

Effets des chlorophylles, du bêta-carotène, de l'alphatocophérol, du tyrosol et de leurs interactions sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive tunisienne

Imène BEN TEKAYA¹
Mnasser HASSOUNA²

¹ Institut National Agronomique de Tunisie (INAT),

43, Avenue Charles Nicolle 1082 Tunis

Mahrajène – Tunisie

<ibentekaya@yahoo.fr>

² École Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis (ESIAT),

58, Avenue Alain Savary 1003 El Khadra Tunis, Tunisie

Abstract: Chlorophylls *a* and *b*, beta-carotene, alpha-tocopherol, tyrosol and their interactions effects on Tunisian extra virgin olive oil (EVOO) were studied. Beta-carotene, used at a level of 7 ppm, has an antioxidant effect more important at light than at obscurity. Chlorophyll *a* and *b* accelerate significantly the olive oil photooxidation, with a more important effect of chlorophyll *b*. When one or else of these chlorophylls is added with beta-carotene to oil, the global effect on peroxide value is attenuated. Both of alpha-tocopherol (0, 50, 100, 200, 400 ppm) and tyrosol (0, 5, 10, 20, 40 ppm) addition improved purified olive oil stability. On the other hand, alpha-tocopherol addition in EVOO has not significantly modified its oxidative stability, whereas that of tyrosol was very efficient. A factorial plane using three factors, beta-carotene (4 ppm), alpha-tocopherol (200 ppm) and tyrosol (50 ppm) is studied on EVOO and on purified olive oil. The results are different due to presence of various minor compounds on EVOO.

Key words: olive oil, oxidative stability, chlorophyll, beta-carotene, alpha-tocopherol, tyrosol, antioxidant

Introduction

Outre sa richesse en lipides, l'huile d'olive contient des composés mineurs qui lui confèrent ses qualités organoleptiques et nutritionnelles [1, 2]. Par ailleurs, ces composés ont des effets notables sur la stabilité de ce produit au cours de son stockage [3-17].

Les chlorophylles *a* et *b* et leurs produits immédiats de dégradation, phéophytines *a* et *b*, sont des photosensibilisateurs. En présence de lumière, ces pigments passent de leur état singulet fondamental à un état singulet excité puis à un état triplet excité métastable. Les pigments ont alors tendance à revenir à l'état singulet fondamental en transformant l'oxygène atmosphérique (³O₂) en oxygène singulet très réactif (¹O₂). Ce dernier réagit directement sur les acides gras insaturés de l'huile en donnant des hydroperoxydes très instables qui peuvent se décomposer pour donner des composés volatils à faible poids moléculaire qui sont à l'origine du rancissement de l'huile d'olive vierge. En revanche, le bêta-carotène agit comme protecteur en désactivant l'oxygène singulet produit par les chlorophylles [18]. Il est suggéré, en outre, que le bêta-carotène aurait pour rôle de filtrer les longueurs d'onde actives des radiations lumineuses en protégeant ainsi l'huile contre l'activation de l'oxygène par la lumière [19]. Kiritsakis et Osman [10] ont montré que l'effet du bêta-carotène diminue progressivement au cours de l'exposition de l'huile à la lumière. Les pigments caroténoïdes sont facilement dégradés en présence de la lumière et de températures élevées [20, 21]. Les travaux de Steenson et Min [22] effectués sur l'huile de soja ont montré que les produits de dégradation thermique du bêta-carotène agissent comme prooxydants à l'obscurité alors qu'ils n'ont pas d'effet significatif à la lumière. Peu d'études, à notre connaissance, ont été effectuées sur le rôle joué par le bêta-carotène sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive conservée à l'obscurité.

Outre le bêta-carotène, l'alphatocophérol, qui est le tocophérol prédominant dans l'huile d'olive (90-100 %), montre un effet inhibiteur de l'auto- et la photo-oxydation, aussi bien des systèmes modèles que de l'huile d'olive. À l'obscurité, l'alphatocophérol interrompt la réaction en chaîne du processus radicalaire en agissant avec les radicaux hydroperoxydes par transfert d'hydrogène avec formation d'hydroperoxydes et de radicaux aryloxydes qui se couplent avec d'autres radicaux hydroperoxydes, dans une réaction de terminaison, pour former des produits non radicalaires [23]. L'association alphas-tocophérol/bêta-carotène semble être moins efficace que l'alphatocophérol seul pour inhiber ces réactions [24]. En outre, l'action de l'alphatocophérol ne devient effective dans l'huile d'olive que lorsque la fraction phénolique polaire est réduite et que les produits primaires d'oxydation ont atteint un certain seuil. Une activité légèrement prooxydante de ce composé a également été enregistrée dans les premiers stades de l'auto-oxydation de l'huile d'olive, dépendant de sa concentration [5, 7, 24, 25]. À la lumière, l'alphatocophérol agit par une désactivation de l'oxygène singulet à l'oxygène atmosphérique mais aussi par une réaction chimique avec lui pour former des produits de dégradation tels que les quinones tocophéroliques et les époxydes de quinones. Par ailleurs, à la lumière, l' α -tocophérol montre un effet synergiste avec le bêta-carotène. [18, 19, 24]. L'huile d'olive est, par ailleurs, pourvue de certains composés phénoliques (hydroxy-

Article reçu le 9 décembre 2005
accepté le 6 décembre 2006

FONDAMENTAL

tyrosol, tyrosol...) qui lui confèrent son goût particulier et contribuent à sa stabilité. Plusieurs études ont été conduites sur la stabilité oxydative des huiles d'olive additionnées d'antioxydants phénoliques entreposées à des températures élevées (50-80 °C) et à l'obscurité [14, 26-29]. Chimi et al. [6, 29] ont montré que l'hydroxytyrosol se comporte comme le meilleur antioxydant comparé à l'acide caféique, l'oleuropéine et le tyrosol. Le BHT, qui est un antioxygène synthétique, s'avère être plus efficace que l'oleuropéine et le tyrosol mais moins efficace que l'acide caféique et l'hydroxytyrosol. D'une manière générale, les orthodiphénols (hydroxytyrosol, acide caféique et oleuropéine) sont plus efficaces que les monophénols (tyrosol). En outre, Hartzallah et Kiritsakis [26] ont comparé l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'olivier à celle d'antioxydants synthétiques. L'ordre établi est le suivant : extrait phénolique du fruit de l'olivier > extrait phénolique de la feuille de l'olivier > BHT > BHA.

Compte tenu de ce qui précède, l'objectif de la présente étude, s'inscrivant dans le cadre d'investigations antérieures effectuées sur la stabilité oxydative des huiles d'olive vierges extra tunisiennes [3], a été d'étudier les effets de l'addition de certains composés mineurs (chlorophylles *a* et *b*, bêta-carotène, alphatocophérol et tyrosol) et de leurs interactions sur la stabilité oxydative des huiles d'olive tunisiennes vierges extra et purifiées, au cours de leur stockage dans différentes conditions (lumière, obscurité, étuvage). Cette étude, a été réalisée afin de comprendre l'activité antioxydante de certains composés natifs (bêta-carotène, chlorophylles *a* et *b*, alphatocophérol, tyrosol) de l'huile d'olive vierge.

Matériel et méthodes

L'étude a porté sur des huiles d'olive vierges extra (HOVE) de la variété *Chétoui* des campagnes oléicoles 2001/2002 et 2002/2003, obtenues par un système d'extraction continue à trois phases, qui consiste en une centrifugation double nécessitant un ajout d'eau de façon à obtenir séparément l'huile, l'eau de végétation (margine) et le grignon, et prélevées à partir d'une huilerie située au Nord-Est de la Tunisie, choisie sur la base de la qualité et de la régularité des huiles extraites.

Purification de l'huile d'olive vierge

La purification des huiles d'olive vierges extra a été réalisée à l'aide d'une terre décolorante *Tonsil* ajoutée à une teneur de 2 %. L'agitation a été conduite à 30 °C [10] pendant 5 à 10 min. Par la suite, l'échantillon d'huile a été centrifugé à 4000 tours/min pendant 5 min.

Traitement des échantillons

Le bêta-carotène (Fluka), la chlorophylle *a* (Fluka) et l'alphatocophérol (Fluka) ont été dissous dans le cyclohexane, alors que le 4-hydroxyphényléthanol (tyrosol) (Fluka) a été dissous dans le méthanol. Un mL de chaque solution a été ajouté et mélangé par agitation à des échantillons de 50 g d'huile d'olive purifiée, conditionnés dans des flacons en verre de 90 ml fermés par des bouchons à vis, de telle manière à obtenir les quatre gammes de concentrations finales suivantes : (i) 1, 2, 3, 4 et 8 ppm (bêta-carotène), (ii) 1,6, 3,2, 4,8 et 6,4 ppm (chlorophylle *a*), (iii) 50, 100, 200 et 400 ppm (alphatocophérol) et finalement (iv) 5, 10, 20 et 40 ppm (tyrosol). Les échantillons d'huile purifiée témoins ont été préparés sans ajouts d'additifs. Tous les échantillons d'huile enrichis en bêta-carotène et en chlorophylle *a* ont été placés à 35 cm d'une source lumineuse (lampe de 250 Watt) à 45 ± 2 °C, enveloppés par du papier aluminium pour créer l'obscurité ou exposés directement à la lumière artificielle. Les prélèvements ont été effectués toutes les 4 h pendant 32 h. La source de radiation a été éteinte au moment de l'échantillonnage et les échantillons ont été rangés de nouveau à leur place après chaque échantillonnage. Tous les échantillons additionnés d'alphatoco-

phérol et de tyrosol ont été étuvés à 40 °C à l'obscurité. Les prélèvements ont été réalisés tous les 3 jours pendant 33 jours. Parallèlement, dans les mêmes conditions opératoires, une étude complémentaire a été réalisée sur une HOVE (huile T) non purifiée, contenant tous ces composés mineurs.

Afin d'étudier les effets des chlorophylles *a* et *b* (Fluka), du bêta-carotène, de l'alphatocophérol, du tyrosol et de leurs interactions sur la stabilité de l'huile d'olive et de les comparer à ceux de certains antioxydants synthétiques, nous avons réalisé trois plans factoriels (3 facteurs) complets à deux niveaux suivant l'ordre classique [30] (tableau 1). Le choix des niveaux hauts a été fixé en se basant, d'une part, sur les résultats des essais préliminaires réalisés, en tenant compte des teneurs moyennes trouvées dans les HOVE tunisiennes [3] et, d'autre part, sur les doses maximales des additifs (alphatocophérol) autorisées pour les huiles raffinées [31, 32].

Les effets calculés suite aux réponses trouvées pour les différents plans d'expériences sont considérés significatifs, à $p < 0,05$, lorsque leur valeur absolue est supérieure à deux fois l'erreur-type (e). La représentation graphique de l'effet (qui est calculé sur la moyenne de deux mesures) divisé par deux fois l'erreur-type « $effet/(2e)$ » a alors été effectuée pour chaque facteur afin de faciliter la lecture des résultats. Ainsi, lorsque $|effet/(2e)| > 1$, l'effet est considéré comme significatif.

L'erreur-type est déterminée comme décrit par Goupy [30]. Après calcul de la variance à chaque essai du plan, nous déterminons la variance moyenne des réponses, l'erreur-type sur un effet est alors calculée grâce à la relation suivante :

$$e = \sqrt{\frac{s_y^2}{n}}$$

Où e représente l'erreur-type sur l'effet ;

s_y^2 représente la variance moyenne des réponses ;

n est le nombre total d'essais du plan (en tenant compte de la duplication du plan), soit 16 dans notre cas.

Les échantillons du plan 1 ont été placés sous la source lumineuse, enveloppés ou non de papier aluminium. Les prélèvements ont été effectués toutes les 4 h pendant 16 h, et après 32 h. La détermination de l'indice de peroxyde (IP) a été effectuée pour tous les prélèvements. Les échantillons du plan 2 ont été soumis directement au test Rancimat à 90 °C.

Afin de récapituler et synthétiser les résultats du plan 1, ceux-ci ont été traités par un plan complet 2^5 puis modélisés. En supposant que les k facteurs de l'étude sont quantitatifs continus et que la réponse est elle-même continue, le modèle mathématique réel associé est continu et peut être approché par un polynôme du type suivant [33] :

$$y = I + E_1x_1 + E_2x_2 + \dots + E_kx_k + \dots + E_{ik}x_ix_k$$

Où y est la réponse en unités usuelles ;

I est la moyenne des réponses en unités usuelles ;

E_i est l'effet du facteur i en unités usuelles ;

x_i est le niveau du facteur i en valeurs centrées réduites.

Tableau 1. Niveaux hauts et bas des différents facteurs (ppm) des plans d'expériences étudiés.

Niveaux	Plan 1			Plan 2		
	bêta-car	chl a	chl b	bêta-car	alpha-toc	tyr
Bas	0	0	0	0	0	0
Haut	7	3	3	4	200	50

bêta-car : bêta-carotène ; chl a : chlorophylle *a* ; chl b : chlorophylle *b* ; alpha-toc : alphatocophérol ; tyr : tyrosol.

Pour l'interprétation, nous avons aussi appliqué la formule de changement de variables suivante :

$$x = \frac{X - \bar{X}}{p}$$

Où x est le niveau du facteur en valeurs centrées réduites ;

X est le niveau du facteur en valeurs usuelles ;

\bar{X} est le niveau du point central, soit la moyenne, en valeurs usuelles ;

$p = (X_+ - X_-) / 2$ est le pas de variation, X_+ étant le niveau haut du facteur et X_- le niveau bas du facteur en valeurs usuelles.

Analyses physico-chimiques

Le processus d'oxydation des huiles étudiées a été suivi par les déterminations de l'indice de peroxyde (IP) [34], du coefficient d'extinction spécifique des produits secondaires tels que les dicétones dans l'ultraviolet à 270 nm (K_{270}) [35] à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1201 et du temps d'induction (h) au test Rancimat [36] (Rancimat Metrohm 743). Les conditions opératoires du test Rancimat ont alors été les suivantes : une prise d'essai de 3 g, un débit d'air de 20 L/h et une température de 90 °C. Par ailleurs, nous avons mesuré l'acidité libre [37], exprimée en pourcentage d'acide oléique, les taux de chlorophylles totales [38] et de bêta-carotène [39] à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1201 et la teneur en phénols totaux par la méthode de Folin à 725 nm [28], exprimée en tyrosol (ppm). Les teneurs en hydroxytyrosol et en tyrosol ont été déterminées par chromatographie liquide-haute performance (CLHP) selon la méthode décrite par Cortesi *et al.* [40] à l'aide d'un chromatographe HP séries 1100 équipé d'un détecteur UV réglé à 280 nm et d'une colonne ODS C18 à phase inverse de 25 cm de longueur et de 4,6 mm de diamètre interne. Le débit est réglé à 1 mL/min et la température à 21 °C. Les solvants d'élution sont composés d'un solvant A, mélange eau/acide acétique (99,5/0,5 ; v/v), et d'un solvant B, l'acétonitrile (A/B ; 90/10 ; v/v). L'étalon interne utilisé, l'acide syringique à raison de 1,9 mg/100 mL, est préparé dans un mélange méthanol/eau (80/20 ; v/v). L'extraction des phénols a été effectuée à l'aide d'une solution méthanol/eau (80/20 ; v/v). L'alphatocophérol a été dosé par la méthode CLHP à détection fluorimétrique [41] à l'aide d'un chromatographe HP séries 1100 équipé d'un fluorimètre programmable HP 1046 A et d'une colonne de silice de 25 cm de longueur et de 4,6 mm de diamètre interne. La longueur d'onde d'excitation est de 290 nm et celle d'émission est de 330 nm. Le débit est réglé à 1 mL/min et la température à 21 °C. Le solvant d'élution est un mélange hexane/

propan-2-ol (99,5/0,5 ; v/v). L'étalon externe utilisé est le DL-alphatocophérol (Merck).

Résultats et discussion

Caractéristiques des huiles d'olive étudiées

Dans l'huile d'olive purifiée, les quantités, entre autres, de chlorophylles totales, bêta-carotène, phénols, alphatocophérol et acides gras libres totaux ont été trouvées quasi-nulles, ce qui témoigne de la bonne conduite de l'opération de purification (tableau 2).

Les HOVE tunisiennes, utilisées dans cette étude, ont, toutes deux, leur acidité libre, leur indice de peroxyde (surtout l'huile T) et leur K_{270} de départ relativement faibles. D'ailleurs, les valeurs de ces paramètres de qualité sont assez proches de celles trouvées pour des HOVE espagnoles extraites par un système de centrifugation à trois phases [42]. En revanche, la teneur en tocophérols de l'HOVE T est plus élevée que celle de ces huiles espagnoles qui ont présenté des teneurs comprises entre 158 et 176 ppm. De même, ce taux est supérieur à ceux des huiles d'olive algériennes, également extraites par centrifugation, qui ont des teneurs allant de 176 à 291 ppm [43]. Par ailleurs, les taux en pigments de nos échantillons se situent dans l'intervalle des variétés algériennes trouvées par Douzane et Bellal [43]. Cependant, nous pouvons constater que les HOVE P et T ont des concentrations très différentes en chlorophylles, l'huile T contenant trois fois plus de chlorophylles que l'huile P, alors qu'elles ont des concentrations semblables en bêta-carotène.

Effets de la teneur en bêta-carotène et en chlorophylle a sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive

Le bêta-carotène est sans effet à l'obscurité comme à la lumière, sauf aux doses élevées où il montre un léger effet pro-oxydant, notamment à la concentration la plus élevée (8 ppm), légèrement plus marqué à la lumière qu'à l'obscurité (figure 1). Il faut noter, cependant, que l'huile contient encore environ 1 ppm de bêta-carotène après purification, ce qui expliquerait probablement le peu de différences observées entre le témoin et les échantillons où nous avons ajouté 1 à 3 ppm de ce composé. Rahmani et Saad [19] expliquent l'effet pro-oxydant du bêta-carotène à la lumière par la dégradation du bêta-carotène par photo-oxydation en produits catalysant l'oxydation primaire. Il a, en outre, été rapporté par certains auteurs qu'en l'absence de lumière, les caroténoïdes et leurs produits de dégradation agissent comme pro-oxydants dans les huiles végétales [44].

Tableau 2. Caractéristiques des huiles d'olive étudiées.

Caractéristiques	Huile P ^a		Huile T ^b	
	avant purification	après purification	avant purification	après purification
Acidité libre (% d'acide oléique)	0,35 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,29	0,06
Indice de peroxyde (még O ₂ /kg)	11,50 ± 0,50	1,25 ± 0,07	6,6	0,4
K ₂₃₂	1,64 ± 0,05	0,24 ± 0,04	nd	nd
K ₂₇₀	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,00	0,12	0,23
Chlorophylles totales (ppm)	1,60 ± 0,03	0,05 ± 0,01	4,87	0,09
Bêta-carotène (ppm)	3,52 ± 0,04	0,92 ± 0,02	3,01	0,81
Phénols totaux (ppm tyrosol)	26 ± 2	0,22	nd	nd
Hydroxytyrosol	nd	nd	33,5	0,14
Tyrosol	nd	nd	25,5	0,57
Tocophérols (ppm) :	nd	nd	364,02	20,52
Alphatocophérol				

Nd : non déterminé.

^a Huile P : huile utilisée pour l'étude des pigments.

^b Huile T : huile utilisée pour l'étude de l'alphatocophérol et du tyrosol.

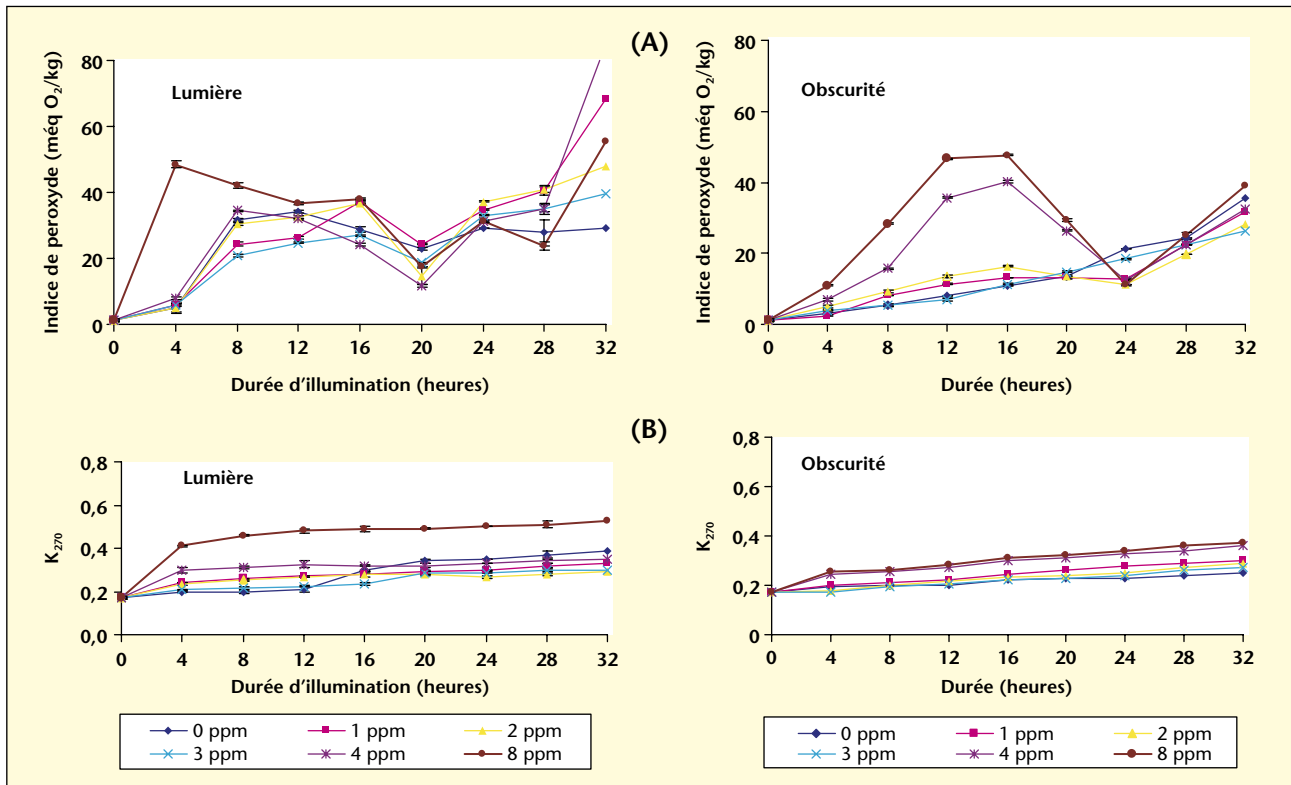


Figure 1. Évolution de l'indice de peroxyde (még O₂/kg) (A) et du K₂₇₀ (B) de l'huile d'olive purifiée exposée ou non à la lumière en fonction des ajouts de bêta-carotène (ppm).

La chlorophylle *a* ne présente pas d'effet à l'obscurité, la phase d'induction étant d'environ 24 h pour toutes les huiles (figure 2A). En revanche, elle présente un effet prooxydant à la lumière d'autant plus significatif que sa teneur augmente. Ceci est vérifié par les valeurs de l'IP lors des premières heures d'illumination des huiles (figure 2A) bien que la phase d'induction est éliminée par la lumière. De plus, les produits secondaires d'oxydation à 270 nm augmentent plus rapidement pour les huiles aux teneurs les plus élevées en chlorophylle *a* pendant toute la durée d'illumination étudiée (figure 2B).

Effets de la teneur en alphanatocophérol et en tyrosol sur la stabilité de l'huile d'olive

L'évolution de l'IP de l'huile purifiée (T) ayant reçu des teneurs croissantes en alphanatocophérol (figure 3) montre deux phases distinctes : (i) une première phase ascendante ayant une pente très atténuée s'étalant sur environ 20 jours d'étuvage à 40 °C (16 jours environ pour l'échantillon témoin) puis (ii) une deuxième phase ascendante montrant une pente beaucoup plus accentuée. Pour l'huile témoin T, la durée de la première phase, correspondant à la période d'induction de l'oxydation, semble voisine de celle obtenue avec l'huile purifiée P témoin (figures 1 et 2). Par contre, l'IP de l'huile purifiée témoin T ne dépasse qu'au bout de 16 jours, la valeur de 5 még O₂/kg, seuil au-delà duquel une huile d'olive raffinée devient oxydée [32]. En présence de tocophérol, la valeur de 5 még n'est atteinte qu'en 19 et 21 jours pour les échantillons ayant reçu respectivement 50 à 100 ppm et 200 à 400 ppm. D'une manière générale, nous avons observé que l'alphanatocophérol agit sur la phase de propagation en la ralentissant d'autant plus que sa teneur augmente, mais il est peu sensible sur la phase d'induction. En effet, à l'obscurité, l'alphanatocophérol agit par rupture de la chaîne radicalaire [23]. De la même manière, les courbes d'évolution de l'IP d'une HOVE en fonction de la teneur en alphanatocophérol ajoutée ont révélé deux phases distinctes

(figure 4) : (i) une phase d'induction plus faible de 9-13 jours puis (ii) une phase de propagation plus marquée avec un taux de IP atteignant 35. Toutefois, nous avons observé que l'alphanatocophérol ne montrait pas d'effet significatif par rapport à l'huile témoin. Il est vraisemblable que les niveaux de protection sont déjà atteints avec les antioxydants endogènes, tocophérols et autres composés phénoliques, déjà présents dans l'huile témoin (tableau 2). En outre, l'huile d'olive purifiée a révélé une période d'induction de l'oxydation plus longue que celle de l'HOVE, du fait de l'absence totale d'hydroperoxydes et du bêta-carotène dans l'huile purifiée. L'oxydation proprement dite ne peut se déclencher, c'est-à-dire que la propagation de l'oxydation ne peut avoir lieu, que lorsque la concentration en radicaux libres ait atteint un certain niveau [45]. De plus, l'IP atteint par l'HOVE est nettement plus élevé que celui de l'huile d'olive purifiée ; il s'avère ainsi qu'une teneur en tocophérols supérieure à 300 ppm ne retarde pas l'oxydation de l'HOVE.

L'IP des échantillons d'huile purifiée additionnés de tyrosol (figure 5) commence à augmenter à partir du 19^e jour d'étuvage à 40 °C ce qui révèle un effet antioxydant net par rapport à l'huile témoin. Sur l'huile vierge, le tyrosol agit aussi nettement sur la phase d'induction et montre un effet-dose un peu plus marqué que sur l'huile purifiée (figures 5 et 6). L'IP de l'huile purifiée témoin a dépassé, au bout de 16 jours la valeur de 5 még O₂/kg par rapport aux durées de 22 et 25 jours obtenues pour les échantillons ayant reçu respectivement 5 à 20 ppm et 40 ppm de tyrosol. Nous constatons ainsi que ces durées sont relativement plus importantes que celles notées après les ajouts d'alphanatocophérol.

Effets du bêta-carotène, des chlorophylles *a* et *b* et de leurs interactions sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive purifiée

L'étude menée par la méthode des plans d'expériences (plan 1) (figures 7 et 8) a montré que :

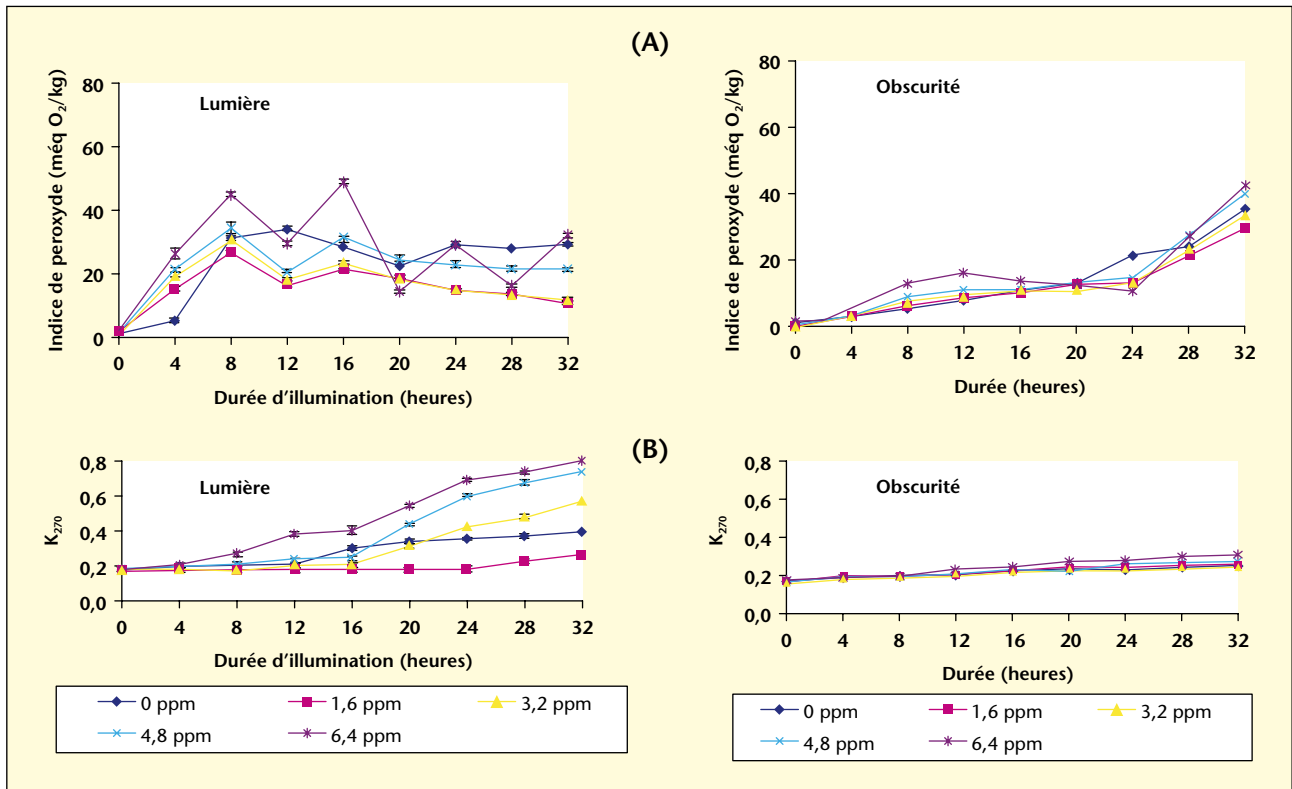


Figure 2. Évolution de l'indice de peroxyde (még O₂/kg) (A) et du K₂₇₀ (B) de l'huile d'olive purifiée exposée ou non à la lumière en fonction des ajouts de chlorophylle a (ppm).

– En accord avec les résultats précédents, les chlorophylles a et b, seules et ensemble, sont prooxydantes à la lumière, l'effet étant de plus en plus net au fur et à mesure du temps d'exposition jusqu'à 16 heures d'illumination puis diminue après 32 heures d'exposition à la lumière, que ce soit sur l'IP ou le K₂₇₀. L'effet photosensibilisateur de la chlorophylle b est régulièrement plus important (p < 0,05) que celui de la chlorophylle a pendant toute la durée de l'expérience, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Rahmani sur l'huile d'olive marocaine [18].

– Le bêta-carotène (7 ppm) seul apparaît antioxydant, sur l'IP et plus nettement sur le K₂₇₀ bien qu'il ait présenté un effet légèrement prooxydant à une teneur de 8 ppm.

– Quand l'une ou l'autre des chlorophylles est en mélange avec le bêta-carotène, l'effet global sur l'IP reste prooxydant mais atténué, l'effet

sur le K₂₇₀ est encore plus atténué, il va jusqu'à s'annuler, voire s'inverser en raison de l'effet antioxydant du bêta-carotène de plus en plus marqué.

– Quand le bêta-carotène est en mélange avec les deux chlorophylles ensemble, l'effet global reste totalement prooxydant.

Ceci semble indiquer un effet additif du mélange. Kiritsakis et Dugan [46] ont également trouvé que l'ajout de 4 ppm de bêta-carotène à l'huile d'olive décolorée réduit de façon significative la photo-oxydation induite par les chlorophylles.

– À l'obscurité, nous notons que le bêta-carotène seul ou en présence de chlorophylle b est antioxydant mais nous pouvons remarquer, que de manière générale les effets sont nettement moins significatifs qu'à la lumière.

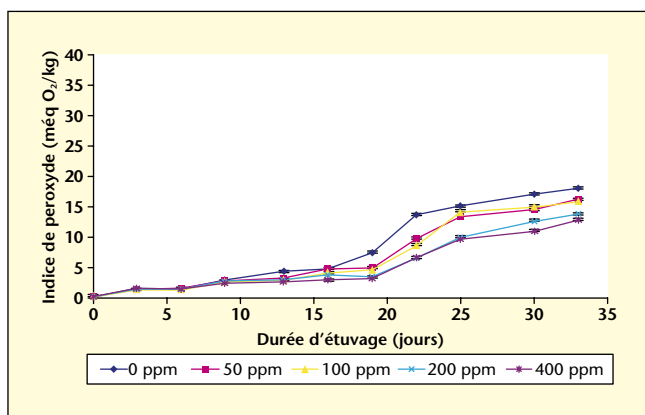


Figure 3. Évolution de l'indice de peroxyde (még O₂/kg) d'une huile d'olive purifiée étuvée à 40 °C à l'obscurité en fonction des ajouts d'alpha-tocophérol.

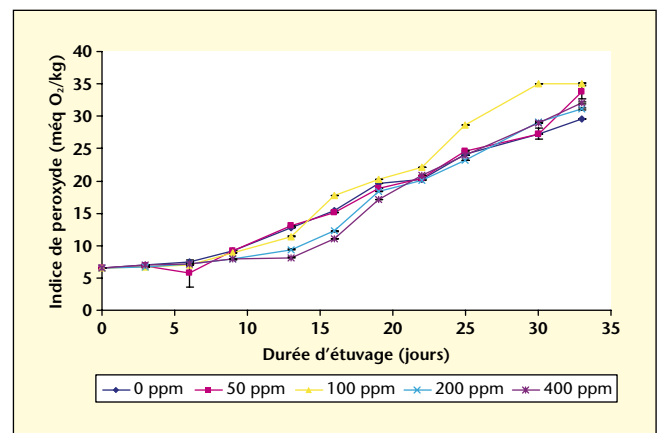


Figure 4. Évolution de l'indice de peroxyde (még O₂/kg) d'une huile d'olive vierge extra étuvée à 40 °C à l'obscurité en fonction des ajouts d'alpha-tocophérol.

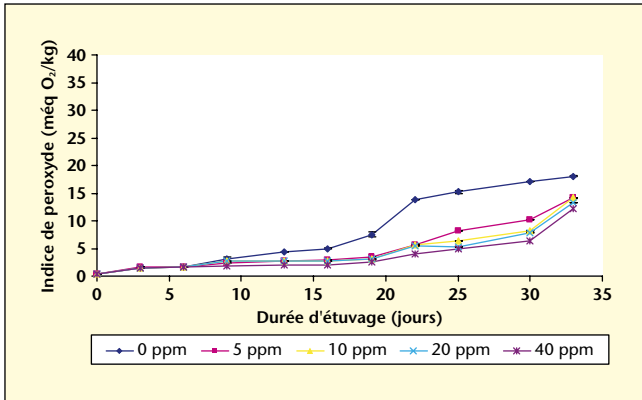


Figure 5. Évolution de l'indice de peroxyde (még O₂/kg) d'une huile d'olive purifiée étuvée à 40 °C à l'obscurité en fonction des ajouts de tyrosol.

Par ailleurs, afin de mieux exploiter les résultats obtenus, la lumière et la durée sont considérées parmi les facteurs étudiés. Ainsi, les niveaux hauts et bas de ce plan 2⁵ sont représentés dans le tableau 3. Les effets calculés sont également représentés dans le tableau 3.

Il ressort que tous les facteurs sont significatifs ($p < 0,05$) (2 fois l'erreur = 0,25), avec des effets de la lumière et de la durée bien plus importants que ceux des pigments. Le bêta-carotène (7 ppm) présente un effet antioxydant tandis que la chlorophylle *b* agit plus significativement comme prooxydant.

Afin de pouvoir établir le modèle mathématique, nous avons considéré que le facteur lumière est quantitatif et continu. En ne tenant compte que des facteurs (influentes) et des interactions significatives d'ordre 2, le modèle s'écrit donc, en variables centrées réduites :

$$IP = 30,48 - 2,12x_1 + 1,81x_2 + 2,92x_3 + 15,51x_4 + 12,62x_5 - 0,80x_1x_3 + 2,35x_1x_4 - 3,87x_1x_5 + 1,42x_2x_4 + 1,88x_2x_5 + 2,71x_3x_4 + 3,40x_3x_5 + 13,31x_4x_5$$

Où *IP* est l'indice de peroxyde en még O₂/kg ;

x_1, x_2, x_3, x_4 et x_5 sont les niveaux des facteurs 1, 2, 3, 4 et 5 (bêta-carotène, chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, lumière et durée) en valeurs centrées réduites.

Toutefois afin d'alléger le modèle puisque les 5 facteurs sont influents nous avons négligé les interactions. Le modèle mathématique devient donc le suivant :

$$IP = 30,48 - 2,12x_1 + 1,81x_2 + 2,92x_3 + 15,51x_4 + 12,62x_5$$

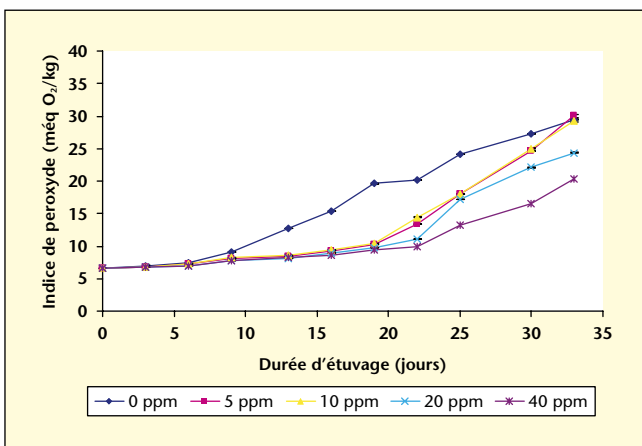


Figure 6. Évolution de l'indice de peroxyde (még O₂/kg) d'une huile d'olive vierge extra étuvée à 40 °C à l'obscurité en fonction des ajouts de tyrosol.

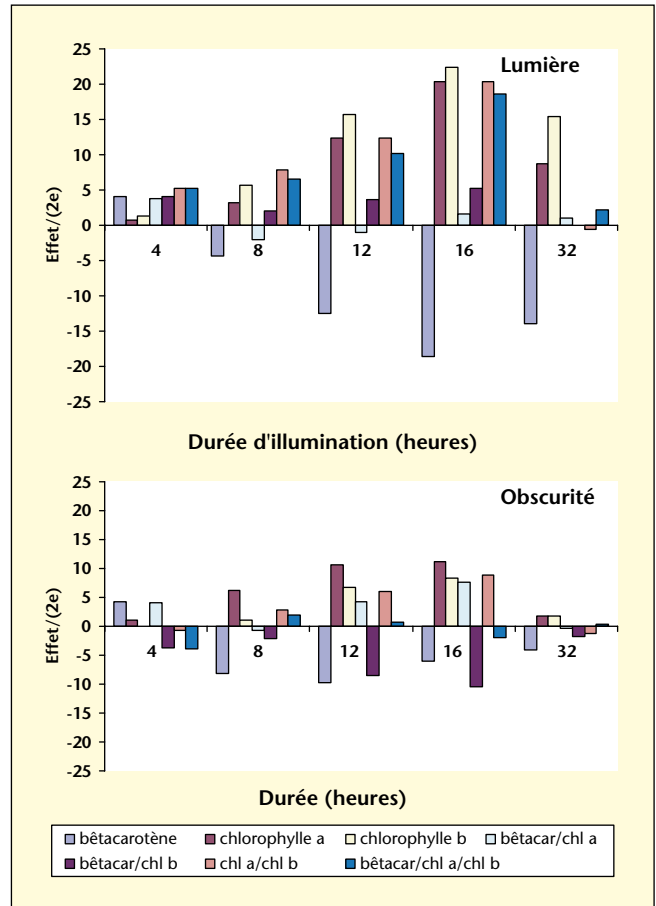


Figure 7. Effets des pigments et de leurs interactions sur l'indice de peroxyde (még O₂/kg) de l'huile d'olive purifiée exposée ou non à la lumière. bêta-car : bêta-carotène ; chl a : chlorophylle *a* ; chl b : chlorophylle *b*.

En appliquant le changement de variables des valeurs centrées réduites en valeurs vraies ou usuelles, et en supposant que l'obscurité correspond à 0 % de lumière et la présence de lumière correspond à 100 %, le modèle mathématique a été établi au niveau haut de la durée (32 heures), d'une part, dans le cas où les échantillons sont conservés à l'obscurité, et d'autre part, dans le cas où ils sont conservés à la lumière. Les deux modèles s'écrivent donc :

$$IP = 24,98 - 0,61X_1 + 1,21X_2 + 1,95X_3$$

à l'obscurité ;

$$IP = 58,61 - 0,61X_1 + 1,21X_2 + 1,95X_3$$

à la lumière.

Où *IP* est l'indice de peroxyde en még O₂/kg ;

X_1, X_2 et X_3 sont les niveaux des facteurs 1, 2 et 3 (bêta-carotène (ppm), chlorophylle *a* (ppm) et chlorophylle *b* (ppm)).

Effets du bêta-carotène, de l'alphatocophérol, du tyrosol et de leurs interactions sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive

Les réponses mesurées dans l'étude menée suivant le plan 2 sont des temps d'induction. De ce fait, un effet positif correspond à un effet antioxydant puisque proportionnel à l'augmentation du temps d'induction. Globalement les effets mesurés sont assez faibles en comparaison à ceux obtenus pour le plan 1 (figures 7, 8 et 9). Toutefois, certains sont significatifs.

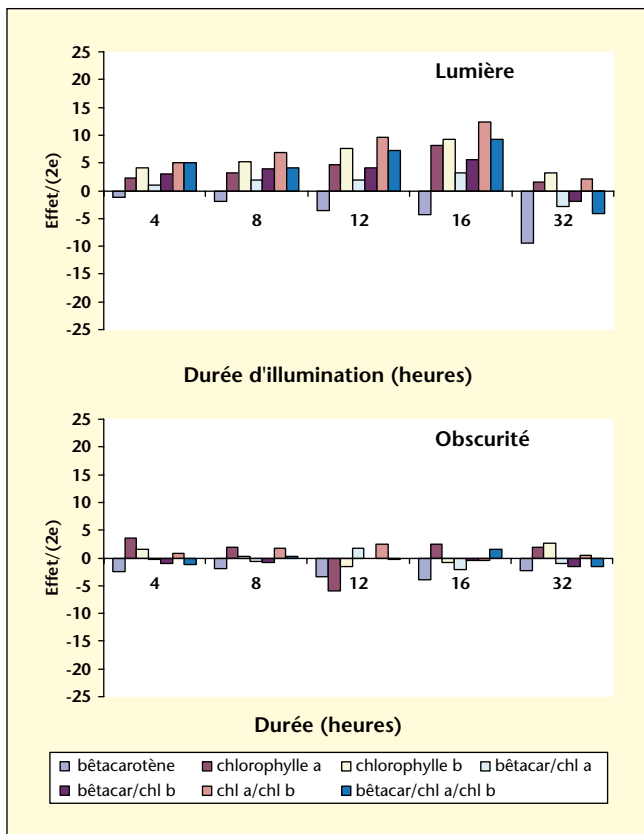


Figure 8. Effets des pigments et de leurs interactions sur le K_{270} de l'huile d'olive purifiée exposée ou non à la lumière.
bêta-car : bêta-carotène ; chl a : chlorophylle a ; chl b : chlorophylle b.

Ainsi, l'ajout de 200 ppm d'alphatocophérol à l'huile d'olive purifiée (figure 9A) a eu un effet significatif sur l'augmentation du temps d'induction de l'oxydation (test Rancimat) de cette huile par rapport à l'HOVE contenant initialement 364 ppm d'alphatocophérol (figure 9B), résultat en accord avec les données obtenues lors du suivi de l'IP de ces huiles en fonction des ajouts en alphanatocophérol (figures 3 et 4). L'ajout de 4 ppm de bêta-carotène n'a aucun effet sur l'huile d'olive purifiée alors qu'il montre un effet antioxydant dans l'HOVE. Ceci s'expliquerait probablement par la teneur totale en bêta-carotène dans l'huile. En effet, l'HOVE contient initialement 3 ppm de bêta-carotène, soit une teneur globale de 7 ppm. Cet effet antioxydant confirme celui observé lors de l'étude précédente (figures 7 et 8). L'ajout de 50 ppm de tyrosol n'a aucun effet sur le temps d'induction de l'oxydation par Rancimat, aussi bien de l'huile purifiée que de l'HOVE, alors qu'il était paru efficace lors de l'étuvage de ces huiles à 40 °C (figures 5 et 6). Les différentes associations du bêta-carotène, de l'alphatocophérol et du tyrosol dans l'huile d'olive purifiée, ont permis de dégager les constatations suivantes :

Tableau 3. Niveaux et effets des différents facteurs étudiés par un plan 2⁵.

	Béta-carotène	Chlorophylle a	Chlorophylle b	Lumière	Durée
Niveau bas	0	0	0	obscurité	4 h
Niveau haut	7 ppm	3 ppm	3 ppm	lumière	32 h
Effet (még O₂/kg)	-2,12	1,81	2,92	15,51	12,62

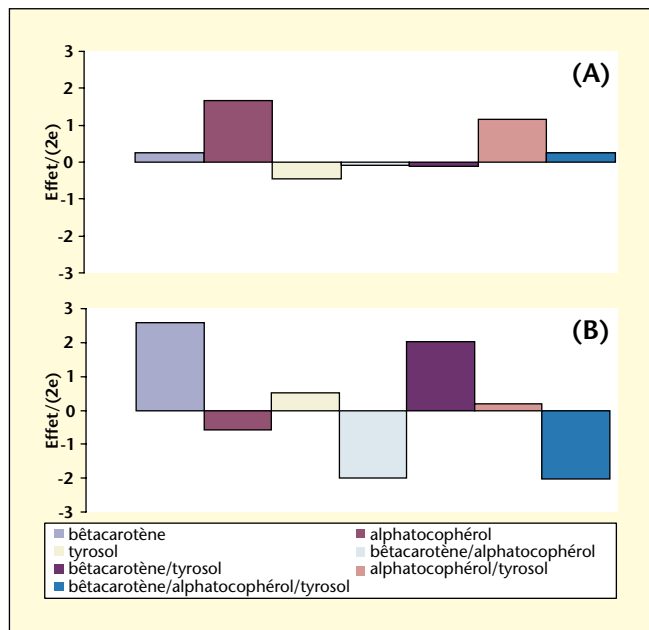


Figure 9. Effets de l'ajout de composés naturels sur le temps d'induction (h) de l'oxydation par Rancimat de l'huile d'olive purifiée (A) et de l'huile d'olive vierge extra (B).

- L'ajout de 4 ppm de bêta-carotène (qui est sans effet seul) à 200 ppm d'alpha-tocophérol, avec ou sans ajout de 50 ppm de tyrosol, réduit complètement l'effet anti-oxydant des tocophérols ;
 - L'ajout de 50 ppm de tyrosol (qui est sans effet) à 200 ppm d'alpha-tocophérol réduit légèrement l'efficacité de ce dernier.
- Ces effets antagonistes sur l'huile purifiée ne sont pas vérifiés avec l'HOVE, en raison de la présence de ces trois composés et de multiples autres composés mineurs dans l'HOVE pouvant masquer l'influence des substances que nous étudions tant les interactions entre composés sont nombreuses [23]. Ainsi, dans l'HOVE, nous avons observé que :
- L'ajout de 4 ppm de bêta-carotène aux 364 ppm d'alphatocophérol, 3 ppm de bêta-carotène et 25 ppm de tyrosol initiaux de l'HOVE, avec ou sans ajout de 50 ppm de tyrosol supplémentaires, augmente la stabilité de l'HOVE ;
 - L'ajout de 200 ppm d'alphatocophérol, soit 564 ppm en tout, n'a pas d'effet seul, mais avec 4 ppm de bêta-carotène et en présence ou non de 50 ppm de tyrosol supplémentaires, l'effet devient prooxydant.
- Il est ainsi vraisemblable que les effets de synergie ou d'antagonisme varient en fonction des rapports molaires entre les différents composés.

Conclusion

Les effets de certains composés mineurs (chlorophylles a et b, bêta-carotène, alphanatocophérol, tyrosol) et de leurs interactions à deux ou trois facteurs sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive tunisienne ont été étudiés en utilisant des plans d'expériences factoriels complets à deux niveaux. Le bêta-carotène, à une teneur de 7 ppm, est antioxydant l'huile d'olive avec un effet bien plus important à la lumière qu'à l'obscurité. En revanche, les chlorophylles a et b sont prooxydantes à la lumière avec un effet plus significatif de la chlorophylle b. Par ailleurs, les interactions chlorophylle a/bêta-carotène et chlorophylle b/bêta-carotène ont un pouvoir prooxydant atténué à la lumière en raison de l'effet additif du mélange. En revanche, les effets des différents pigments sur la stabilité de l'huile d'olive sont nettement moins significatifs à l'obscurité qu'à la lumière.

Par ailleurs, l'alphatocophérol, à 200 ppm, agit comme antioxydant dans l'huile d'olive purifiée, alors qu'il est sans effet dans une HOVE contenant initialement 364 ppm de ce composé. En revanche, le bêta-carotène, à une teneur de 4 ppm, utilisé seul ou en association avec 50 ppm de tyrosol, n'a pas d'effet sur l'huile d'olive purifiée, alors qu'il agit comme antioxydant de l'HOVE contenant initialement 3 ppm de ce composé. Ainsi, l'action des antioxydants natifs de l'huile d'olive est assez complexe puisqu'elle ne dépend pas uniquement de leur teneur, mais également des synergies et des antagonismes qui peuvent se produire entre eux.

RÉFÉRENCES

- JACOTOT B. Intérêt nutritionnel de l'huile d'olive. *Olivae* 2001 ; 86 : 27-9.
- CALABRESE G. Effets de l'huile d'olive vierge extra sur la santé. *Olivae* 2002 ; 93 : 19-20.
- BEN TEKAYA I, HASSOUNA M. Étude de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge extra tunisienne au cours de son stockage. *OCL* 2005 ; 12 : 447-54.
- APARICIO R, RODA L, ALBI MA, GUTIERREZ F. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J Agric Food Chem* 1999 ; 47 : 4150-5.
- BLEKAS G, TSIMIDOU M, BOSKOU D. Contribution of alfa-tocopherol to olive oil stability. *Food Chem* 1995 ; 52 : 289-94.
- CHIMI H, RAHMANI M, CILLARD J, CILLARD P. Autooxydation des huiles d'olive : rôle des composés phénoliques. *Rev Franç Corps Gras* 1990 ; 37 : 363-7.
- DEINA M, ROSA A, CAO CF, PIRISI FM, BANDINO G, DESSI MA. Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils : importance of alfa-tocopherol concentration. *J Agric Food Chem* 2002 ; 50 : 4342-6.
- GUTIERREZ F, ARNAUD T, GARRIDO A. Contribution of polyphenols to the oxidative stability of virgin olive oil. *J Sci Food Agric* 2001 ; 81 : 1463-70.
- GUTIERREZ F, FERNANDEZ JL. Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oils is no longer of « extra » quality. *J Agric Food Chem* 2002 ; 50 : 571-7.
- KIRITSAKIS A, OSMAN M. Effets du bêta-carotène et de l'alphatocophérol sur la stabilité photo-oxydative de l'huile d'olive. *Olivae* 1995 ; 56 : 25-8.
- KIRITSAKIS A, STINE CM, DUGAN LR. Effect of selected antioxidants on the stability of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 1983 ; 50 : 1286-90.
- LAVELLI V. Comparison of the antioxidant activities of extra virgin olive oils. *J Agric Food Chem* 2002 ; 50 : 7704-8.
- MORELLO JR, MOTILVA MJ, TOVAR MJ, ROMERO MP. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbeniquina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chem* 2004 ; 85 : 357-64.
- PAPADOPOULOS G, BOSKOU D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 1991 ; 68 : 669-71.
- SALVADOR MD, ARANDE F, FREGAPANE G. Contribution of chemical components of Cornicabra virgin olive oil to oxidative stability. A study of three successive crop seasons. *J Am Oil Chem Soc* 1999 ; 76 : 427-32.
- SALVADOR MD, ARANDE F, GOMEZ-ALONSO S, FREGAPANE G. Cornicabra virgin olive oil : a study of five successive crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chem* 2001 ; 74 : 267-74.
- TSIMIDOU M, PAPADOPOULOS G, BOSKOU D. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil. Part I. *Food Chem* 1992 ; 45 : 141-4.
- RAHMANI M. Mise au point sur le rôle des pigments chlorophylliens dans la photo-oxydation de l'huile d'olive vierge. *Olivae* 1989 ; 26 : 30-2.
- RAHMANI M, SAAD L. Photooxydation des huiles d'olive : influence de la composition chimique. *Rev Franç Corps Gras* 1989 ; 36 : 355-60.
- MARTY C, BERSSET C. Degradation products of trans-beta-carotene produced during extrusion cooking. *J Food Sci* 1988 ; 53 : 1880-6.
- MINGUEZ-MOSQUERA MI, JAREN-GALAN M. Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *J Sci Food Agric* 1995 ; 67 : 153-61.
- STEENSON DF, MIN DB. Effects of beta-carotene and lycopene thermal degradation products on oxidative stability of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 2000 ; 27 : 1153-60.
- DEBAL A. Chimie et physico-chimie des tocophérols. In : Léger C, ed. *Vitamine E, Tocophérols et composés apparentés- Propriétés antioxygènes et rôle biologique - Sources alimentaires*. Paris : Polytechnica, 1992 : 1-21 ; (Coord.).
- PERRIN JL. Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Rev Franç Corps Gras* 1992 ; 39 : 25-32.
- SATUE MT, HUANG SW, FRANKEL EN. Effect of natural antioxidants in virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 1995 ; 72 : 1131-7.
- HARZALLAH H, KIRITSAKIS A. Effet antioxydant des extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'olivier. *Olivae* 1999 ; 77 : 47-9.
- THOMOPOULOS CD, GRIGOROPOULOU HP. *Rev Fr Corps Gras* 1982 ; 29 : 329-31.
- GUTFINGER T. Polyphenols in olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 1981 ; 58 : 966-8.
- CHIMI H, SADIK A, LE TUTOUR B, RAHMANI M. Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropéine et du BHT. *Rev Franç Corps Gras* 1988 ; 35 : 339-44.
- GOUPY J. *La méthode des plans d'expériences. Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats*. Paris : Dunod, 1996.
- COI (Conseil Oléicole International) T.15/NC n°2/Rév.10. (2001). Norme commerciale applicable à l'huile d'olive et à l'huile de grignons d'olive, 1-15.
- NT (Norme Tunisienne enregistrée) 118.08 (1987). Huile comestible de soja. Spécifications.
- SADO G, SADO MC. (2000). Les plans d'expériences. De l'expérimentation à l'assurance qualité. AFNOR, Paris, 123-324.
- NT 118.22 (1994). Détermination de l'indice de peroxyde (corps gras d'origines animale et végétale) NT ISO 3960 (1977).
- NT 118.72 (1994). Détermination de l'absorbance dans l'ultraviolet (corps gras d'origines animale et végétale) NT ISO 3356 (1989).
- AOCS (American Oil Chemists Society) Official Method Cd 12b-92 (1993). Oil Stability Index (OSI).
- NT 118.18 (1994). Détermination de l'acidité de l'huile (graines oléagineuses) NT ISO 729 (1988).
- AOCS. *Official Methods and Recommended Practices*. 4 ed. Firestone, Champaign, Illinois, 1987.
- WOLFF JP. *Manuel d'analyse des corps gras*. Paris : éd. Azoulay, 1968.
- CORTESI N, ROVELLINI P, FEDELI E. *Détermination des polyphénols par HPLC à détection UV, IOOC Working Group 1*. 1999.
- POCKLINGTON WD, DIEFFENBACHER A. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography : results of a collaborative study and the standardized method. *Pure Appl Chem* 1988 ; 60 : 877-92.
- CERT A, ALBA J, PÉREZ-CAMINO MC, et al. Influence des systèmes d'extraction sur les caractéristiques et les composés mineurs de l'huile d'olive vierge extra. *Olivea* 1999 ; 79 : 41-50.
- DOUZANE M, BELLAL MM. Contribution à la caractérisation des huiles de quelques variétés de populations d'olive algériennes : étude de quelques composés mineurs de la fraction insaponifiable. *Olivae* 2005 ; 103 : 33-41.
- LEE S, KIM DH. Effects of beta-carotene on the stability of soybean oil subject to autoxidation and photosensitized oxidation. *Food Biotechnol* 1992 ; 1 : 1-7.
- CHEFTEL JC, CHEFTEL H. *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*. Paris : Tec. et Doc, Lavoisier, 1992.
- KIRITSAKIS A, DUGAN LR. Studies in photooxidation of olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 1985 ; 62 : 892-6.