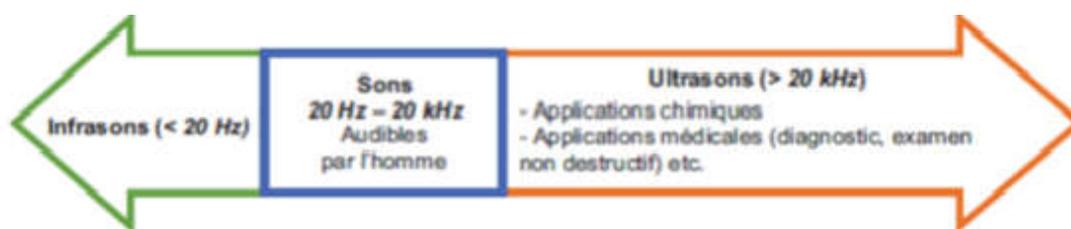
**I.7.3. Co-traitement :** Consiste à l'addition d'herbes ou d'autres matières végétales à la pâte d'olive avant l'étape de malaxage ; et cela peut être favorisé par l'utilisation des ultrasons avant le malaxage de la pâte d'olive (Clodoveo et al., 2016). Dans un récent travail, il a été montré que le refroidissement de la pâte d'olive avant l'étape de malaxage améliore la qualité de l'huile d'olive (Veneziani, et al., 2017).

**I.7.4. Enrichissement assistée par ultrasons :** L'application de micro-ondes et plus fréquemment des ultrasons à la diffusion des composés fonctionnels dans l'huile d'olive en raison de l'effet mécanique de la cavitation, accélère l'extraction de composés aromatiques ou bioactifs dans l'huile d'olive. Le temps de traitement est donc réduit avec un rendement meilleur (Achat et al., 2012 ; Veillet et al., (2010).

Ces dernières années différentes études utilisent l'huile d'olive comme un solvant d'extraction des substances d'intérêt à partir de différents matrices végétales et cette extraction est favorisée et accélérée par l'application des ultrasons (Peñalvo et al., 2016 ; Li et al., 2013, Achat et al., 2012).

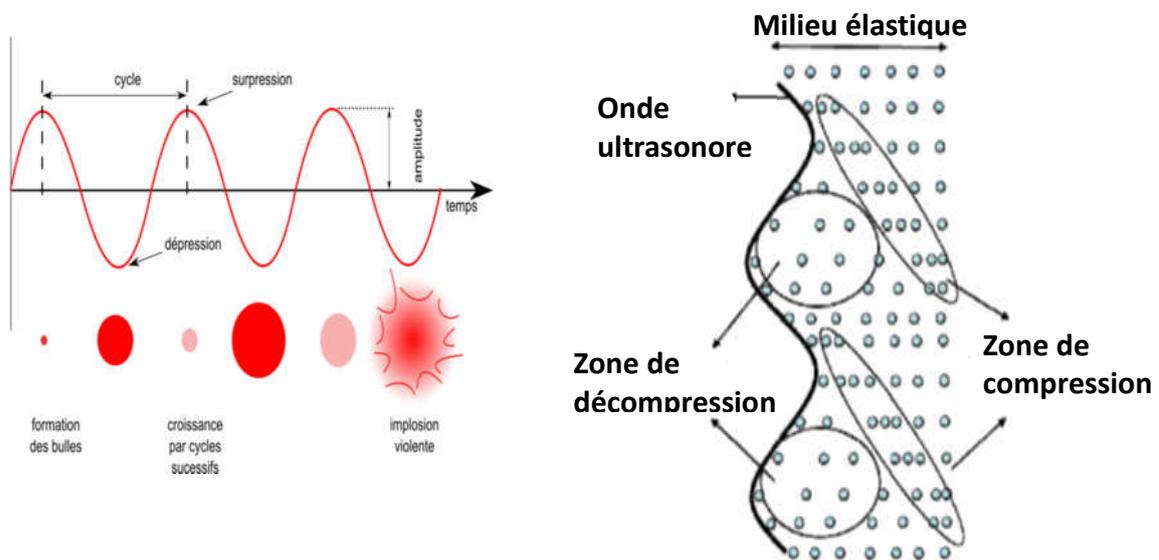
#### I.7.4.1. Principe d'extraction par ultrasons

a. **Définition des ultrasons :** Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui sont capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz) (Figure 3). Les ultrasons peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leurs fréquences : ultrasons de diagnostic et de puissance.



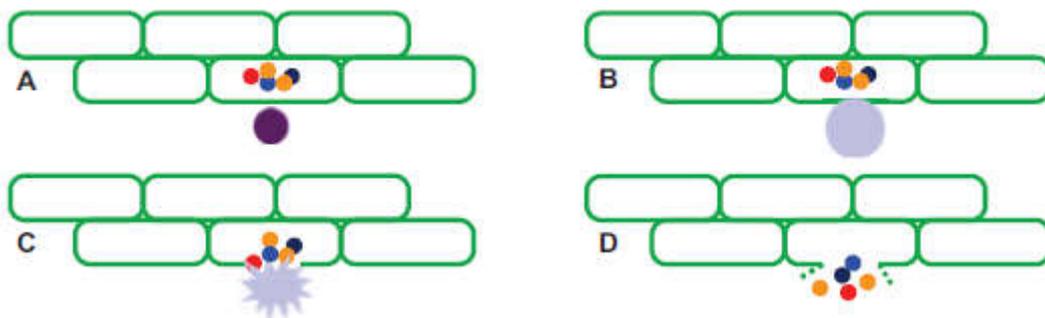
**Figure 3.** Fréquences des ondes sonores et leurs applications (Cristina-Gabriela Grigoras, 2013).

b. **Extraction par ultrasons et phénomène de cavitation :** Lorsque des ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation de zones de compression et de dépression (Figure 4), et cela crée une pression acoustique (Pa) dans le milieu. Ces variations de pression entre phases de compression et de raréfaction impliquent des mouvements moléculaires induisant des distensions et des rapprochements entre des groupes de molécules. Lors de cycles de raréfaction la distance  $d$  augmente (Figure 4).



**Figure 4.** La déformation d'un milieu suite au passage d'une onde sonore

Chaque milieu liquide à une distance moléculaire critique au-dessus de ce seuil caractéristique, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation contenant de la vapeur du liquide et des gaz dissous apparaissent et l'implosion d'une bulle de cavitation génère des valeurs locales de température et de pression très élevées (milliers de degrés Kelvin et milliers de kPa). Et cela pourrait détruire les parois de cellules de la matrice végétale et leur contenu peut être libéré dans le milieu environnant (Veillet, 2010 ; Cristina-Gabriela GRIGORAŞ, 2012).



**Figure 5.** Explosion de bulles de cavitation et libération du matériel végétal ( GRIGORAŞ, 2012).

*A. génération de bulles de cavitation; B. explosion de bulles; C. création de micro jet; D. libération de solutés*

## II.1. Description botanique de la mûre sauvage (*Rubus fruticosus*)

La Ronce commune ou mûre sauvage mesure en moyenne 4 m de hauteur. Il s'agit d'une plante vivace, semi caduques et épineuse. Les feuilles sont vertes portant trois lobes, garnies de poils épars sur les deux faces. Elles comportent cinq folioles souvent plissées et finement dentées. La fleur se trouve construite selon le schéma propre à cette famille : cinq pétales roses ou presque blanches, cinq sépales verts sur le dos, étalées et concaves et de nombreuses étamines plus courtes que les styles ou les égalant à peine. Les fruits sont des grappes de baies noires (Bruzese *et al.*, 2000; Lim, 2012).

## II.2. Classification

**Règne :** *Plantae*  
**Sous règne :** *Tracheobionta*  
**Super division :** *Spermatophyta*  
**Division :** *Magnoliophyta*  
**Classe :** *Magnoliopsida*  
**Sous classe :** *Rosidae*  
**Ordre :** *Rosales*  
**Famille :** *Rosaceae*  
**Genre :** *Rubus*  
**Espèce :** *Rubus fruticosus* L.

## Dénomination :

D'après Lim (2012), plusieurs noms vernaculaires sont attribués à cette plante :

Nom botanique	<i>Rubus fruticosus</i> L
Nom français	Mûre sauvage
Nom anglais	Blackberry
Nom arabe	التوت البري
Nom kabyle	Thiwzey

### II.3. Composition nutritionnelle de la mûre sauvage

Les fruits de la mûre présente une composition variée et riche résumé dans le tableau. Ci-dessous.

**Tableau V.** Composition moyenne des fruits des mures sauvages (USDA, 2016).

Nutriment	unité	Valeur pour 100 grammes
L'eau	g	88.15
Energie	kcal	43
Protéine	g	1.39
<b>Lipides</b>	g	0.49
Acides gras saturés	g	0.014
Acides gras poly-insaturés	g	0.280
Acides gras mono-insaturés	g	0.047
<b>Glucides</b>	g	9.61
Fibres alimentaires	g	5.3
sucres	g	4.88
<b>Minéraux</b>		
Calcium, Ca	mg	29
Fer, Fe	mg	0.62
Magnesium, Mg	mg	20
Phosphor, P	mg	22
Potassium, K	mg	162
Sodium, Na	mg	1
Zinc, Zn	mg	0.53
<b>Vitamines</b>		
Vitamine C (acide ascorbique)	mg	21.0
Vitamine A	IU	214
VitamineE (alpha-tocophérol)	Mg	1.17

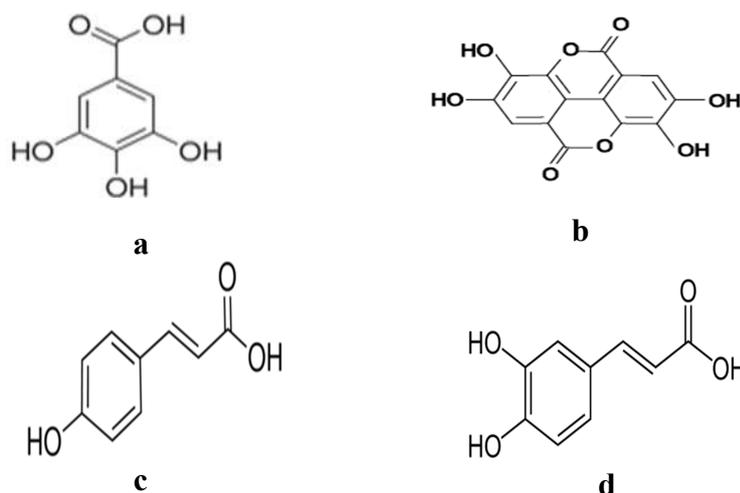
La composition chimique de la mûre sauvage dépend de la variété des fruits, des pratiques agronomiques utilisées dans la culture, le stade de la collecte des fruits, et des conditions géologiques et climatiques de la région d'où les fruits sont collectés (Zia-Ul-Haq et al., 2014).

En plus des composés cités dans le tableau ci-dessus, les fruits de la mûre contiennent d'autres substances bioactives.

## II.4. Composition biochimique des mûres sauvages

### II.4.1. composés phénoliques

- **Acide phénolique** : principalement l'acide ellagique, l'acide gallique, l'acide caféique et l'acide p-coumarique.



**Figure 6.** Quelques acides phénoliques présents dans la mûre sauvage.

**a** : acide gallique, **b** : acide ellagique, **c** : acide caféique, **d** : acide p-coumarique

- **Les flavonoïdes** : sont des métabolites secondaires des plantes, ils présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6). Les principaux flavonoïdes identifiés dans la mûre sont : La catéchine, l'epicatéchine, la quercétine et le kaempferol (Sellappan S et al., 2002).

- **Anthocyanines** : Anthocyanines sont un groupe de dérivés des flavonoïdes et de pigment naturel solubles dans l'eau, et qui donnent de la couleur à la fleur et le fruit .La teneur totale en anthocyanines peut être 176 mg/100g de mûre. L'anthocyane primaire détecté

dans la mûre est : cyanidine-3-O-glucoside. D'autres anthocyanines sont également détectées dans le fruit comme cyanidin-3-O-dioxaloylglucoside et cyanidin-3-O-(600-malonyl)-glucoside (Zia-Ul-Haq et al., 2014).

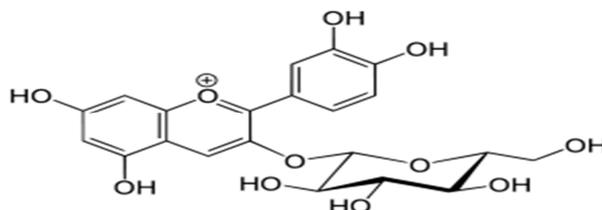


Figure 7. La structure chimique de la cyanidine-3-O-glucoside

#### II.4.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont un groupe important de pigments naturels liposolubles, ils possèdent diverses propriétés stimulant l'immunité et les effets favorisant la santé.

Les caroténoïdes présentés dans les mûres sauvages sont : la lutéine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, le lycopène, la zéaxanthine, le  $\beta$ -carotène et l' $\alpha$ -carotène . (Marinova et al., 2007)

#### II.4.3. Composé aromatiques

Quelques composés aromatiques importants ont été isolés des fruits de *Rubus fruticosus* à savoir les furanes, 5-hydroxyméthylfurfural et 2,3-dihydro-3 ; 5-dihydroxy-6-méthyl-4H-pyran-4-one. L'arôme du fruit de mûre est dû à la présence de 5-hydroxyméthylfurfural (Turemis, N et al., 2003).

#### II.5. Les bienfaits des mûres sauvages

Les mûres sauvages, appartiennent aux meilleures sources alimentaires de composés bioactifs. Elles ont un goût et une saveur délicieuse, elles ont des propriétés antioxydantes très intéressantes pour les nutritionnistes et les technologues alimentaires en raison de l'opportunité d'utiliser ces composés bioactifs comme ingrédients alimentaires fonctionnels vu que les antioxydants provenant de sources naturelles ont une biodisponibilité plus élevée et donc une efficacité protectrice supérieure ou antioxydants synthétiques. Les composés bioactifs dans les mûres sauvages contiennent principalement des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tels que les anthocyanines et les flavonols et les tanins) et l'acide ascorbique. Ces composés, individuellement ou combinés, sont responsables de divers

avantages pour la santé des baies, tels que la prévention des troubles de l'inflammation, des maladies cardiovasculaires ou des effets protecteurs pour abaisser le risque de divers cancers.

(Meziti et al .,2017 ;Skrovankova et al .,2015)

# *Partie expérimentale*

## Matériel et méthodes

### I.1. Matériel végétal

Les matières végétales utilisées dans notre étude sont : les mûres sauvages (à incorporer dans la matrice huileuse) et l'huile d'olive vierge (matrice d'enrichissement).

❖ les mûres sauvages : les fruits sont récoltés de Souk-el-tennine durant le mois de septembre 2016, présentaient une couleur violacées-noirâtre en pleine maturité. Ce choix se justifie par sa richesse en antioxydants (Ryu et al., 2016).

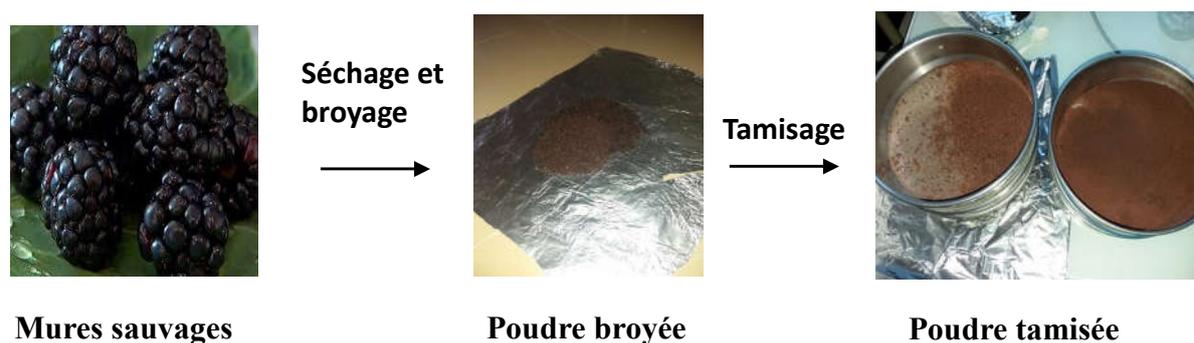
❖ L'huile d'olive : le type de l'huile d'olive est de variété CHEMLLAL, commercialisée par l'huilerie NUMIDIA d'Ouzellaguen 'Ighzer Amokrane'. Il s'agit d'une huile d'olive vierge dont l'extraction est faite par l'extraction à deux phases.

### II.2. Préparation et caractérisation du matériel végétal

#### II.2.1. Préparation du matériel végétal

a- **Séchage** : Le séchage des mûres sauvages a été réalisé dans une étuve ventilée à 40° C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

b- **Le broyage et le tamisage** : Les mûres sauvages séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, et tamisées à l'aide d'un tamiseur (RESTCH AS 200) en vue d'obtention d'une poudre fine dont le diamètre est  $<250\mu\text{m}$  (Figure 8). La poudre obtenue a été conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière et d'humidité dans un flacon en verre.



**Figure 8.** Etape de préparation du matériel végétal.

## I.2.2. Caractérisation du matériel végétal

### II.2.2.1. Détermination de taux d'humidité

#### ❖ Principe

La teneur en eau a été déterminée par la méthode décrite par (Doymaz et al., 2004). Une prise d'essai de 2 g de la poudre du fruit est mise dans une étuve à  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

#### ❖ Expression des résultats

Le taux d'humidité (H %) est calculé par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100$$

Où :

**H%** : Taux d'humidité en % ;

**M<sub>1</sub>** : Masse de la capsule + matière fraîche avant séchage en g ;

**M<sub>2</sub>** : Masse de l'ensemble après séchage en g ;

**P** : Masse de la prise d'essai en g.

### I.2.2.2. Détermination de l'activité de l'eau (AW)

L'activité de l'eau de la poudre a été mesurée à  $22^{\circ}\text{C}$  avec un hygromètre à capteur de type capacitif (HygroPalmAW1, Rotronic).

### I.2.2.3. Extraction des composés phénoliques totaux

L'extraction a été réalisée à l'aide d'un micro-onde domestique, ayant une cavité de dimensions de  $22.5 \times 37.5 \times 38.6$  cm et une fréquence de fonctionnement de 2,45 GHz. Pour l'extraction, un gramme de la poudre des mures a été placé dans un ballon de 250 ml, 25 ml d'éthanol/eau (v/v) ont été rajoutés. Le mélange a été irradié à une puissance de 700 W pendant 60 s. Le mélange a été filtré avec un papier filtre. Puis, le filtrat a été ré-extrait avec 15 ml du solvant dans les mêmes conditions. Les deux fractions récupérées ont été rassemblées (Dairi et al. 2014).



Figure 9. L'extraction assistée par microonde des PT

### I.2.2.4. Dosage des composés phénolique totaux

#### ❖ Principe

La concentration de la teneur en composés phénoliques totaux a été estimée par le dosage de Folin-Ciocalteu. Le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

### ❖ Mode opératoire

La détermination de la teneur en polyphénols totaux est réalisée selon le protocole décrit par (Georgé et al.,2005). Dans des tubes à essai, nous avons mélangé 250 µL d'extrait des mures sauvages avec 1,25 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 1/10).Après 2 min à l'obscurité, on ajoute 1 ml de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (75g /L). Après 15 minutes d'incubation à 50°C, l'absorbance est mesurée à 760 nm contre un témoin ou l'extrait est remplacé par le même volume du solvant utilisé .Les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par g de poudre des mures sauvages sèches.

#### I.2.2.5. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée par une méthode colorimétrique décrite par (Bonvehi, Torrento,et Lorente .,2001). 1ml de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  2%) est additionné à 1ml d'extrait. Après 15 mn d'incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 430 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent rutine/g de poudre.

#### I.2.2.6.Dosage des anthocyanes

- *Extraction des anthocyanes :*

Dns un flacon en verre on mélange 1g de poudre des mûres sauvages avec 25ml du mélange 1.5 N HCl /méthanol (15/80, v/v)., incubation dans un bain marie à 70° pendant 73 minutes ,puis une centrifugation a 4000 rpm pendant 15 minutes ,et on récupère l'extrait pour le dosage .

- *Le dosage des anthocyanes totaux a été effectué par la méthode du pH-différentiel (Lee et al., 2005).* Le principe de cette méthode est basé sur la capacité de changement de couleur des anthocyanes à des différents pH. Les anthocyanes monomériques totaux, présentent sous la forme d'oxonium (coloré), qui est stable à pH 1, et la forme hémicétale (décoloré) prédominante à pH 4,5. La différence dans l'absorbance des pigments à 520 nm (entre le pH 1 et 4,5) est proportionnelle à la concentration en pigment anthocyanique. Pour cela, les extraits sont dilués dans les deux tampons (pH1 et 4.5) et une lecture spectrophotométrique est effectué 520 et 700 nm (pour la correction du trouble). Les résultats sont exprimés en équivalent mg cyanidine-3-glucoside/g de matière sèche et sont calculées selon l'équation suivante :

$$\left[ANC(\text{en Eq mg Cyan-3-gluc / g de MS})\right] = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\varepsilon \times l}$$

*ANC* : anthocyanes (en équivalent mg cyanidine-3-glucoside/g de matière sèche)

$$A : A = \left(A_{520nm} - A_{700nm}\right)_{pH1,0} - \left(A_{520nm} - A_{700nm}\right)_{pH4,5} ;$$

*PM* : poids moléculaire = 449.2 g/mol pour la cyanidine-3-glucoside ;

*FD* : facteur de dilution ;

: coefficient d'extinction molaire de la cyanidine-3-glucoside=26900 (en Lmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

*l* : le trajet optique de la cuve (en cm).

### I.2.2.7. Détermination de la teneur en caroténoïdes et en chlorophylle

Selon [Minguez Mosquera et al. \(1991\)](#), le protocole du dosage des caroténoïdes et de la chlorophylle est comme suit : Une prise d'essai de 3 g d'huile est ajustée jusqu'à 10 ml de cyclohexane dans une fiole jaugée. Les absorbances maximales à 670 nm et à 470 nm nous renseignent sur la fraction chlorophyllienne et les caroténoïdes respectivement. La valeur du coefficient d'extinction spécifique utilisée :

- E<sub>0</sub>= 613 pour la Phéophytine (composant majeur des chlorophylles).
- E<sub>0</sub>= 2000 pour la Lutéine (composant majeur des caroténoïdes).

#### ❖ Résultats :

$$C_{\text{lorop ylle}} = \frac{A_{670}}{613} \frac{10^{-6}}{100 \times T}$$

$$C_{\text{aroténoïdes (mg/Kg)}} = \frac{A_{470}}{2000} \frac{10^{-6}}{100 \times T}$$

*A* : absorbance.

*T* : trajet optique (épaisseur de la cuve 1 cm)

### I.2.2.8. Tests d'activité antioxydante

#### 1. Test DPPH

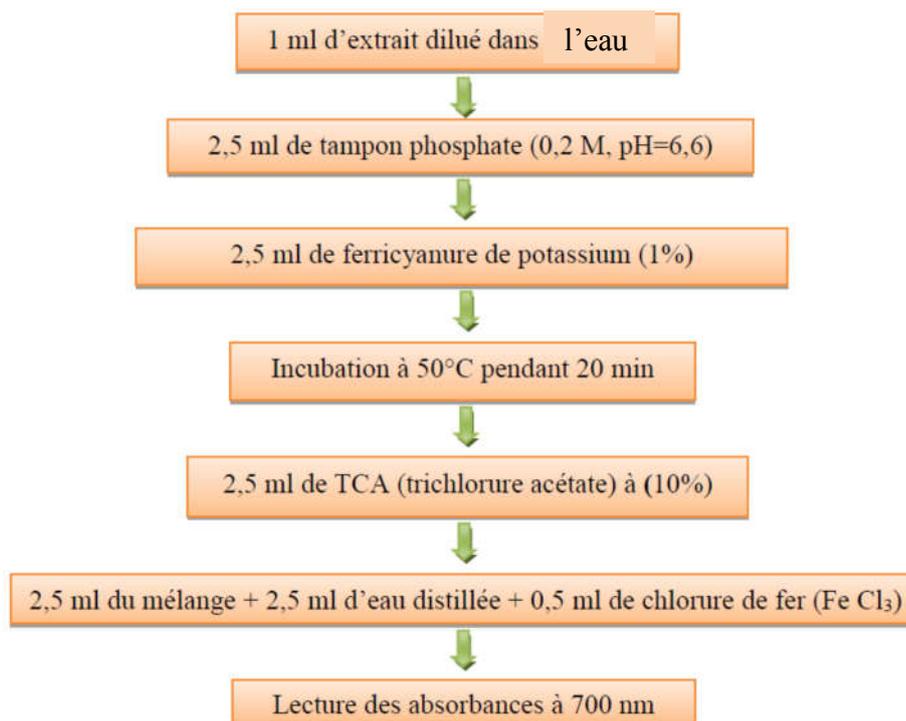
Le composé chimique 2, 2diphényl-1- picrylhydrazyl ( $\alpha, \alpha$ - diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure- activité antioxydant des composés phénoliques. Du fait que ce composé possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote, les molécules du radical ne forme pas des dimères il reste donc sous sa forme monomère relativement stable à température ambiante. C'est cette délocalisation qui provoque la coloration violet foncé bien caractéristique de la solution de DPPH. Mesurer la diminution de la coloration de DPPH permet de mesurer l'efficacité d'un antioxydant, due à une recombinaison des radicaux DPPH qui possède une absorbance maximum à 515 nm. Concernant les composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par transfert de l'atome H sur le DPPH° alors transformé en une molécule stable DPPH. Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou en pourcentage d'inhibition des radicaux libres en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{abs témoin} - \text{Abs d'échantillon}) / \text{Abs témoin}$$

**Mode opératoire :** Le test DPPH est réalisé selon la méthode décrite par (Dudonné al., 2009). 100  $\mu$ l d'extrait à différentes concentration sont mélangés avec 3 ml de la solution de DPPH (60  $\mu$ M). Après 20 minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance est lue à 515 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, et une courbe d'inhibition en fonction de la concentration est tracée : % d'inhibition = f (concentrations). On a déterminé ainsi la concentration inhibitrice de 50% le radical ( $IC_{50}$ ).

## 2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits a été déterminé en utilisant la méthode basée sur la réduction de ferricyanure de potassium (Oyaizu, 1986). La présence des agents réducteurs dans les extraits induit la réduction de l'ion ferrique ( $Fe^{+3}$ ) à l'ion ferreux ( $Fe^{+2}$ ). Cette réduction est mesurée par l'intensité de la couleur verte bleue qui en résulte. Le protocole de détermination du pouvoir réducteur est illustré dans la Figure 10.



**Figure 10.** Protocole pour la détermination du pouvoir réducteur.

#### **I.4 .Optimisation d'enrichissement assisté par ultrasons**

La partie de cette étude est consacrée à la recherche de différents facteurs influençant le processus d'extraction et de déterminer les niveaux (bas et haut) de chaque facteur retenu par le plan d'expérience (JMP<sup>®</sup>). La deuxième approche consiste au choix du plan d'expérience adéquat à l'étude autrement dit la méthode d'expérimentation choisie doit faciliter l'interprétation des résultats. Elle doit également minimiser le nombre des essais sans toutefois altérer la qualité.

##### **I.4.1. Etude préliminaire**

L'enrichissement de l'huile d'olive pourrait être influencé par différents facteurs. Pour cela, nous avons étudié l'effet de certains paramètres à savoir le temps et l'amplitude sur la teneur en composés phénoliques totaux, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles des huiles enrichies. Cette étape préliminaire nous a permis également de définir les intervalles des facteurs à utiliser dans le plan des expériences (**étape d'optimisation**).

- **Procédure de macération assistée par ultrasons**

Cinq grammes de mures sauvages séchées et broyées ont été ajoutés à 100 ml d'huile d'olive utilisée comme solvant dans le dispositif à ultrasons pendant différents temps (10, 20,30 et 40 minutes) et à différentes amplitudes (20, 40, 60 80 et 10%). Le mélange a été ensuite centrifugé à 3500 rpm pendant 5 min. Finalement, l'huile ainsi filtrée est conservé à 6°C jusqu'à son analyse.

#### **I.4.2. Méthodologie de surface de réponse (MSR)**

La méthodologie de surface de réponse (MSR) est un outil efficace pour optimiser un processus. La force et l'avantage de cette technique est le nombre réduit des expériences requises pour évaluer des paramètres multiples et leurs interactions. Par conséquent, il consomme moins de temps et de travail, que d'autres approches requises pour optimiser un processus.

Dans notre étude, nous avons opté pour le modèle Box-Behnken Design (BBD) qui est un modèle du second degré à plusieurs variables, il est facile à mettre en œuvre.

Dans le cadre de notre étude, nous avons dressé un plan de Box-Behnken de trois niveaux pour évaluer l'effet combiné de deux variables indépendantes : le temps et l'amplitude qui sont désignés par  $X_1$ ,  $X_2$  respectivement. L'étude préliminaire qu'on a effectuée, nous a permis de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant sur l'expérimentation qui sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Les variables indépendants	Niveaux des facteurs		
	-1	0	+1
<b><math>X_1</math> : Temps (min)</b>	5	15	25
<b><math>X_2</math> : amplitude (%)</b>	40	70	100

#### **I.5. Extraction conventionnelle**

Cinq grammes de mures sauvages séchées et broyées ont été ajoutés à 100 mL d'huile d'olive comme solvant dans le dispositif à ultrasons pendant 24 h. Le mélange a été ensuite centrifugé

à 3500 rpm pendant 5 min. Finalement, l'huile ainsi filtrée est conservé à 6°C jusqu'à son analyse (**Figure 11**).



**Extraction par ultrasons**



**Extraction conventionnelle**

**Figure11.** Les méthodes d'enrichissement de l'huile d'olive.

## **I.6. Caractérisation phyto-chimique de l'huile d'olive enrichie**

### **I.6.1. L'extraction des polyphénols de l'huile**

#### **❖ Principe**

Il s'agit d'une extraction liquide/ liquide qui consiste à dissoudre l'huile dans un solvant organique et mélangé avec un solvant polaire pour la récupération des composés phénoliques.

#### **❖ Mode opératoire :**

Une prise d'essai de 2.5 g d'huile est additionnée à 5 ml d'hexane (99%) et 5 ml du méthanol/ eau (6/4, v/v), puis agitée au vortex pendant 2 min, ensuite le mélange est centrifugé à 3200 rpm pendant 5 min. La fraction polaire (phase méthanolique) est récupérée, tandis que la phase apolaire (hexanique) subit un épuisement (une autre extraction). Les deux fractions obtenues sont mélangées et conservé à 4°C et à l'abri de la lumière ([Kalantzakis et al., 2006](#)).

### **I.6.2. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des huiles**

Les mêmes protocoles utilisés dans les dosages des polyphénols totaux et flavonoïdes pour l'extrait des mures sauvages

### I.6.3. mesure des activités anti oxydantes

Les mêmes protocoles utilisés dans l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits des mures sauvages. Sauf dans le cas du test DPPH, le volume de l'huile utilisé est de 0,5 ml mélangé avec 1,5 ml du DPPH.

### I.6.4. Détermination des acides gras libres

C'est le pourcentage d'acides gras libres exprimés conventionnellement selon la nature du corps gras, en acide oléique ou palmitique. Il nous renseigne sur le degré de la fraîcheur du corps gras.

#### ❖ Principe

C'est une neutralisation des acides gras libres (AGL) par une solution de NaOH (0.1 N) en présence de la phénophtaléine comme indicateur coloré, selon la réaction suivante :



#### ❖ Mode opératoire

On pèse 5g d'huile dans une fiole, on ajoute 25 ml (éther éthylique / éthanol) et place le mélange sous agitation pour bien solubiliser l'huile dans le solvant, puis on ajoute quelques gouttes de phénol phtaléine et on titre avec KOH (0.1N) jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante (**règlement(CEE) N° 2568/91**).

#### Expression des résultats :

$$\text{Acidité \%} = (V - V_0) (N \times M_{eq} / 10.m)$$

$M_{eq}$  : masse équivalente d'acide oléique = 282 $m_{eq}$

$N$  : normalité de KOH à 0.1N.

$m$ : poids de la prise d'essai.

$V$  : volume de KOH utilisé pour le titrage de l'échantillon.

$V_0$  : volume en ml de KOH nécessaire au titrage du blanc.

## I.6.5. Détermination de l'indice de peroxyde

### ❖ Principe

Consiste à un traitement d'une quantité d'huile en solution dans l'acide acétique et le chloroforme par une solution d'iodure de potassium (KI). Le titrage d'iode libéré se fait par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon comme indicateur coloré (règlement(CEE) N° 2568/91).

### ❖ Mode opératoire

On pèse 2 g d'huile dans une fiole, on ajoute 10 ml de chloroforme, 15 ml d'acide acétique et 1 ml de KI (iodure de potassium). Après agitation pendant 1 min, on met le mélange à l'abri de la lumière pendant 5 min et on ajoute 75 ml d'eau distillé. 3 à 4 gouttes de la solution d'amidon ont été ajoutées et on titre par le thiosulfate de sodium (0.01 N) jusqu'à la disparition de la couleur. En parallèle on effectue un essai à blanc.

### ➤ Expression des résultats

La détermination de l'indice de peroxyde est faite selon la formule suivante :

$$I_p = \frac{[N.(V_1 - V_0).100]}{m}$$

$I_p$  : Indice de peroxyde (Meq d'O<sub>2</sub> / kg d'huile).

$N$  : Normalité de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (N).

$V_1$  : Volume de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utilisé pour titrer l'échantillon (ml).

$V_0$  : Volume de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utilisé pour l'essai à blanc (ml).

$m$  : masse de la prise d'essai (g).

### I.6.6. Détermination de l'absorbance spécifique en rayonnement UV

L'examen spectrophotométrique dans l'UV peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse et sur son état de conservation. Les absorptions aux longueurs d'onde prévues dans la méthode sont dues à la présence de systèmes diéniques et triéniques conjugués.

#### ❖ Principe

La matière grasse étudiée est dissoute dans le solvant requis, puis on détermine l'extinction de la solution à la longueur d'onde prescrite, par rapport au solvant pur. On calcule les extinctions spécifiques à partir des lectures spectrophotométriques.

#### ❖ Protocole

Nous avons fait la même opération pour l'huile témoin et l'huile enrichie. Une prise d'essai de 0.25g d'huile d'olive est introduite dans une fiole jaugée, ensuite ajustée avec 25ml d'hexane jusqu'au trait de jauge. Placer sous agitation, puis on fait lecture de l'absorbance à  $\lambda=232\text{nm}$  et  $\lambda=270\text{nm}$  (règlement(CEE) N° 2568/91).

### I.7. Stockage accéléré de l'huile d'olive : stabilité oxydative

La résistance à l'oxydation ne peut être mesurée véritablement que par des essais pratiques de conservation. Mais ceux-ci en raison de leur durée, il faut donc avoir recours à des essais accélérés d'oxydation. Le traitement thermique forcé par l'étuve chauffante. Le principe de la méthode consiste en une oxydation du corps gras par l'étuve à une température précise 60°C tout en augmentant la durée du traitement. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par mesure de l'indice de l'acidité, l'indice de peroxyde, les  $K_{232}$  et  $K_{270}$  en fonction du temps. D'autres dosages également ont été réalisés à savoir les caroténoïdes et la chlorophylle.

Le protocole suivi est décrit par [Ayadi et al., \(2009\)](#) avec quelques modifications. Une prise d'essai de 5 g d'huile témoin et de l'huile enrichie est introduite dans des tubes à essai, puis chauffés dans une étuve à une température de 60°C à différents temps d'exposition (2,4,6, 8, 10, 12, 14,16,18 jour ).Après chauffage, les échantillons traités sont laissés refroidir à température ambiante avant leur analyse chimiques. L'huile enrichie subit les mêmes analyses que l'huile témoin après avoir été soumise à un traitement thermique de 18 jours.





## II.1. Taux d'humidité et activité de l'eau (Aw)

Le taux d'humidité et l'activité d'eau (Aw) jouent un rôle important dans la conservabilité de la poudre des fruits séchés. De plus, la matrice végétale à incorporer dans une matrice huileuse, devrait de préférence contenir une faible quantité d'eau pour éviter une hydrolyse possible des triglycérides, ce qui pourrait par conséquent libérer des acides gras libres plus oxydables.

La poudre de mures séchées a présenté un taux d'humidité de 4 % (96 % de matière sèche), et une activité d'eau (Aw) de 0.4 (27 °C).

## II.2. Analyse phytochimique des mures sauvages

La détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, anthocyanes et caroténoïdes est une étape importante dans l'évaluation de la valeur nutritionnelle d'un aliment (fruit, légumes) [Zia-Ui-Haq et al. \(2014\)](#).

Les teneurs en pigments et en composés phénoliques de la poudre étudiées sont représentées dans le **Tableau VI**

**Tableau VI.** Les teneurs en pigment et en composés phénoliques dans la poudre des mûres sauvage

Paramètre	Teneurs
Polyphénols totaux	41.7± 0.27 mg EAG /g
Flavonoïdes	2.69 ± 0.12 mg ER /g
Anthocyanes	598 µg ECG/g
Caroténoïdes	9,110 µg/ml

Le dosage des *polyphénols* par la méthode de Folin ciocalteu révéla une teneur de 41.70 mg EAG/g de la mure séchée. Selon les travaux de [Sladana et al. \(2012\)](#), les teneurs en composés phénoliques sont aux alentours de 2.3-2.7 mg/g du fruit frais, correspondant approximativement à 23-27 mg /g matière sèche. Ces résultats sont inférieurs à la teneur trouvée dans notre présent travail. La teneur en *flavonoïdes* est en moyenne de 2.96 mg ER / g du produit. Ce résultat est presque 2 fois inférieur à la teneur des flavonoïdes rapportée par [Samec et al. \(2011\)](#).

**Les anthocyanes** ont été extraits avec un solvant légèrement acide car ils sont des pigments instables en milieu neutre (Choi et al.(2002), Delgado-vergas et al.(2002). D'après les résultats de cette présente étude, la teneur en anthocyanes est de l'ordre de 0.598 mg/g du fruit séché. Néanmoins, Sladana et al. (2012) ont rapporté des teneurs en anthocyanes comprises entre 0.5-1 mg ECG/g matière fraîche, correspondant approximativement à une teneur de 5-10 mg/g ECG de matière sèche.

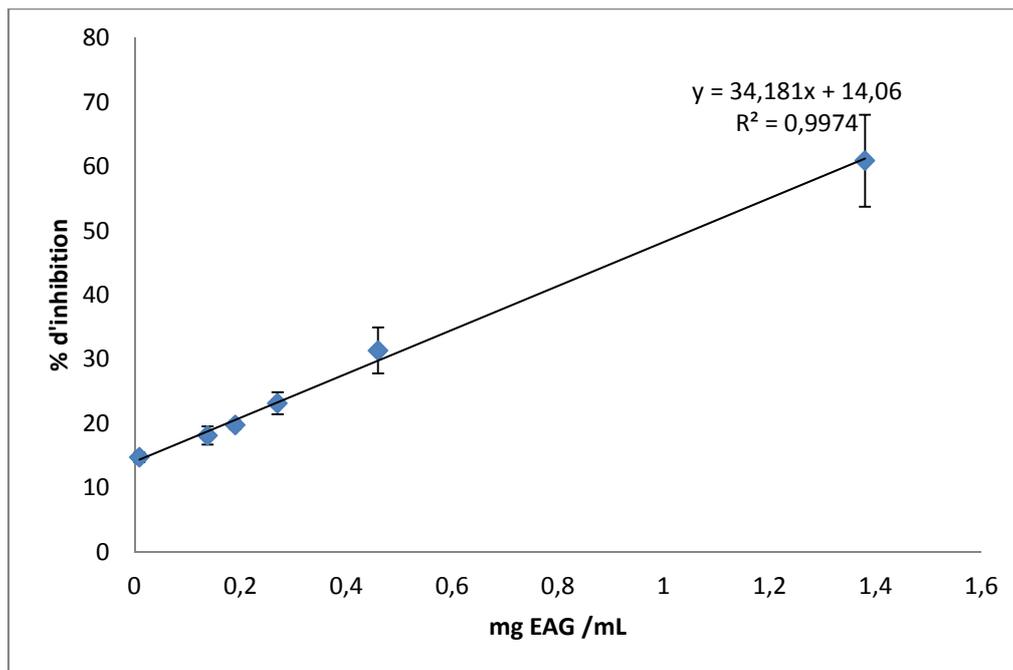
Cette différences observées entre notre travail et les données de la littérature pourraient être attribuées aux plusieurs facteurs à savoir : la saison (degré de maturité), et la région de récolte, les conditions environnementales, la variété... De ancous et al. (2004).

### **II.3.Activités anti oxydantes des mures sauvages**

Différentes méthodes ont été développées pour l'évaluation des activités anti oxydantes. Dans cette présente étude, nous avons utilisé deux méthodes : test DPPH et le pouvoir réducteur.

#### **II.3.1.Activité Scavenger du radical DPPH**

Le test DPPH permet de mettre en évidence le pouvoir donneur d'H aux radicaux libres. La figure 12 représente les résultats de mesure des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits testés. Les résultats obtenus avec ce test révèlent que l'extrait de la mûre sauvage est une substance anti radicalaire pouvant neutraliser efficacement le radical DPPH (Jaihyunk et al. (2016) et montrent également que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration, c'est ce qui est appelé « dose-dependant effect ».



**Figure 12.** Test de neutralisation du radical DPPH.

Ces activités pourraient être liées à la richesse des extraits en polyphénols. Car selon [Turkmen et al. \(2007\)](#), les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

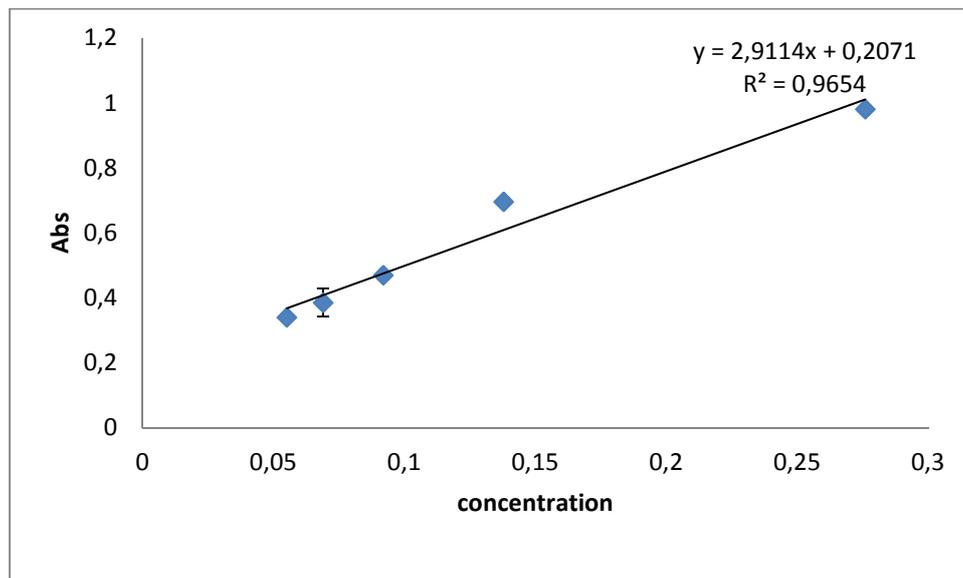
L' $IC_{50}$  est inversement proportionnel à la capacité antioxydant d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. En effet, plus la valeur d' $IC_{50}$  est petite, plus l'activité antioxydant d'un composé est grande [Khoudali et al. \(2014\)](#). Dans notre étude,  $IC_{50}$  estimé est de 1 mg EAG/mL. Ce résultat s'explique ainsi par le fait que l'extraction avec un mélange éthanol-eau montre généralement de meilleures activités antioxydants dans ce test ([Mojtaba Delfanian et al. \(2014\)](#)).

### II.3.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est un test qui permet de mettre en évidence le pouvoir donneur d'électron. De plus, la propriété réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydant potentielle ([Jeong et al., 2004](#) ; [Kumaran et al., 2007](#)). Dans le test utilisé, en présence des extraits anti oxydants, le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) est réduit en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ). La coloration verdâtre résultante est proportionnelle à l'activité antioxydante ; cela signifie que lorsque l'absorbance augmente, le pouvoir réducteur augmente également.

D'après la **Figure 13**, on remarque que le pouvoir réducteur de l'extrait de la mûre sauvage augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait avec un effet dose dépendant. Ce résultat est en accord avec les travaux de [Violeta et al. \(2014\)](#) qui ont montré les propriétés réductrices des extraits de la mure sauvage. Cette capacité réductrice des extraits testés pourrait être liée à la présence des composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron ([Sddhuraju et Becker, 2007](#)). En effet, différents auteurs ont révélé la présences des acides phénoliques (acide gallique, acide syringique), des flavonoïdes (la rutine, quercitrine, catéchine et également des anthocyanes ([Stajcic et al., 2012](#) ; [Radovanovic et al., 2013](#)). Ces différentes molécules ont largement montrés leur propriétés anti oxydantes et leurs teneurs présentaient une forte corrélation avec les tests d'activités anti oxydantes tes que le DPPH, PR et FRAP et ABTS.

Comme on peut également le constater, l'extrait des mures est efficace aussi bien vis-à-vis du radical DPPH et dans la réduction de fer ferreux, cela suppose que cet extrait peut agir avec différents mécanisme d'action (donneur d'électron et d'hydrogène).



**Figure 13.** Test du pouvoir réducteur de l'extrait des mures sauvages.

### II.3.3. Optimisation d'enrichissement assisté par ultrasons

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction sur les matrices végétales ou alimentaires est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements ou/et d'accélérer les cinétiques d'extraction. Ces améliorations peuvent être attribuées à l'amélioration de la diffusion des

substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction (Veillet et al. (2010)). Néanmoins, différents paramètres peuvent moduler l'efficacité de ce procédé. Pour cela, avant d'avoir recours à un plan d'expérience, des essais préliminaires doivent être menés afin de déterminer les bornes à appliquer au plan d'optimisation.

### II.3.3.1. Etude préliminaire

#### a- Effet de l'amplitude

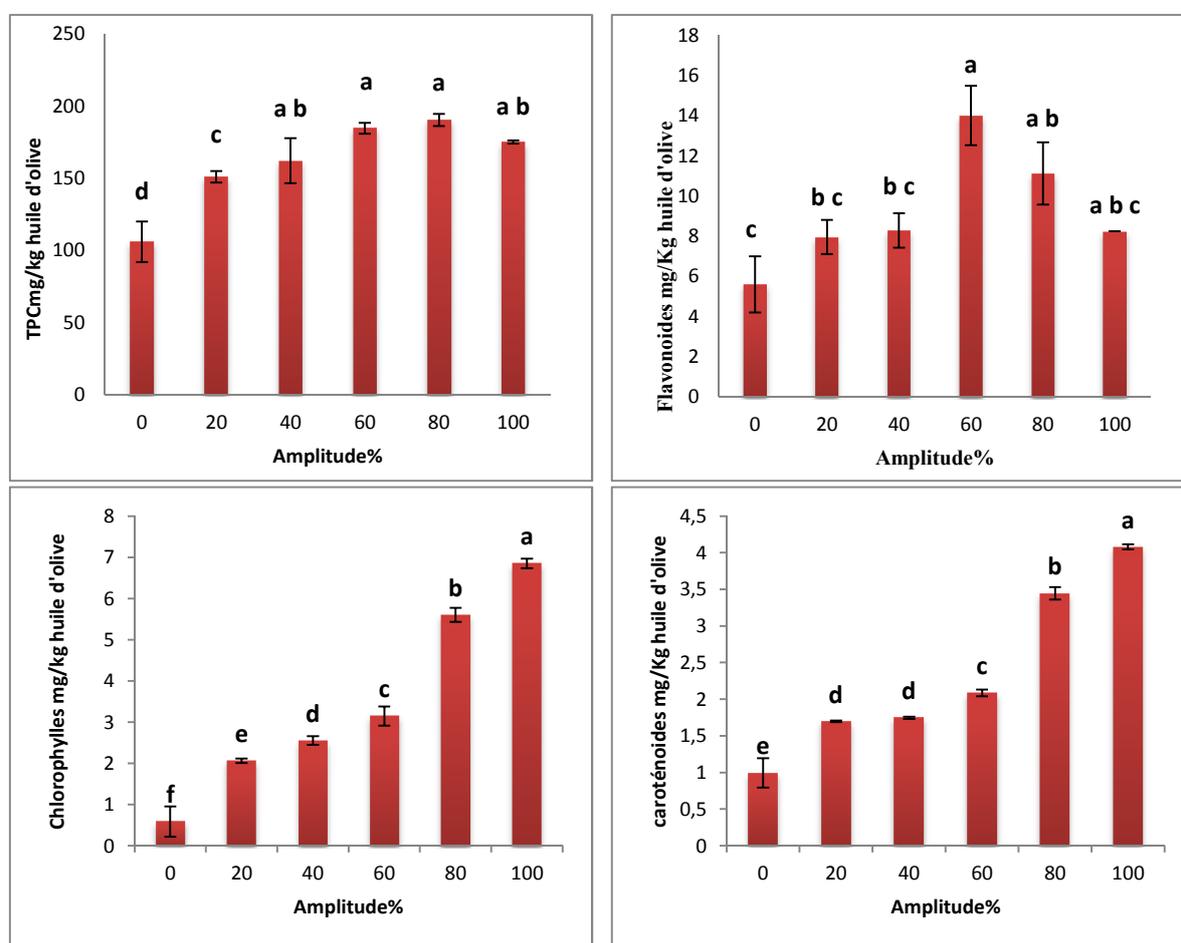
Afin de choisir la bonne amplitude à utiliser, une série d'essai à différentes amplitudes est réalisée, à savoir 20%, 40%, 60%, 80% et 100%, et les autres paramètres ont été fixés à 10 min et à 5% pour le temps et le ratio respectivement. Les résultats obtenus de l'effet de l'amplitude sont résumés dans la **Figure 15**.

- **Polyphénols totaux** : la **Figure 15** montre que l'augmentation de l'amplitude appliquée de 20 jusqu'à 80% est accompagnée par une élévation significative ( $(p < 0,05)$ ) de la teneur en composés phénoliques pour atteindre une augmentation maximale de 80% par rapport au témoin (huile non enrichie). Par contre, l'utilisation d'une amplitude supérieure à 80 % montre une diminution en composés phénoliques. Cela peut être expliqué par l'influence négative de l'amplitude élevée (+ de 80) sur les composés phénoliques par leur dégradation.

- **Les flavonoïdes** : Selon la **Figure 15**, une légère augmentation de la teneur des flavonoïdes est observée de l'amplitude 0 à 40% mais sans aucune différence significative ( $(p < 0,05)$ ). Puis au-dessus de cette valeur, une augmentation plus élevée et significative est constatée à une amplitude de 60 % permettant ainsi une augmentation de 133% par rapport au témoin. L'utilisation des amplitudes au-delà de 60% a causé la diminution de la teneur en flavonoïdes.

La diminution des teneurs en substances bioactives à fortes amplitudes car les ultrasons peuvent générer dans le milieu liquide un phénomène de cavitation (compression et décompression) dont les effets sono chimiques se traduisent entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations de rendement d'extraction. Cependant, une forte amplitude, peut générer des bulles de faible taille mais dont l'implosion permet d'atteindre localement des températures de l'ordre de 5500 K (Kristina et al., 2012) ; pouvant ainsi causer l'oxydation et la dégradation des molécules avoisinantes.

• **Caroténoïdes et chlorophylles** : D'après les résultats obtenus, on constate que la teneur en caroténoïdes et chlorophylles présente une augmentation linéaire en fonction de l'amplitude appliquée. Plus l'amplitude n'augmente, plus la teneur des pigments suivis augmentent progressivement. En effet, la teneur des caroténoïdes passe de 0.99 à 4.08 mg/Kg d'huile (amplitude 100%) soit une augmentation de 312%, et de 0.58 à 6.85 mg/kg pour la chlorophylle. Donc, l'augmentation de l'amplitude améliore significativement l'efficacité de l'extraction et migration de ces pigments dans la matrice huileuse.



**Figure 14.** Effet de l'amplitude sur l'enrichissement d'huile d'olive en PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles.

*La barre verticale représente l'écart-type*

*Les valeurs portant les différentes lettres présentent une différence significative ( $p < 0,05$ )*

L'information qu'on peut aussi tirer de ces résultats, est que les pigments présentent une vitesse de migration plus importante que celle des composés phénoliques (PT et flavonoïdes). En effet, les taux de migration sont largement supérieurs à ceux obtenus avec les composés phénoliques, et cela peut être lié à la structure chimique des composés et par conséquent à leur solubilité dans le milieu d'extraction. En d'autres termes, les pigments sont plus apolaires, alors plus solubles dans l'huile

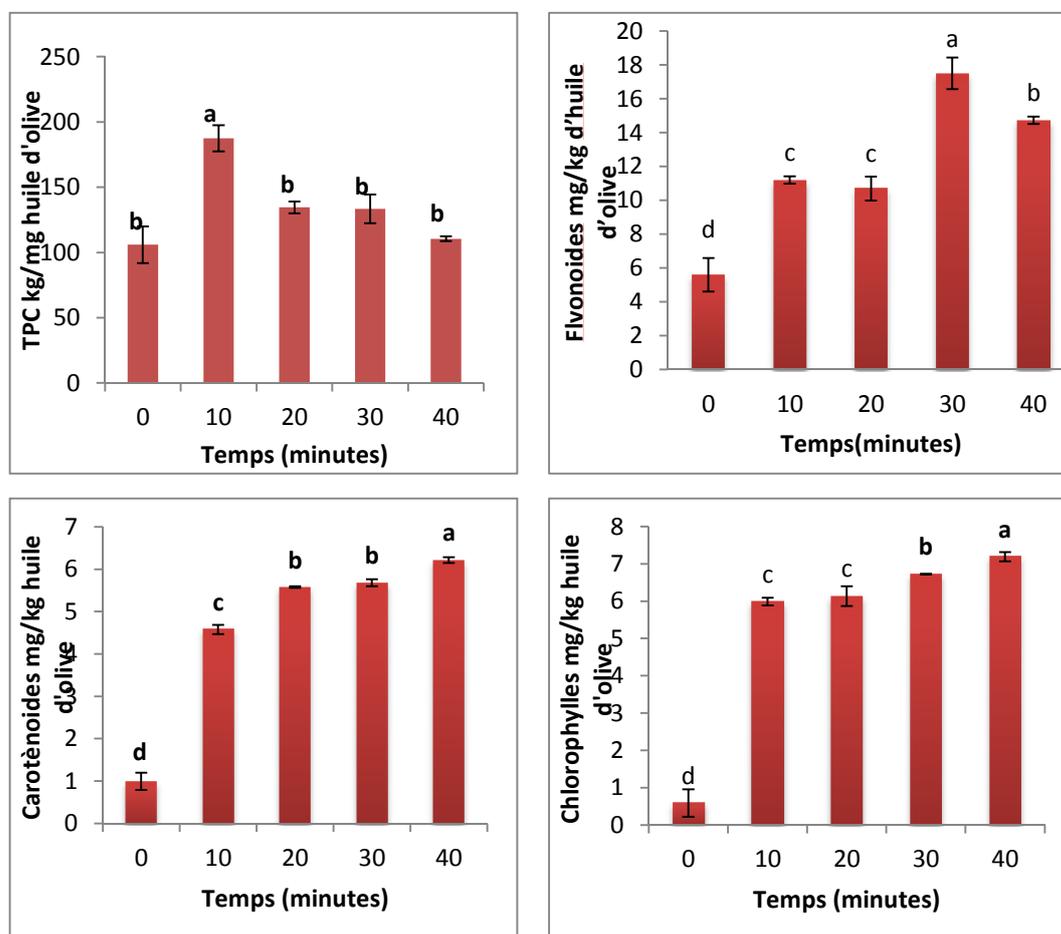
Dans cette étape, l'amplitude 80% a été choisie pour le reste des expériences vu qu'il présente un meilleur compromis en matière de la teneur en PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles.

### **b. Effet du temps**

Le temps d'extraction est un autre paramètre important qui influence l'extraction des composés phénoliques et des pigments ([Tan et al., 2013](#)). Dans cette étape, une série d'essai à différents temps (10, 20, 30 et 40 min) est réalisée, et les autres paramètres ont été fixés à 80 % min et à 5% pour le temps et le ratio respectivement. Les résultats obtenus de l'effet du temps sont résumés dans la **Figure 16**.

- **Les polyphénols totaux :** Selon la figure, les teneurs en PT dans l'huile d'olive enrichie augmentent graduellement avec l'augmentation de temps d'extraction et la teneur maximale est obtenue est de 187.55 mg/Kg après 10 min d'exposition aux ondes ultrasonores. Après ce temps, la teneur en PT a commencé à diminuer progressivement jusqu'à atteindre une valeur de 110.51 mg/Kg après 40 min. Cette diminution peut être due au phénomène d'oxydation [Mai, \(2015\)](#).

- **Les flavonoïdes :** D'après le résultat obtenu, la teneur en flavonoïdes augmente avec l'augmentation de temps d'extraction. La valeur maximale est obtenue après 30 min d'exposition, soit une augmentation de 207 % .Mais, après des temps d'expositions supérieurs à 30 min, une diminution significative est constatée (- 15 % par rapport à la valeur maximale)



**Figure 15.** Effet de temps sur l'enrichissement de l'huile d'olive en PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles.

La barre verticale représente l'écart-type

Les valeurs portant les différentes lettres présentent une différence significative ( $p < 0,05$ )

• **Caroténoïdes et chlorophylles** : Comme on peut aisément le constater sur la figure, le temps d'extraction affecte significativement l'enrichissement de l'huile d'olive en pigments des mures sauvages. En effet, pendant les 10 premières minutes d'exposition, la teneur en caroténoïdes a grimpé d'une façon significative par rapport au témoin. Après, on a constaté une augmentation progressive et moins rapide des caroténoïdes au cours du temps pour atteindre une valeur maximale de 6.21 mg/Kg. La même tendance est observée avec les chlorophylles. En effet, pendant les 10 premières minutes, une augmentation et un relargage rapide de la chlorophylle de la mure sauvage dans l'huile. Mais, une augmentation faible et

progressive est constatée avec l'augmentation supplémentaire du temps d'exposition aux ondes ultrasonores pour atteindre une valeur maximale 7.19 mg/Kg [Chang-Liang Jing et al.\(2015\)](#). Ces résultats suppose que les ultrasons favorise la migration des pigments [Farid Chemat et al. \(2012\)](#) et la durée d'exposition n'affecte pas leur teneur. Ce qui laisse dire, que les caroténoïdes et la chlorophylle sont des substances plus résistantes aux ondes ultrasonores contrairement aux substances bioactives qui sont très sensible au temps d'exposition et l'amplitude appliquée.

D'après l'ensemble de ces résultats, les intervalles d'étude choisis pour l'optimisation de l'enrichissement assisté par ultrasons sont : **5-25 min** pour le temps, et **40-100%** pour l'amplitude.

### **II.3.3.2. Optimisation des conditions d'enrichissement assistée par ultrasons**

#### **a. Le plan d'expérience**

Le modèle de Box Behnken a été utilisé pour optimiser ce procédé de macération assistée par ultrasons. 11 essais ont été réalisés et 4 réponses pour chaque condition ont été rapportées. Les résultats sont résumés dans le **tableau VII** ci-dessous.

Les résultats montrent une variation dans la réponse en fonction des paramètres étudiés. En effet, la teneur des réponses varient entre 121 à 183 mg Kg<sup>-1</sup>, 5 à 11.11 mg ER Kg<sup>-1</sup>, 0.97 à 4.32 mg kg<sup>-1</sup> et 1.55 à 6.96 mg kg<sup>-1</sup> pour les PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles. Cela signifie que les paramètres utilisés ont un effet sur ce procédé d'enrichissement étudié

**Tableau VII . Plan d'optimisation de l'enrichissement de l'huile d'olive par les mures sauvages**

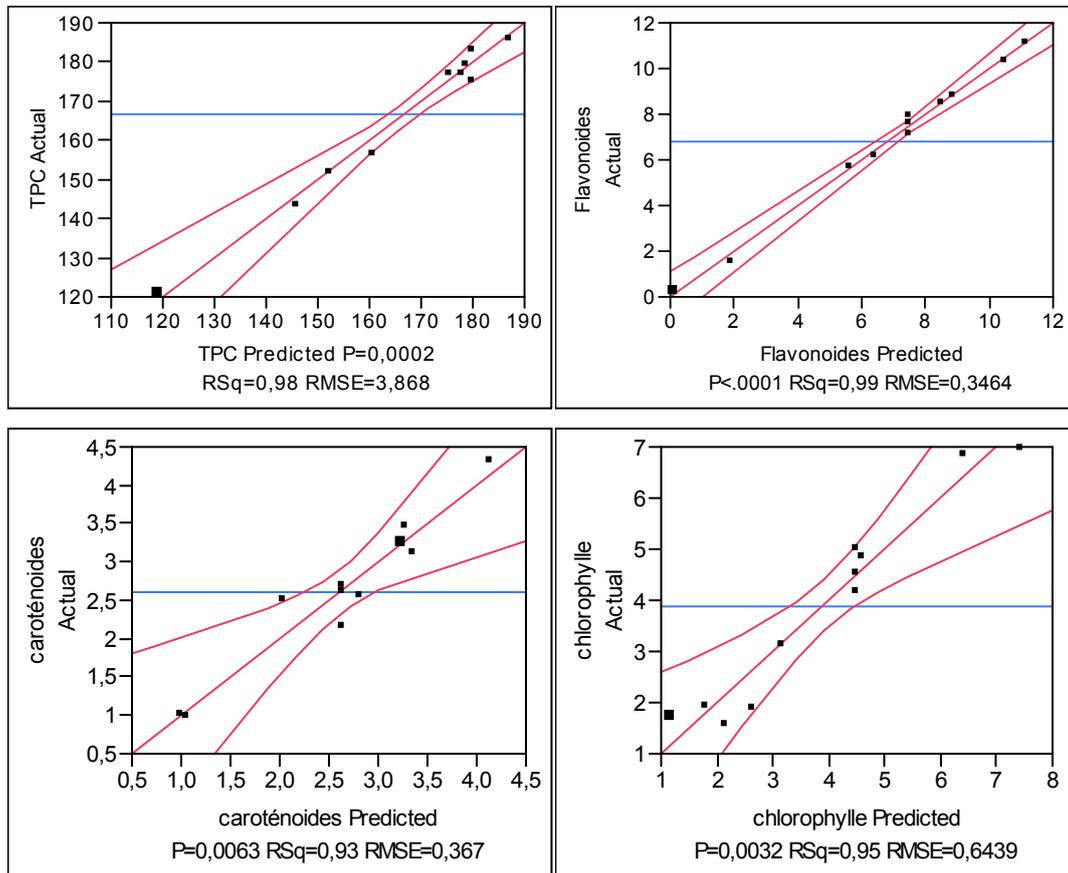
Expérience	Temps (min)	Amplitude (%)	TPC (mg EAG/Kg)	Flavonoïdes (mg ER/Kg)	Caroténoïdes (mg/Kg)	Chlorophylles (mg/kg)
<b>A0</b>	25	70	185,91	8,77	2,5	4,85
	5	40	121,01	5,00	3,25	1,72
<b>++</b>	25	100	176,92	11,11	3,10	6,96
<b>0a</b>	15	40	156,49	6,16	4,32	1,86
<b>00</b>	15	70	183,09	7,929	2,15	4,99
<b>0A</b>	15	100	179,43	10,28	3,47	6,85
<b>00</b>	15	70	183,09	7,09	2,69	4,52
<b>00</b>	15	70	175,12	7,61	2,6	4,17
<b>a0</b>	5	70	143,54	1,53	0,97	1,55
<b>+</b>	5	100	151,90	5,70	1,01	3,10
<b>+</b>	25	40	176,92	8,47	2,56	1,93

### b. Validation du modele

Dans le plan d'expériences, le modèle mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influence, et afin d'avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées.

Les modèles d'ajustement (model fit en anglais) obtenus pour les différentes réponses sont résumés dans la Figure 17. Comme on peut le constater, une bonne qualité d'ajustement est obtenue pour les PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles, avec des  $R^2$  de 0.98, 0.99, 0.93 and 0.95, respectivement. Cela, indique une bonne représentation et explication de la variabilité des réponses par le modèle proposé (Li et al., 2013). Selon Man et al. (2010), un modèle est considéré adéquat quand  $R^2 > 0.75$ . De plus, l'analyse d'ANOVA montre que le modèle polynomial est hautement significatif avec  $P$ -value compris entre 0.0001 à  $< 0.0032$ .

Les valeurs de  $R^2$  ajusté sont supérieures à 0.90, ce qui implique qu'il y a une forte corrélation entre les valeurs prédites et expérimentales Li et al. (2013). De plus, les valeurs de Lack of fit sont supérieures à 0.05, ce qui signifie que le manque d'ajustement n'est pas significatif.



**Figure 16.** Comparaison entre les valeurs prédites des TPC et les valeurs expérimentales

### c. Analyse de la variance (ANOVA)

Afin d'estimer la pertinence du modèle et de déterminer les paramètres influençant significativement sur l'enrichissement, une analyse de variance est réalisée et résumé dans le **tableau VIII**.

- **Effet des paramètres « temps et amplitude » sur les PT et flavonoïdes**

Selon le tableau, 5 effets ont été trouvés significatifs pour un intervalle de confiance de 95% sur la réponse étudiée. En effet, les effets linéaires ( $X_1$  et  $X_2$ ), effets quadratiques ( $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ) et effet d'interaction ( $X_1X_2$ ) présentent une influence significative sur la réponse en PT et flavonoïdes. Et selon les résultats du digramme du Pareto (données non présentées) qui

permet de déterminer quels sont les paramètres influençant de façon significative sur la concentration finale en PT et flavonoïdes. Il a été constaté que les effets linéaires du temps et d'amplitude sont hautement significatif [Chavanet al.\(2013\)](#), suivi des effets quadratiques du temps ( $X_1^2$ ), mais les effets quadratiques d'amplitude  $X_2^2$  et l'effet d'interaction ( $X_1X_2$ ) présentent une faible signification sur les teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

**Tableau VIII . Analyse de la variance (ANOVA) pour l'estimation de l'effet des variables temps amplitude sur l'enrichissement de l'huile d'olive en PT et flavonoïdes.**

<b>PT</b>				
<b>Termes</b>	<b>Estimation</b>	<b>Erreur</b>	<b>Rapport t</b>	<b>P value</b>
Constante	179,50553	<b>standard</b>	90,47	<,0001*
Temps(5,25)	20,550749	1,984223	13,01	<,0001*
Amplitude(40,100)	8,971	1,579089	5,68	0,0024*
Temps*Amplitude	-7,725	1,579089	-3,99	0,0104*
Temps*Temps	-13,37357	1,933982	-5,50	0,0027*
Amplitude*Amplitude	-10,14181	2,430167	-4,17	0,0087*
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.982587</b>			
<b>R adj</b>	<b>0.96517</b>			
<b>Lack of fit</b>	<b>0.715</b>			
<b>flavonoïdes</b>				
<b>Termes</b>	<b>Estimation</b>	<b>Erreur</b>	<b>Rapport t</b>	<b>P value</b>
Constante	7,4336546	<b>standard</b>	41,83	<,0001*
Temps(5,25)	3,4835681	0,177696	24,63	<,0001*
Amplitude(40,100)	2,0375587	0,141414	14,41	<,0001*
Temps*Amplitude	-0,711268	0,141414	-4,11	0,0093*
Temps*Temps	-2,105263	0,173196	-9,67	0,0002*
Amplitude*Amplitude	0,9651594	0,217632	4,43	0,0068*
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.99</b>			
<b>R adj</b>	<b>0.98</b>			
<b>Lack of fit</b>	<b>0.73</b>			

Ces résultats indiquent que dans le cadre du traitement par exposition aux ultrasons, la diffusion des composés bioactifs du matériau au solvant pourrait être améliorée et l'équilibre de la dissolution pourrait être établi dans un temps court. Mais les composants antioxydants peuvent être dégradés après une longue exposition à l'irradiation par ultrasons.

- **Effet des paramètres « temps et amplitude » sur les caroténoïdes et chlorophylles**

Selon le tableau VII, 5 et 4 effets sont été trouvé significatifs pour un intervalle de confiance de 95% sur la teneur en caroténoïdes et chlorophylles. Et selon les résultats du digramme du Pareto (annexe) par rapport aux caroténoïdes, ce sont les effets quadratiques  $X_1^2$  et  $X_2^2$  qui une influence hautement significative, suivi des effets d'interaction ( $X_1X_2$ ). Par contre, les effets linéaires ( $X_1$  et  $X_2$ ) présentent une influence significative sur cette réponse, contrairement à ce qui a été observé précédemment. Cependant concernant les chlorophylles, c'est l'effet linéaire d'amplitude  $X_2$  qui présente la plus haute influence, suivi de temps  $X_1$ . Les effets d'interaction et quadratique  $X_1^2$  montrent une très faible influence et absence d'effets quadratiques  $X_2^2$ .

D'après ces résultats, on peut conclure que le type d'effet sur la réponse, dépend grandement de type de composé à extraire. De, il y a un manque d'interaction entre les variables étudiés, le temps et l'amplitude.

Les réponses d'enrichissement sont données sous formes d'équations polynomiales tenant compte de l'influence des variables et leurs interactions :

$$\text{TPC } Y = 179.505 + 20.550X_1 + 8.971X_2 - 7.725X_1X_2 - 13.373X_1^2 - 10.14X_2^2$$

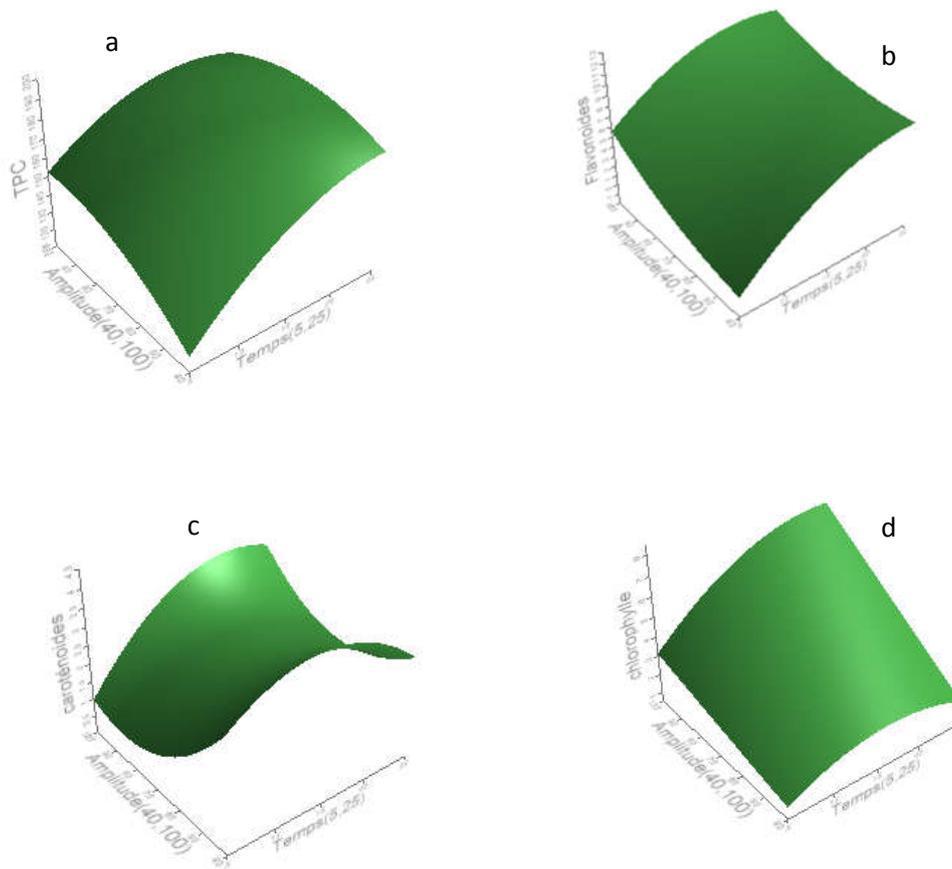
$$\text{Flavonoïdes : } Y = 7.433 + 3.483X_1 + 2.037X_2 - 0.71X_1X_2 - 2.105X_1^2 + 0.96X_2^2$$

$$\text{Caroténoïdes : } Y = 2.623 + 0.487X_1 - 0.424X_2 + 0.695X_1X_2 - 1.085X_1^2 + 1.062X_2^2$$

$$\text{Chlorophylles : } Y = 4.474 + 1.229X_1 + 1.901X_2 + 0.913X_1X_2 - 1.133X_1^2 + 0.02X_2^2$$

**Tableau IX. Analyse de la variance (ANOVA) pour l'estimation de l'effet des variables temps et amplitude sur l'enrichissement de l'huile d'olive en caroténoïdes et chlorophylles.**

<b>Caroténoïdes</b>				
<b>Termes</b>	<b>Estimation</b>	<b>Erreur</b>	<b>Rapport t</b>	<b>P value</b>
Constante	2,6230171	<b>standard</b>	13,93	<,0001*
Temps(5,25)	0,4870892	0,188252	3,25	0,0227*
Amplitude(40,100)	-0,424883	0,149815	-2,84	0,0364*
Temps*Amplitude	0,6954225	0,149815	3,79	0,0128*
Temps*Temps	-1,095641	0,183486	-4,75	0,0051*
Amplitude*Amplitude	1,0628095	0,230561	4,61	0,0058*
<b>R<sup>2</sup></b>	0.93			
<b>R adj</b>	0.86			
<b>Lack of fit</b>	0.34			
<b>chlorophylles</b>				
<b>Termes</b>	<b>Estimation</b>	<b>Erreur</b>	<b>Rapport t</b>	<b>P value</b>
Constante	4,4743433	<b>standard</b>	13,55	<,0001*
Temps(5,25)	1,2292351	0,330319	4,68	0,0055*
Amplitude(40,100)	1,9012936	0,262876	7,23	0,0008*
Temps*Amplitude	0,9133102	0,262876	2,84	0,0364*
Temps*Temps	-1,133702	0,321956	-2,80	0,0379*
Amplitude*Amplitude	0,0208601	0,404557	0,05	0,9609
<b>R<sup>2</sup></b>	0.94			
<b>R adj</b>	0.89			
<b>Lack of fit</b>	0.23			



**Figure 17.** Les surfaces de réponses pour les PT (a), flavonoïdes (b), caroténoïdes (c) et chlorophylles (d).

#### d. Conditions optimales

Les conditions optimales retenues dans cette étude sont 20 min et 75% pour le temps et l'amplitude respectivement. Afin de voir si le modèle proposé est valide pour représenter les réponses étudiées, une comparaison a été faite avec les valeurs expérimentales réalisées dans ces conditions optimales (tableau). Les résultats montrent que les teneurs prédites sont très proches des teneurs expérimentales pour les 4 réponses étudiées. Cela signifie que ce modèle est approprié et valide pour représenter l'étude réalisée.

**Tableau X.** Conditions optimales d'enrichissement assisté par ultrasons de l'huile d'olive par les mures sauvages

	Valeur prédite	Valeur expérimentale
<b>TPC (mg EAG Kg<sup>-1</sup>)</b>	187.05 ± 4.95 <sup>a</sup>	183.90 ± 7.43 <sup>a</sup>
<b>Flavonoïdes (mg ER Kg<sup>-1</sup>)</b>	8.94 ± 0.47 <sup>a</sup>	8.49 ± 1.62 <sup>a</sup>
<b>Caroténoïdes (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	2.60 ± 0.46 <sup>a</sup>	2.85±0.028 <sup>b</sup>
<b>Chlorophylles (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	5.17 ± 0.82 <sup>a</sup>	5.19±0.24 <sup>b</sup>

### II.3.3.2. Comparaison entre macération conventionnelle et assistée par ultrasons

#### a- Comparaison de la composition phytochimique

En vue de voir l'efficacité de l'utilisation des ultrasons dans l'enrichissement de l'huile, une comparaison avec la macération passive a été faite et les résultats sont résumés dans le **tableau XI**.

D'après ces résultats obtenus, on constate que l'utilisation de l'ultrason pour l'extraction des composés bioactifs a augmenté le rendement de l'extraction. En effet, dans le cas des PT, il y a une augmentation de 75% et une légère augmentation a été trouvée avec la macération conventionnelle. La même observation a été faite pour les caroténoïdes et chlorophylles. Néanmoins, pour les flavonoïdes, on remarque qu'il y a une légère augmentation mais sans aucune différence significative entre les deux méthodes.

En comparant entre les deux méthodes d'enrichissement, on conclue que la méthode conventionnelle a donnée moins de rendement dans un temps prolongé (24 heures), alors que celle assistée par ultrasons a été courte avec un rendement important la sonication entraine

une augmentation de transfert de la matière des composés bioactifs de la matrice au solvant (huile) [Jing et al., \(2015\)](#) ; [Li et al., \(2012\)](#) et [Achat et al., \(2012\)](#).

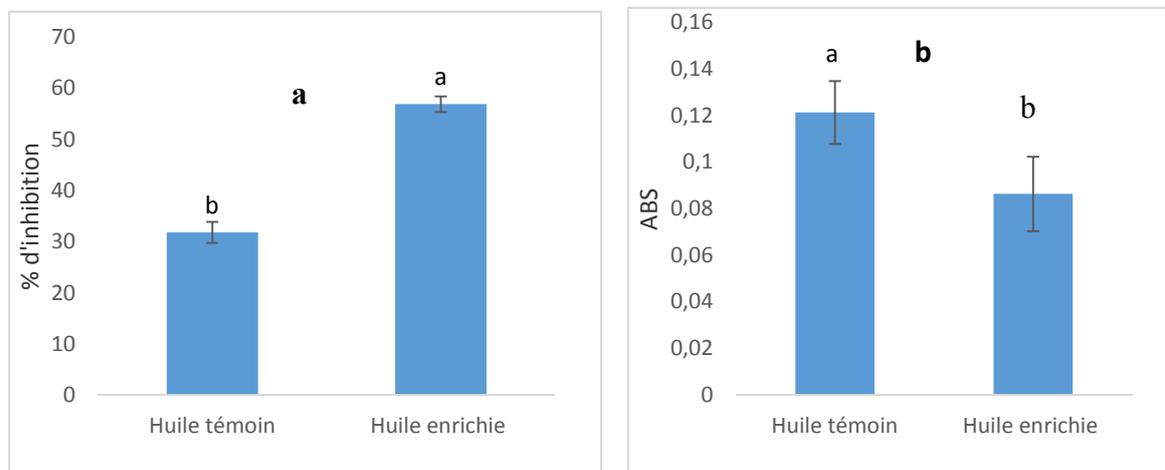
**Tableau XI** . Comparaison entre la méthode conventionnelle et ultrasons

	Témoin	Extraction assisté par ultrason	Extraction liquide- solide par agitation
<b>Temps</b>		20 min	24
<b>Amplitude</b>		75%	
<b>TPC</b>	105±14 <sup>b</sup>	183.90 ± 7.43 <sup>a</sup>	113.18±3.35 <sup>b</sup>
<b>Flavonoïdes</b>	5.58±0.98 <sup>a</sup>	8.49 ± 1.62 <sup>a</sup>	6.08±1.007 <sup>a</sup>
<b>Caroténoïdes</b>	0.99±0.20 <sup>b</sup>	2.85±0.028 <sup>a</sup>	1.16±0.03 <sup>b</sup>
<b>Chlorophylles</b>	0.58±0.38 <sup>bc</sup>	5.19±0.24 <sup>a</sup>	1.86±0.44 <sup>b</sup>

#### **b. Comparaison phytochimique entre macération conventionnelle et assistée par ultrasons**

La Figure 18 représente les résultats de mesure des pourcentages d'inhibition du radical DPPH des deux types d'huile « témoin et enrichie ». Les résultats obtenus avec ce test révèlent que les deux huiles ont des propriétés anti radicalaires et montrent également que le pourcentage d'inhibition du radical libre est meilleur dans le cas de l'huile enrichie. Ce résultat est en accord avec les travaux de [Dairi et al. \(2017\)](#) montrant que l'enrichissement de l'huile par les extraits de myrte améliore son activité antioxydant.

Ces activités pourraient être liées à la richesse de l'extrait par lequel on a enrichi l'huile en polyphénols. Car selon [Turkmen et al. \(2007\)](#), les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique. Ceci suppose que les antioxydants de l'huile et ceux des mures peuvent agir en synergie vis-à-vis des radicaux DPPH ([Dairi et al., 2017](#) ; [Bourgou et al., 2008](#)).



**Figure 18.** Test DPPH (a) et pouvoir réducteur (b) des huiles obtenus par la méthode conventionnelle et ultrasons

Concernant le pouvoir réducteur (figure b), on peut constater qu'il n'y a pas d'amélioration de l'activité réductrice, voir même une diminution par rapport à lui témoin. Dans le récent de travail de [Dairi et al. \(2017\)](#), il a été montré que des effets antagonistes peuvent avoir lieu dans un mélange complexe d'antioxydant et cela dépend aussi de type test utilisé. En effet, dans le test DPPH, une augmentation nette d'activité antioxydante, mais dans le test d'oxydation lipidique avec le système  $Fe^{+3}$ /acide ascorbique, pas d'amélioration de la dite activité. Cela suppose que des complexations entre les molécules antioxydant es peuvent se produire, bloquant ainsi les groupements réducteurs.

### c. Test de stockage accéléré à l'étuve

Afin de voir l'effet de l'enrichissement sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive, un test de stockage accéléré a été réalisé et les résultats sont résumés dans la **Figure 19**.

#### - L'acidité

Ce paramètre d'acidité a pour longtemps été considéré comme un critère de la qualité et de la norme commerciale d'huile d'olive [Judde A. \(2004\)](#). D'après les résultats obtenus au cours de chauffage des huiles étudiées, on constate qu'il y a une certaine stabilité dans l'acidité. En

effet, Le % d'acidité est aux alentours de 2 à 2,3% pour les deux huiles étudiées, ce qui dépasse légèrement les normes fixées par COI (2015) caractérisant l'huile d'olive vierge  $\leq 2\%$ . Ces résultats expliquent que la réaction d'hydrolyse enzymatique ou chimique des chaînes d'acides gras des triglycérides n'a pas eu lieu au cours de ce traitement par chauffage Tanouti et al. (2011).

#### - Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde est un paramètre qui nous renseigne sur l'état d'oxydation de l'huile d'olive particulièrement les produits primaires d'oxydation. D'après la **figure19**, la teneur en peroxyde augmente considérablement avec l'augmentation du temps pour les deux huiles enrichies. Cette augmentation indique que l'huile s'oxyde. L'IP des huiles étudiées dépasse la norme fixées par COI (2015b), une huile d'olive vierge a un (IP  $\leq 20$ meq O<sub>2</sub>/kg). En effet, après un temps de stockage de 8 jours, l'IP dépasse 19 meq O<sub>2</sub>/kg. Une autre information à tirer également, est que l'enrichissement n'a pas présenté un effet additionnel voire protecteur vis-vis d'oxydation. Ce résultat est en accord avec celui d'Ayadi et al. (2009) qui ont étudié l'aromatisation de l'huile d'olive avec différentes plantes, et ont montré que le taux d'amélioration de la stabilité thermique dépend du type de la matière végétale incorporée.

La chaleur est l'un des facteurs l'oxydation des huiles (Dairi et al., 2014). Et cette augmentation rapide d'IP pourrait être expliquée par le fait que l'huile de départ présentait une acidité élevée.

#### -Les coefficients d'extinctions spécifique K<sub>232</sub> et K<sub>270</sub>

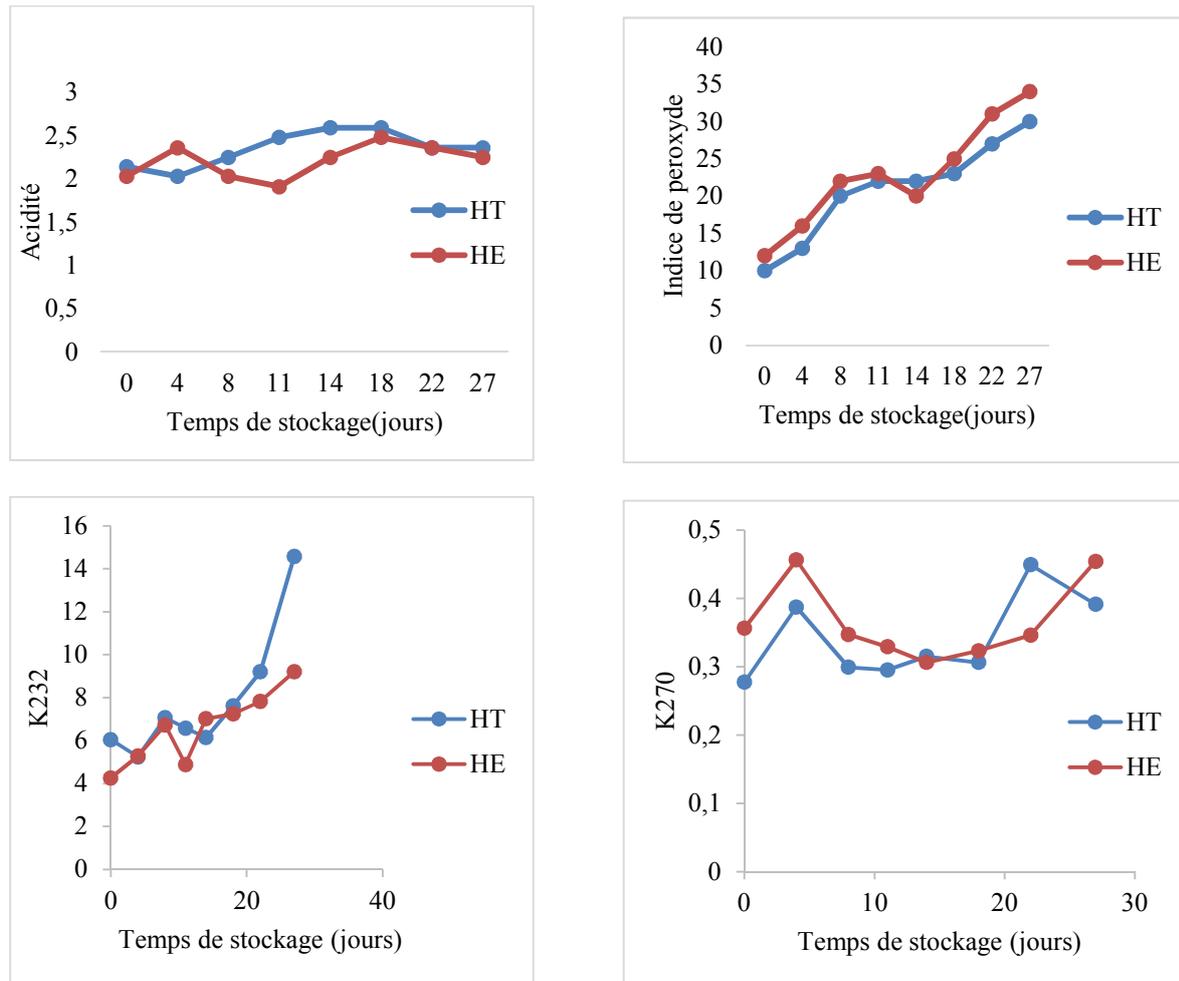
Les K<sub>232</sub> et k<sub>270</sub> nous renseigne sur les diènes et triènes conjugués et les composés carbonyles respectivement. Les valeurs maximum retenus pour les huiles d'olive vierges sont  $\geq 2.6$  et  $\geq 0.25$  (COI, 215). Ces coefficients nous renseignent également sur les produits d'oxydation primaires et secondaires respectivement.

On remarque que les valeurs de k<sub>232</sub> et k<sub>270</sub> des huiles non chauffées sont supérieures aux limites fixées par COI (2015). Cela décline ces huiles autant qu'huiles d'olive vierges.

Selon la **figure19**, on constate qu'il y a une évolution lente et progressive des valeurs de K<sub>232</sub> pour les deux huiles étudiées. Une nette différence de K<sub>232</sub> est observée après 24 jours de stockage donnant des valeurs de 14 et 8 pour l'huile témoin et enrichie respectivement. Cette

différence signifie que l'huile enrichie a un effet positif sur la diminution de la formation des dienes conjugués.

Concernant les  $K_{270}$  (Figure 4d), on constate globalement qu'il y a une légère augmentation des valeurs  $K_{270}$  pendant le stockage.



**Figure 19.** Test de chauffage accéléré des huiles d'olives témoins et enrichies.

## Conclusion

Ce présent travail montre que le modèle Box behenken utilisé dans l'optimisation de l'enrichissement assisté par ultrasons est valide, et les conditions optimales (le temps 20 minute et l'amplitude 75 %) nous ont permis d'avoir une huile plus riche en composés bioactives à savoir PT, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles par rapport à l'huile obtenue par macération et l'huile témoin.

En effet, sous ces condition, les PT sont estimés à 183,90 mg /Kg d'huile, une augmentation avec 75 % par apport a celle de l'huile témoin (105 mg EAG /kg), de même pour la teneur en flavonoïdes qui est passé de 5,58 à 8,49 mg /kg d'huile (+ 52%), les caroténoïdes de 0,99 à 2,85 mg /kg d'huile (+ 187%) et pour les chlorophylles de 0,58 à 5,19mg /kg d'huile ,une augmentation très importante avec 794% par apport au témoin.

Ces résultats nous a permis de conclure que l'incorporation de la poudre des mûres sauvage dans l'huile d'olive a relativement aidé à améliorer sa composition en antioxydants. De plus, l'huile enrichie présente une activité anti radicalaire vis-à-vis du radical DPPH plus importante que l'huile témoin. Le test de stabilité thermique montre un léger effet positif sur la réduction de la formation des diènes conjugués ( $K_{232}$ ). Par conséquent, cette huile produite peut constituer un potentiel aliment fonctionnel de par sa riche composition. En perspective, il serait très intéressant d'analyser et de caractériser les polyphénols et caroténoïdes présent dans l'huile enrichie, et bien sûr d'évaluer également la biodisponibilité aussi bien des composés endogènes et exogènes des substances bioactives de l'huile enrichie. L'utilisation de test d'évaluation d'activité antioxydante in vivo également permettrait de mieux appréhender la qualité nutritionnelle de ce produit..

**Références bibliographiques**

- Abaza, L., Msallem, M., Daoud, D., & Zarrouk, M.** (2002). Caractérisation des huiles de sept variétés d'olivier tunisiennes. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 9(2), 174-179.
- Achat, S., Tomao, V., Madani, K., Chibane, M., Elmaataoui, M., Dangles, O., & Chemat, F.** (2012). Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonic sonochemistry*, 19(4), 777-786.
- Awad, A. B., & Fink, C. S.** (2000). Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 130(9), 2127-2130
- Awad, M. R., El-Gamel, A., Hasleton, P., Turner, D. M., Sinnott, P. J., & Hutchinson, I. V.** (1998). Genotypic variation in the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene: association with transforming growth factor- $\beta$ 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*, 66(8), 1014-1020
- Ayadi, M. A., Grati-Kamoun, N., & Attia, H.** (2009). Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and chemical toxicology*, 47(10), 2613-2619.
- Azadmard-Damirchi, S.** (2007). Olive Oil Phytosterols, Tracing of Adulteration with Hazelnut Oil and Chemical Interesterification.
- Benlemlih, M., & Ghanam, J.** (2012). Polyphénols d'huile d'olive, trésors santé. *Macro-pietteur éd., Embourg (Belgique)*.
- Boskou, D.** (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Science Technology*, 17, 505-512.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., & Sayadi, S.** (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108(1), 253-262.
- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., & Marzouk, B.** (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 48-55.

- Bravi, E., Perretti, G., Falconi, C., Marconi, O., & Fantozzi, P.** (2017). Antioxidant effects of supercritical fluid garlic extracts in sunflower oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 102-107.
- Bruzzese, E., Mahr, F., & Faithfull, I.** (2000). Best practice management guide for environmental weeds: Blackberry, *Rubusfruticosus* aggregate. *The Cooperative Research Centre for Weed Management Systems: Australia*. Retrieved May, 20(2012), 1-6.
- Caponio, F., Durante, V., Varva, G., Silletti, R., Previtali, M. A., Viggiani, I., ... & Baiano, A.** (2016). Effect of infusion of spices into the oil vs. combined malaxation of olive paste and spices on quality of naturally flavoured virgin olive oils. *Food chemistry*, 202, 221-228.
- Chanforan, C.** (2010, September). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Avignon.
- Chimi, H.** (2006). Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Bulletin mensuel d'information et de liaison de PNNTA: Maroc*, (141), 1-4 .
- Choi, M. H., Kim, G. H., & Lee, H. S.** (2002). Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35(8), 753-759.
- Clodoveo, M. L., Dipalmo, T., Crupi, P., Durante, V., Pesce, V., Maiellaro, I., ... & Franchini, C.** (2016). Comparison Between Different Flavored Olive Oil Production Techniques: Healthy Value and Process Efficiency. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 81-87.
- Conseil Oléicole International .** (2015). Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de Grignons d'olive. COI/T.15/NC n°3/R2V.8
- Covas, M. I., Konstantinidou, V., & Fitó, M.** (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 54(6), 477-482.
- Dairi, S., Madani, K., Aoun, M., Him, J. L. K., Bron, P., Lauret, C., ... & Carbonneau, M. A.** (2014). Antioxidative properties and ability of phenolic compounds of *Myrtus*

communis leaves to counteract in vitro LDL and phospholipid aqueous dispersion oxidation. *Journal of food science*, 79(7), C1260-C1270.

**Dairi, S., Galeano-Díaz, T., Acedo-Valenzuela, M. I., Godoy-Caballero, M. P., Dahmoune, F., Remini, H., & Madani, K.** (2015). Monitoring oxidative stability and phenolic compounds composition of myrtle-enriched extra virgin olive during heating treatment by flame, oven and microwave using reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME)-HPLC-DAD-FLD method. *Industrial Crops and Products*, 65, 303-314.

**Dairi, S., Carbonneau, M. A., Galeano-Dias, T., Remini, H., Dahmoune, F., Aoun, O., ... & Madani, K.** (2017). Antioxidant effects of extra virgin olive oil enriched by myrtle phenolic extracts on iron-mediated lipid peroxidation under intestinal conditions model. *Food Chemistry*.

**de Ancos, B., González, E. M., & Cano, M. P.** (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10), 4565-4570.

**Delfanian, M., EsmaeilzadehKenari, R., & Sahari, M. A.** (2015). Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.) skin and pulp extracts. *Food science & nutrition*, 3(3), 179-187.

**Delgado-Adámez, J., Baltasar, M. N. F., Yuste, M. C. A., & Martín-Vertedor, D.** (2014). Oxidative stability, phenolic compounds and antioxidant potential of a virgin olive oil enriched with natural bioactive compounds. *Journal of oleo science*, 63(1), 55-65.

**Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O.** (2002). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. CRC Press.

**de Valle-Prieto, M. B., Delgado-Adámez, J., Gil, M. V., Martillanes, S., Franco, M. N., & Martín-Vertedor, D.** (2017). Virgin Olive Oil Enriched with Lutein-Zeaxanthin from *Spinaciaoleracea*. *Journal of Oleo Science*, 66(5), 463-468.

**Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M.** (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial

interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.

**Fedala, N. N., el Mahdi Haddam, A., Chentli, F., Youcef, R. S., & Kalafat, N.** (2014). Adrenal Hematoma: A Report of Three Cases. *Journal of endocrinology and diabetes mellitus*, 2(3), 117-121

**Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J.** (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373.

**Gandul-Rojas, B., & Minguéz-Mosquera, M. I.** (1996). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(1), 31-39.

**Ghedira, K.** (2008). L'olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89.

**Gharbi, I., Issaoui, M., Mehri, S., Cheraief, I., Sifi, S., & Hammami, M.** (2015). Agronomic and technological factors affecting tunisian olive oil quality. *Agricultural Sciences*, 6(05), 513.

**Gharby, S., Harhar, H., Bouzoubaa, Z., Roudani, A., Chafchaoui, I., Kartah, B., & Charrouf, Z.** (2014). Effet des Polyphénols extraits des margines sur la stabilité de l'huile de tournesol (Effect of Polyphenols extracts from margins on the stability of sunflower oil). *J. Mater. Environ. Sci*, 5(2), 464-469.

**Grigoraş, C. G.** (2012). *Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).

**Gutiérrez, K. D., Baquedano-López, P., & Tejada, C.** (1999). Rethinking diversity: Hybridity and hybrid language practices in the third space. *Mind, culture, and activity*, 6(4), 286-303

**Haddam, M., Chimi, H., & Amine, A.** (2014). Formulation d'une huile d'olive de bonne qualité. *OCL*, 21(5), D507.

- Isérin, P., Masson, M., & Kedellini, J. P.** (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Identifications, Préparations. *Soins*.
- Inarejos-García A.M., Fregapane G. & Salvador M.D.** (2011). Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *Eur Food Res Technol.*, 232, 441–451.
- Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S. C.** (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3389-3393.
- Jing, C. L., Dong, X. F., & Tong, J. M.** (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from Alfalfa using response surface method. *Molecules*, 20(9), 15550-15571.
- Kalantzakis, G., Blekas, G., Pegklidou, K., & Boskou, D.** (2006). Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 329-335.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K.** (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100(1), 273-286..
- Kataja-Tuomola, M., Sundell, J. R., Männistö, S., Virtanen, M. J., Kontto, J., Albanes, D., & Virtamo, J.** (2008). Effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplementation on the incidence of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51(1), 47-53.
- Katsoyannos, E., Batrinou, A., Chatzilazarou, A., Bratakos, S. M., Stamatopoulos, K., & Sinanoglou, V. J.** (2015). Quality parameters of olive oil from stoned and nonstoned Koroneiki and Megaritiki Greek olive varieties at different maturity levels. *Grasas y Aceites*, 66(1), 067.
- Khoudali, S., Benmessaoud, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., & Azzi, M.** (2014). Etude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5(3), 887-898.

- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J.** (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 344-352.
- Lizzerini, C., & Domenici, V.** (2017). Pigments in Extra-Virgin Olive Oils Produced in Tuscany (Italy) in Different Years. *Foods*, 6(4), 25.
- Le Man, H., Behera, S. K., & Park, H. S.** (2010). Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(1), 157-164.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E.** (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 88(5), 1269-1278.
- Lim, T. K.** (2012). *Edible medicinal and non-medicinal plants* (Vol. 1, pp. 656-687). New York, NY, USA:: Springer.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Tomao, V., Cravotto, G., & Chemat, F.** (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonic sonochemistry*, 20(1), 12-18.
- Mai, D. S.** (2015). Study on the extraction of polyphenol from *Artocarpus altilis* with ultrasonic wave technology optimized by central composite design-response surface method. *J. Food Nutr. Sci*, 3, 1-2.
- Manai-Djebali, H., Krichène, D., Ouni, Y., Gallardo, L., Sánchez, J., Osorio, E., ... & Zarrouk, M.** (2012). Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(2), 109-119.
- Manna, C., D'Angelo, S., Migliardi, V., Loffredi, E., Mazzoni, O., Morrica, P., ... & Zappia, V.** (2002). Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(22), 6521-6526.
- Marinova, D., & Ribarova, F.** (2007). HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and analysis*, 20(5), 370-374.

- Meziti,A ., Bouriche,H., Meziti,H., Kada,S., Senator, A., Dimertas,I.**(2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *rubus fruticosus* an *zizyphus vulgaris* methanol extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **9(2)**, 69-76.
- Miguel, M. G., Antunes, M. D., Rohaim, A., Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., &Barroso, J. G.** (2014). Stability of fried olive and sunflower oils enriched with *Thymbracapitata* essential oil. *Czech Journal of Food Sciences*, **32**, 102-108.
- Mitic, V., Jovanovic, V. S., Dimitrijevic, M., Cvetkovic, J., Simonovic, S., &Mandic, S. N.** (2014). Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia. *Fruits*, **69(5)**, 413-422.
- Oyaizu, M.** (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307–315
- Peñalvo, G. C., Robledo, V. R., Callado, C. S. C., Santander-Ortega, M. J., Castro-Vázquez, L., Lozano, M. V., & Arroyo-Jiménez, M. M.** (2016). Improving green enrichment of virgin olive oil by oregano. Effects on antioxidants. *Food chemistry*, **197**, 509-515.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., &Chemat, F.** (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. *Food control*, **31(2)**, 593-606.
- Radovanović, B. C., Anđelković, S. M., Radovanović, A. B., &Anđelković, M. Z.** (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **12(5)**, 813-819.
- Ran, J.** (2014). *Comparison of chemical quality standards for New Zealand extra virgin olive oil: a thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Food Technology at Massey University, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).
- Reboredo-Rodríguez, P., Figueiredo-González, M., González-Barreiro, C., Simal-Gándara, J., Salvador, M. D., Cancho-Grande, B., & Fregapane, G.** (2017). State of the art on functional virgin olive oils enriched with bioactive compounds and their properties. *International journal of molecular sciences*, **18(3)**, 668.

**Rubió, L., Motilva, M. J., Macià, A., Ramo, T., & Romero, M. P.** (2012). Development of a phenol-enriched olive oil with both its own phenolic compounds and complementary phenols from thyme. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(12), 3105-3112.

**Rouas, S., Rahmani, M., El Antari, A., Idrissi, D. J., Souizi, A., & Maata, N.** (2016). Effect of geographical conditions (altitude and pedology) and age of olive plantations on the typicality of olive oil in Moulay Driss Zarhoun. *Mediterranean Journal of Biosciences*, 1(3), 128-137.

**Rupani, B., Gadre, R., Kodam, K., & Najafpour, G. D.** (2013). Enrichment of Olive Oil with Alpha Linolenic Acid Catalyzed by Lipase Mediated Trans-Esterification.

**Ryu, J., Kwon, S. J., Jo, Y. D., Jin, C. H., Nam, B. M., Lee, S. Y., ... & Ha, B. K.** (2016). Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activity in Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Fruits of Mutant Lines at the Different Harvest Time. *Plant Breeding and Biotechnology*, 4(2), 242-251.

**Salomone, R., Cappelletti, G. M., Malandrino, O., Mistretta, M., Neri, E., Nicoletti, G. M., ... & Saija, G.** (2015). Life Cycle Assessment in the Olive Oil Sector. In *Life Cycle Assessment in the Agri-food Sector* (pp. 57-121). Springer International Publishing.

**Samaniego-Sánchez, C., Quesada-Granados, J. J., de la Serrana, H. L. G., & López-Martínez, M. C.** (2010).  $\beta$ -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *Journal of food composition and analysis*, 23(7), 671-676.

**Šamec, D., & Piljac-Žegarac, J.** (2011). Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures—Comparison with blackberries, white and red grapes. *Scientia horticulturae*, 131, 15-21.

**Sánchez de Medina, V., Priego-Capote, F., Jiménez-Ot, C., & Luque de Castro, M. D.** (2011). Quality and stability of edible oils enriched with hydrophilic antioxidants from the olive tree: The role of enrichment extracts and lipid composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(21), 11432-11441.

**Šarolić, M., Gugić, M., Marijanović, Z., & Šuste, M.** (2014). Virgin olive oil and nutrition. *HRANA U ZDRAVLJU I BOLESTI*, 3(1), 38-43.

- Segantini, D. M., Falagán, N., Leonel, S., Modesto, J. H., Takata, W. H. S., & Artés, F.** (2015). Chemical quality parameters and bioactive compound content of brazilian berries. *Food Science* .
- Sellappan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G.** (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2432-2438.
- Serra Bonvehí, J., Soliva Torrentó, M., & Centelles Lorente, E.** (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in spain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1848-1853.
- Servili, M.** (2014). The phenolic compounds: a commercial argument in the economic war to come on the quality of olive oil?. *Ocl*, 21(5), D509.
- Siddhuraju, P., & Becker, K.** (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-19.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J.** (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24673-24706.
- Sousa, A., Casal, S., Malheiro, R., Lamas, H., Bento, A., & Pereira, J. A.** (2015). Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 22-28.
- Stajčić, S. M., Tepić, A. N., Đilas, S. M., Šumić, Z. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Ćetković, G. S., ... & Tumbas, V. T.** (2012). Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits. *Acta Periodica Technologica*, (43), 93-105.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., León, L., De la Rosa, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A.** (2016). From olive fruits to olive oil: Phenolic compound transfer in six different olive cultivars grown under the same agronomical conditions. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 337.

**Tan, M. C., Tan, C. P., & Ho, C. W.** (2013). Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *International Food Research Journal*, 20(6), 3117-3123.

**Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M.** (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*, 18(01), 98-112.

**Turemis, N., Kafkas, E., Kafkas, S., Kurkcuoglu, M., & Baser, K. H. C.** (2003). Determination of aroma compounds in blackberry by GC/MS analysis. *Chemistry of natural compounds*, 39(2), 174-176.

**Turkmen, N., Velioglu, Y. S., Sari, F., & Polat, G.** (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.

**USDA National Nutrient Data Base.** (2016). Available online:

<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2161>.

**Veillet, S.** (2010). *Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive: entre tradition et innovation* (Doctoral dissertation, université d'Avignon).

**Veillet, S., Tomao, V., & Chemat, F.** (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), 905-911.

**Viola, P., & Viola, M.** (2009). Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector. *Clinics in dermatology*, 27(2), 159-165.

**Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., De Feo, V., Jaafar, H. Z., & Moga, M.** (2014). *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*, 19(8), 10998-11029.





# *Annexes*

***Les appareils la verrerie et les réactifs utilisés***

<b>Les appareils</b>	<b>La verrerie</b>	<b>Les réactifs</b>
Bain marie (MEMMERT)	Ballon à fond plat	Acide acétique
Balance de précision (WPS 600/C/2)	Bécher	Amidon
Centrifugeuse (ALC CENTRIFUGETTE 4206)	Burette graduée	Carbonate de sodium
Etuve ventilée (BINDER)	Cuve en verre et en quartz	Chloroforme
Micro-onde domestique	Eprouvette graduée	Chlorure d'aluminium à 2%
Micropipettes	Fioles de jaugée	Cyclohexane
PH métré	Pipettes graduée	DPPH
Plaque agitatrice	Tube à essai	Ethanol
Spectrophotomètre		Folin –Ciocalteu 1/10
Vortex (VELP Scientifique)		Hexane
		Méthanol
		KOH.
		NaCL ; NaOH
		Tétrachlorure de carbone
		Thiosulfate de sodium
		Phénol phtaléine
		Phosphate de sodium

## **Résumé**

L'élaboration d'une huile d'olive fonctionnel a gagné ces dix dernières années un grand d'intérêt en utilisant des matières végétales. Dans cette perspective, l'objectif de notre travail consiste à optimiser un procédé d'enrichissement assisté par ultrasons de l'huile d'olive avec les mures sauvages en utilisant le modèle box behenken. Les deux facteurs étudiés sont le temps et l'amplitude. Les résultats ont montré que les deux facteurs étudiés ont une influence sur l'extraction des polyphénols totaux, flavonoides, caroténoïdes et chlorophylles. Les conditions optimales sont obtenues avec un temps de 20 min et une amplitude de 100%. La macération conventionnelle montre un faible rendement par rapport à celui assisté par ultrasons. De plus, l'huile d'olive enrichie possède une composition plus riche en antioxydants, des activités anti oxydantes meilleures également. Concernant la stabilité thermique, il n'y a pas un effet nettement significatif. Par conséquent, l'huile d'olive enrichie avec les mures peut constituer un aliment fonctionnel pouvant avoir un effet bénéfique sur la santé.

## **Abstract**

The development of a functional olive oil has gained great interest in the last ten years using vegetable materials. In this perspective, the objective of our work is to optimize an ultrasonic assisted enrichment process of olive oil with wild mures using the box behenken model. The two factors studied are time and amplitude. The results showed that the two factors studied influence the extraction of total polyphenols, flavonoids, carotenoids and chlorophylls. The optimum conditions are obtained with a time of 20 min and an amplitude of 100%. Conventional maceration shows a low yield compared to that assisted by ultrasound. In addition, the enriched olive oil has a richer antioxidant composition, better antioxidant activities as well. Regarding the thermal stability, there is not a significant effect. Consequently, olive oil enriched with mures may constitute a functional food that may have a beneficial effect on health