



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1**

**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION  
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES  
I.N.A.T.A.A.**

**Département de Biotechnologie**

N° d'ordre :49/D3C/2019

N° de série :03/IN.P/2019

**Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle**

**Filière:** Sciences biologiques

**Spécialité :** Biotechnologie

**Intitulé :** Sciences alimentaires et Biotechnologie

Présentée par :

**Fatima Zohra MAKHLOUF**

---

**Screening phytochimique, potentiel antioxydant de  
l'huile et aptitude technologique de la farine du  
gland de trois espèces de *Quercus*  
(*Q. ilex*, *Q. suber* et *Q. coccifera*)**

---

Soutenue le : 16 / 06 / 2019

Devant le Jury composé de :

<b>Président (e) :</b>	Karima KHARROUB	Professeur	I.N.A.T.A.A., U.F.M.C.1
<b>Rapporteur (e) :</b>	Malika BARKAT	Professeur	I.N.A.T.A.A., U.F.M.C.1
<b>Examineurs :</b>	Farida BEKHOUCHE	Professeur	I.N.A.T.A.A., U.F.M.C.1
	Laid BENDERRADJI	M.C.A	Université M'Sila
	Mahieddine BOUMENDJEL	M.C.A	Université Annaba
	Souheila DALI CHAOUICHE	M.C.A	U.S.B.C.3

Année universitaire 2018-2019

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biotechnologie et Qualité Des Aliments (BIOQUAL), Département de Biotechnologie, INATAA, UFMCI et le laboratoire « DI.S.S.P.A », Département des Sciences du Sol, des Plantes et de l'Alimentation, Université de Bari, Italie.*

*Cette thèse a représenté pour moi une période de vie à la fois intense et enrichissante, et ce en grande partie grâce aux personnes qui m'ont soutenue et écoutée.*

*Mes sincères remerciements s'adressent en premier lieu à ma directrice de thèse, Madame BARKAT Malika, Professeur à l'INATAA et Chef de département de biotechnologie alimentaire, UFMCI, pour m'avoir acceptée sur ce projet, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements et surtout pour la confiance qu'elle m'a accordé tout au long de ce travail.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Francesco Caponio et Madame le Professeur Antonella Pasqualone, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, pour leur écoute, leur intérêt à mon sujet de thèse, le temps qu'ils m'ont consacré et les fructueuses conversations que nous avons échangées.*

*Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Docteur Giacomo Squeo, pour sa gentillesse, ses précieux conseils, son aide scientifique et technologique qui m'a permis de mener à bien ce travail.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Madame KHARROUB Karima, Professeur à l'INATAA, UFMCI et Chef de laboratoire BIOQUAL, pour accepter de présider le jury de cette thèse.*

*J'adresse également mes sincères remerciements à Madame BEKHOUCHE Farida, Professeur à l'INATAA, UFMCI, Monsieur BENDERRADJI Laid, M.C.A, Faculté SNV, Univ. Mohammed Boudiaf M'Sila, Monsieur BOUMENDJEL Mahieddine, M.C.A, Univ. Badji Mokhtar, Annaba et Madame DALI CHAOUUCHE Souheila, M.C.A, Faculté de Médecine, U.F.M.C.3, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de m'honorer par leur participation au jury de cette thèse.*

*Je voudrais remercier très sincèrement Madame GHENAY Oulaya, Ingénieur de laboratoire BIOQUAL, pour son aide, sa gentillesse et pour m'avoir épaulée sans fléchir durant cette thèse.*

*J'adresse également mes sincères remerciements à toutes les doctorantes qui ont partagé, au même moment que moi, les difficultés de l'expérimentation et les bons moments : Rania, Kaouthar, Lamia, Sana et Romila.*

*Je tiens à remercier les différents techniciens des laboratoires pédagogiques et plus spécifiquement Linda, Siham et Youssef pour leur aide, ainsi que l'ensemble du personnel administratifs de l'institut de l'INATAA, à tous celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.*

*Avec mes profonds sentiments, je voudrais remercier ma chère maman et mon mari, sans qui, mon travail et mon rêve ne pouvaient pas se réaliser, toujours très enthousiastes pour m'encourager, m'aider et faire tout pour moi. Mes enfants, Maram et Iyad, n'ont pas toujours compris et apprécié mon absence physique et affective. J'espère qu'ils prendront conscience qu'ils ont toujours été des acteurs essentiels de l'ensemble de ce projet. Je les remercie de m'avoir accompagné à leur manière.*

*Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux personnes chères qui comptent énormément pour moi. Je pense tout particulièrement à mon père qui voulait tant me voir réussir. Je pense également à mes sœurs, mon frère qui me soutiennent depuis toujours. Je suis très fier de les avoir à mes côtés.*

## Abstract

---

Oak acorns (*Quercus*) are among the underutilized vegetable resources in the agri-food sector. Few studies are present in literature on acorn fruit, which is a handicap for the valorization of these fruits which unfortunately remain under-exploited. These studies show that the acorn fruit has interesting nutritional and functional properties. The present study aims at investigating the biochemical composition and the technological aptitude of two acorn products "oil" and "flour" in order to valorize this neglected natural resource. Firstly, a detailed study of the physicochemical properties and chemical composition of oil extracted from three *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. coccifera* and *Q. suber*) species was carried out. Antioxidant proprieties and oxidative stability of extracted oil were also evaluated. Then, a technological aptitude study of *Quercus* flours for the elaboration of a functional biscuit was performed.

The study of physicochemical characteristics showed a similarity between acorn oil and olive oil. GPC analysis of *Quercus* oil revealed a predominance of unsaturated fatty acids (oleic acid), and a particular sterol composition, which differs from those of most conventional edible oils. The volatile fraction analysis, reported for the first time, indicated that acorn oils were found to contain specific and variable range volatiles compound profiles. Twenty phenolic compounds were detected by LC / MS analysis; all of them were hydrolysable tannins derivatives. Studied oils had significant amounts of phenolic compounds, tocopherols and carotenoids, which give them a strong antioxidant capacity, which was revealed by the two tests ABTS and DPPH. Monitoring the oxidation state of the *Quercus* oil during 180 days (6 months) of storage showed slight variations in the measured oxidation markers.

The chemical characteristics of acorn flour obtained from three different *Quercus* species were compared. *Q. coccifera* L. flour, which were the most antioxidant, was used for preparing biscuits at two levels of substitution *Q30* and *Q60*. Acorn-added biscuits showed significantly higher content of phenolics, higher antioxidant activity and oxidative stability (induction time) than control biscuits. The acorn-based biscuits also showed technological (volume, friability,...) and organoleptic properties (odor, color, taste, ..) better than the control biscuits.

---

**Keywords:** *Quercus*, oil, flour, biochemical composition, technological ability, functional biscuits, oxidation, antioxidant activity

تعتبر ثمرة البلوط من بين الموارد النباتية غير المستغلة في قطاع الأغذية الزراعية. توجد القليل من الدراسات على ثمرة البلوط، وهذا ما يشكل عائقاً لتثمين هذه الثمار التي لا تزال للأسف غير مستغلة. يهدف هذا العمل إلى دراسة التركيب الكيميائي الحيوي والقدرة التكنولوجية لمنتجين من البلوط "الزيت" و "الدقيق" من أجل تثمين هذا المورد الطبيعي المهم. أولاً، تم إجراء دراسة مفصلة للخصائص الفيزيوكيميائية والتركيب الكيميائي للزيوت المستخرجة من ثلاثة أنواع من ثمرة البلوط (*Quercus*). كما تم أيضاً تقييم النشاط المضاد للأكسدة والقابلية للأكسدة للزيوت المستخرجة. بعد ذلك، أجريت دراسة حول القدرة التكنولوجية لدقيق البلوط في إعداد بسكويت وظيفي.

سمحت لنا دراسة الخصائص الفيزيوكيميائية بتحديد تشابه بين زيت البلوط وزيت الزيتون. كشف تحليل الزيت باستعمال كروماتوغرافيا الطور الغازي عن غلبة الأحماض الدهنية غير المشبعة (حمض الأوليك)، وتركيبه ستيرولية خاصة، تختلف عن معظم الزيوت النباتية التقليدية. أشار تحليل المواد المتطايرة لزيت البلوط، الذي تتم دراسته لأول مرة، إلى أن هذه الزيوت تحتوي على مكونات مرغبة متطايرة محددة. تم اكتشاف عشرين مركباً فينولي بواسطة تحليل "LC/MS" معظمهم من مشتقات التانينات القابلة للتحلل بالماء. وكانت الزيوت المدروسة تحتوي على كميات كبيرة من المركبات الفينولية والتوكوفيرول والكاروتينات، مما أعطاهم قدرة قوية مضادة للأكسدة كشفت عن طريق الاختبارين DPPH و ABTS. أظهرت مراقبة حالة الأكسدة لزيت البلوط خلال 180 يوماً من التخزين اختلافات طفيفة في علامات التأكسد المقاسة.

تمت مقارنة الخصائص الكيميائية لطحين البلوط التي تم الحصول عليها من أنواع البلوط الثلاثة التي تمت دراستها، و تم استخدام طحين *Q. coccifera* L.، الأغنى من حيث مضادات الأكسدة، لتحضير البسكويت Q30 و Q60. أظهر بسكويت البلوط مستويات أعلى بكثير من المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة واستقرار الأكسدة من بسكويت القمح. كما أظهر أيضاً بسكويت البلوط خصائص تكنولوجية (الحجم، التفتيت، ...) وحسية (الرائحة، اللون، الذوق، ..) أفضل من البسكويت اللين.

---

**الكلمات الدالة:** *Quercus*، الزيت، الطحين، التركيب الكيميائي الحيوي، القدرة التكنولوجية، بسكويت وظيفي، الأكسدة، النشاط المضاد للأكسدة.

## Résumé

---

Les glands de chênes (*Quercus*) figurent parmi les ressources végétales sous utilisées dans le domaine agroalimentaire. Il existe peu de données dans la littérature sur le fruit de gland, ce qui constitue un handicap pour la valorisation de ces fruits qui restent malheureusement sous-exploités. Les études réalisées montrent que ce fruit possède des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressantes. Le présent travail vise à étudier la composition biochimique et l'aptitude technologique de deux produits de gland « huile » et « farine » afin de valoriser cette ressource naturelle négligée.

Dans un premier temps, une étude détaillée de la composition et des propriétés physicochimiques des huiles, extraites à partir de trois espèces de fruit de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. coccifera* et *Q. suber*) a été effectuée. Le pouvoir antioxydant et la susceptibilité à l'oxydation des huiles extraites ont été également évalués. Ensuite, une étude de l'aptitude technologique des farines, issues des glands des mêmes espèces, pour l'élaboration d'un biscuit fonctionnel a été menée.

L'étude des caractéristiques physicochimiques nous a permis de déterminer une similitude entre l'huile de gland et l'huile d'olive. L'analyse des huiles par CPG a révélé une prédominance de l'acide gras insaturé (acide oléique), et une composition stérolique particulière, qui diffère de celles de la plupart des huiles conventionnelles comestibles. L'analyse de la fraction volatile des huiles de *Quercus*, rapportée pour la première fois, nous a affirmé que ces huiles se sont avérées contenir des profils en composés volatils spécifiques. L'analyse LC/MS a permis d'identifier vingt composés phénoliques dont les plus abondants sont des dérivés de tanins hydrolysables. Une richesse des huiles étudiées en composés phénoliques, tocophérols et caroténoïdes a été obtenue, ce qui leur confère une forte capacité antioxydante. Celle-ci a été révélée par les deux tests ABTS et DPPH. Le suivi de l'état d'oxydation des huiles de *Quercus* pendant 180 jours de stockage (6 mois) a montré de légères variations des marqueurs d'oxydation mesurés.

Les caractéristiques chimiques de la farine des trois espèces étudiées de *Quercus* ont été comparées. La farine de *Q. coccifera* L., la plus riche en antioxydants, a été utilisée pour la préparation des biscuits à deux niveaux de substitution Q30 et Q60. Les biscuits à base de gland ont montré une teneur significativement plus élevée en composés phénoliques, une activité antioxydante et une stabilité à l'oxydation (TI) supérieures à celles des biscuits témoins. Les biscuits à base de gland ont également montré des propriétés technologiques (volume, friabilité,...) et organoleptiques (odeur, couleur, goût,..) meilleures que les biscuits témoins.

---

**Mots clés :** *Quercus*, huile, farine, composition biochimique, aptitude technologique, biscuit fonctionnel, oxydation, activité antioxydante.

## Publications et communications

### Publications

Makhlouf F. Z., Squeo G., Barkat M., Trani, A. & Caponio F. (2018). **Antioxidant activity, tocopherols and polyphenols of acorn oil obtained from *Quercus* species grown in Algeria.** *Food Research International*, 114, 208-213.

Makhlouf F. Z., Squeo G., Barkat M., Pasqualone A. & Caponio F. (2019). **Comparative study of total phenolic content and antioxidant properties of *Quercus* fruit: flour and oil.** *The North African Journal of Food and Nutrition Research*, 3(5), 148-155.

Pasqualone A., Makhlouf F. Z., Barkat M., Squeo G., Summo C. & Caponio F. (2019). **Effect of acorn flour on the physico-chemical and sensory properties of biscuits.** *Food chemistry* (Soumis).

### Communication orales

Makhlouf F. Z., Barkat M. **Phytochemical screening of oils extracted from fruit of three species of *Quercus* genus.** 4<sup>ème</sup> Congrès International de la Biodiversité Végétale, Marrakech (Maroc). 5-8 Octobre 2017.

Makhlouf F. Z., Barkat M., Squeo G., Pasqualone A. & Caponio F. **Comparative study of total phenolic content and antioxidant properties of *Quercus* fruit: flour and oil.** Séminaire International Des Sciences Alimentaires (SISA), Constantine, Algérie. 15-16 Octobre 2018

### Communication affichées

Makhlouf F. Z., Barkat M., Squeo G. & Caponio F. **Polyphenol composition of aqueous and ethanolic extracts from three species of "*Quercus*" genus.** 1<sup>st</sup> International Congress on Biotechnologies for Sustainable Development (CIBSDD 2017), Boumerdes, Algeria. 24 - 25 Octobre 2017.

Makhlouf F. Z., Barkat M., Squeo G. & Caponio F. **Composition chimique et activité antioxydante des extraits éthanoliques et aqueux de trois espèces de genre *Quercus*.** 3<sup>ème</sup> congrès international de la Société Algérienne de la Nutrition (CI-SAN), Constantine. 28-30 Novembre 2017.

Makhlouf F. Z., Barkat M., Squeo G., Pasqualone A. & Caponio F. **Conditions d'extraction (conventionnelles et «Green») des composés phénoliques du fruit de *Quercus* et évaluation de leur activité antioxydante.** Le congrès international : Les rencontres de l'agriculture et de la biologie RAB 2018, Constantine, Algérie. 4-7 Mai 2018.

Makhlouf F. Z., Barkat M., Squeo G., Pasqualone A. & Caponio F. **Etude de la composition biochimique du fruit de deux espèces de *Quercus* en vue de sa valorisation en alimentation humaine.** SISA. Constantine, Algérie. 15-16 Octobre 2018.

### **Autres participations**

MAKHLOUF F. Z., Barkat M. **Production d'une nouvelle huile alimentaire à partir du fruit de gland.** Salon National des Produits de la Recherche « Proposition d'exposition de produit innovant ». Palais des Expositions, la SAFEX, Alger, 2-4Juillet 2018.

MAKHLOUF F. Z., Barkat M. **Fabrication d'un biscuit riche en fibre à base de la farine de gland.** Salon National des Produits de la Recherche « Proposition d'exposition de produit innovant ». Palais des Expositions, la SAFEX, Alger, 2-4Juillet 2018.



## Table des matières

Liste des tableaux .....	i
Liste des figures .....	iii
Liste des annexes .....	v
Liste des abreviations.....	vi

Introduction générale .....	1
-----------------------------	---

### **Première partie : Eléments bibliographiques et description des espèces de chêne retenues dans cette étude**

1. Le chêne: Aspects géographique, écologique et botanique .....	4
1.1. Répartition géographique.....	4
1.1.1. A l'échelle mondiale .....	4
1.1.2. Dans le bassin méditerranéen .....	4
1.1.3. En Algérie.....	5
1.2. Exigences écologiques de chêne .....	6
1.3. Présentation botanique .....	7
1.3.1. Taxonomie .....	7
1.3.2. Description générale .....	8
1.3.3. Caractéristiques anatomiques du gland.....	8
1.4. Importance du fruit de gland .....	9
1.4.1. Composition chimique du fruit.....	9
1.4.2. Utilisation du fruit.....	10
2. Espèces de chêne retenues dans la présente étude .....	12
2.1. Origine géographique.....	12
2.2. Description des espèces .....	13
2.2.1. Le chêne vert ( <i>Quercus ilex</i> L.).....	13
2.2.2. Le chêne liège ( <i>Quercus suber</i> L.).....	14
2.2.3. Le chêne Kermès ( <i>Quercus coccifera</i> L.) .....	15
2.3. Récolte et conditionnement .....	16
Références bibliographiques .....	18

### **Deuxième partie: Le fruit de *Quercus* pour la production d'une huile alimentaire**

Introduction.....	22
<b>Chapitre I : Etude bibliographique.....</b>	<b>23</b>
1. Données phytochimiques sur les lipides et les huiles végétales.....	23

1.1.	Lipides alimentaires .....	23
1.1.1.	Aperçu sur les lipides.....	23
1.1.2.	Biochimie des lipides.....	23
1.1.3.	Rôles biologiques et technologique des lipides .....	28
1.1.4.	Principales sources des lipides .....	28
1.2.	Huiles végétales .....	29
1.2.1.	Classification des huiles .....	29
1.2.2.	Composition chimique des huiles végétales .....	31
1.2.3.	Rôle des huiles végétales.....	34
2.	Evaluation de l'état d'oxydation des huiles végétales .....	35
2.1.	Mécanisme d'auto-oxydation des lipides .....	35
2.1.1.	Mécanisme général.....	35
2.1.2.	Facteurs influençant l'oxydation des lipides .....	37
2.1.3.	Conséquences de l'oxydation des lipides.....	38
2.1.4.	Méthodes de mesure de l'état d'avancement d'oxydation des lipides .....	39
3.	Evaluation du potentiel antioxydant des huiles végétales .....	41
3.1.	Mécanisme d'antioxydation des lipides .....	41
3.1.1.	Définition et mécanisme d'action des molécules antioxydantes .....	41
3.1.2.	Principaux antioxydants .....	42
3.1.3.	Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante .....	49

## **Chapitre II: Matériel et Méthodes**

<b>1.</b>	<b>Etude phytochimique des huiles de <i>Quercus</i></b> .....	<b>51</b>
1.1.	Extraction des huiles de <i>Quercus</i> .....	51
1.1.1.	Opérations de prétraitement.....	51
1.1.2.	Extraction de l'huile par « Soxhlet ».....	51
1.1.3.	Rendement en huiles.....	53
1.2.	Caractéristiques physico-chimiques .....	53
1.2.1.	Indice de réfraction.....	54
1.2.2.	Extinction spécifique dans l'UV .....	54
1.2.3.	Indice d'acide.....	54
1.2.4.	Indice de peroxyde .....	55
1.2.5.	Indice d'iode .....	55
1.2.6.	Indice de saponification .....	56
1.2.7.	Teneur en insaponifiables.....	57
<b>2.</b>	<b>Etude de la composition des huiles de <i>Quercus</i></b> .....	<b>58</b>

2.1.	Analyse des acides gras .....	58
2.1.1.	Saponification et obtention des acides gras .....	58
2.1.2.	Analyse des acides gras par CPG/FID .....	59
2.2.	Analyse des stérols .....	60
2.2.1.	Obtention de l'insaponifiable .....	60
2.2.2.	Préparation de la fraction stérolique par CCM .....	60
2.2.3.	Préparation de triméthylsilyléther .....	61
2.2.4.	Analyse des stérols par CPG/FID .....	61
2.3.	Analyse des composés volatils .....	62
2.3.1.	Micro-Extraction en Phase Solide (HS-SPME) .....	63
2.3.2.	Analyse par GC/MS .....	64
2.3.3.	Identification des composés volatils .....	65
<b>3.</b>	<b>Mesure de l'état d'oxydation des huiles de <i>Quercus</i></b> .....	<b>66</b>
3.1.	Conditionnement et stockage des huiles de <i>Quercus</i> .....	66
3.2.	Suivi des marqueurs d'oxydation .....	67
3.3.	Test d'oxydation accéléré « Rapidoxy » .....	72
<b>4.</b>	<b>Etude de l'activité antioxydante des huiles de <i>Quercus</i></b> .....	<b>75</b>
4.1.	Analyse des composés phénoliques .....	75
4.2.	Analyse des tocophérols .....	80
4.3.	Etude des pigments .....	81
4.4.	Tests de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	82
4.4.1.	Activité antioxydante de la fraction phénolique .....	83
4.4.2.	Activité antioxydante de l'huile .....	84
5.	Analyse statistique .....	84

### **Chapitre III: Résultats et discussion**

1.	Rendement en huile .....	85
2.	Propriétés physico-chimiques des huiles de <i>Quercus</i> .....	86
2.1.	Indice de réfraction .....	87
2.2.	Extinction spécifique dans l'UV .....	87
2.3.	Indice d'acide .....	87
2.4.	Indice de peroxyde .....	88
2.5.	Indice d'iode .....	88
2.6.	Indice de saponification .....	89
2.7.	Teneur en insaponifiable .....	89
3.	Composition chimique des huiles de <i>Quercus</i> .....	90

3.1.	En acides gras .....	90
3.2.	En stérols .....	92
3.3.	En composés volatils .....	94
4.	Activité antioxydante des huiles de <i>Quercus</i> .....	99
4.1.	Profils des composés phénoliques .....	99
4.2.	Profils des tocophérols .....	105
4.3.	Profils des pigments .....	107
4.4.	Activité antioxydante des huiles de <i>Quercus</i> .....	108
5.	Stabilité oxydative des huiles de <i>Quercus</i> .....	111
5.1.	Indices de qualité .....	111
5.2.	Composition en acides gras .....	113
5.3.	Composés volatils .....	115
5.4.	Composés polaires .....	118
5.5.	Composés antioxydants.....	120
5.6.	Stabilité oxydative.....	124
	Conclusion .....	126
	Références bibliographiques .....	129

### **Troisième partie: Le fruit de *Quercus* pour l'élaboration d'un biscuit**

Introduction .....	142
--------------------	-----

#### **Chapitre I: Etude bibliographique**

1.	Définition du biscuit.....	143
2.	Classification des biscuits .....	143
2.1.	Biscuits à pâtes molles .....	143
2.2.	Biscuits à pâtes dures.....	144
3.	Principaux ingrédients des biscuits.....	144
3.1.	Farine .....	144
3.2.	Matière grasse.....	145
3.3.	Sucre .....	145
3.4.	Eau.....	146
4.	Pâte biscuitière .....	146
5.	Cuisson des biscuits .....	147
6.	Critères de qualité d'un biscuit .....	147

#### **Chapitre II: Matériel et Méthodes**

1.	<b>Préparation de la farine de gland</b> .....	148
----	--	-----

<b>2.</b>	<b>Propriétés physiques des farines</b> .....	149
2.1.	Couleur .....	149
2.2.	Granulométrie.....	149
<b>3.</b>	<b>Composition biochimique des farines</b> .....	150
3.1.	Teneur en eau .....	150
3.2.	Taux de cendres .....	150
3.3.	Teneur en protéines .....	150
3.4.	Teneur en lipides extractibles.....	151
3.5.	Teneur en fibres brutes.....	151
3.6.	Teneur en glucides totaux.....	152
<b>4.</b>	<b>Propriétés antioxydantes des farines</b> .....	152
4.1.	Détermination des composés phénoliques.....	152
4.2.	Détermination de l'activité antioxydante .....	153
<b>5.</b>	<b>Elaboration des biscuits</b> .....	153
5.1.	Formules à tester pour la préparation .....	153
5.2.	Protocole de préparation.....	154
<b>6.</b>	<b>Tests d'appréciation des biscuits formulés</b> .....	157
6.1.	Caractérisation physique des biscuits formulés.....	157
6.2.	Propriétés antioxydantes des biscuits .....	159
6.3.	Etude de la stabilité oxydative des biscuits .....	159
6.4.	Analyse des composés volatils des biscuits.....	160
6.5.	Analyse sensorielle des biscuits .....	160
7.	Analyse statistique.....	161

### **Chapitre III: Résultats et discussion**

1.	Caractéristiques physico-chimiques des farines .....	162
1.1.	Propriétés physiques .....	162
1.2.	Composition biochimique des farines .....	164
2.	Activité antioxydante des farines de <i>Quercus</i> .....	166
2.1.	Composés phénoliques.....	166
2.2.	Activité antioxydante.....	167
3.	Caractérisation des biscuits formulés.....	167
3.1.	Caractérisation physique des biscuits formulés.....	167
3.2.	Activité antioxydante des biscuits .....	172
3.3.	Stabilité oxydative des biscuits .....	173
3.4.	Profils volatils des biscuits .....	174
3.5.	Analyse sensorielle.....	177

Conclusion .....	180
Références bibliographiques .....	182
Conclusion générale .....	188

## Liste des tableaux

Tableau 1. Composition nutritive du gland en pourcentage (Shimada, 2001; Bainbridge, 2006) .....	9
Tableau 2. Principaux acides gras, leurs structures et leurs sources alimentaires.....	25
Tableau 3. Pourcentage des acides gras dans quelques huiles végétales (Harwood et Aparicio, 2000 ; Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012).....	33
Tableau 4. Teneurs en insaponifiable de quelques huiles végétales (Karleskind, 1992).....	34
Tableau 10. Conditions du gradient de solvant utilisé pour l'analyse HPLC .....	78
Tableau 11. Rendement moyen d'extraction des huiles de <i>Quercus</i> .....	85
Tableau 12. Aspect qualitatif des huiles extraites de <i>Quercus</i> .....	86
Tableau 13. Caractéristiques physiques et chimiques des huiles de <i>Quercus</i> .....	86
Tableau 14. Composition en acides gras des huiles des espèces de <i>Quercus</i> analysées.....	90
Tableau 15. Répartition (%) et teneur en stérols (mg/kg) des huiles de <i>Quercus</i> .....	93
Tableau 16. Profils en composés volatils des huiles de <i>Quercus</i> .....	95
Tableau 17. Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/kg) et en flavonoïdes (mg CE/kg) des huiles de <i>Quercus</i> .....	99
Tableau 18. Identification des composés phénoliques individuels.....	102
Tableau 19. Teneurs moyennes des composés phénoliques (mg GAE/kg d'huile) .....	104
Tableau 20. Concentrations moyennes des tocophérols (mg/kg d'huile brute) .....	105
Tableau 21. Teneurs moyennes en caroténoïdes et en pigments chlorophylliens .....	107
Tableau 22. Activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET / g d'huile}$ ).....	108
Tableau 23. Matrice de corrélations linéaires entre les composés antioxydants .....	110
Tableau 24. Caractéristiques qualitatives des huiles de <i>Quercus</i> après stockage .....	111
Tableau 25. Composition en acides gras des huiles de <i>Quercus</i> après stockage.....	114
Tableau 26. Profils volatils des huiles de <i>Quercus</i> après stockage .....	116
Tableau 27. Pourcentage des composés polaires des huiles de <i>Quercus</i> fraîches.....	119
Tableau 28. Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/kg) .....	121
Tableau 29. Concentrations moyennes des tocophérols (mg/kg d'huile brute) .....	122

Tableau 30. Taux (%) des polyphénols et des tocophérols dégradés pendant le stockage ....	123
Tableau 31. Temps d'induction (min) des huiles de <i>Quercus</i> avant et après stockage .....	124
Tableau 32. Composition moyenne de la farine de blé tendre (pour 100g) .....	154
Tableau 33. Liste des ingrédients incorporés dans les biscuits formulés .....	155
Tableau 34. Descripteurs sensoriels décrivant la texture et l'aspect général .....	161
Tableau 35. Granulométrie des farines de gland (en % de la masse) .....	162
Tableau 36. Paramètres de couleur de farines de gland .....	163
Tableau 37. Composition biochimique des farines de gland en % de matière sèche .....	164
Tableau 38. Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/100g), en flavonoïdes .....	166
Tableau 39. Paramètres dimensionnels et propriétés texturales .....	169
Tableau 40. Paramètres de couleur des différents biscuits formulés .....	172
Tableau 41. Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/100g), en flavonoïdes .....	173
Tableau 42. Profil volatil des différents types de biscuits formulés .....	175
Tableau 43. Caractéristiques sensorielles des différents types de biscuits formulés .....	177



## Liste des figures

Figure 1. Zones de répartition des chênes dans le monde (Romuald, 2007).....	4
Figure 2. Aire géographique du chêne en méditerranée (Barbero et Loisel, 1980).....	5
Figure 3. Répartition du chêne en Algérie (Nedjahi, 2010) .....	6
Figure 4. Coupe longitudinale d'un fruit de gland .....	9
Figure 5. Situation géographique de zone d'étude (ANIREF, 2013) .....	12
Figure 6. Montagne Sidi Rghis.....	13
Figure 7. Le chêne vert ( <i>Quercus ilex</i> L.) ; a : Fruit, b : Arbre, c : Feuilles (Images personnelles).....	14
Figure 8. Le chêne liège ( <i>Quercus suber</i> L.) ; a : Fruit, b : Arbre, c : Feuilles (Images personnelles).....	15
Figure 9. Le chêne kermès ( <i>Quercus coccifera</i> L.) ; a : Fruit, b : Arbre, c : Feuilles (Images personnelles).....	16
Figure 10. Structure et nomenclature des acides gras saturés, mono- et polyinsaturés .....	24
Figure 11. Représentation d'une molécule de triglycérides .....	26
Figure 12. Représentation des principales catégories de phospholipides .....	27
Figure 13. Classement des huiles végétales en fonction de leur composition en acides gras (% saturés AGS, monoinsaturés AGMI et polyinsaturés AGPI (Cuvelier et Maillard, 2012) .....	31
Figure 14. Composition panoramique des corps gras et importance relative des principales classes de composés (Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012).....	32
Figure 15. Schéma des réactions d'oxydation des lipides (Berset et Cuvelier, 1996).....	36
Figure 16. Évolution schématique de l'auto-oxydation des acides gras insaturés au.....	39
Figure 20. Structure chimique des tanins (Macheix <i>et al.</i> , 2005).....	47
Figure 21. Principaux caroténoïdes antioxydants (Laguerre <i>et al.</i> , 2007) .....	48
Figure 26. Photo d'un appareil Rapidoxy (Anton Paar) .....	73
Figure 27. Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction et l'analyse des composés phénoliques des huiles de <i>Quercus</i> .....	80
Figure 28. Chromatogramme LC-PDA-MS à 280 nm des composés phénoliques .....	101

Figure 29. Chromatogrammes typiques des tocophérols des huiles étudiées A: <i>Q. ilex</i> ; .....	107
Figure 30. Evolution des caractéristiques de qualité des huiles étudiées avant (T0) .....	113
Figure 31. Variation des teneurs totales en acides gras des huiles de <i>Quercus</i> gras avant (T0) .....	115
Figure 32. Evolution des composés phénoliques totaux pendant le stockage.....	120
Figure 33. Variation des tocophérols avant et après stockage.....	123
Figure 34. Arrangement des biscuits crus dans le plat à four.....	155
Figure 35. Diagramme adopté pour la préparation des biscuits .....	156
Figure 36. Test de flexion en trois points par texturomètre Zwick .....	159
Figure 37. Teneur en eau (TE) et activité de l'eau (aw) des différents biscuits formulés .....	168
Figure 38. Présentation des différents types de biscuits .....	170
Figure 39. Résultats du test Rapidoxy (IT) des trois types de biscuits .....	174
Figure 40. Profil sensoriel de trois types de biscuits formulés.....	179

## Liste des annexes

Annexe 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux .....	i
Annexe 2. Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes .....	i
Annexe 3. Courbe d'étalonnage des tocophérols .....	ii
Annexe 4. Courbe d'étalonnage du $\beta$ -carotène .....	iii
Annexe 5. Courbe d'étalonnage de Trolox (test DPPH).....	iv
Annexe 6. Courbe d'étalonnage de Trolox (test ABTS).....	iv
Annexe 7. Profils chromatographiques des esters méthyliques d'acides gras des huiles de trois espèces de <i>Quercus</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> v
Annexe 8. Profils chromatographiques des stérols des huiles de trois espèces de <i>Quercus</i> .. ...	vi
Annexe 9. Profils chromatographiques des composés volatils des huiles de trois espèces de <i>Quercus</i> .....	vii
Annexe 10. Chromatogrammes HPLC-UV des composés phénoliques des huiles étudiées.	viii
Annexe 11. Chromatogrammes typiques des composés polaires des huiles étudiées .....	ix
Annexe 12. Fiche d'évaluation sensorielle des biscuits formulés.....	x

## Liste des abreviations

<b>ABTS.</b>	2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
<b>AG.</b>	Acides gras
<b>AGI.</b>	Acides gras insaturés
<b>AGMI.</b>	Acides gras monoinsaturés
<b>AGPI.</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>AGS.</b>	Acides gras saturés
<b>CCM.</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CE.</b>	Catéchine équivalent
<b>CPG.</b>	Chromatographie phase gazeuse
<b>CPT.</b>	Composés phénoliques totaux
<b>DAD.</b>	Détecteur à barrettes diode
<b>DG.</b>	Diglycérides
<b>DPPH.</b>	1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil
<b>EMAG.</b>	Esters méthyliques des acides gras
<b>ESI.</b>	Ionisation par électrospray
<b>FID.</b>	Détecteur à Ionisation de Flamme
<b>FLD.</b>	Détecteur de fluorescence
<b>FT.</b>	Flavonoïdes totaux
<b>GAE.</b>	Acide gallique équivalent
<b>HDP.</b>	Hydroxy-diphénoyle
<b>HPLC.</b>	Chromatographie liquide de haute performance
<b>HPSEC.</b>	Chromatographie d'exclusion à haute performance
<b>HS.</b>	Espace de tête
<b>MS.</b>	Spectrométrie de masse
<b>ox-TG.</b>	Triglycérides oxydés
<b>PTG.</b>	Oligopolymères de triglycérides
<b>TAG.</b>	Triglycérides des acides gras
<b>TCP.</b>	Composés polaires totaux
<b>TE.</b>	Trolox équivalent
<b>THF.</b>	Tetrahydrofuran
<b>MSE.</b>	Triméthylsilyléther
<b>SPME.</b>	Solide Phase Micro Extraction
<b>UV.</b>	Ultra Violet

## Lexique

**Akène** : Fruit sec, indéhiscent, à graine unique, dont le péricarpe, plus ou moins sclérifié, n'est pas soudé à la graine.

**Albumen** : Tissu riche en réserves nutritives, qui avoisine la plantule chez certaines graines.

**Arbrisseau** : Plante ligneuse vivace, rameuse dès la base et ne dépassant pas 4 m de hauteur.

**Arbuste** : Plante ligneuse vivace ne dépassant pas 10 m de hauteur et dont le tronc n'est pas ramifié dès la base. (Un arbuste jeune a le port d'un arbrisseau, puis il acquiert celui d'un arbre par perte des branches les plus basses.).

**Caducifoliés** : Qualifie un groupe d'arbres, une forêt, dont les arbres perdent leurs feuilles en hiver. Un végétal caducifolié, ou caduescent, a des feuilles caduques ou vit dans une formation végétale composée de tels végétaux.

**Caduques** : Se dit des feuilles qui tombent durant la saison d'hiver et se renouvellent chaque année.

**Chatons** : Inflorescence propre à divers arbres et constituée par un épi, pendant ou dressé, de minuscules fleurs unisexuées.

**Cupule** : Godet écailleux, creusé en forme de petite coupe, enserrant la base du fruit chez certains végétaux.

**Endocarpe** : Partie la plus interne du fruit.

**Epicarpe** : Pellicule, peau qui recouvre un fruit.

**Eu-méditerranéen** : Relatif à la Méditerranée, typique des pourtours méditerranéens

**Futaies** : Bois ou forêt provenant de semis ou de plantations et destiné à produire des arbres de grande dimension, au fût élevé et droit.

**Gemmule**: Premier bourgeon d'une plante, à partir duquel elle commence à germer.

**Héliophile** : Une plante héliophile qualifie une plante aime la lumière et qui se développe dans des biotopes ensoleillés.

**Introgression** : Transfert d'un gène d'une espèce au génome d'une autre après une hybridation.

**Mésocarpe** : Zone médiane d'un fruit, entre l'épicarpe et le noyau ou les graines.

**Persistantes** : Se dit des feuilles qui ne tombent pas en hiver, par opposition à caduque.

**Sclérophylles** : Se dit des plantes sclérophytes, à feuilles coriaces, à cuticule épaisse et cireuse, adaptées à la sécheresse.

**Semi-Aride** : Se dit des zones bioclimatiques au sein desquelles l'alimentation en eau est insuffisante.

**Semi persistantes** : Plante conservant au moins une partie de son feuillage en toute saison.

**Supra-Méditerranéen** : étage bioclimatique qui a été défini comme ni trop doux (mésoméditerranéen), ni trop froid (montagnard), ni trop humide l'été (collinéen), et peut posséder des variantes sub-humides, humides ou per-humides (bien que rare) selon les secteurs géographiques Semi-caducifoliés

**Xérophile**: Une plante xérophile qualifie une plante capable de vivre dans une sécheresse importante, ou adaptée aux milieux secs.

# *Introduction générale*

Malgré la diversité des ressources végétales dans le monde, très rares sont celles exploitées pour l'alimentation humaine pour satisfaire les divers besoins des populations. En effet, beaucoup d'espèces, dont l'utilisation alimentaire était importante dans le passé, sont négligées ou sous-exploitées actuellement. Les glands, fruits des chênes, présentent un excellent exemple de ces ressources négligées.

Depuis des milliers d'années, les espèces du *Quercus* ont été cultivées et utilisées dans la plupart des régions du monde (Hoeche *et al.*, 2014). Selon Bainbridge (2006), les glands étaient un aliment de base en Europe, au Moyen-Orient, en Afrique du Nord, en Asie et en Amérique du Nord. Cependant, à l'heure actuelle, ils ont presque disparus en tant que produit de consommation humaine.

*Quercus* est sans doute un des genres forestiers les plus riches en espèces, il comprend quelque 500 espèces accompagnées de nombreux hybrides, qui poussent dans des écosystèmes tempérés. Il est bien représenté à l'état spontané dans le bassin méditerranéen (Bonfils *et al.*, 2005).

Les chênes représentent un capital forestier et constituent une des richesses forestières de l'Algérie. Ils couvrent des superficies étendues, soit environ 40 % de la forêt Algérienne (Alatou, 1994).

Les glands sont riches en composés nutritifs; ils contiennent environ 59% d'amidon, 33% de matière grasse dont plus de 80% sont insaturés et environ 8% de protéines. De plus, ils contiennent une quantité considérable d'électrolytes (calcium, magnésium, potassium et phosphore) (Özcan *et al.*, 2006 ; Hoeche *et al.*, 2014). A côté des composants alimentaires, ils contiennent divers composés biologiquement actifs (stéroïdes, tocophérols, composés phénoliques) (Léon-Camacho *et al.*, 2004 ; Rakić *et al.*, 2006).

L'intérêt récent porté à la recherche de la santé grâce à une alimentation équilibrée pourrait faire de cette ressource de nourriture, autrefois importante, un nouvel ingrédient attrayant pour l'avenir, et pourrait constituer également un argument en faveur de l'inclusion des glands dans notre régime alimentaire (Hoeche *et al.*, 2014).

L'originalité de cette étude réside dans l'absence d'études exhaustives sur la caractérisation et la composition de l'huile et de la farine de glands du genre *Quercus* et en particulier leur composition, leur potentiel antioxydant et technologique.



Les principaux objectifs de cette thèse s'inscrivent dans le cadre d'une contribution à la valorisation du fruit de gland de trois espèces de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. suber* et *Q. coccifera*) afin de mettre au point de nouveaux produits à haute valeur ajoutée (huile et farine) et ainsi de créer de nouvelles opportunités pour l'utilisation de ces deux produits de gland.

De ce fait, il nous a paru judicieux de soulever et traiter deux préoccupations importantes pour renforcer notre hypothèse selon laquelle l'huile et la farine de gland pourraient constituer de nouveaux produits à haute valeur ajoutée.

- L'huile de gland peut-elle être classée dans la catégorie des huiles alimentaires de par ses caractéristiques biochimiques et technologiques ?
- La farine de gland peut-elle être acceptée en tant que nouvel ingrédient alimentaire ?

Pour atteindre ces objectifs et répondre à ces préoccupations, ce travail de thèse se donne les objectifs suivants :

- Réalisation d'un screening phytochimique des huiles extraites des fruits de gland par leur caractérisation biochimique et évaluation de leur potentiel antioxydant et leur stabilité oxydative au cours du stockage ;
- Caractérisation physicochimique des farines de gland, étude de leur aptitude technologique par l'élaboration d'un biscuit fonctionnel et appréciation de ses qualités nutritionnelle et sensorielle.

Après une introduction générale, l'ensemble de ce travail est articulé en trois parties principales :

La première partie a pour objectif de présenter la matière végétale de façon botanique, en apportant des précisions sur la nature et la répartition géographique des espèces de *Quercus*, en énumérant les différentes utilisations, et en y présentant la composition chimique et la valeur nutritionnelle. Au sein de cette même partie, une description des différentes espèces retenues dans le présent travail ainsi qu'une présentation de leur origine géographique seront abordées.

Les huiles extraites à partir des fruits de gland retenus feront l'objet de la deuxième partie. Dans un premier temps, une étude phytochimique incluant une caractérisation physicochimique, une détermination de la composition en acides gras des huiles et des dosages qualitatifs et quantitatifs des principaux composés de la fraction insaponifiable de ces huiles seront réalisés. Puis, une évaluation de leur potentiel antioxydant ainsi que leur stabilité oxydative, par le suivi des marqueurs d'oxydation au cours du stockage, sera menée.

Enfin, une troisième partie consacrée, à l'étude de la possibilité d'utiliser la farine de gland comme un nouvel ingrédient pour l'élaboration d'un biscuit fonctionnel, sera réalisée.

Les trois parties seront suivies d'une conclusion générale et quelques recommandations.

*Première partie :*

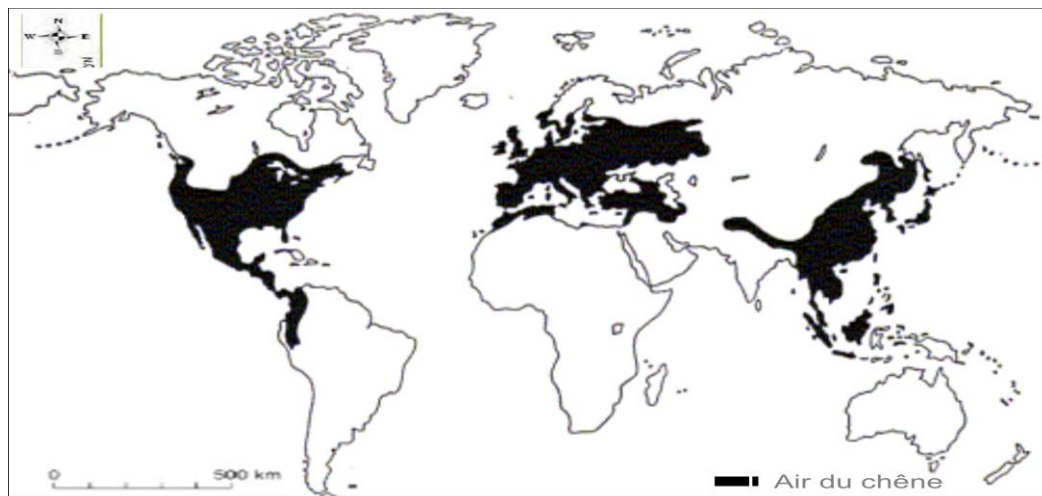
*Eléments bibliographiques et description des  
espèces de chêne retenues dans cette étude*

## 1. Le chêne: Aspects géographique, écologique et botanique

### 1.1. Répartition géographique

#### 1.1.1. A l'échelle mondiale

*Chêne* est le nom vernaculaire de nombreuses espèces d'arbres et d'arbustes appartenant au genre *Quercus*, et à certains genres apparentés de la famille des Fagacées, notamment *Cyclobalanopsis* et *Lithocarpus*. Le genre *Quercus* est sans doute un des genres forestiers les plus riches en espèces, mais aussi un des plus controversés. Il est indigène dans l'hémisphère nord et comprend quelque 500 espèces accompagnées de nombreux hybrides. Le centre de répartition se situe en Amérique du Nord, mais un grand nombre d'espèces peuple la région méditerranéenne et l'ouest de l'Asie (Bonfils *et al.*, 2005). En direction du sud, quelques espèces se sont avancées jusqu'à l'Équateur et en Indonésie. En Afrique, ils sont limités à sa partie Nord. En Europe, il existe 20 à 30 espèces différentes de chênes, la plupart autour de la Méditerranée orientale (Figure 1). Le nombre d'espèces diminue fortement lorsque l'on va vers le nord, aucune espèce n'atteignant la zone boréale au 60° degré de latitude (Bonfils *et al.*, 2005).



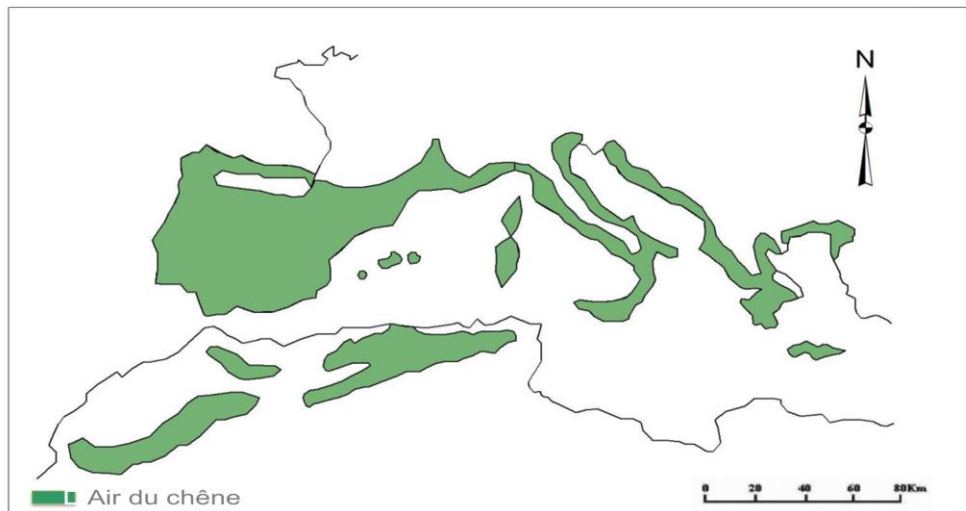
**Figure 1.** Zones de répartition des chênes dans le monde (Romuald, 2007)

#### 1.1.2. Dans le bassin méditerranéen

La place des chênaies en région méditerranéenne peut sembler, à première vue, réduite. Cependant une analyse plus approfondie de la végétation forestière et de son histoire montre l'importance majeure des chênes dans le bassin méditerranéen et leur diversité spécifique (Bonin et Romane, 1996).

Le chêne est parmi les espèces qui occupent une large espace sur les deux rives du bassin méditerranéen (Figure 2), avec une expansion plus importante en France, Italie, Grèce, Espagne et Portugal (Barbero et Loisel, 1980). L'aire de distribution de chêne se localise principalement dans la partie occidentale du bassin méditerranéen où son aire de distribution diminue dans la partie centrale du bassin pour disparaître totalement dans la zone orientale (Barbero et Romane, 1992). En effet, sa distribution est déterminée par des limites climatiques précises (Bellarossa *et al.*, 2003).

C'est ainsi que, les chênes sclérophylles caractérisent électivement l'étage de végétation «eu-méditerranéen» surtout en ambiance bioclimatique subhumide, alors que les chênes caducifoliés se rencontrent essentiellement à l'étage «supra-méditerranéen» et en ambiance bioclimatique humide. Les chênes semi-caducifoliés se situent en revanche en méditerranée méridionale et en ambiance bioclimatique humide également (Quézel, 1976).



**Figure 2.** Aire géographique du chêne en méditerranée (Barbero et Loisel, 1980)

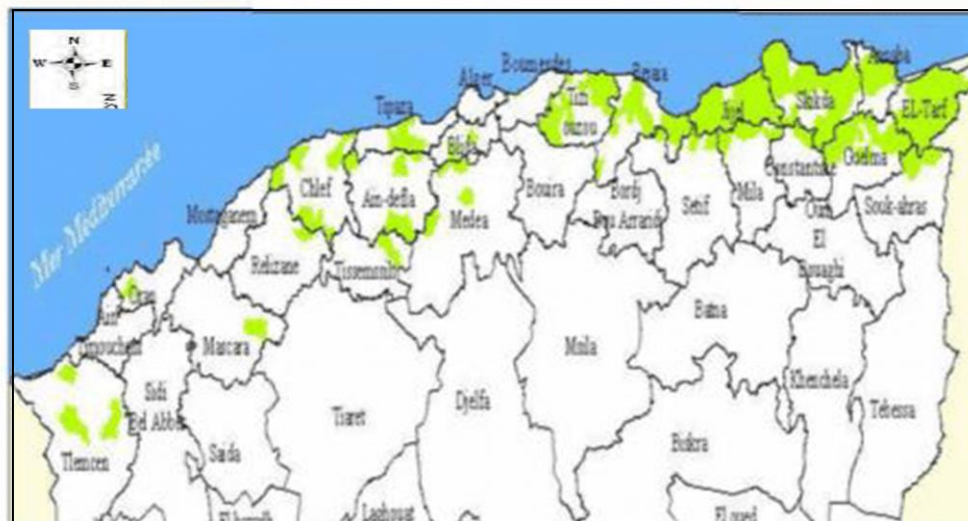
### 1.1.3. En Algérie

En Algérie, les chênes représentent un capital forestier, ils couvrent des superficies qui s'étendent entre les frontières marocaines et tunisiennes, du littoral méditerranéen au nord jusqu'aux chaînes telliennes au sud, soit environ 40 % de la forêt Algérienne (Alatou, 1994). Les plus vastes massifs sont localisés à l'Est du pays, région qui renferme à elle seule près du 4/5 de la subéraie algérienne.

Les subéraies algériennes sont constituées de nombreuses espèces, essentiellement le chêne-liège (*Quercus suber*), le chêne vert (*Quercus ilex*), le chêne-zeen (*Quercus faginea*) et le chêne-kermès (*Quercus coccifera*) (Boudy, 1955).

La chênaie est très inégalement répartie, les plus belles futaies denses occupent les montagnes de Kabylie et à l'est jusqu'à la frontière Tunisienne (Messaoudène, 1996). Au plan de la répartition géographique, on peut distinguer trois zones principales:

- Le littoral Est et les massifs côtiers humides et subhumides ; on y trouve les forêts les plus denses de chênes lièges qui se localisent principalement dans le nord-est du pays et les chênes caducifoliés (Zéen et Afarès) (Messaoudène, 1996). Ces peuplements occupent les milieux les plus frais et les altitudes élevées dans la subéraie.
- Les hautes plaines continentales avec les grands massifs de Pin d'Alep et de chênes verts. Le chêne vert est surtout abondant dans le nord-ouest du pays et qui, en étage semi-aride, joue avec le thuya et le genévrier un rôle de protection essentiellement.
- L'Atlas Saharien avec les maquis de chênes verts et de genévriers.



**Figure 3.** Répartition du chêne en Algérie (Nedjahi, 2010)

## 1.2. Exigences écologiques de chêne

L'une des principales raisons du succès du chêne en zone méditerranéenne, réside dans sa remarquable résistance aux contraintes écologiques et en particulier hydriques. Le chêne présente un certain nombre de traits biologiques lui permettant de survivre et de continuer à fonctionner pendant les périodes de sécheresse. Ainsi, en plus d'un enracinement profond, le chêne peut

répondre à une forte sécheresse par le développement d'une surface évapotranspirante limitée qui est en relation avec la faible réserve hydrique des sols sur lesquels il pousse (Barbero *et al.*, 1992).

Le chêne est un arbre thermophile, poussant sous des climats tempérés à hiver doux, dont l'optimum se situe entre 13 °C et 18 °C, souvent résistant à la sécheresse, pas adapté à la vie dans les climats froids (Boudy, 1952 ; Bonflis *et al.*, 2005). La tolérance du chêne au froid semble se situer à la limite de -4°C (Alatou *et al.*, 2007).

L'humidité est généralement un facteur limitant, car bien qu'étant xérophile, le chêne nécessite une humidité atmosphérique d'au moins 60 %, même en saison sèche, et d'une pluviométrie allant de 400 à 1200 mm par an (Boudy, 1952).

Pour la lumière, le chêne est une essence héliophile, c'est-à-dire de pleine lumière et exigeant une forte insolation (Chollet, 1997).

### **1.3. Présentation botanique**

#### **1.3.1. Taxonomie**

Le genre *Quercus* comprend plusieurs centaines d'espèces (entre 200 et 600). Leur nombre fait l'objet de polémiques entre les taxonomistes, en raison des nombreuses formes intermédiaires résultant de l'introgression entre espèces. Le genre *Quercus* est subdivisé en six grandes sections botaniques dont les plus importantes en nombre sont les Chênes blancs (*Lepidobalanus*, 152 espèces) et les Chênes rouges (*Erythrobalanus*, 136 espèces) (Kremer *et al.*, 2002).

La classification classique du chêne (Cronquist, 1981) est :

- ✓ Règne : Plantea
- ✓ Sous règne : Tracheobionta
- ✓ Division : Magnoliophyta
- ✓ Classe : Magnolipsida
- ✓ Sous-classe : Hamamelidae
- ✓ Ordre : Fagales
- ✓ Embranchement : Angiospermes
- ✓ Sous/Embranchement : Dicotylédones
- ✓ Famille: Fagaceae
- ✓ Genre: *Quercus*

D'après Bouhraoua *et al.* (2002), le chêne est reconnu en Algérie, selon les noms suivants:

- ✓ *Belloute El Féline* : cette dénomination est probablement due au fait de la dénomination grecque Phelloderus (Phellos : liège)
- ✓ *Aqchouch* : dans les régions de grande Kabylie.
- ✓ *Fernane* : dans les régions de petite Kabylie.

### **1.3.2. Description générale**

Le genre *Quercus* compte plusieurs centaines d'espèces caduques, persistantes ou semi-persistantes, originaires des régions tempérées, tropicales ou subtropicales. Selon l'espèce, le chêne peut être un arbre de plusieurs dizaines de mètres de haut (chêne sessile), ou un grand arbuste (chêne vert) ou un arbrisseau (chêne kermès). De croissance rapide, il est capable de vivre plusieurs siècles, son tronc atteignant plus de 50 cm de diamètre. Le port du chêne varie aussi selon les espèces. Rustique à semi-rustique, le chêne appréciera une place en plein soleil dans un endroit dégagé.

De nombreuses espèces présentent des feuilles avec un bord lobé, mais certaines sont des feuilles entières avec un bord lisse ou denté. Une des principales caractéristiques réside dans la cupule du fruit. Les fleurs sont des chatons qui apparaissent au printemps. Les fleurs femelles sont isolées les unes des autres et entourées d'une enveloppe écailleuse, " la cupule ", à l'extrémité d'un pédoncule de longueur variable. Chez les chênes méditerranéens, les fleurs femelles sont groupées par 3 sur un court pédoncule (Yessad, 2000).

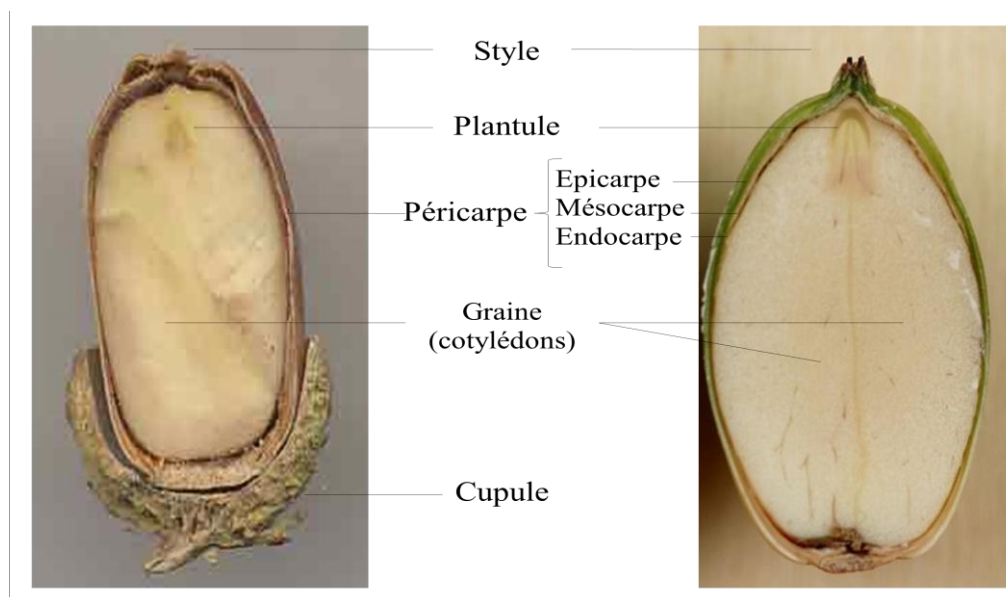
Le fruit est un akène, appelé "gland", fixé dans la cupule. Quand il est mûr, en septembre, il tombe de lui-même et quitte sa cupule. Vu le nombre et la complexité botanique de ce genre, il a été divisé en sous-genres et en sections. Les caractères les plus apparents, qui permettent habituellement de comparer et de distinguer les chênes sont tirés de la cupule (Boudy, 1950 ; Berrichi, 2011).

### **1.3.3. Caractéristiques anatomiques du gland**

Le gland est un fruit sec ou akène. Il est constitué d'une graine enveloppée par un péricarpe assez coriace de couleur brune (Figure 4). Le péricarpe est formé de trois couches: vers l'extérieur par un épiderme externe ou épicarpe ; vers l'intérieur par l'endocarpe ; au centre par le mésocarpe. Le hile constitue la partie basale du gland ; c'est la zone la plus perméable du péricarpe. Le micropyle représente la partie distale. La graine est protégée par un tégument assez mince et



nervuré. Elle comprend deux cotylédons qui cachent du côté du micropyle un embryon composé d'une radicule, d'une tigelle et d'une gemmule (Praciak *et al.*, 2013).



**Figure 4.** Coupe longitudinale d'un fruit de gland

#### **1.4. Importance du fruit de gland**

##### **1.4.1. Composition chimique du fruit**

Les glands varient considérablement d'une espèce à l'autre. Riches en protides et souvent en lipides (selon les espèces), les glands sont très nutritifs. Ils contiennent d'importantes quantités de vitamines C, B2 et PP (Bainbridge, 2006). En outre, ils contiennent une quantité considérable d'électrolytes (calcium, magnésium, potassium et phosphore) (Özcan *et al.*, 2006; Hoeche *et al.*, 2014). La gamme de composition moyenne du fruit de gland est présentée dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Composition nutritive du gland en pourcentage (Shimada, 2001; Bainbridge, 2006)

<b>Eléments nutritifs</b>	<b>Teneurs en g/100g</b>
Eau	8,7-44,6
Protéines	2,3-8,6
Lipides	1,1-31,3
Glucides	32,7-89,7
Fibres	1,9-6,8
Calorie (Kcal/100g)	1,200-2,600

Selon Rakić *et al.* (2006), les glands sont des aliments fonctionnels et nutritionnels riches en nutriments. Certains de leurs avantages pour la santé sont attribués au haut niveau de composés phénoliques (tanins, acide gallique et différents dérivés hexahydroxydiphenoyl) trouvés dans les glands, similaires ou supérieurs aux amandes, noisettes et arachides. Ces composés phénoliques fournissent une farine avec des niveaux élevés d'antioxydants, ce qui pourrait avoir des avantages potentiels pour la santé (Hoeche *et al.*, 2014).

#### **1.4.2. Utilisation du fruit**

Les glands, fruit de chêne, ont été utilisés pendant des milliers d'années pratiquement partout où des chênes sont trouvés, en Europe, en Asie, en Afrique du Nord, en Moyen-Orient et en Amérique du Nord. Selon Bainbridge (2006), les glands ont été une nourriture de base dans de nombreuses régions du monde, jusqu'à récemment ils sont encore une culture alimentaire commerciale dans plusieurs pays. L'utilisation de glands dans le cadre de l'alimentation humaine a été bien documentée par Creel (1920); Bainbridge (2006); Sommerfeld (2008); Bethany (2009); Mason et Nesbitt (2009) ; Claudia (2013) et Hoeche *et al.* (2014).

Une importante récolte commerciale a encore lieu en Chine. La récolte commerciale en Corée fournit annuellement l'amidon et la farine préparés qui atteignent les marchés américains. Certains glands sont collectés au Japon. Les glands sont encore récoltés et utilisés dans plusieurs régions des États-Unis, notamment le sud de l'Arizona et la Californie. Historiquement, les glands étaient particulièrement importants en Californie. Pour beaucoup de Californiens, les glands constituaient la moitié du régime alimentaire et la récolte annuelle dépassait probablement la récolte de maïs sucré dans l'état (Bainbridge, 2006).

Dans la région méditerranéenne, principalement en Italie et en Espagne, les glands ont été utilisés par les classes les plus pauvres (Hill, 1952 ; Pieroni, 1999 ; Rakić *et al.*, 2007). Ils ont été utilisés comme aliment directement, pour faire du pain ou comme ingrédient pour le café, le gâteau, la crème glacée et d'autres desserts (Bainbridge, 1986; León-Camacho *et al.*, 2004; Al-Rousan *et al.*, 2013). Cependant, à l'heure actuelle, il a presque disparu comme aliment pour la consommation humaine.

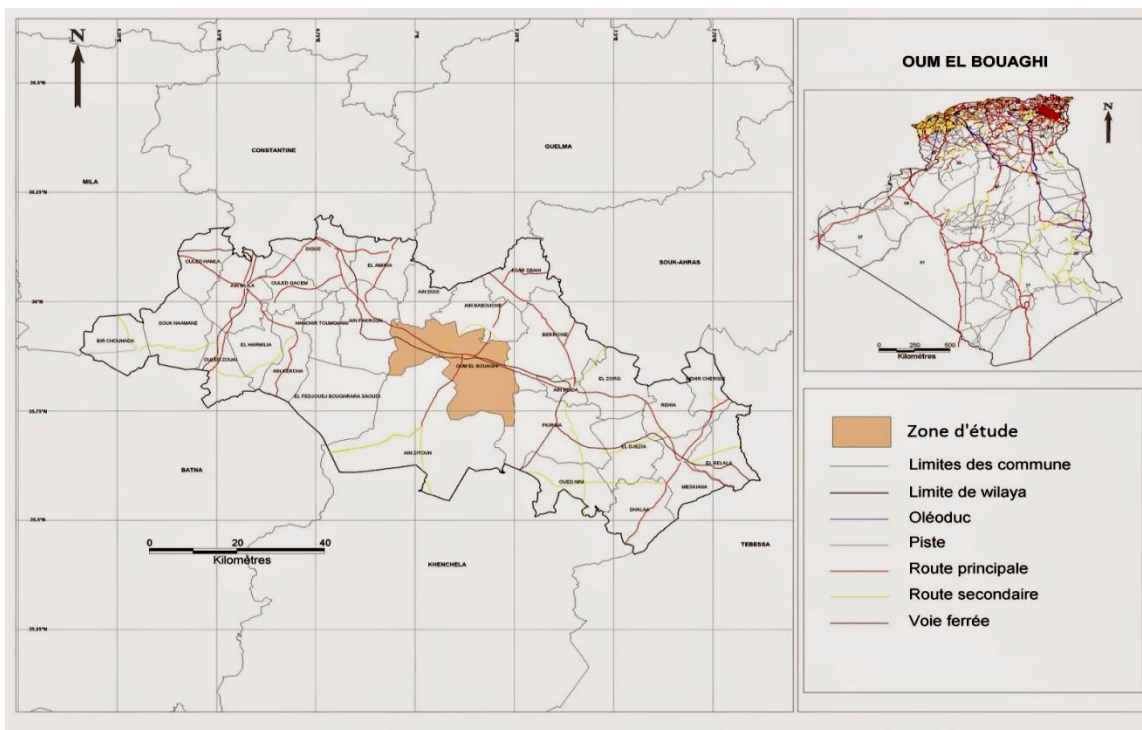
En Afrique du nord, il demeure encore une certaine consommation du gland parmi les produits de cueillette. En Algérie, les glands sont soit consommés en tant que fruit sec ou intégrés dans la fabrication du couscous (Région de Kabylie); un plat très prisé par la population autochtone.

Etant un aliment énergétique de premier ordre, riche notamment en amidon, le gland a été toujours utilisé, de part le monde, en alimentation animale et servi à différents espèces animales domestiques pour produire des viandes très appréciées par les consommateurs: porcs, ovins, bovins, volailles...etc. (Ait Saada *et al.*, 2017).

## 2. Espèces de chêne retenues dans la présente étude

### 2.1. Origine géographique

Les espèces retenues dans le cadre de cette étude ont été récoltées d’une forêt située dans la montagne Sidi Rghis dans la région d’Oum El Bouaghi (O.E.B.). La wilaya d’O.E.B. se situe dans la zone des hauts plateaux, au centre des wilayas de l’Est Algérien, elle s’étend sur une superficie de 6187 km<sup>2</sup>, et elle se localise à une altitude variant entre 700 et 1000 m (Figure 5). La région correspond à un étage bioclimatique semi-aride à hiver froid et pluvieux et un été chaud et sec avec une pluviométrie comprise entre 350 et 400 mm/an. Le territoire de la wilaya est constitué de hautes terres entrecoupées de chaînons calcaires. Les plaines et collines occupent 63,8%, les montagnes 17,3%, les plateaux et autre 18,9% (Kabbout, 2016).



**Figure 5.** Situation géographique de zone d’étude (ANIREF, 2013)

La montagne Sidi Rghis est l’un des principaux reliefs montagneux de la région. Elle se situe au nord de la ville d’O.E.B. et culmine à 1635 m, ce positionnement lui confère l’avantage naturel de profiter de la végétation naturelle de la montagne (Figure 6). Les forêts s’étendent sur 75,750 ha, soit 12% de la superficie de la wilaya, les principales essences sont : Pin d’Alep (66,400 ha), Chêne (8,150 ha) Cyprés (1,200 ha) (Ramade, 2002 ; ANDI, 2013).



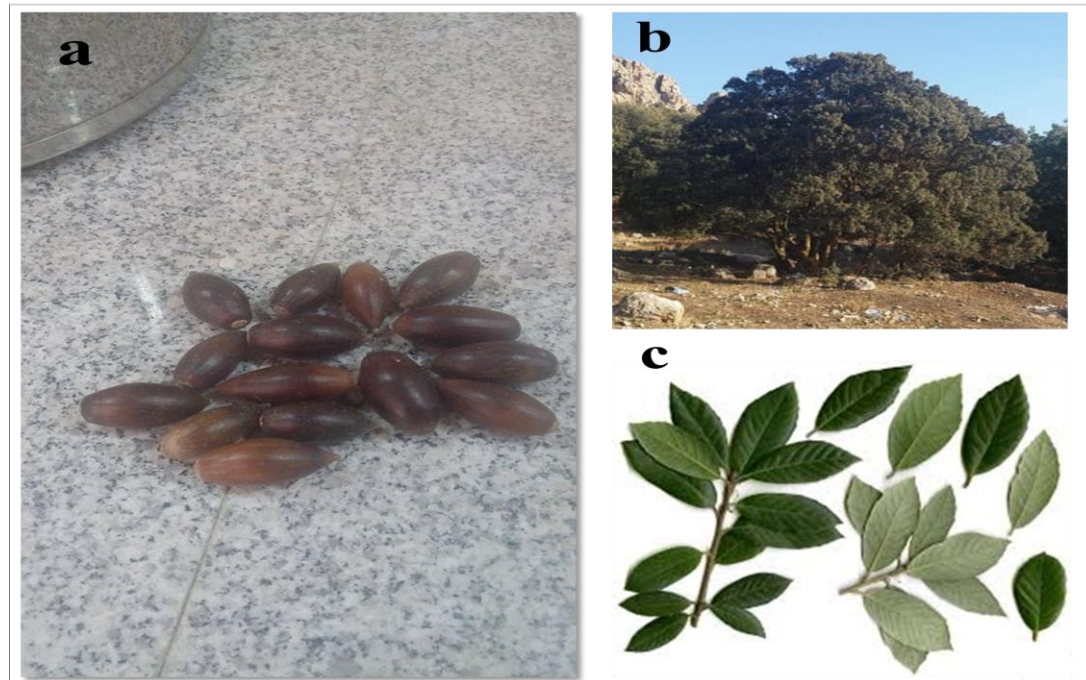
**Figure 6.** Montagne Sidi Rghis

## **2.2. Description des espèces**

Cette étude a porté sur trois espèces du genre *Quercus* : *Quercus ilex* L., *Quercus suber* L. et *Quercus coccifera* L. Le choix particulier tient compte à la fois de leur localisation géographique, leur accessibilité et la rareté des études exhaustives sur la composition phytochimique des produits issus de leurs fruits (Léon-Camacho *et al.*, 2004 ; Charef *et al.*, 2008) et même sur leur potentiel alimentaire (Bainbridge, 2006; Hoeche *et al.*, 2014; Casey, 2015).

### **2.2.1. Le chêne vert (*Quercus ilex* L.)**

Le chêne vert est un arbre au feuillage persistant. Sa durée de vie peut atteindre plus de 1000 ans. Ses feuilles caduques ou ovales sont vert foncé et luisantes sur le dessus, pubescentes et blanchâtres en-dessous, à bords lisses ou dentés (Figure 7). L'écorce est noir brunâtre et craquelée en petites plaques carrées minces. Le fruit est un gland de couleur brune, de 1,5-2 cm de long, enfermé dans une cupule pubescente vert pâle avec des écailles appliquées et pendu sur de courts pédoncules. Il aime les sols calcaires et peut grandir jusqu'à 25 mètres de haut par 20 m de large (Praciak *et al.*, 2013; De Rigo et Caudullo, 2016).



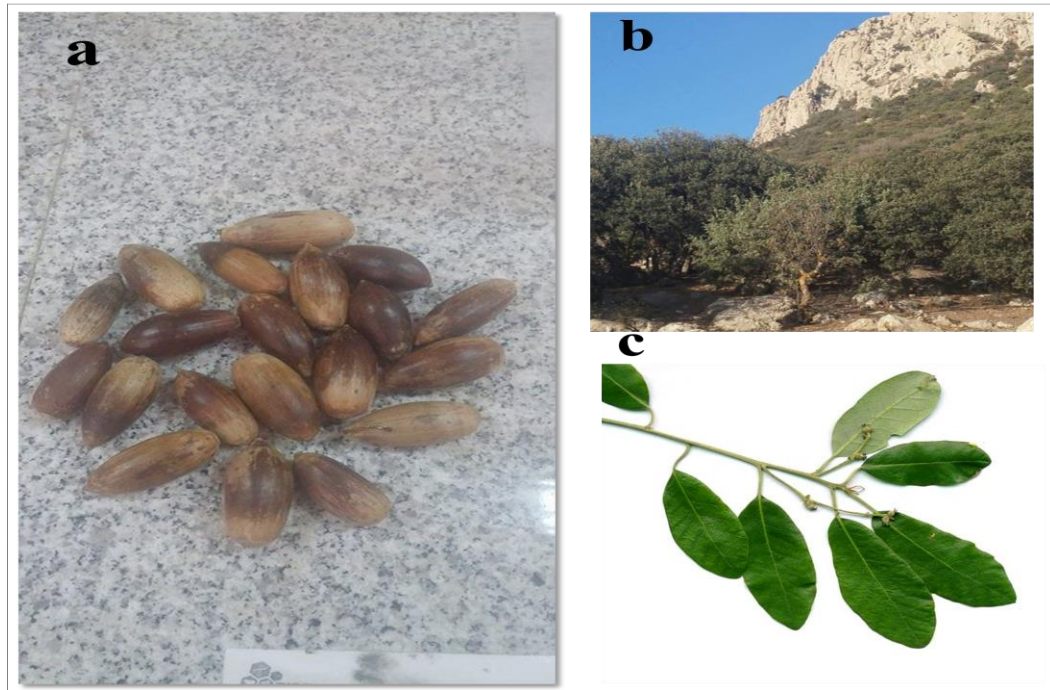
**Figure 7.** Le chêne vert (*Quercus ilex* L.) ; **a** : Fruit, **b** : Arbre, **c** : Feuilles (Images personnelles)

### 2.2.2. Le chêne liège (*Quercus suber* L.)

Le chêne liège est un arbre à la cime arrondie et au feuillage persistant. Il a une croissance lente et une longue durée de vie (environ 200 ans ou plus) et atteint généralement 20 m de hauteur, mais peut atteindre 25 m et un diamètre de 1,5 m dans de bonnes conditions (Gil et Varela, 2008).

Les glands ont une longueur de 2-3 cm dans une coupe assez profonde avec des écailles allongées. Les feuilles sont sclérophylles, à feuilles persistantes et de forme ovale, de 4 à 7 cm de longueur, vert foncé au-dessus et de couleur grisâtre pâle au-dessous.

Le Chêne liège se développe sur des sols non calcaires sous des climats chauds à tempérés (Praciak *et al.*, 2013 ; Houston *et al.*, 2016).



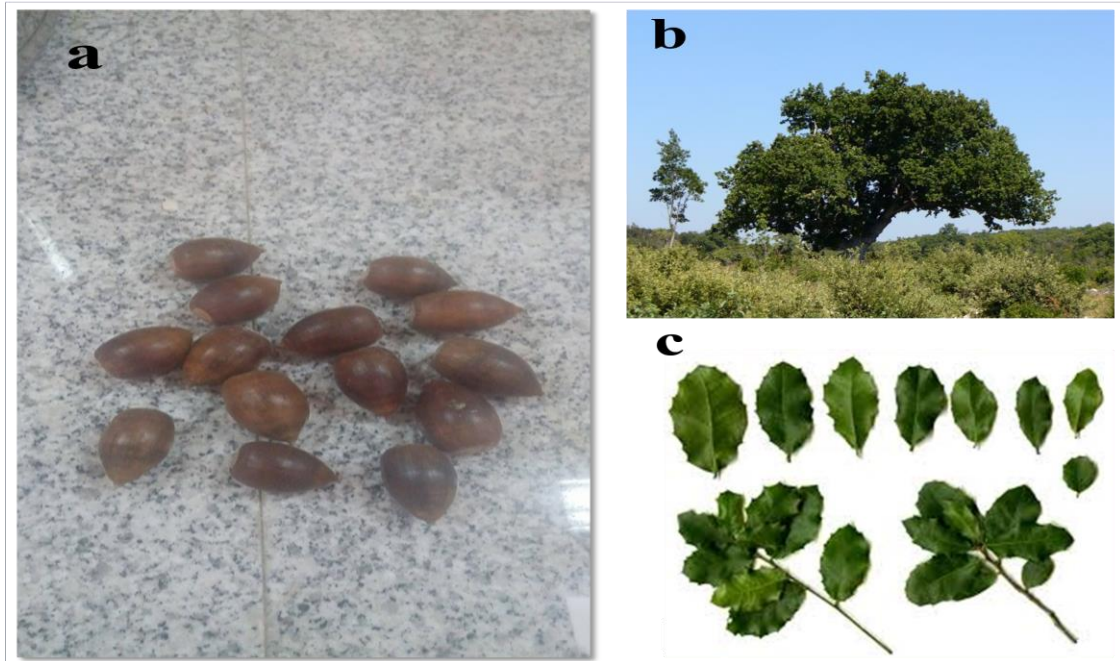
**Figure 8.** Le chêne liège (*Quercus suber* L.) ; **a** : Fruit, **b** : Arbre, **c** : Feuilles (Images personnelles)

### 2.2.3. Le chêne Kermès (*Quercus coccifera* L.)

Cette espèce est peu abondante par rapport aux autres espèces de *Quercus*. Le chêne kermès est un arbuste de petite taille (max 2-3m), parfois confondu avec le chêne vert, en buisson, poussant dans les terrains ouverts, pierreux et calcaires.

Il présente des petites feuilles persistantes coriaces et piquantes, d'un vert luisant, les cupules des glands sont couvertes d'écailles aigües et redressées.

L'écorce est noire, légèrement crevassée. Le gland est recouvert par la cupule sur plus de la moitié de sa longueur (Ksontini, 1996 ; Villar-Salvador *et al.*, 2013).



**Figure 9.** Le chêne kermès (*Quercus coccifera* L.) ; **a** : Fruit, **b** : Arbre, **c** : Feuilles (Images personnelles)

### 2.3. Récolte et conditionnement

La récolte des fruits est une étape qui doit être faite soigneusement en respectant la période et la méthode de la cueillette. Les dates de récolte ont été majoritairement déterminées en fonction de la période de fructification des chênes. En plus des caractéristiques intrinsèques de l'espèce impliquée, les conditions de récolte (degré de maturité, présence ou absence des fruits détachés,...) peuvent aussi influencer la valeur nutritive des fruits.

Ainsi, la récolte des espèces retenues a été effectuée sur des fruits sains et mûrs, cueillis directement sur l'arbre juste avant leur chute. Les glands ont été récoltés sur plusieurs arbres entre octobre et novembre 2016 (4 à 5 kilogrammes par espèce). Ensuite, pour acheminer les fruits de gland du lieu de récolte jusqu'au laboratoire, ils sont introduits dans des sacs hermétiques placés dans des glacières à titre préventif afin d'éviter d'éventuels phénomènes de dégradations biochimiques.

Les espèces de *Quercus* utilisées dans cette étude ont été identifiées par comparaison avec celles répertoriées dans le « Guide illustré de la flore Algérienne » (N° 978-2-7466-4242-3).



Une fois identifié et récoltés, les glands de différentes espèces ont été triés en éliminant les glands percés et débarrassés de toutes les impuretés. Les graines ont été séparées manuellement et visuellement des coques. Elles ont été ensuite broyées en poudre fine en utilisant un broyeur électrique et passées à travers un tamis de 425  $\mu\text{m}$ , et convenablement lyophilisées (à  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  et à une pression de 0,08 mbar pendant 24 h pour obtenir une teneur en humidité  $<3\%$ ).

Avant les différentes extractions, la poudre ainsi produite a été conservée à l'abri de l'air, de l'humidité, de la lumière et à basse température (à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans des sacs hermétiques) afin d'inhiber les processus enzymatiques et les phénomènes d'oxydation.

## Références bibliographiques

ANDI (2013). Agence Nationale de développement de l'Investissement.

ANIREF (2013). Agence nationale d'intermédiation et de régulation foncière. Rubrique monographie Wilaya de Oum El Bouaghi, Algérie.

Ait Saada D., Ait Chabane O., Selselet-Attou G., Boudroua K., & Keddou R. (2017). Essais nutritionnels de la farine des glands en alimentation du poulet de chair (Caractéristiques organoleptiques-biochimiques-digestives et diététiques). *Salon National de l'investissement dans le Domaine des forêts- Parc National de Tlemcen* 24 et 25 Décembre 2017.

Alatou D. (1994). Croissance rythmique du chêne liège et du chêne zeen. *Première journée sur les végétaux ligneux*. Constantine 14 et 15 Novembre 1994.

Alatou D., Younsi S., Chouiel M., Kanouni M. & Benderradji M.E. (2007). Essai de la régénération assistée du chêne liège (*Quercus suber* L.) : par semis direct et par transplantation. *Annales de la recherche Forestière en Algérie*, 13 : 48-63.

Al-Rousan W. M., Ajo R. Y., Al-Ismaïl K. M., Attlee A., Shaker R. R., & Osaili T. M. (2013). Characterization of acorn fruit oils extracted from selected mediterranean *Quercus* species. *Grasas y Aceites*, 64(5), 554-560.

Bainbridge D. A. (2006). Acorn Use as Food.1–32 [Online]. Available at: [http://works.bepress.com/david\\_a\\_bainbridge/17](http://works.bepress.com/david_a_bainbridge/17)

Bainbridge D. (1986). Use of acorns for food in California: past, present, future. In: *Symposium, November*. 12-14.

Barbero M. et Loisel R. (1980). Le chêne vert en région méditerranéenne. *Revue forestière française*, XXXII, 531-544.

Barbero M. & Romane F., (1992). Evolution actuelle de la forêt méditerranéenne. In Landmann, G. (éd.) " Les recherches en France sur les écosystèmes forestiers". Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Paris : 19-20.

Barbero M., Loisel R., & Quézel P. (1992). Biogeography, ecology and history of Mediterranean *Quercus ilex* ecosystems. In *Quercus ilex L. ecosystems: function, dynamics and management* (pp. 19-34). Springer Netherlands.

Bellarosa R., Simeone M.C. & Schirone B. (2003). Germplasm conservation of Mediterranean oaks in Italy: distribution and genetic structure of cork oak (*Quercus suber* L.). In: Bozzano M, Turok J, eds. *Mediterranean Oaks Network, Report of the second meeting, 2-4 May 2002, Gozo, Malta. Rome, Italy : International Plan Genetic Resources Institute*, 5-12.

Berrichi M. (2011). Détermination des aptitudes technologiques du bois de *Quercus rotundifolia* lamk. et possibilités de valorisation. *Thèse Doct. État. Sci. Foresterie*, Univ. Tlemcen Algérie, 149 p.

- Bonfils P., Horisberger D. & Ulber M. (2005). Promotion du chêne. Stratégie de conservation d'un patrimoine naturel et culturel en Suisse. Ed: pro-*Quercus*; Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFFEP), Berne. 102.
- Bonin G. & Romane F. (1996). Chêne vert et chêne pubescent: Histoire, principaux groupements, situation actuelle. *For. Médit.* 17: 119-128.
- Boudy P. (1955). Economie forestière Nord Africaine. vol. 1, Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie. T. IV: 483 p. *Larose Edit., Paris*.
- Boudy P. (1952). Guide du forestier en Afrique du Nord, Ed : librairie agricole, horticole, forestière et ménagères, Pais, 505p.
- Bouhraoua R. T., Villemant C., Khelil M. A., & Bouchaour S. (2002). Situation sanitaire de quelques subéraies de l'ouest algérien: impact des xylophages. *IOBC/wprs Bull*, 25(5), 85-92.
- Bussotti F. & Grossoni P. (1998). Des problèmes dans la classification des chênes « Taxonomie en Europe et région méditerranéenne ». *Forêt méditerranéenne*. XIX, n° 3, p 267-278.
- Casey H. J. (2015). Southwest Cooking Oil: Acorn Oil from Native Oak Species *Q. Macrocarpa*, *Q. Shumardii*, and *Q. Polymorpha* Acorns as a Potential High-End Cooking Oil.
- Charef M., Yousfi M., Saidi M., & Stocker P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 921-924.
- Chollet F. (1997). La régénération naturelle du Hêtre. ONF -Bulletin techniques n°32.
- Claudia P. (2013) Acorn bread: A traditional food of the past in Sardinia (Italy). *Journal of Cultural Heritage*, 14 (S), pp. 71-74.
- Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.
- De Rigo D. & Caudullo G. (2016). *Quercus ilex* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species; European Union: Luxembourg*, 130-131.
- Gil L., & Varela M. C. (2008). EUFORGEN technical guidelines for genetic conservation and use for cork oak (*Quercus suber*). Bioersvity International. *Rome, Italy*, 6.
- Hill A.F. (1952). Economic Botany: A Textbook of Useful Plants and Plant Products. 2nd Edn., McGarw-Hill Book Co. Inc, New York, USA., Pages: 432.
- Hoeche U., Kelly A., & Noci F. (2014). Acorn: Staple food from the past or novel food for the future? –An investigation into the desirability and acceptability of acorn flour products. *Dublin gastronomy symposium*, Dublin, Ireland (pp. 1–14).

- Houston Durrant T., De Rigo D. & Caudullo G. (2016). *Quercus suber* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species, Publication Office of the European Union, Luxembourg.*
- Kabbout N., Merzoug D. & Chenchouni H. (2016). Ecological status of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural communities of Northeastern Algeria. *Journal of arthropod-borne diseases, 10(1), 24.*
- Kremer A., Petit R. J., & Ducousso A. (2002). Biologie évolutive et diversité génétique des chênes sessile et pédonculé. Biologie et écologie. *Revue Forestière Française, 2, 111-130.*
- Ksontini M. (1996). Étude écophysiological des réponses à la contrainte hydrique du chêne liège (*Quercus suber*) dans le Nord-Tunisie: comparaison avec le chêne Kermès (*Q. Coccifera*) et le chêne Zeen (*Q. faginea*) (Doctoral dissertation, Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC)).
- León-Camacho M., Viera-Alcaidea I. & Vicario I. (2004). Acorn (*Quercus* spp.) fruit lipids: saponifiable and unsaponifiable fractions: a detailed study, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81(5), 447-453.
- Messaoudène M. (1992). Relation climat- croissance radiale de *Quercus canariensis* Willd. et de *Quercus afarès* Pomel. dans les massifs forestiers de l'Akfadou et de Beni Ghobri-Algérie. *Ann. Forest. Algérie.* 3-27.
- Nedjahi M. (2010). Note synthétique sur la gestion sylvo - pastorale des forêts de chêne liège. *Institut National de la Recherche Forestière, Arboretum de Bainem Alger.* 14p.
- Özcan T. (2006). Total protein and amino acid compositions in the acorns of Turkish *Quercus* L. taxa. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53(2):419–429.
- Pieroni A. (1999). Gathered Wild Food Plants in the Upper Valley of the Serchio River (Garfagnana), Central Italy. *Economic Botany.* 53 (3), 327-341.
- Praciak A., Pasiecznik N., Sheil D., van Heist M., Sassen M., Correia C.S., Dixon C., Fyson G., Rushford K. & Teeling C. (2013). The CABI encyclopedia of forest trees, Wallingford Ltd., CABI: Oxfordshire, UK, p. 41
- Quézel P. (1976). Les chênes sclérophylles en région méditerranéenne. *Options Méditerranéennes, 35, 25-29.*
- Rakić S., Petrović S., Kukić J., Jadranin M., Tešević V., Povrenović D. & Šiler- Marinković S. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chem.* 104, 830-834.
- Rakić S., Petrović D., Tešević V., Simić M. & Maletić R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering, 74(3), 416–423.*
- Ramade F. (2002). Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. 2<sup>ème</sup> édition Dunod. Paris. p 240

Romuald H. (2007). Dans le monde Où trouver le genre *Quercus* ? [En ligne] accessible sur le site : [http://r.menant.free.fr/article.php3id\\_article=32&lang=en](http://r.menant.free.fr/article.php3id_article=32&lang=en)

Shimada T. (2001). Nutrient compositions of acorns and horse chestnuts in relation to seed-hoarding. *Ecological Research*, 16(4), 803-808.

Villar-Salvador P., Uscola M., & Heredia Guerrero N. (2013). *Quercus coccifera* L. Producción y Manejo de Semillas y Plantas Forestales. Organismo Autónomo Parques Nacionales. *Egraf, SA, Madrid*, 192-205.

Yessad S.A. (2000). Le chêne-liège et le liège dans les pays de la Méditerranée occidentale. ASBL Forêt wallonne, Louvain la Neuve, Belgium, Edi. MRW.123 p.

*Deuxième partie :*  
*Le fruit de Quercus pour la production*  
*d'une huile alimentaire*

## **Introduction**

De nombreuses sources d'huiles végétales disponibles ne sont pas exploitées ou utilisées de manière identique. A côté des sources conventionnelles à haut rendement telles que le palmier ou les graines de légumineuses, d'autres végétaux présentent des quantités non négligeables en huiles, et ne sont pas exploitées à grande échelle. C'est le cas du fruit de gland « *Quercus* ».

Depuis l'antiquité, l'huile de gland a été utilisée comme aliment et comme médicament dans la majeure partie du monde. C'est une huile de cuisson nutritive comparable à l'huile d'olive. Certaines variétés de glands contiennent plus de 30% d'huile. L'huile de gland est très similaire à l'huile d'olive et elle présente une saveur comparable (Bainbridge, 2006). Les études menées sur cette huile ont montré qu'elle présente des avantages nutritionnels similaires à ceux de l'huile d'olive (Al-Rousan *et al.*, 2013). Elle contient de nombreuses substances aux propriétés antioxydantes (Rakić *et al.*, 2000; Cantos *et al.*, 2003) et des niveaux importants d'acides gras insaturés (Ferriara-Dias *et al.*, 2003 ; Charef *et al.*, 2008; Al-Rousan *et al.*, 2013).

Dans cette partie du travail, nous avons tenté de réaliser un screening phytochimique et d'étudier la stabilité oxydative des huiles de trois espèces de *Quercus* et d'établir des comparaisons avec d'autres huiles végétales, en occurrence l'huile d'olive.

Pour atteindre cet objectif, cette partie s'est articulée autour des points suivants :

- Extraction de l'huile des glands de trois espèces du genre *Quercus*;
- Étude des propriétés physicochimiques et de la composition biochimique des huiles extraites;
- Evaluation de leurs composants fonctionnels et leur potentiel antioxydant ;
- Suivi de leur susceptibilité à l'oxydation (stabilité) après six mois de stockage.

## **Chapitre I : Etude bibliographique**

### **1. Données phytochimiques sur les lipides et les huiles végétales**

#### **1.1. Lipides alimentaires**

##### **1.1.1. Aperçu sur les lipides**

Les lipides sont des produits naturels largement répandus dans les règnes animal et végétal. Ils forment un grand groupe de molécules très hétérogène au point de vue de la structure ou des groupements fonctionnels mais possèdent des propriétés communes concernant leur densité (inférieure à celle de l'eau) et leur solubilité (Guilloton et Quintard, 2003). Peu polaires, les lipides sont généralement insolubles dans les solvants polaires (comme l'eau) mais très solubles dans les solvants non polaires ou faiblement polaires (comme l'éther, le chloroforme, l'acétone, l'hexane, etc.) (Kessous, 2008).

Les lipides forment une classe de constituants biologiques nutritionnellement importants. Ils forment une réserve d'énergie et ils contribuent à l'apport indispensable d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles dans la ration alimentaire.

##### **1.1.2. Biochimie des lipides**

Les lipides sont des molécules très importantes pour la vie. Il en existe un très grand nombre, ce qui a conduit à établir une classification. Les lipides pourront se trouver sous forme de lipides simples (alcool associé avec un acide gras) ou sous forme de lipides complexes (alcool associé avec un acide gras et d'autres molécules) (Masson, 2007).

Les lipides ont fait l'objet de nombreuses classifications. Celle de Hennen (1995), la plus citée, classe ces molécules en 5 catégories: les acides gras, les triglycérides, les phospholipides, les sphingolipides et enfin le cholestérol (Cuvelier *et al.*, 2004) .

###### **1.1.2.1. Les acides gras**

Les acides gras, représentant le motif structural des lipides, sont des acides carboxyliques composés d'une chaîne hydrocarbonée comportant à une extrémité un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) et à l'autre extrémité un groupement carboxyle (COOH) (Percheron *et al.*, 1981 ; Adrian *et al.*, 2003). Les acides gras alimentaires sont des molécules linéaires à longue chaîne, généralement à nombre pair de carbones possédant une seule fonction carboxylique et une chaîne carbonée conférant à la plupart des lipides leur propriété d'insolubilité dans l'eau et leur consistance

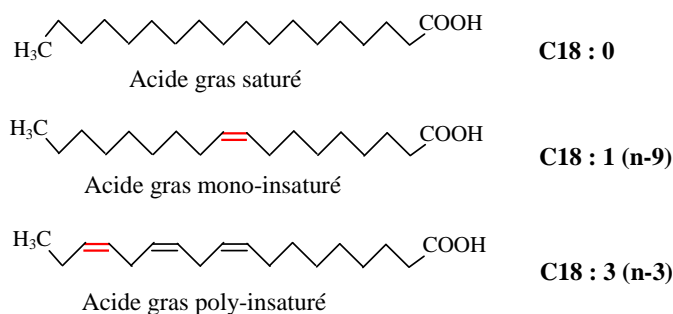


graisseuse et huileuse (Guilloton and Quintard, 2003; León Camacho *et al.*, 2004; Alais *et al.*, 2008). On peut néanmoins trouver des acides gras à nombre impair de carbones (acides pentadécyclique (C15:0) et margarique (C17:0) ou des acides gras à chaîne ramifiée (Ran-Ressler *et al.*, 2011), dans la matière grasse laitière par exemple.

Trois paramètres différencient les acides gras :

-*La longueur de la chaîne carbonée* : c'est à dire le nombre d'atomes de carbone. Ce nombre peut varier généralement entre 4 et 24. Il permet de classifier les acides gras en 4 catégories : les acides gras volatils, avec 2, 3 ou 4 atomes de carbone, les acides gras à chaîne courte qui possèdent entre 6 et 10 atomes de carbone, les acides gras à chaîne moyenne, avec 12 à 14 atomes de carbone et les acides gras à chaîne longue, avec 16 atomes de carbone ou plus (Cuvelier *et al.*, 2004). Il y a une prédominance très remarquée des acides de 16 à 18 atomes de carbone dans le règne végétal (Ledoux *et al.*, 2005 ; Applequist *et al.*, 2006).

-*Le degré d'insaturation de la chaîne carbonée* : en fonction du type de liaison existant entre les atomes de carbone (liaison simple ou double), les acides gras sont dits saturés (AGS) ou insaturés (AGI). L'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0), abondants dans la plus part de graisses d'origine animale, appartiennent aux acides gras saturés. En revanche, l'acide oléique (C18 :1), composant majoritaire de l'huile d'olive est un acide monoinsaturé. L'acide linoléique (C18 :2), abondant dans l'huile de tournesol, présentant deux doubles liaisons, est polyinsaturé (Figure 10). Dans les acides gras, les doubles liaisons sont rarement conjuguées et séparées par un groupement méthylène. Les acides gras existent naturellement dans une configuration *cis* (ou *Z*).



**Figure 10.** Structure et nomenclature des acides gras saturés, mono- et polyinsaturés

-Le point de fusion : en fonction de leur composition en acides gras, les corps gras ont une texture différente pour une même température. Ainsi, au réfrigérateur, le beurre est dur tandis que certaines margarines sont crémeuses et les huiles sont liquides (Karleskind, 1992 ; Cuvelier *et al.*, 2004 ; Norris, 2005).

Les acides gras les plus communs sont illustrés dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Principaux acides gras, leurs structures et leurs sources alimentaires  
(Cuvelier *et al.*, 2004)

<b>Acide gras Saturé</b>	<b>Nom commun del'acide</b>	<b>Masse moléculaire (Kda)</b>	<b>Principales sources alimentaires</b>
<b>C12 : 0</b>	laurique	200,31	Huile de coprah
<b>C14 : 0</b>	myristique	228,36	Produits laitiers
<b>C16 : 0</b>	palmitique	256,42	Huile de palme
<b>C18 : 0</b>	stéarique	284,47	Graisse animale
<b>C20 : 0</b>	arachidique	312,52	Huiles d'arachide, de germe de maïs
<b>C22 : 0</b>	béhénique	340,57	Huiles d'arachide, de jojoba
<b>Insaturé</b>			
<b>C16 : 1</b>	palmitoléique	254,39	Huile de noix de macadamia
<b>C18 : 1</b>	oléique	282,44	Huiles d'olive, de pépin de raisin, beurre de karité, huiles de tournesol, de lin, de maïs, de soja.....
<b>C22 : 1</b>	érucique	338,55	Huile de poissons
<b>C18 : 2</b>	linoléique	280,43	Constituants des phospholipides (animaux)
<b>C18 : 3</b>	$\alpha$ -linoléique	278,41	Huiles de noix, de colza, de soja
<b>C20 : 4</b>	arachidonique	304,45	Graisse animale

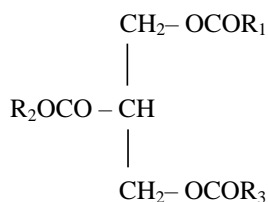
Il faut rappeler que l'origine alimentaire de certains acides gras s'avère primordiale compte tenu de l'incapacité de notre organisme à les synthétiser. Ces acides gras sont dits essentiels. Ils sont nécessaires au développement et au bon fonctionnement de l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation car ils sont non synthétisables par notre organisme. Ils appartiennent en partie aux séries oméga 3 ( $\omega$ -3) et oméga 6 ( $\omega$ -6) (position du premier atome de carbone impliqué dans la double liaison en partant du groupement méthyle terminal). Les acides linoléique (C18:2) et  $\alpha$ -

linoléique (C18:3) sont les deux principaux acides gras essentiels. Ils sont les précurseurs des lignées oméga 3 et oméga 6 (Legrand, 2010).

Ces acides polyinsaturés ont donc un rôle bénéfique pour la santé mais leur sensibilité à l'oxydation leur confère également un potentiel toxique.

### 1.1.2.2. Les triglycérides

Les triglycérides ou plus exactement les triacylglycérols (Figure 11) sont des triples esters d'acides gras et de glycérol. Il s'agit de molécules très hydrophobes, constituant une forme de réserve de l'énergie très courante dans le règne animal, au niveau du cytoplasme des adipocytes (Cuvelier *et al.*, 2004).



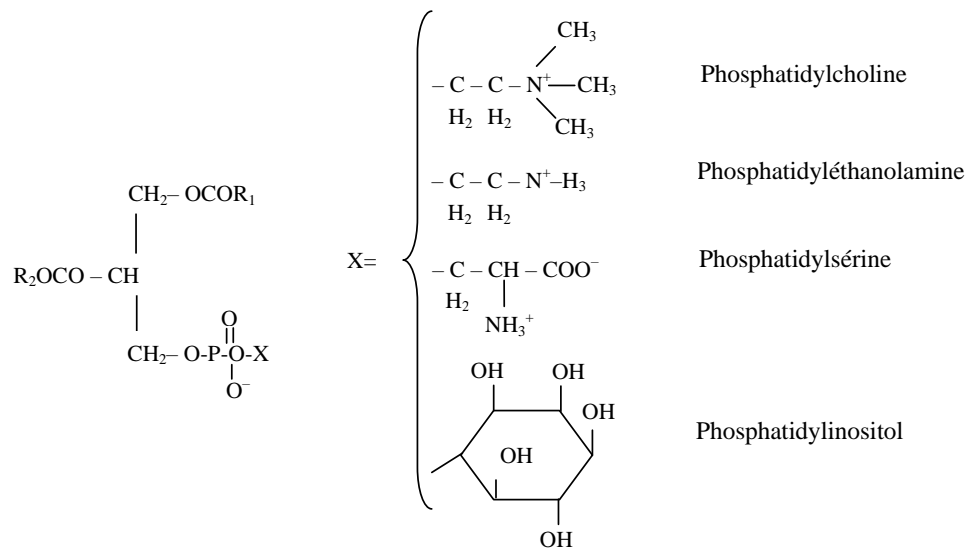
**Figure 11.** Représentation d'une molécule de triglycérides

(R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> : chaînes d'acides gras)

Les triglycérides constituent la catégorie de lipides la plus abondante dans les aliments. En effet, ils représentent 95 à 98 % des lipides alimentaires ingérés, constituant ainsi la source presque exclusive d'acides gras alimentaires.

### 1.1.2.3. Les phospholipides

Les glycérophospholipides ou phospholipides sont des dérivés de l'acide phosphatidique (Figure 12). Les deux premiers atomes de carbone du glycérol portent, par liaison ester, les chaînes aliphatiques d'acides gras, tandis que le troisième carbone est estérifié à un groupement phosphoryle relié lui-même par une autre liaison ester à un alcool, qui peut être du glycérol, de l'inositol, de l'éthanolamine ou ses dérivés choline et sérine. La phosphatidylcholine (lécithine), la phosphatidyléthanolamine (céphaline), la phosphatidylsérine et la phosphatidylinositol sont les principaux phospholipides d'origine alimentaire. Les phospholipides constituent la structure de base des membranes biologiques. La molécule d'alcool ainsi que le groupement phosphoryle du troisième carbone étant fortement polaires, les phospholipides ont une structure caractérisée par une tête polaire et une queue hydrophobe, qui détermine l'organisation en double couche des phospholipides au sein des membranes (Cuvelier *et al.*, 2004; Masson, 2007).



**Figure 12.** Représentation des principales catégories de phospholipides

#### 1.1.2.4. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont constitués d'un acide gras et d'un alcool aminé, la sphingosine, ainsi que, dans certains cas, d'un substituant qui peut être de la choline ou un groupement de nature glucidique. Ils sont caractérisés par une liaison amide formée suite à la réaction entre le groupement aminé de la sphingosine et le groupement carboxyle de l'acide gras. Les sphingolipides sont, tout comme les glycérophospholipides, des constituants des membranes biologiques, mais dans une moindre mesure (Cuvelier *et al.*, 2004 ; Masson, 2007).

#### 1.1.2.5. Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimique. La molécule de cholestérol comprend quatre cycles carbonés, notés A, B, C, D. Elle possède un groupement hydroxyle sur le carbone 3, qui peut être estérifié par un acide gras, saturé ou insaturé, rendant la molécule encore plus hydrophobe. Le cholestérol est essentiellement présent dans les aliments d'origine animale. Il possède une double origine : il est apporté par l'alimentation et synthétisé par l'organisme. Le cholestérol est non seulement le précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdes et de la vitamine D, mais aussi un constituant important des membranes plasmiques (Cuvelier *et al.*, 2004).

### **1.1.3. Rôles biologiques et technologique des lipides**

Longtemps appréciés sans restriction par les consommateurs, les " corps gras " ou " lipides alimentaires " ont vu leur prestige tempéré par la mise à jour de l'activité des lipoprotéines macromoléculaires comme facteurs de risque pour le développement du cancer et des maladies cardiovasculaires. Les lipides n'en demeurent pas moins indispensables à la santé humaine. Ils jouent un rôle essentiel dans le développement et l'entretien des fonctions cérébrales, du système nerveux central et sensoriel. Les constituants lipidiques des aliments fournissent à l'organisme d'importantes vitamines liposolubles (A, D, E, K) et des acides gras essentiels.

Les lipides ont aussi une forte influence sur les propriétés rhéologiques et sensorielles des aliments. Leur interaction avec les autres constituants, durant les procédés d'élaboration industrielle, détermine en effet les propriétés fonctionnelles des systèmes alimentaires. Si les lipides doivent indéniablement être apportés en quantité suffisante par les aliments, les progrès technologiques (techniques de raffinage, fractionnement, modification, restructuration, stabilisation et encapsulation des lipides, nouvelles techniques de fabrication d'émulsions et de mousses alimentaires industrielles) permettent d'améliorer la gestion de cet apport, facilitant notamment une plus large utilisation des lipides insaturés (Graille, 2003).

### **1.1.4. Principales sources des lipides**

Les lipides, ou graisses, comme les autres nutriments occupent une place très importante dans l'alimentation humaine. Ils sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme et fournissent une quantité d'énergie supérieure à celle apportée par les glucides. Les lipides sont rarement consommés en l'état. Ils sont une partie constitutive des aliments. Ils peuvent se trouver dans l'alimentation sous forme libre ou sous forme complexe, liés entre eux ou à d'autres nutriments (glucides, protides,...). Ils peuvent conserver leur organisation native mais ils se réorganisent généralement en fonction des autres constituants présents et des traitements technologiques appliqués au cours de la formulation ou de la préparation (Gunstone *et al.*, 2007). Les acides gras alimentaires sont issus de tous les règnes du monde vivant. La nature et la répartition de ceux-ci au sein des aliments font l'objet d'une littérature abondante, parfois non convergente entre les auteurs (Cuvelier *et al.*, 2004). Selon Poisson et Narce (2003), les principales sources de lipides sont:

-Les huiles végétales (arachide, olive, tournesol, maïs...) qui contiennent des AGS et des AGI à chaîne moyenne ou longue, en proportion variable selon l'origine ;

-Les graisses végétales (palme, palmiste, noix de coco) qui contiennent surtout des AGS à chaîne courte ou moyenne.

On différencie généralement les huiles des autres graisses par leur point de fusion. Les huiles sont des corps gras liquides à la température de 15°C, tandis que les graisses sont plus ou moins solides à cette température (Lecerf, 2011).

-Les graisses animales sont soit apparentes ou visibles (beurre, saindoux, suif), soit cachées ou invisibles (car faisant partie intégrante du tissu : viande, poisson, fromage, noix) (Frénot et Vierling, 2002). Ces graisses animales contiennent surtout des AGS sous forme complexe. La composition en acides gras varie selon les animaux (mammifères ou poissons...) et selon leur mode de vie (domestique ou sauvage...).

## **1.2. Huiles végétales**

En général, les huiles et les graisses alimentaires sont préparées à partir de graines ou de fruits oléagineux, germes ou pépins de production végétale diverse et de tissus adipeux d'animaux terrestres ou marins (Salas *et al.*, 2009). Dans la catégorie des huiles, nous trouvons principalement les huiles d'olive, de noix, d'arachide, de tournesol, de soja, de colza, du germe de blé, de maïs et des pépins de raisin. La qualité des huiles alimentaire est caractérisée par leurs propriétés physiques, nutritionnelles, organoleptiques et sensorielles (Shahidi, 2005). Cependant, un des principaux aspects qualitatifs d'une huile s'attache à sa composition ainsi qu'à sa stabilité oxydative. Les huiles végétales représentent un vaste ensemble très varié de corps gras d'origine, de composition, de qualité et de goût différents. Celles-ci sont présentées selon leurs caractéristiques physico-chimiques, leur mode de fabrication, leur composition en acides gras, en vitamines, en composés mineurs, leur intérêt nutritionnel et leurs usages. Toutes ont un intérêt différent (Lecerf, 2011).

### **1.2.1. Classification des huiles**

Les huiles végétales se définissent essentiellement par leur origine et leur composition en acides gras qui sont très différentes d'une huile à l'autre.

### **1.2.1.1. Classification selon leur origine**

Karleskind (1992) subdivise les huiles et les graisses alimentaires en plusieurs classes :

-*Huiles végétales fluides* : huiles d'arachide, de colza, de germe de maïs, de tournesol, de soja, d'olive, de noix et de pépins de raisin.

-*Huiles végétales concrètes (ou graisses)* : huile de coprah (provenant de la noix de coco), huiles de palme et de palmiste.

-*Huiles et graisses d'origine animale terrestres* : saindoux (graisse de porc), suif (graisse de bœuf ou de mouton), huile de cheval et graisse d'o. ie.

-*Huiles et graisses marines* : mammifères marins (baleine) et de poissons (sardine, hareng, etc.).

-*Corps gras élaborés* : beurres et margarines.

### **1.2.1.2. Classification selon leur composition en acides gras**

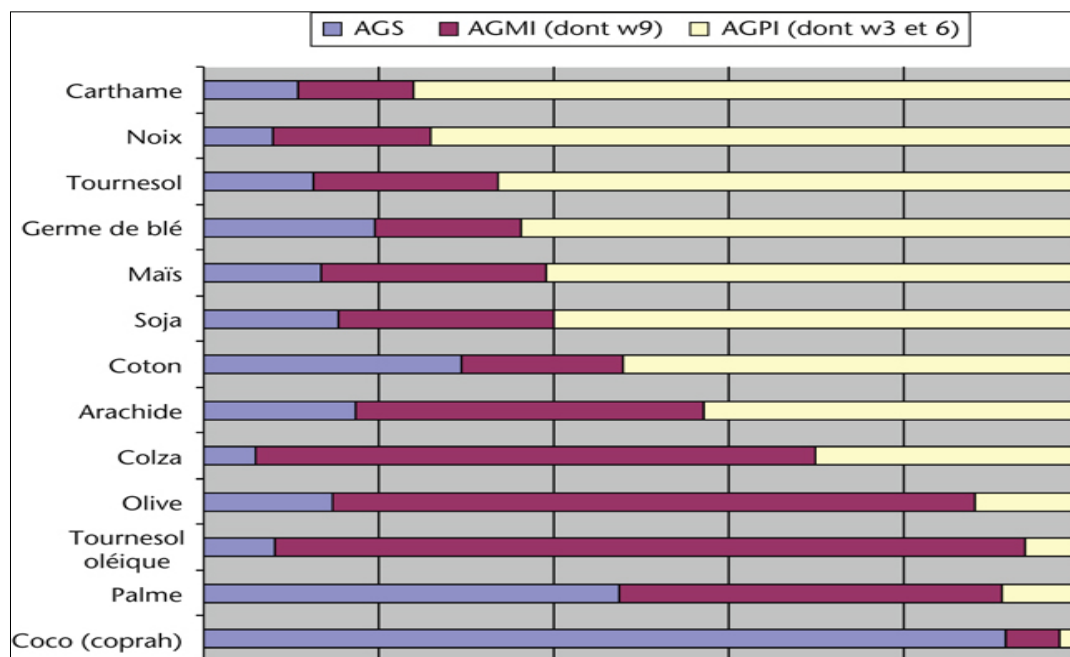
Selon leurs compositions en acides gras, les huiles végétales se répartissent entre différentes familles. Selon les critères de caractérisation de ces familles, elles peuvent être plus ou moins nombreuses (Alais *et al.*, 2003 ; Dubois *et al.*, 2008) ; mais il en existe quatre principales (Figure 13).

-*Huiles saturées* telle que l'huile de coprah avec 90% d'acides gras saturés ;

-*Huiles riches en acides gras saturés et en acide oléique* telle que l'huile d'olive avec respectivement 14% et 81%, l'huile d'arachide avec 19% et 50% ;

-*Huiles riches en acides gras polyinsaturés* telle que l'huile de carthame avec 75%, l'huile de noix avec 72%, l'huile de pépins de raisin avec 69%, l'huile de tournesol avec 64% et l'huile de soja avec 58% ;

-*Huiles intermédiaires* telle que l'huile de colza avec 33% de polyinsaturés, 60% d'acide oléique et 7% d'acides saturés.



**Figure 13.** Classement des huiles végétales en fonction de leur composition en acides gras (% saturés AGS, monoinsaturés AGMI et polyinsaturés AGPI) (Cuvelier et Maillard, 2012)

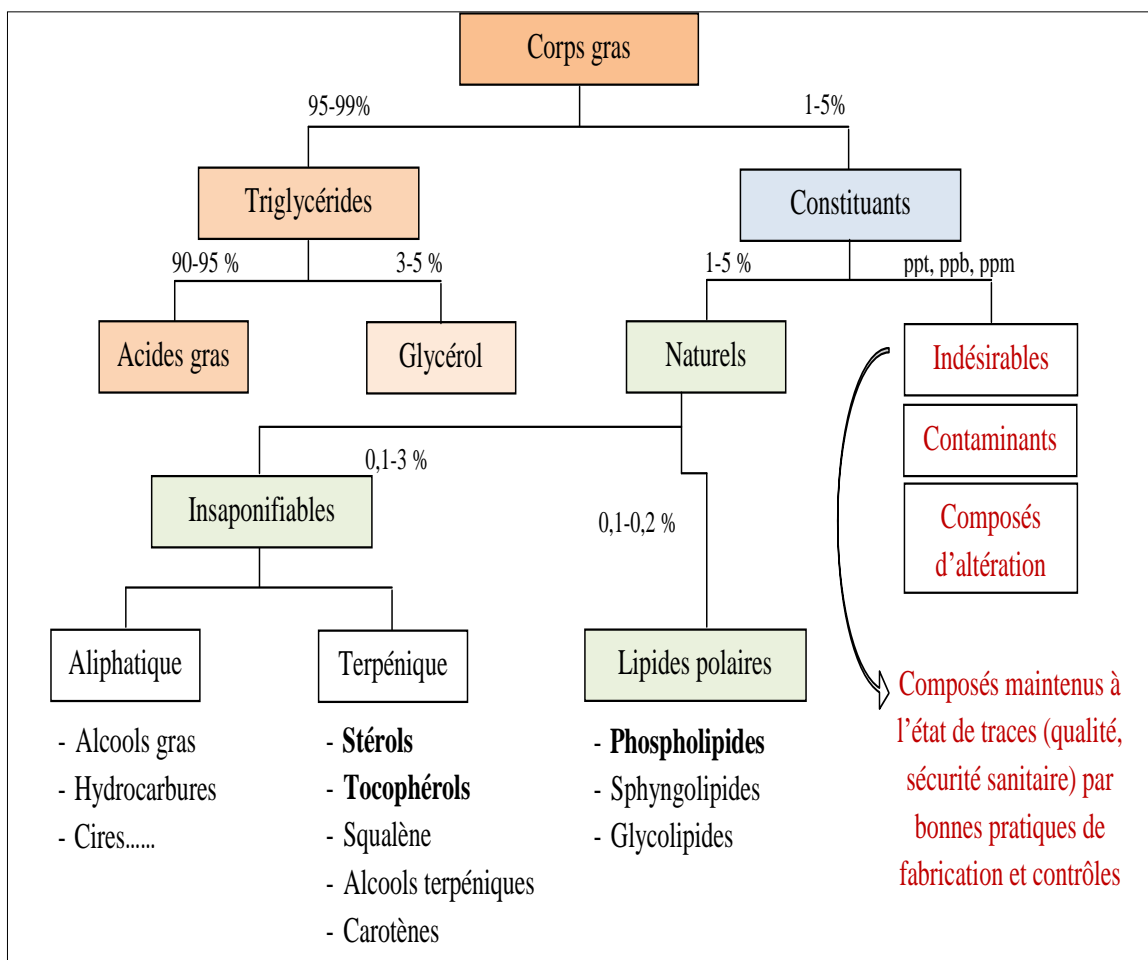
### 1.2.2. Composition chimique des huiles végétales

Les huiles végétales sont composées d'une grande variété de constituants que la figure 14 présente de façon panoramique.

Les triglycérides sont très largement majoritaires (95-99%) : ils sont composés de glycérol (3-5 %) et d'acides gras (90-95 %).

D'autres constituants sont naturellement présents en plus faible quantité : des lipides à caractère polaire tels que les phospholipides, de stérides et de cérides (0,1-0,2 %) et des composés dits insaponifiables appartenant à une fraction non glycéridiques (0,1 à 3 %) principalement représentés par les stérols et les tocophérols mais contenant également des caroténoïdes, des alcools terpéniques, du squalène, des composés phénoliques, etc. (Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012).





**Figure 14.** Composition panoramique des corps gras et importance relative des principales classes de composés (Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012)

### 1.2.2.1. Constituants majeurs

Les triglycérides représentent 90 à 99% de lipides simples apolaires, ce sont des triples esters d'acide gras et de glycérol (Cuvelier et Maillard, 2012). Les acides gras sont les principaux composés des huiles végétales.

Les huiles végétales se définissent essentiellement par leur composition en acides gras qui est très différente d'une huile à l'autre (Tableau 3). Elles n'ont cependant pas une composition fixe, car elles varient selon les arrivages, la génétique, la culture des plantes et les saisons (Lecerf, 2011).

**Tableau 3.** Pourcentage des acides gras dans quelques huiles végétales (Harwood et Aparicio, 2000 ; Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012)

Acides Gras	Huile d'olive	Huile de colza	Huile de noix de coco	Huile de maïs	Huile de coton	Huile de tournesol
<b>Myristique</b>	≤ 0,05	0,1-0,2	16,5-20,8	0-0,3	0,6-1,0	0-0,1
<b>Palmitique</b>	7,5-20,0	3,0-5,0	8,2-10,2	9,1-16,8	21,0-26,8	5,5-7,7
<b>almitoléique</b>	0,3-3,5	0,2-0,6		0-0,3	0-1,3	0-0,3
<b>Stéarique</b>	0,5-5,0	1,0-2,0	2,3-3,4	1,4-3,0	2,0-3,3	2,8-6,5
<b>Oléique</b>	55,0-83,0	52,0-67,0	4,3-8,1	20,0-38,0	14,0-22,0	14,0-38,0
<b>Linoléique</b>	3,5-21,0	16,0-24,8	0,7-2,0	39,5-65,0	46,5-58,0	48,2-74,2
<b>Linoléinique</b>	≤ 0,9	6,5-14,0	0-tr	0,6-1,4	0-0,4	0-0,1
<b>Arachidique</b>	≤ 0,6	0,2-0,8	0,1	0,3-0,7	0,2-0,5	0,2-0,4
<b>Béhénique</b>	≤ 0,2	0,1-0,5		0-0,5	0-0,6	0,7-1,3
<b>Lignocérique</b>	≤ 0,2	0-0,2		0-0,3		0-0,4

tr : trace

#### 1.2.2.2. Constituants mineurs

La fraction mineur ou fraction insaponifiable représente 0,2 à 2% d'un lipide non raffiné. Ses constituants chimiques sont extrêmement variés en nature et en proportions (Harwood et Ramon, 2000). Ces composés, bien que mineurs quantitativement, ils jouent un rôle nutritionnel de première importance. Une grande partie des propriétés biologiques des huiles est attribuée à la partie insaponifiable (Lecerf, 2011).

Les principaux constituants de cette fraction sont des hydrocarbures divers, des composés terpéniques (alcools triterpéniques, stérols,...), des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E (tocophérols et tocotriénols)), des polyphénols, des caroténoïdes et des constituants extrêmement divers.

Les teneurs moyennes en composés insaponifiables des principales huiles végétales sont données dans le tableau 4 (Karleskind, 1992).

**Tableau 4.** Teneurs en insaponifiable de quelques huiles végétales (Karleskind, 1992)

<b>Huile</b>	<b>Teneur en insaponifiable (%)</b>	<b>Huile</b>	<b>Teneur en insaponifiable (%)</b>
Tournesol	0,5-1,5	Citrouille	1,2
Colza	0,7-1,8	Courge	2,1
Soja	0,5-1,6	Melon	1,0
Mais	0,8-2,0	Germe de blé	3,0 4,0
Pépins de raisin	0,8-1,5	Arachide Afrique	0,6- 1,0
Carthame	1,0-1,5	Arachide Amérique du sud	0,6-0,9
Sésame	0,5-1,5	Coton	0,6-1,5
Oeillette	0,5-1,3	Coprah	0,6-1,5
Lin	0,3-1,2	Palmiste	0,3-0,8
Amande	0,3-1,2	Beurre de cacao	0,3-0,5
Noisette	0,5-0,7	Olive vierge	0,4-0,8
Noix	0,5-1,0	Palme	0,5-1,2
Pépin de cassis	1,0-1,2	Avocat	1-12,0

### 1.2.3. Rôle des huiles végétales

Les huiles végétales jouent un rôle essentiel dans notre alimentation. Elles assurent tout d'abord une fonction nutritionnelle : elles contribuent à l'apport d'énergie, sont sources d'acides gras indispensables, en particulier d'acide linoléique (C18:2, précurseur des oméga-6) et d'acide alpha-linolenique (C18:3, précurseur des oméga-3), et participent à l'apport et au transport de vitamines liposolubles (dont E, D et pro-A) et d'autres constituants d'intérêt nutritionnel comme des phytostérols ou des composés phénoliques (cas de l'huile d'olive notamment) (Cuvelier et Maillard, 2012).

Elles contribuent à la qualité organoleptique des produits, leur apportant une texture onctueuse, crémeuse, fondante, un aspect brillant et une saveur spécifique. Enfin, elles assurent des fonctions technologiques, en particulier comme moyens de transfert de chaleur en cuisson (exemple des huiles de friture), agents d'enrobage et de démoulage ou comme supports d'arômes et de colorants lipophiles (Cuvelier et Maillard, 2012).

## **2. Evaluation de l'état d'oxydation des huiles végétales**

Les huiles végétales, du fait de leur richesse en acides gras mono- et/ou polyinsaturés, sont sujettes à des réactions chimiques telles que l'isomérisation et l'oxydation des acides gras (Cuvelier et Maillard, 2012).

L'oxydation des lipides est une cause majeure de dégradation des aliments lors de leur fabrication et de leur conservation. Elle affecte les acides gras insaturés présents dans les huiles, les graisses ou les lipides de structure (Villière et Genot, 2006). L'oxydation des lipides est, en effet, l'une des causes principales de détérioration des aliments pendant leur stockage ou leur cuisson. Elle affecte les huiles et les graisses en l'état, les lipides constitutifs des aliments, altère les composants liposolubles tels que certaines vitamines et pigments et conduit également à des détériorations des constituants non lipidiques (Croguennec, 2006).

L'oxydation des lipides pose particulièrement problème dans les aliments contenant des AGPI, dans les aliments soumis à des traitements thermiques (friture) ou encore dans les aliments ayant une grande surface de contact avec l'oxygène. Elle survient sans exception dans tous les aliments contenant des lipides oxydables, aussi bien dans les produits à longue durée de conservation que dans les produits à conservation plus courte.

### **2.1. Mécanisme d'auto-oxydation des lipides**

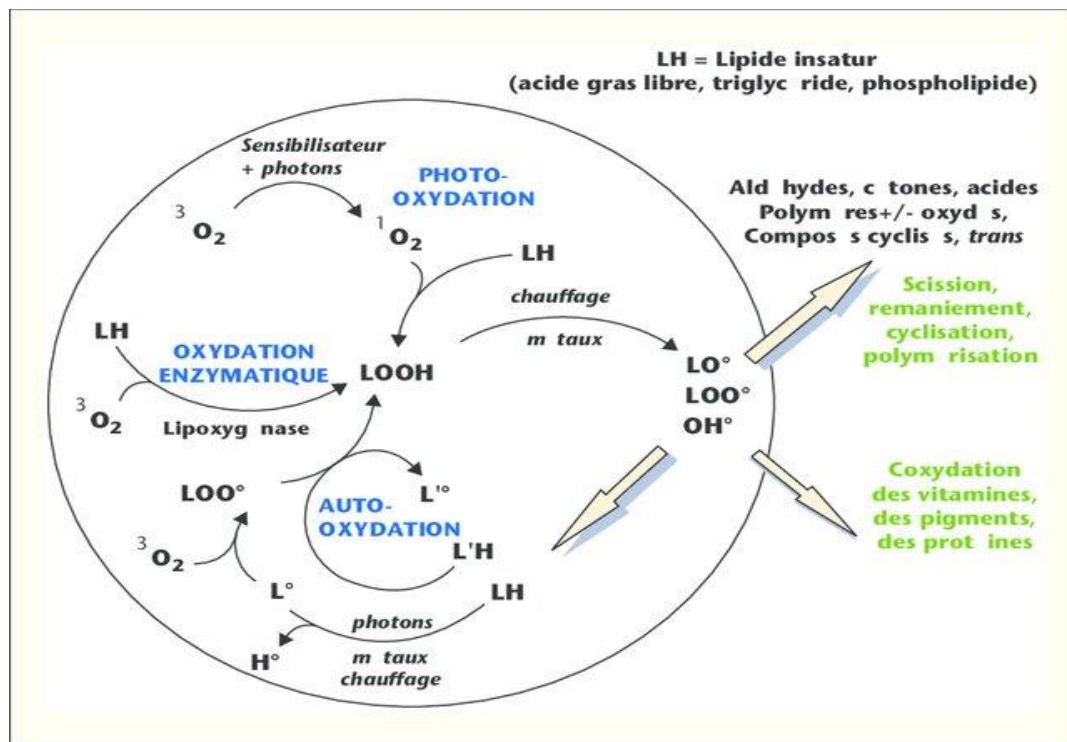
#### **2.1.1. Mécanisme général**

L'oxydation des lipides est un phénomène qui peut résulter de trois voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs (Figure 15): l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ; la photo-oxydation, en présence des substances photo-sensibilisatrices, catalysée par l'oxygène singulet, et l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase (Berset et Cuvelier, 1996).

L'auto-oxydation des lipides est une réaction dont les principaux mécanismes sont complexes mais bien connus (Frankel, 2007). Il s'agit d'un enchaînement des réactions radicalaires se déroulant en trois étapes : initiation, propagation et terminaison (Figure 15).

La première de ces étapes est l'étape d'amorçage ou initiation. Ces réactions, qui consistent en l'arrachement d'un proton  $H^\circ$  au voisinage d'une double liaison d'un acide gras (LH), vont aboutir à la formation des premières molécules lipidiques radicalaires (radicaux alkyles  $L^\circ$ ).

Les réactions d'initiation sont spontanées mais naturellement lentes en conditions douces. En revanche, elles sont fortement accélérées par une élévation de la température, un éclaircissement du produit ou encore la présence d'ions métalliques qui vont réagir avec des hydroperoxydes déjà présents dans l'huile pour former des radicaux initiateurs de l'oxydation (Rolland, 2004; Villière et Genot, 2006; Cuvelier et Maillard, 2012).



**Figure 15.** Schéma des réactions d'oxydation des lipides (Berset et Cuvelier, 1996)

La deuxième étape réactionnelle est l'étape de propagation, au cours de laquelle les radicaux alkyles  $L^\circ$ , précédemment formés, réagissent avec l'oxygène dissous dans l'huile pour former des radicaux peroxyde ( $LOO^\circ$ ). Ces derniers vont aller à leur tour arracher un  $H^\circ$  à une autre molécule d'acide gras, libérant alors un nouveau radical et formant un hydroperoxyde ( $LOOH$ ) et de nouveaux radicaux alkyle, engageant ainsi de nouveaux cycles réactionnels.

Les nouveaux radicaux qu'ils produisent, vont à leur tour alimenter l'auto-oxydation des AGI ou trouver pour cibles d'autres composés tels que les vitamines et les pigments (Rolland, 2004 ; Villière et Genot, 2006 ; Cuvelier et Maillard, 2012).

La troisième étape est la terminaison : les espèces radicalaires sont également à l'origine de réactions de scission, de cyclisation et de polymérisation. Ces réactions, dites de terminaison,

vont donner naissance à d'autres composés secondaires dont les principaux sont résumés dans le tableau 5.

Globalement, ce processus complexe aboutit à la formation de produits primaires : hydroperoxydes, radicaux libres, diènes conjugués, qui sont des molécules incolores et inodores mais étant instables, en particulier en présence d'ions métalliques tels que  $Fe^{2+}$  et  $Cu^+$  ou à des températures élevées, ils se décomposent en donnant naissance à une multitude de composés dits secondaires, parmi lesquels aldéhydes, alcools, cétones, composés polaires et polymères,... (Pokorny, 2003; Cuvelier et Maillard, 2012).

**Tableau 5.** Produits secondaires d'oxydation des acides gras insaturés  
(Kim et Min, 2008)

Classe	Acide oléique	Acide linoléique	Acide $\alpha$ -linoléique
Aldéhydes	Heptanal	Pentanal	Propanal
	Octanal	Hexanal	Butanal
	Nonanal	Heptanal	2-Butéanal
	2-Décéanal	2-Héptanal	2-Pentéanal
	2-Undécéanal	Octanal	Hexanal
	Décéanal	2-Octéanal	2-Héxéanal
		2-Nonéanal	2-Heptéanal
	3-Nonéanal	2,4-Heptadiéanal	
	2,4-Décadiéanal	3,6-nonadiéanal	
	4,5-Epoxy-2-décéanal	Décatriéanal	
Acides carboxyliques	Acide heptanoïque	Acide heptanoïque	Acide heptanoïque
	Acide octanoïque	Acide octanoïque	Acide octanoïque
	Acide 8-oxooctanoïque	Acide 8-oxooctanoïque	Acide nonanoïque
	Acide 9-oxononanoïque	Acide 9-oxononanoïque	Acide 9-oxononanoïque
	Acide 10-oxodécanoïque	Acide 10-oxodécanoïque	Acide 10-oxodécanoïque
	Acide 10-oxo-8-décenoïque	Acide 12-oxo-10-décanoïque	Acide 12-oxo-9-undécenoïque
	Acide 11-oxo-9-undécenoïque	Acide 9,11-dodécadiénoïque	
Alcools	1-Heptanol, 1-octanol	1-Pentanol, 2-octen-1-ol	2-Pentén-1-ol
Hydrocarbures	Heptane	Pentane	Ethane
	Octane		Pentane

### 2.1.2. Facteurs influençant l'oxydation des lipides

Plusieurs facteurs vont intervenir pour favoriser ou au contraire freiner les réactions d'oxydation des huiles. Il s'agit d'une part de facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras insaturés, l'activité de l'eau, la présence de pro-oxydants (ions métalliques, enzymes,..) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes,..), et d'autre part de facteurs environnementaux dont les principaux sont la température, la lumière et la pression partielle en

oxygène (Tekaya et Hassouna, 2005 ; Choe et Min, 2006 ; Cuvelier et Maillard, 2012 ; Zungur *et al.*, 2014). Ces facteurs affectent de manière interactive l'oxydation de l'huile et il n'est pas facile de différencier l'effet individuel des facteurs (Choe et Min, 2006).

En effet, les conditions de stockage telles que la chaleur et la lumière vont bien sûr augmenter la vitesse d'auto-oxydation. Mais celle-ci dépend en premier lieu de la composition en acides gras de l'huile, en particulier en AGPI, et de sa composition en composés mineurs pro-oxydants tels que des traces d'ions métalliques ou de pigments comme les chlorophylles. Au contraire, l'oxydation est réduite en présence de tocophérols ou autres composés phénoliques antioxydants (Choe et Min, 2006 ; Cuvelier et Maillard, 2012).

### **2.1.3. Conséquences de l'oxydation des lipides**

L'oxydation des lipides est l'une des principales réactions délétères au cours du stockage et du traitement, qui affecte considérablement la qualité des huiles végétales (Smouse 1995 ; Tan *et al.*, 2001). Cela entraîne une perte des qualités nutritionnelle, sensorielle et technologique (Matthäus *et al.*, 2010 ; Cuvelier et Maillard, 2012).

Le principal résultat de l'oxydation des lipides est la modification des propriétés sensorielles des aliments, caractérisée par un changement de couleur et l'apparition d'un goût désagréable, souvent qualifié de rance (Velasco et Dobarganes, 2002 ; Choe et Min, 2006 ; Pragasam *et al.*, 2015). Ces odeurs, qui conduisent souvent au rejet de l'aliment par le consommateur, peuvent être perçues très précocement. Elles sont liées à la formation de composés volatils aux seuils de détection olfactifs très bas. L'oxydation des lipides peut également induire une modification de la couleur des produits par co-oxydation des pigments qu'ils soient liposolubles ou hydrosolubles (Villière et Genot, 2006).

Au plan nutritionnel, l'oxydation des huiles conduit peu à peu à une perte de leur qualité, en raison notamment de la dégradation partielle des AG indispensables et des vitamines, comme elle peut produire des composés toxiques et des polymères oxydés (Choe et Min, 2006 ; Cuvelier et Maillard, 2012). Enfin, l'oxydation des lipides a été identifiée comme le principal facteur responsable de la détérioration de la qualité de l'huile alimentaire.

Ses répercussions économiques peuvent être importantes, car l'accumulation de produits de détérioration peut encore accélérer les défaillances organoleptiques et réduire la valeur nutritive

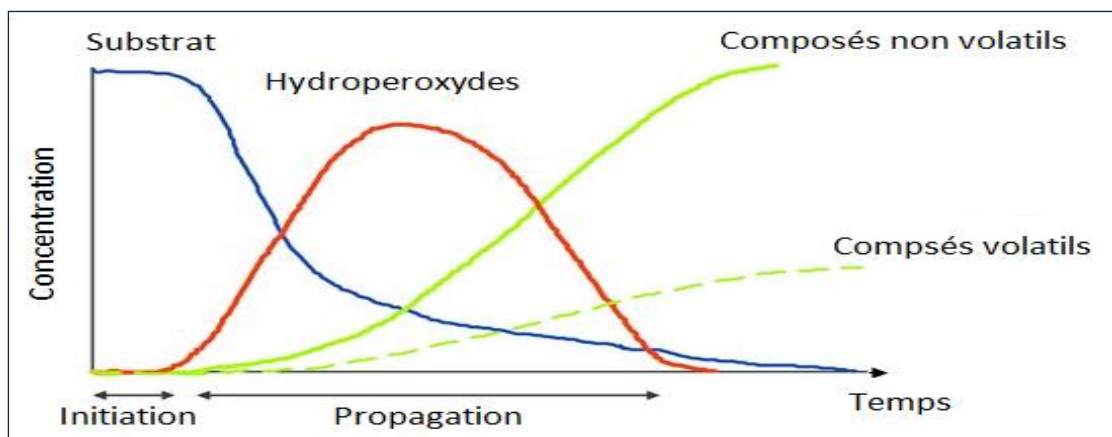
et donc l'acceptation par le consommateur (Matthäus *et al.*, 2010 ; Cuvelier et Maillard, 2012 ; Pragasam *et al.*, 2015).

#### 2.1.4. Méthodes de mesure de l'état d'avancement d'oxydation des lipides

L'état d'oxydation dans lequel se trouve une huile peut être mesuré de diverses manières, selon que l'on dose l'apparition des produits primaires d'oxydation (diènes conjugués, hydroperoxydes) ou des produits secondaires (polymères, composés volatils,...), la consommation d'oxygène ou des acides gras insaturés. La diversité des techniques (titrimétrique, colorimétriques, spectrométriques, chromatographiques,...) avec leurs limites, leurs sensibilités et leurs spécificités rend difficile la comparaison des résultats. L'analyse sensorielle reste bien sûr la méthode de choix puisqu'elle est la seule à rendre compte parfaitement de l'état d'acceptabilité mais elle reste lourde à mettre en œuvre (Cuvelier et Maillard, 2012).

Chaque mesure apporte ainsi une information partielle sur un phénomène global, l'idéal étant d'évaluer l'état d'oxydation par plusieurs méthodes complémentaires, permettant de suivre en parallèle la formation des produits primaires et secondaires. Il faut également avoir conscience que l'oxydation est un phénomène évolutif, comme le schématise la figure 16, et qu'une mesure seule, à un temps donné, ne permet pas toujours de rendre compte de l'état réel d'oxydation, ni de savoir à quel stade d'avancement des réactions on se situe.

Il est donc intéressant d'établir les cinétiques d'évolution des marqueurs d'oxydation, ce qui permet de repérer le temps d'induction, c'est-à-dire le moment où commence à apparaître le phénomène d'oxydation (Frankel, 1998 ; Cuvelier et Maillard, 2007).



**Figure 16.** Évolution schématique de l'auto-oxydation des acides gras insaturés au cours du temps (Cuvelier et Maillard, 2007)



La mesure de l'état d'oxydation dans lequel se trouve une huile à un temps donné ne permet en général pas de prédire son évolution. En revanche, il est possible de mesurer son oxydabilité ou sa résistance à l'oxydation en mettant en œuvre des tests accélérés de vieillissement. On peut citer le test de Schaal ou à l'étuve, le test de Swift ou AOM (Active Oxygen Method) et des tests plus récents, automatisés tels que Rancimat ou OSI, Oxidograph et Oxipress. Dans ces tests, l'huile est soumise à des conditions favorisant les réactions d'oxydation : éclairage, élévation de température, oxygénation (Rolland, 2004 ; Cuvelier et Maillard, 2012).

### **3. Evaluation du potentiel antioxydant des huiles végétales**

L'oxydation est un phénomène complexe, qui met en jeu des espèces moléculaires très réactives. C'est un phénomène qui s'autoalimente, une fois que la réaction est initiée, les réactions en chaîne se poursuivent, et ne s'arrêtent qu'une fois toute la matrice est oxydée. Seule l'intervention d'agents de terminaison comme des antioxydants peuvent avoir une influence (Rolland, 2004). Les antioxydants sont des réducteurs qui ralentissent et inhibent l'oxydation des lipides. Ils peuvent agir sur différentes étapes de l'oxydation (Marc *et al*, 2004). Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique et l'industrie pharmaceutique.

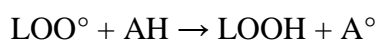
#### **3.1. Mécanisme d'antioxydation des lipides**

##### **3.1.1. Définition et mécanisme d'action des molécules antioxydantes**

Un antioxydant est une molécule qui retarde ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » (Halliwell, 1999). Ainsi, un antioxydant peut augmenter la durée de vie d'un aliment et réduire les pertes en vitamines et en acides gras essentiels.

Les antioxydants peuvent agir contre l'oxydation de deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation (Léger, 2006). Dans le premier cas, les antioxydants sont dits préventifs (ou retardeurs ou encore secondaires). Dans le second cas, les antioxydants sont dits briseurs de chaîne (ou antiradicalaires ou encore primaires) (Laguerre *et al.*, 2007).

Les antioxydants primaires ou antiradicalaires sont des molécules capables de bloquer les radicaux lipidiques  $L^\circ$ ,  $LO^\circ$  et  $LOO^\circ$  en transférant un atome d'hydrogène et retardent ainsi le phénomène d'oxydation :



L'antioxydant devient alors lui-même porteur d'un radical ( $A^\circ$ ), mais à la différence des radicaux lipidiques, il est peu réactif, ce qui stoppe la propagation radicalaire. Ce groupe d'antiradicalaires est constitué presque exclusivement de composés phénoliques en raison de la grande stabilité apportée par leur cycle aromatique. On trouvera ainsi dans ce groupe les additifs antioxydants,

butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), et le tertio-butylhydroxyquinone (TBHQ) et les gallates de propyle (PG), mais aussi les tocophérols (vitamine E) et les polyphénols végétaux (flavonoïdes, acides phénoliques, diterpénoïdes) (Berset, 2006).

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

### **3.1.2. Principaux antioxydants**

Les antioxydants peuvent soit être naturellement présents dans les huiles, par exemple la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols, ou être ajoutés dans la composition tels que : le BHT, le BHA, les PG et le TBHQ. Ces antioxydants, dits synthétiques, sont perçus comme potentiellement toxiques par les consommateurs et par conséquent, les antioxydants naturels leur sont souvent préférés (Shahidi et Zhong, 2005 ; Wanasundara et Shahidi, 2005). Pour répondre à un besoin de naturalité, un grand nombre de sources végétales d'antioxydants a été exploré depuis plusieurs décennies et tout récemment (Cinquanta *et al.*, 1997 ; Wanasundara et Shahidi, 2005 ; Berset, 2006 ; Léger, 2006 ; Chira *et al.*, 2008).

Seuls les antioxydants naturels et leurs mécanismes d'action seront évoqués ici, ceux-ci étant susceptibles d'être naturellement présents dans les huiles végétales.

#### **3.1.2.1. Les tocophérols**

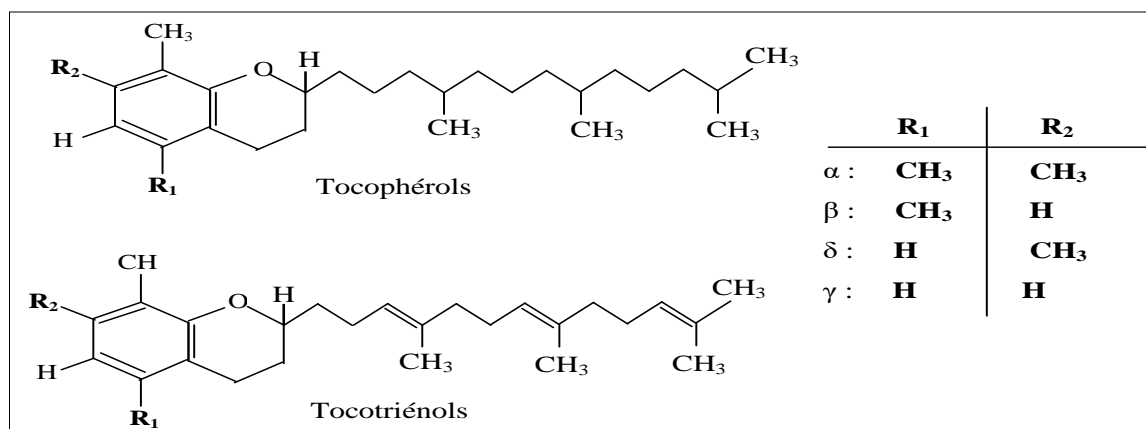
La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui sont présents en quantité non négligeable (Tableau 6), sous quatre formes isométriques :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  (Cuvelier *et al.*, 2003 ; Gunstone, 2009). Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurales avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  - tocotriénol (Cuvelier *et al.*, 2003).

**Tableau 6.** Teneurs en tocophérols et tocotriénols (mg/kg) dans les principales huiles végétales (Cuvelier *et al.*, 2003; Gunstone, 2009)

Type d'huile	Tocophérols				Tocotriénols			
	$\alpha$	$\beta + \gamma$	$\Delta$	Total	$\alpha$	$\beta + \gamma$	$\delta$	Total
<b>Palme</b>	260	320	70	650	140	320	70	530
<b>Tournesol</b>	490	50	10	550	-	-	-	-
<b>Maïs</b>	110	650	20	780	-	-	-	-
<b>Soja</b>	100	590	260	960	-	-	-	-
<b>Colza</b>	170	650	20	780	-	-	-	-
<b>Olive</b>	200	20	-	220	-	-	-	-

- Non détectable

Les tocophérols et tocotriénols sont des composés aromatiques possédant un noyau chromanol (l'atome de carbone 6 porte un groupement hydroxyle) substitué par une chaîne à 3 unités isopenténique condensées (Verleyen, 2002 ; Cuvelier *et al.*, 2003). Les deux classes diffèrent par la présence de trois doubles liaisons dans la chaîne latérale de la série des tocotriénols (Cert *et al.*, 2000). Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et la position des groupements méthyles autour du noyau chromanol (Figures 17) (Cuvelier *et al.*, 2003).



**Figure 17.** Structure chimique de base des tocophérols et des tocotriénols (Laguerre *et al.*, 2007)

Les tocophérols, plus présents, bien qu'en fraction mineure, sont intéressants en raison de leur pouvoir antioxydant (en particulier vis à vis des acides gras polyinsaturés) et aussi vitaminique. En effet, la forme  $\alpha$ -tocophérol présente l'activité vitaminique la plus importante (vitamine E), tandis que l'isomère  $\gamma$ -tocophérol est plus efficace comme antioxydant (Drissi *et al.*, 2006).

L'activité antioxydante des tocophérols est due à leur capacité à réduire les radicaux lipidiques et ainsi à retarder le processus d'auto-oxydation. Son activité antioxydante repose principalement sur l'existence du système de réduction tocophérol/tocophérylquinone.

En effet, les tocophérols peuvent réduire les radicaux peroxydes en cédant un atome d'hydrogène pour former un hydroperoxyde et un radical  $\alpha$ -tocophérylquinone. Ce radical peut se combiner avec un autre radical peroxyde dans une série de réactions de terminaison conduisant à un produit d'oxydation non radicalaire ( $\alpha$ -tocophérol peroxyde) (Verleyen, 2001).

### **3.1.2.2. Les composés phénoliques**

Depuis une quinzaine d'années, chercheurs et industriels de l'agro-alimentaire s'intéressent de plus en plus à une catégorie d'antioxydants, les polyphénols. Avec plus de 8000 structures phénoliques connues, les polyphénols, ou composés phénoliques, constituent l'une des plus grandes familles de molécules omniprésentes dans le règne végétal.

Les polyphénols sont des molécules organiques caractérisées, comme leur nom l'indique par la présence de plusieurs groupements phénols associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes (Mochizuki *et al.*, 2002; Hennebelle *et al.*, 2004; Macheix *et al.*, 2005 ; Chira *et al.*, 2008 ; Mehinagic *et al.*, 2011).

Bien qu'étant très diversifiés, les polyphénols présentent toutefois une structure commune : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Macheix, 1996 ; Hennebelle *et al.*, 2004).

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques qui peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins (Tableau 7) (Ismail *et al.*, 2004 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Chira *et al.*, 2008).

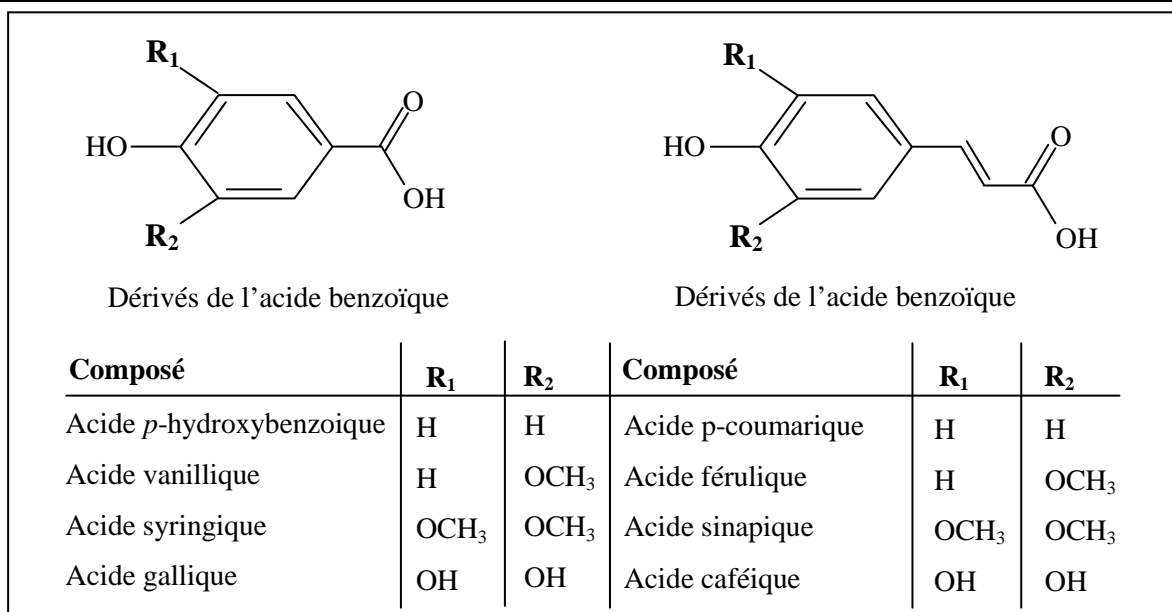
**Tableau 7.** Principales classes de composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005)

<b>Squelette carboné</b>	<b>Classe</b>	<b>Exemple</b>	<b>Origine (exemple)</b>
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	Busserole
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraises
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre <i>Citrus</i>
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbénoides	Resvératrol	Raisin
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes		
	Flavonols	Kaempférol, quercétine	Fruits, légumes
	Anthocyanes	Cyanidine	Fruits rouges
	Flavanols	Catéchine	Raisin, pomme
	Flavanones	Naringénine	<i>Citrus</i>
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	Soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Entérodiol	Bactéries intestinales
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins condensés	Procyanidol	Raisins, kaki

#### **a) Les acides phénoliques**

Ils sont largement répandus dans les végétaux. Ils se répartissent en deux groupes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque. Ces acides existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides dans les plantes, mais leurs formes libres sont parfois retrouvées en faibles proportions. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque les plus répandus sont : *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, etc. Ces acides ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) comme le montre la Figure 18 (Macheix *et al.*, 2005).

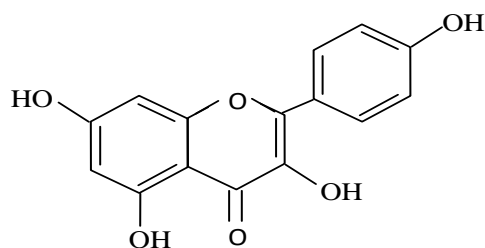
Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) dérive de celle de l'acide cinnamique (Psotova *et al.*, 2003 ; Macheix *et al.*, 2005). Comme les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques sont rarement présents à l'état libre mais sont généralement combinés à d'autres molécules organiques formant des esters, des phénolamides ou des glucosides. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique (Figure 23) (Macheix *et al.*, 2005).



**Figure 18.** Structure chimique de quelques acides phénoliques (Macheix *et al.*, 2005)

### b) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les plus abondants parmi tous les composés polyphénoliques. Ils ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de 15 atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle central de type pyrane (Figure 19) (De Souza, 2004 ; Chira *et al.*, 2008).

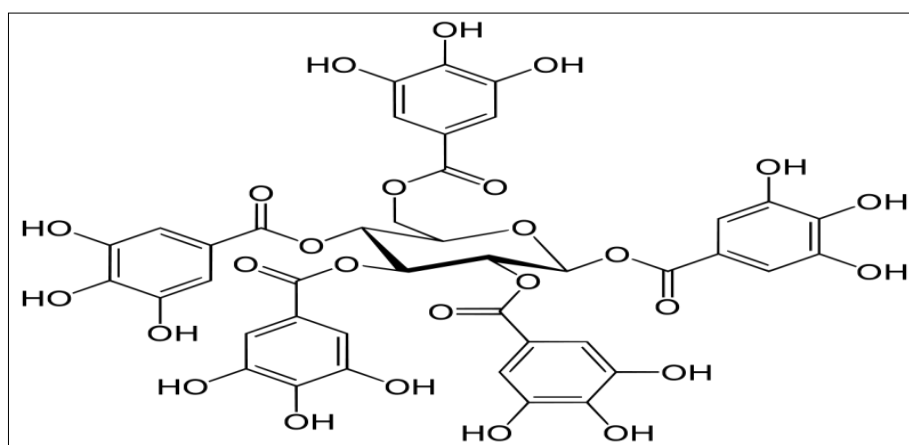


**Figure 19.** Motif chimique caractéristique des flavonoïdes (Macheix *et al.*, 2005)

Cette classe, caractérisée par la même structure (C<sub>15</sub> : C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), comprend à elle seule plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes. C'est la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes : flavones et flavonols, anthocyanidines, flavonones, flavanes (Marais, 2006).

### c) Les tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires importants dans le règne végétal. Ils représentent une classe très importante de polyphénols (Figure 20). La structure chimique de ces polyphénols leur confère une capacité très développée à se fixer sur toutes sortes de molécules, essentiellement les protéines (Zimmer, 1996; Chira *et al.*, 2008). Les tanins sont classiquement divisés en deux groupes, tanins hydrolysables (qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique, soit de l'acide ellagique) et tanins condensés ou proanthocyanidines (constitués de la condensation des dérivés flavane) (Macheix, 1996).



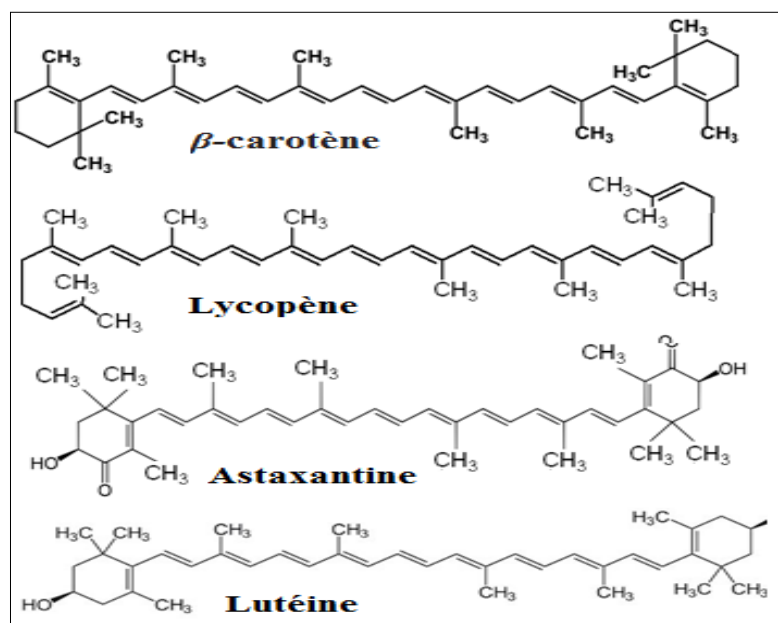
**Figure 17.** Structure chimique des tanins (Macheix *et al.*, 2005)

Il est admis que les composés phénoliques sont des antioxydants efficaces, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes. Leur activité antioxydante est principalement due à leurs propriétés redox, qui peuvent jouer un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres (hydroxyles, superoxydes et peroxydes) par transfert d'hydrogène (Zheng et Wang, 2001; Javanmardi *et al.*, 2003). En effet, la propriété anti-radicalaire des polyphénols est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de délocalisation électronique exercé par les noyaux aromatiques qui permet une stabilisation supplémentaire des radicaux libres (Cuvelier *et al.*, 1992). De nombreuses études ont établi des relations entre la structure des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres (Cuvelier *et al.*, 1992 ; Pietta, 2000 ; Goupy *et al.*, 2003 ; McPhail *et al.*, 2003). De ces données, il ressort que la présence d'un groupement hydroxyle (*ortho*-diphénol ou 1,2-dihydroxybenzène) est le déterminant majeur de l'activité redox des polyphénols.



### 3.1.2.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels synthétisés par les plantes. On les trouve dans un grand nombre de fruits et légumes (Rivera et Canela-Garayoa, 2012). Chimiquement, les caroténoïdes peuvent être des hydrocarbures purs appelés carotènes : lycopène,  $\beta$ -carotène... ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, appelés xanthophylles : astaxanthine, lutéine... (Figure 21) (Stahl et Sies, 2003 ; Laguerre *et al.*, 2007). Les caroténoïdes absorbent fortement dans le domaine du visible et se présentent sous plusieurs formes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) dont la plus abondante est le  $\beta$ -carotène (précurseur biochimique de la vitamine A) (Rivera et Canela-Garayoa, 2012).



**Figure 18.** Principaux caroténoïdes antioxydants (Laguerre *et al.*, 2007)

La structure des caroténoïdes, en particulier le système de double liaison conjuguée, donne lieu à de nombreuses propriétés fondamentales de ces molécules (Young et Lowe, 2001). En effet, les caroténoïdes sont des molécules très efficaces pour piéger l'oxygène singulet (Laguerre *et al.*, 2007), ils sont considérés parmi les inhibiteurs les plus efficaces de la photo-oxydation induite par les pigments chlorophylliens (Tekaya et Hassouna, 2007).

Les caroténoïdes exercent leur activité antioxydante par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes distincts bien que probablement complémentaires (i.e. antioxydant briseur de chaîne et piègeur d'oxygène singulet). Ce dernier mode d'action s'exerce par la désactivation de l'oxygène singulet

et les radicaux peroxydes (Young et Lowe, 2001 ; Stahl et Sies, 2003 ; Laguerre *et al.*, 2007). L'énergie de l'oxygène singulet est transférée à la molécule de caroténoïde pour donner un oxygène à l'état fondamental et un carotène excité. L'excès d'énergie de son état excité ( $\beta$ -carotène\*) est dissipé au travers d'interactions vibrationnelles et rotationnelles avec le solvant ou leur environnement et par ce mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, le  $\beta$ -carotène régénéré peut commencer un nouveau cycle de piégeage de l'O<sub>2</sub> (Stahl et Sies, 2003; Laguerre *et al.*, 2007).

### **3.1.3. Méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante**

De manière générale, les méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante s'articulent autour de quatre composantes : (i) un substrat oxydable dont la dégradation oxydative peut être suivie par des méthodes physico-chimiques ou sensorielles, (ii) un milieu, permettant la mise en contact des différentes composantes, (iii) des conditions d'oxydation, permettant d'oxyder le substrat, ainsi que (iv) des substances antioxydantes, dont on souhaite évaluer leur aptitude à protéger le substrat oxydable.

Dans un tel système de tests, la mesure du pouvoir antioxydant passe nécessairement par l'évaluation du degré d'oxydation du substrat lipidique, en présence ou en absence d'une molécule ou d'un extrait végétal potentiellement antioxydant. Une stratégie de mesure idéale consisterait à évaluer de manière fiable et rapide les meilleurs marqueurs de l'oxydation, en termes de spécificité et de représentativité du processus oxydatif. Cependant, toute la difficulté à mettre en œuvre une telle méthode repose sur la complexité des mécanismes d'oxydation et d'antioxydation (Laguerre *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle, il existe différentes méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante et du stress oxydant. Cependant, compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, ces méthodes ne sont pas standardisées et de références pour mesurer la capacité antioxydante des aliments (Popovici *et al.*, 2009). Il n'ya donc pas une méthode universelle simple de mesure et de quantification exacte de l'activité antioxydante. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester.

Ces tests peuvent se diviser en deux catégories : les tests mesurant le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un composé coloré stable facile à détecter (test de réduction du radical DPPH°, test TEAC de réduction du radical-cation ABTS<sup>o+</sup>), et ceux faisant intervenir une compétition entre l'antioxydant et une cible à protéger (pigments, lipides) (test ORAC, test de décoloration du  $\beta$ -carotène).

## **Chapitre II: Matériel et Méthodes**

### **1. Etude phytochimique des huiles de *Quercus***

De l'étude bibliographique précédente (première partie), il semble que les fruits de *Quercus* présentent un intérêt important, que ce soit par rapport à leur potentiel nutritionnel ou de leurs vertus alimentaires. Nous rapellons que le choix particulier porté sur trois espèces de *Quercus* tient compte à la fois de leur localisation géographique, leur disponibilité et la rareté des études sur les huiles extraites de leurs fruits (le gland). Dans cette partie du travail, nous nous intéresserons principalement à la caractérisation et à la détermination des différents composés des huiles extraites à partir de ces fruits. L'extraction des huiles de gland et leur caractérisation physicochimique ont été réalisées au niveau du laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Département de Biotechnologie, INATAA, UFMCI.

#### **1.1. Extraction des huiles de *Quercus***

##### **1.1.1. Opérations de prétraitement**

Toute opération d'extraction solide-liquide est précédée d'une ou plusieurs opérations de préparation ou de prétraitement. Les opérations extractives peuvent, suivant les cas, se dérouler soit sur du matériel végétal frais, soit sur du matériel végétal sec.

La poudre des glands frais renferme une importante proportion d'eau. Avant tout traitement de cette poudre, elle a été convenablement lyophilisée et conservée à -20 °C jusqu'à utilisation.

L'objectif de la lyophilisation est de réduire la teneur en eau jusqu'environ 1-3%, pour inactiver les enzymes lipolytiques qui pourraient provoquer une dégradation rapide de l'huile et faciliter sa libération pendant l'extraction (favoriser les rendements d'extraction) (Bernardini, 1983; Williams, 1997; Gutiérrez Alvarez, 2007).

##### **1.1.2. Extraction de l'huile par « Soxhlet »**

L'opération d'extraction peut se réaliser suivant différents procédés : soit mécanique soit chimique. Industriellement, c'est le procédé par pressage au sein des presses continues à vis qui est le plus universellement utilisé car il est simple, continu et économique même s'il offre un moindre rendement et ne limite pas la présence d'impuretés (débris cellulaires, lécithines,...). L'autre méthode d'extraction fait appel à un solvant organique apolaire ou polaire. D'un point de

vue qualitatif et quantitatif, elle est à préférer car, même si elle s'avère plus onéreuse que les procédés mécaniques, elle est plus avantageuse et conduit à une huile de bonne qualité, critère important dans le cas d'une caractérisation de la matière lipidique extraite.

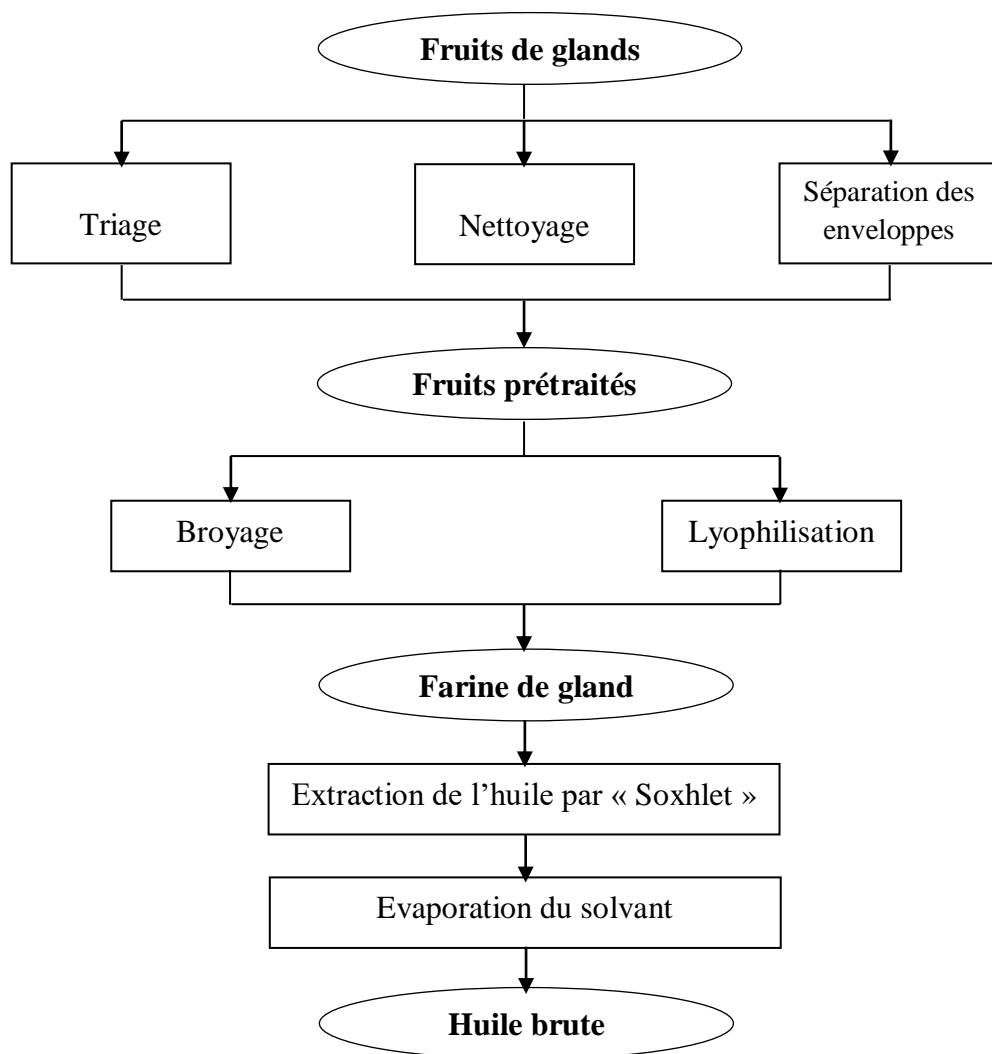
A l'échelle du laboratoire, c'est le procédé chimique par percolation qui a été choisi pour extraire les huiles de *Quercus*. L'extraction de l'huile a été réalisée selon la méthode « Soxhlet » normalisée par AFNOR (NF ISO 8262-3, 2006), qui est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés.

Sachant que les lipides sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants peu ou pas polaires, il a fallu choisir un solvant sélectif vis à vis des huiles désirées, comme l'hexane, le cyclohexane, l'éther de pétrole ou les solvants aromatiques (benzène, toluène,...). L'éther de pétrole, mal défini au sens chimique et conduisant à des résultats moins reproductibles, a été écarté et de même pour les solvants aromatiques en raison de la haute toxicité de leur noyau benzénique. L'extraction à l'hexane, étant la plus utilisée car normalisée (norme AFNOR NF V 03-905), a été choisie.

Les glands broyés et lyophilisés ont été placés dans une cartouche d'extraction en cellulose. L'extraction de l'huile a été réalisée par l'hexane, à l'aide d'un dispositif Soxhlet.

Après filtration et évaporation du solvant, l'huile brute a été conservée dans des bouteilles brunes à +4°C pour des manipulations ultérieures. Pour chacune des espèces étudiées, différents temps d'extraction, de 2 heures à 6 heures, ont été testés afin de déterminer les conditions optimales d'extraction par rapport au rendement d'une part, et la qualité des huiles extraites d'autre part.

La figure 22 récapitule les différentes étapes de l'extraction des huiles de *Quercus*.



**Figure 22.** Diagramme récapitulatif des différentes étapes d'extraction de l'huile de *Quercus*

### 1.1.3. Rendement en huiles

Le rendement en huiles (Rh) a été déterminé après extraction. C'est le rapport entre la masse de l'huile extraite en gramme (m) et la masse de la matière végétale ( $m_0$ ) utilisée durant l'extraction en gramme (g). Il est exprimé en pourcentage et il est calculé par la formule suivante:

$$\text{Rh} = m/m_0 \cdot 100$$

## 1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Dans le but d'évaluer la qualité des huiles extraites, nous nous sommes intéressés à l'étude de leurs propriétés physicochimiques, en particulier, l'extinction spécifique dans l'UV, les indices de réfraction, d'acide, de peroxyde, d'iode et de saponification ainsi que la teneur en matières

insaponifiables. Ces paramètres ont été déterminés en se référant aux méthodes officielles AOCS (AOCS, 1996).

### **1.2.1. Indice de réfraction**

L'indice de réfraction (IR) est particulièrement utile car il renseigne sur l'état de dégradation d'une huile. La détermination de cet indice a été effectuée grâce à un réfractomètre préalablement taré à l'aide de l'eau distillée, permettant l'estimation des indices de réfraction à 0,0002 près. La température de référence, étant donnée la nature des huiles extraites, a été fixée à 20°C.

### **1.2.2. Extinction spécifique dans l'UV**

Le balayage spectrophotométrique dans l'ultraviolet permet la détection des produits d'oxydation des acides gras insaturés. Il correspond à l'absorption maximale des systèmes diéniques et triéniques conjugués qui résultent de la décomposition de l'huile. Les hydroperoxydes (diènes conjugués) peuvent être appréciés par leur absorption spectrophotométrique aux environs de 232 nm (Kiritsakis *et al.*, 2002).

Ces peroxydes évoluent avec le temps et donnent lieu à la formation de divers produits (dicétones et cétones insaturés) qui absorbent vers 270 nm. Le degré et le stade d'oxydation d'une huile peuvent donc être évalués par des coefficients d'absorption de la lumière dans l'ultraviolet appelés absorbances spécifiques  $K_{232}$  et  $K_{270}$  (Kritsakis et Christie, 2000).

Le principe consiste à mesurer l'absorbance de l'huile de *Quercus* en solution dans un solvant (hexane) par spectrophotométrie dans l'UV aux longueurs d'ondes 232 et 270 nm.

Cette analyse prévoit aussi la détermination de la variation de l'extinction spécifique  $\Delta K$  selon l'équation suivante :  $\Delta K = K_{270} - (K_{266} + K_{274}) / 2$ .

### **1.2.3. Indice d'acide**

L'indice d'acide (IA) est la quantité de KOH en milligrammes nécessaire pour neutraliser l'acidité contenue dans 1 g de corps gras. Il correspond à la teneur en acides gras libres contenus dans l'huile. Cette caractéristique rend compte de l'état de dégradation d'une huile dans la mesure où les acides gras libres sont des produits de dégradation et plus particulièrement d'hydrolyse des triglycérides, constituants majoritaires de l'huile.

Une prise d'essai d'huile est mélangée avec 30 ml d'éthanol préalablement neutralisé et quelques gouttes de phénolphthaléine, puis titrée avec une solution d'hydroxyde de potassium 0,1 N, jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistante pendant 10 secondes environ.

L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$IA = (56,1 \times v) / E$$

Où :

v : volume de la solution éthanolique de KOH en ml.

E : masse de la prise d'essai en grammes.

56,1 : masse molaire de KOH

#### **1.2.4. Indice de peroxyde**

C'est le nombre de microgrammes d'oxygène actif contenu dans un gramme de produit capable d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. Cet indice reflète l'état d'oxydation de l'huile et permet de prévoir une détérioration ultérieure des qualités organoleptiques de l'huile.

L'indice de peroxyde (IP) est mesuré par la mise, dans un ballon bien séché, d'une solution de 3 g d'huile dans 12 ml de chloroforme et 18 ml d'acide acétique (2:3, V/V) à laquelle 1 ml d'une solution saturée de KI est ajouté. Le ballon est aussitôt bouché, agité durant 1 mn et le laissé encore 1 mn à l'abri de la lumière puis 75 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'empois d'amidon sont ajoutés (apparition d'une couleur violette). A la fin, un titrage est réalisé par la solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> à 0,01 N jusqu'à la disparition de la couleur violette. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions en remplaçant l'huile par de l'eau distillée.

L'indice de peroxyde est exprimé selon l'équation suivante :

$$IP \text{ (meq O}_2\text{/kg d'huile)} = 1/8 \times 8000 \times ((v - v_0) / E)$$

Où :

E : masse de la prise d'essai en gramme

v : volume de solution de thiosulfate de sodium exprimé en ml.

v<sub>0</sub> : volume de solution de thiosulfate de sodium pour l'essai à blanc

#### **1.2.5. Indice d'iode**

L'indice d'iode (II) d'une matière grasse est le nombre de grammes d'halogène exprimé en iode fixé par 100 grammes de corps gras. Le principe de sa détermination est basé sur la fixation d'halogènes par les doubles liaisons des acides gras insaturés, il permet donc d'évaluer le taux des insaturations moyennes de l'huile.



Une quantité de 0,2 g (4 à 5 gouttes d'huile) d'huile est solubilisée dans 20 ml du cyclohexane. A cette solution, 10 ml du réactif de Wijs ont été ajoutés exactement. Le mélange est bouché et mis dans un endroit sombre pendant 45 min et agité de temps en temps. Une fois le temps écoulé, 15ml d'une solution d'iodure de potassium 10% (KI) et 100 ml d'eau distillée sont ajoutés au mélange précédent puis, l'excès d'iode est titré par une solution de thiosulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,1 N) en présence d'empois d'amidon.

L'indice d'iode est donné comme suit :

$$\text{Ii (g d'iode fixé/g d'huile)} = (0,1296 \text{ N (V}_1\text{-V}_2)) / \text{M}$$

Où :

$V_1$  : volume, en millilitres, de la solution  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utilisé pour l'essai à blanc

$V_2$  : volume, en millilitres, de la solution  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utilisé pour la détermination

N : Normalité.

0,1296 : nombre de gramme d'iode correspondant à 1ml

M : masse, en gramme, de la prise d'essai

### **1.2.6. Indice de saponification**

L'indice de saponification (IS) correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour la saponification d'un gramme de corps gras. Sa valeur nous permet d'estimer les longueurs des chaînes de carbone des acides gras constituant l'huile d'une part, et de calculer les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides qui renferment l'huile d'autre part.

Une quantité de 1g d'huile est saponifiée à reflux par 25 ml de KOH éthanolique (0,5N) pendant une heure. L'excès du KOH est neutralisé par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) (0,5N) en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans l'huile.

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$\text{IS (mg KOH/g d'huile)} = \text{N. (V}_0\text{-V}_1) \times 56,1/\text{M}$$

Où :

$V_0$ : volume de HCl en ml dans le test à blanc en ml

$V_1$  : volume de HCl en ml nécessaire pour neutraliser l'excès de la potasse

M : masse d'huile prise en gramme

N : normalité de la solution potassique.

56,1 : masse molaire de KOH

### **1.2.7. Teneur en insaponifiables**

On entend par matières insaponifiables (TI) toutes les substances présentes dans un produit qui, après saponification de celui-ci par l'hydroxyde de potassium et extraction par un solvant spécifié, ne sont pas volatiles dans les conditions opératoires spécifiées (Karleskind, 1992). Cet ensemble représente généralement une fraction mineure de l'ordre de 0,5 à 2 %. Malgré sa teneur infime, les constituants chimiques de l'insaponifiable peuvent être extrêmement variés en nature et en proportions (Lecerf, 2011).

L'isolement de l'insaponifiable des huiles de *Quercus* a été réalisé suivant les méthodes officielles (AOCS, 1996). Le principe de cette méthode est basé sur la saponification d'une prise d'essai (5 g d'huile) par 50 ml d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium KOH (2 N) à ébullition sous reflux. Après ajout de 50 ml d'eau distillée, la solution froide est extraite 3 fois par 70 ml d'éther diéthylique suivie d'un lavage avec l'eau distillée. Le lavage à l'eau distillée (50 ml) est poursuivi jusqu'à PH neutre (élimination totale de la fraction saponifiable). La phase organique est ensuite filtrée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu ainsi obtenu est séché à  $103 \pm 2$  °C pendant 15 minutes puis refroidi dans un dessiccateur jusqu'à poids constant. Ce résidu constitue la fraction insaponifiable.

La teneur en matières insaponifiables est égale à :

$$\mathbf{TI = (m_1/m_0) \times 100}$$

Où :

$m_1$  : masse du résidu séché en gramme

$m_0$  : masse de la prise d'essai en gramme

## **2. Etude de la composition des huiles de *Quercus***

Peu d'études antérieures ont été menées sur la composition de l'huile de *Quercus* (León-Camacho *et al.*, 2004 ; Charef *et al.*, 2008 ; Al-Rousan *et al.*, 2013). A notre connaissance, les données sur ces huiles ne sont pas complètes, et il n'existe pas d'études exhaustives sur la composition détaillée de cette huile. Ce manque de données semble être un handicap pour la valorisation de ces fruits qui restent malheureusement sous-exploitées. Dans cette optique, l'objectif du présent chapitre est de contribuer à la connaissance de la composition de cette huile. Les travaux présentés dans cette partie du travail ont été menés au sein de laboratoire « DI.S.S.P.A », Département des Sciences du Sol, des Plantes et de l'Alimentation, Université de Bari, Italie.

### **2.1. Analyse des acides gras**

Les acides gras peuvent être analysés sous forme libre, mais généralement ils sont analysés après leur transformation en esters méthyliques (EMAG). Ces derniers ont une volatilité plus élevée et une polarité plus faible (Aparicio et Aparicio-Ruíz, 2000).

Toutefois étant donné que les acides gras sont naturellement estérifiés en glycérol sous forme de triacylglycérols, leur séparation par la chromatographie en phase gazeuse est très difficile, vu que ce type de chromatographie est utilisé pour la séparation de molécules de faible masse moléculaire et de faible polarité ou apolaires. Il est donc nécessaire de les séparer du glycérol et de les estérifier à un alcool gras plus léger que ce dernier, qui va les rendre plus volatils. L'alcool le plus adéquat et le plus léger est le méthanol, d'où l'appellation «Méthylation » (Alais *et al.*, 2003).

L'identification des acides gras a été réalisée par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un Détecteur à Ionisation de Flamme (CPG/FID), après leur transformation préalable en Esters Méthyliques des Acides Gras (EMAG).

#### **2.1.1. Saponification et obtention des acides gras**

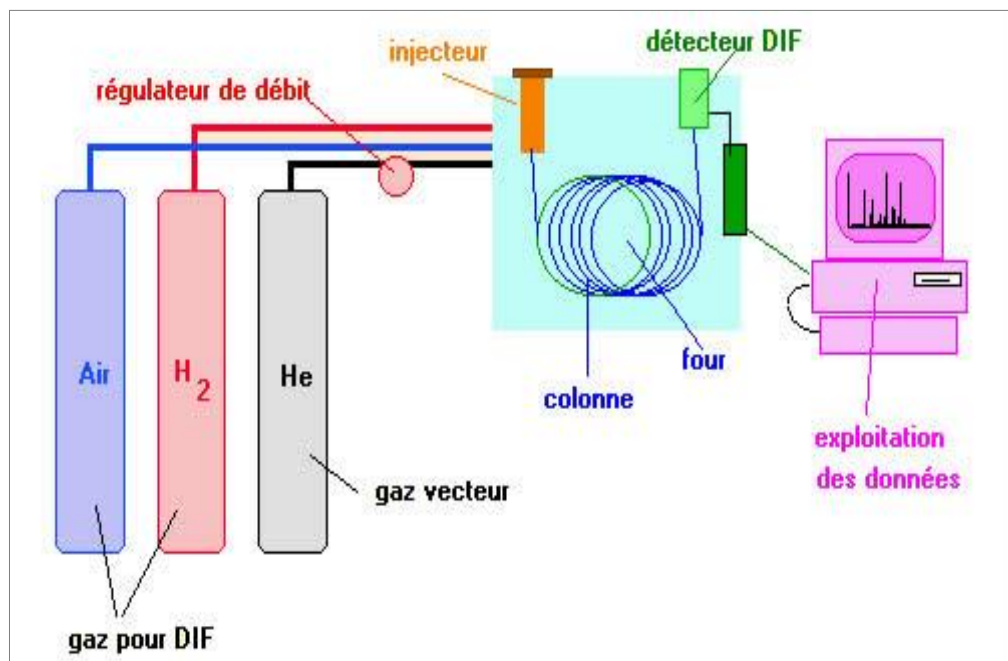
Les acides gras sont transestérifiés par une solution d'hydroxyde de potassium méthanolique suivant les méthodes officielles (AOCS, 1993).

La préparation des esters méthyliques est effectuée comme suit : une solution d'huile de 20 mg/1 ml dans l'hexane est transestérifiée par une solution méthanolique de KOH (2 N). Le mélange est

soumis à un traitement par ultrason pendant 6 min à 20 °C. Les esters méthyliques ainsi préparés ont été ensuite injectés dans la colonne chromatographique.

### 2.1.2. Analyse des acides gras par CPG/FID

L'analyse des esters méthyliques des acides gras est réalisée selon le principe suivant : tout d'abord, les esters méthyliques sont introduits dans l'injecteur. Le mélange se volatilise et passe dans le circuit sous forme de gaz. Ce mélange gazeux est ensuite entraîné par le gaz vecteur et pénètre dans la colonne chromatographique. La colonne est l'élément séparateur dont la paroi intérieure est recouverte d'une mince couche séparatrice. En passant dans la colonne, les constituants de l'échantillon interagissent avec cette couche. A la suite, ils sont captés par le détecteur à ionisation de flamme. Une gamme de pics caractérisée par leurs temps de rétention et leurs surfaces, permettent ainsi de déterminer l'identité et le pourcentage de chaque constituant. Les substances séparées sont affichées sur le chromatogramme (Figure 23).



**Figure 23.** Schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme (Skoog, 2003)

Les esters méthyliques d'acides gras des huiles de *Quercus* sont analysés par un chromatographe model Agilent 7890A Gas Chromatograph (Cernusco, MI, Italie) sur une colonne capillaire avec Détecteur à Ionisation de Flamme (FID).

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne capillaire FFAP-CB, longueur : 25 m, diamètre interne : 0,32 mm, épaisseur de filme : 0,30 $\mu$ m (Chrompack, Middleburg, The Netherlands).
- Gaz vecteur : Helium, débit 1ml/min
- Température de l'injecteur à 210 °C en mode split
- Température de détecteur à 220°C, température de four à 180 °C.

L'identification des esters méthyliques d'acides gras a été effectuée par comparaison des temps de rétention avec ceux d'étalons, et la teneur en un constituant donné est exprimée en % de masse des esters méthyliques.

## **2.2. Analyse des stérols**

Les stérols font partie des constituants mineurs des huiles. Ce sont des composés tétracycliques comportant 27 à 30 atomes de carbone dans lesquels une chaîne latérale est attachée à la position du carbone 17 et peut être saturée ou comporter une ou deux doubles liaisons (Aparicio et Aparicio-Ruíz, 2000 ; Giuffrè *et al.*, 2012). Dans le règne végétal, les stérols les plus abondants sont le  $\beta$ -sitostérol, suivi du campestérol et du stigmastérol et ils sont représentés uniquement par le cholestérol dans le règne animal (Giuffrè *et al.*, 2012).

Les stérols constituent une part notable de l'insaponifiable (30 à 60 %), ils se retrouvent dans presque toutes les graisses et les huiles et ils sont aussi caractéristiques de l'authenticité des huiles végétales (Aparicio et Aparicio-Ruíz, 2000). La détermination de la fraction stérolique est d'une très grande importance puisque elle intervient dans le contrôle de la pureté des corps gras. Cette fraction est spécifique pour chaque corps gras et elle est utilisée comme traceur pour évaluer l'adultération des huiles (Aluyor *et al.*, 2009).

Afin d'étudier les différents stérols composant les huiles extraites de *Quercus*, il a fallu préalablement procéder à plusieurs opérations (Règlement Européen (CEE) N°2568/91):

### **2.2.1. Obtention de l'insaponifiable**

L'isolement de l'insaponifiable des huiles étudiées est réalisé suivant le même protocole précédent (§ 2.2.7) avec l'ajout d' $\alpha$ -cholestanol comme étalon interne.

### **2.2.2. Préparation de la fraction stérolique par CCM**

La séparation de la fraction stérolique de l'insaponifiable a été réalisée par un fractionnement de ce dernier par chromatographie sur couche mince préparative selon le protocole suivant : Une

solution d'environ 5% d'insaponifiable est préparée dans le chloroforme et 300 µl de cette solution ont été prélevés et déposés avec une microseringue de 100 µl sur une plaque de silice (d'épaisseur 0,25 mm) à 2 cm de l'extrémité inférieure. En alignement avec cette bande, 2 à 3 µl de la solution étalon d' $\alpha$ -cholestanol ont été déposés afin d'identifier, après élution, la bande de stérols. La plaque a été ensuite placée dans une chambre d'élution contenant le mélange éluant : hexane/éther diéthylique (65/35 : v/v) et laissée éluer jusqu'à ce que le front de solvant atteigne environ 1 cm du bord supérieur de la plaque. La plaque est ensuite retirée de la chambre d'élution et le solvant est évaporé dans un courant d'air chaud ou laissé pendant un moment sous une hotte. La plaque a été ensuite pulvérisée légèrement et uniformément avec la solution de 2,7-dichlorofluorescein (0,2 % dans l'éthanol) et laissée à sécher. L'observation de la plaque dans l'UV permettra d'identifier la bande de stérols par alignement avec la tache obtenue avec la solution de standard.

En utilisant une microspatule métallique, le gel de silice a été gratté au niveau des tâches marquées et les stérols ont été dilués dans 2 ml de chloroforme chaud. La solution obtenue a été filtrée et le filtrat est lavé trois fois par 10 ml d'éther diéthylique et évaporé à un volume d'environ 4 à 5 ml. La solution résiduelle a été versée dans un tube à essai et séchée par un léger courant d'azote gazeux, le résidu obtenu constitue la fraction stérolique.

### **2.2.3. Préparation de triméthylsilyléther**

Etant donnée la relative polarité des stérols, pour s'assurer de leur plus grande stabilité, leur dérivaison en triméthylsilyléther (TMSE) a été nécessaire. La silylation a été directement effectuée sur les fractions recueillies précédemment. Dans les tubes contenant les stérols, 50 µl du réactif de silylation ont été ajoutés (pyridine-hexaméthylidisilazane-triméthylchlorosilane 9 :3 :1(V/V/V)). Agiter les tubes (sans se retourner) jusqu'à ce que les composés soient complètement dissous. Laisser reposer au moins 15 minutes à température ambiante, puis centrifuger pendant quelques minutes : la solution limpide (le surnageant) est prête pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

### **2.2.4. Analyse des stérols par CPG/FID**

L'analyse des stérols est opérée par CPG à l'aide de la même colonne que celle utilisée pour l'analyse des acides gras. Les conditions de fonctionnement maximal sont les suivantes:

- Gaz vecteur : Hélium, vitesse linéaire : 20-35 cm/s ;

- Gaz auxiliaires : Hydrogène, vitesse linéaire : 30-50 cm/SIT ;
- Programmation en température :
  - Température de la colonne: 260±5 °C
  - Température d'entrée: 280-300 °C
  - Température du détecteur: 280-300 °C
- Quantité de substance injectée: 0,5 à 1 µl de solution de TMSE.

L'identification des pics individuels a été effectuée en comparant leurs temps de rétention avec ceux des TMSE des stérols standards analysés dans les mêmes conditions. Les concentrations des stérols individuels sont exprimées en mg/kg d'huile et, en tant que stérols totaux, leur somme.

### **2.3. Analyse des composés volatils**

La saveur et l'arôme des huiles sont générés par un certain nombre de constituants volatils présents à des concentrations extrêmement faibles. La fraction volatile des huiles comprend des hydrocarbures saturés, insaturés, aromatiques et terpéniques, ainsi que des alcools, aldéhydes, esters et autres (Cert *et al.*, 2000).

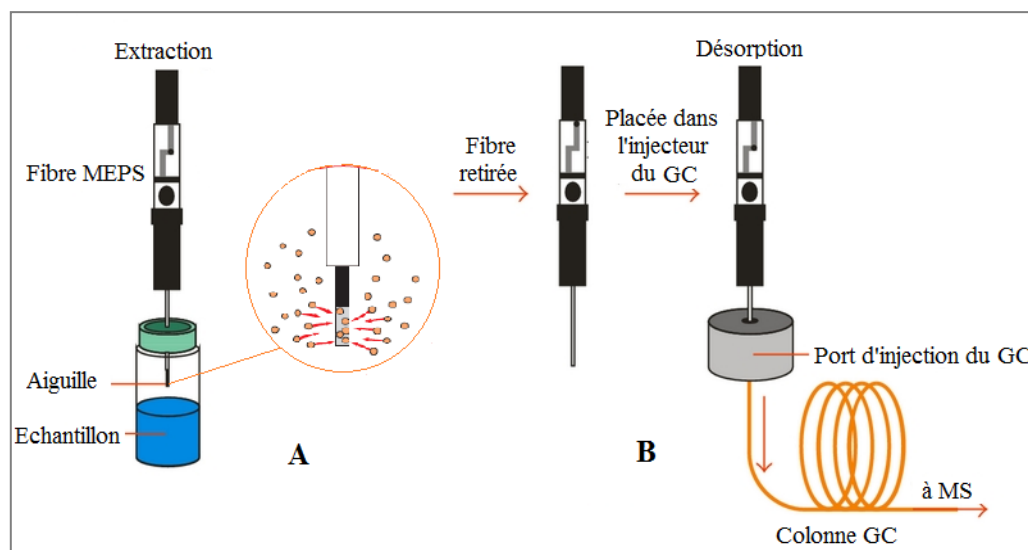
La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présentent bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) est la méthode de référence pour l'analyse des composés volatils (Aparicio et Aparicio-Ruíz, 2000 ; Cert *et al.*, 2000). Elle permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées.

En effet, l'analyse des composés volatils nécessite une étape préliminaire d'extraction et de concentration pour enrichir les molécules d'intérêt à un niveau détectable, comme l'exige la technique analytique à utiliser (Schmidt et Podmore, 2015). La technique d'extraction dite par SPME ("Solid Phase Micro Extraction"), inventée par Arthur et Pawliszyn en 1990, semble offrir de nombreuses perspectives. C'est une technique de préconcentration performante, sans solvant, suffisamment rapide et nécessitant une faible quantité d'échantillon (Blasco *et al.*, 2004 ; Vas et Vekey, 2004 ; Schmidt et Podmore, 2015).

L'extraction par SPME consiste en une adsorption et/ou un partage des molécules volatiles entre la phase stationnaire de la fibre (fibre de silice fondue revêtue d'un polymère adéquat) et le

milieu dans lequel elle est plongée. La méthodologie SPME inclut deux modes d'extraction principaux: (i) une extraction directe (immersion de la fibre directement dans le liquide et les molécules volatiles se partagent entre la fibre et l'échantillon liquide) ; (ii) une extraction de l'espace de tête "Head Space" (HS-SPME) où la fibre est exposée dans l'espace de tête au dessus de l'échantillon (Figure 17-A). Dans ce processus, deux équilibres interviennent : l'équilibre échantillon-phase gazeuse et l'équilibre phase gazeuse-fibre. Ce mode HS-SPME est largement utilisé pour l'extraction des composés volatils et apolaires (Vas et Vekey, 2004 ; Jaraula *et al.*, 2008 ; Schmidt et Podmore, 2015). Après l'extraction, la fibre est rétractée dans l'aiguille, retirée de l'échantillon et désorbée thermiquement directement dans un injecteur de chromatographe en phase gazeuse (Figure 24).

Les composés volatils des huiles de *Quercus* ont été analysés en utilisant la technique de micro-extraction de l'espace de tête en phase solide (HS-SPME) couplée à une chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse (HS/SPME -GC/MS) comme décrit par Caponio *et al.* (2014).



**Figure 24.** Représentation schématique de l'analyse par SPME-GC/MS. A : principe de l'extraction par HS-SPME, B : désorption thermique (Schmidt et Podmore, 2015)

### 2.3.1. Micro-Extraction en Phase Solide (HS-SPME)

L'extraction des composés volatils a été effectuée par la technique HS-SPME, pour absorber les substances volatiles présentes dans l'espace libre équilibré. Une prise d'essai de l'huile a été placée dans un flacon en verre scellé par des cloisons en silicone et des capsules à sertir en



aluminium (VWR International, Radnor, PA, USA) et laissés s'équilibrer pendant 2 minutes sous agitation. Après le temps d'équilibrage, les substances volatiles ont été extraites en exposant une fibre SPME (Supelco, Bellefonte, PA, USA) dans l'espace de tête de l'huile à 40 °C pendant 20 min (Tableau 8).

**Tableau 8.** Paramètres SPME optimisés pour l'étude de la fraction volatile des huiles de *Quercus*

<b>Paramètres</b>	<b>Caractéristiques</b>
Mode d'extraction	« espace de tête »
Nature de la fibre	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm)
Quantité de l'huile	1g
Agitation	magnétique
Temps d'équilibre	2 min
Temps d'extraction	20 min
Température d'extraction	40 °C

### 2.3.2. Analyse par GC/MS

L'analyse a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC/MS). Après extraction, la fibre a été insérée dans l'orifice d'injection (réglé à 230 °C) du chromatographe en phase gazeuse (modèle Agilent 6850), équipé d'un spectromètre de masse (Agilent 5975 "Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA") pour la désorption thermique des substances volatiles pendant 2 min.

Les composés volatils ont été ensuite séparés en utilisant une colonne capillaire polaire HP-Innowax (60 m de longueur x 0,25 mm de diamètre x 0,18 µm épaisseurs de film), dans les conditions suivantes:

- Température de l'injecteur, 250 °C; débit de 1,5 ml/min.
- Programmation du four :
  - ✓ 5min à 40 °C ;
  - ✓ 4 °C/min de 40 °C à 220 °C ;
  - ✓ 10 min à 220 °C

Le détecteur de masse a été réglé dans les conditions suivantes:

- Température de la ligne de transfert 280 °C;
- Température de la source d'ion 230 °C;

- Energie d'ionisation 70 eV;
- Masse d'électron d'ionisation 33-260 uma.

### **2.3.3. Identification des composés volatils**

Les substances volatiles ont été identifiées en comparant leurs spectres de masse et leurs temps de rétention avec ceux des composés répertoriés dans la bibliothèque de spectres de masse.

Les quantités approximatives de chaque composé ont été déterminées par comparaison de sa surface à l'intégrale des pics du chromatogramme ionique total et calculées en comparant la surface du pic avec celle de l'étalon interne.

Les quantités de constituants individuels présents dans l'échantillon ont été calculées et exprimées en pourcentage de la surface totale.

### **3. Mesure de l'état d'oxydation des huiles de *Quercus***

La qualité est l'état actuel de l'acceptabilité de l'huile, tandis que sa stabilité est sa résistance aux futurs changements au cours du traitement et du stockage (Warner et Eskin, 1995). La résistance à l'oxydation peut être exprimée comme le temps nécessaire pour atteindre le point critique de l'oxydation, qu'il s'agisse d'un changement sensoriel ou d'une accélération soudaine du processus d'oxydation. La stabilité à l'oxydation est un facteur très important pour déterminer la qualité de l'huile et sa durée de conservation, car des composés néfastes se forment lors de l'oxydation (Choe et Min, 2006).

La stabilité à l'oxydation est une préoccupation majeure pour de nombreux chercheurs dans le domaine des graisses et des huiles. Les études approfondies sur l'oxydation des lipides ont donné lieu à de nombreuses découvertes dans le domaine de la transformation des graisses et des huiles (Tan *et al.*, 2001; Min et Boff, 2002). De nombreuses études ont été réalisées pour améliorer la stabilité à l'oxydation de nombreuses huiles végétales, mais aucune étude n'a été réalisée pour étudier la stabilité de l'huile de *Quercus*.

Le but de cette partie est d'évaluer la stabilité des huiles de *Quercus* après 180 jours de stockage (soit 6 mois). Le suivi de l'état d'oxydation des huiles de *Quercus* a été réalisé en mesurant les marqueurs d'oxydation, notamment l'indice de peroxyde, les propriétés spectrophotométriques, l'évolution de la composition en acides gras et la teneur en composés polaires et volatils. Nous avons également dosé les composés phénoliques et les tocophérols, présents dans les huiles de *Quercus*, qui doivent jouer un rôle dans la protection de cette huile. En effet, ces méthodes chimiques ont été suivies d'un test accéléré (Rapidoxy), couramment utilisé pour évaluer la stabilité à l'oxydation des graisses et des huiles végétales, afin de les rendre plus fiables et reproductibles.

#### **3.1. Conditionnement et stockage des huiles de *Quercus***

Nous rappelons que les huiles des trois espèces de *Quercus* utilisées pour cette étude (*Quercus ilex* L., *Quercus suber* L. et *Quercus coccifera* L.) ont été extraites par la méthode Soxhlet dans les mêmes conditions définies précédemment (§ 2.1).

Les huiles obtenues ont été conditionnées dans des flacons bruns en verre de sorte que l'espace libre dans chaque flacon a été d'environ 1 ml pour simuler une utilisation domestique. Les flacons ont été alors hermétiquement fermés et divisés en deux séries contenant chacune deux flacons

pour chaque espèce. La première série a été immédiatement analysée (T0), tandis que la deuxième série a été placée à l'obscurité pour être analysée après six mois de stockage (T6). La température moyenne de stockage a été de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **3.2. Suivi des marqueurs d'oxydation**

#### **3.2.1. Teneur en acides gras libres**

L'acidité libre, exprimée en pourcentage de l'acide oléique, est un moyen simple et efficace pour évaluer la qualité d'une huile. Elle est largement utilisée à la fois comme un critère usuel de la classification des huiles, et aussi comme un facteur informatif sur l'altération des huiles (Gharby *et al.*, 2011). Fraîchement extraites et selon de bonnes pratiques, les huiles végétales présentent une très faible acidité. Dans le cas contraire et au cours du stockage, l'huile peut s'altérer et son acidité augmente suite à la libération d'acides gras par hydrolyse des triglycérides (Tanouti *et al.*, 2010). L'indice d'acide des huiles de *Quercus* stockées a été déterminé selon le même protocole décrit précédemment (§ 2.2.3).

#### **3.2.2. Taux de peroxydes**

La mesure de l'indice de peroxyde (IP) est déterminée de façon systématique pour évaluer la qualité des huiles. L'IP fournit une indication de l'état initial de l'oxydation des lipides, car les hydroperoxydes sont les principaux produits primaires de l'oxydation (Wanasundara *et al.*, 1995 ; Tanouti *et al.*, 2010 ; Gharby *et al.*, 2011).

D'après la méthode officielle AOCS (1996), les hydroperoxydes réagissent en milieu acide avec l'ion iodure pour former du diode qui est titré par une solution de thiosulfate de sodium. La quantité d'iode formée est proportionnelle à celle des peroxydes présents (Wanasundara *et al.*, 1995). Cette grandeur est alors définie comme étant la quantité d'oxygène actif contenu dans un gramme de produit capable d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. La mesure de cet indice sert à évaluer l'état de conservation des huiles de *Quercus* au cours du stockage, et ne doit pas dépasser 20 meq  $\text{O}_2/\text{Kg}$  (Gharby *et al.*, 2011).

#### **3.2.3. Teneur en diènes conjugués**

Le degré et le stade d'oxydation des huiles de *Quercus* conservées ont été évalués par des coefficients d'absorption dans l'ultraviolet appelés absorbance spécifique  $K_{232}$  et  $K_{270}$ . En effet, la mesure de l'extinction spécifique à 232 nm (diènes conjugués) et à 270 nm (triènes conjugués)

d'une huile peut être considérée comme une image de son état d'oxydation. Plus son extinction à 232 nm est forte, plus elle est peroxydée. De même, plus l'extinction à 270 nm est forte, plus elle est riche en produits d'oxydation secondaire, ce qui traduit une faible aptitude à la conservation (Wanasundara *et al.*, 1995 ; Tanouti *et al.*, 2010 ; Gharby *et al.*, 2011).

#### **3.2.4. Profil en acides gras**

La composition en acides gras est particulièrement importante pour la stabilité à l'oxydation des huiles. Plus une huile est insaturée, plus la réaction d'oxydation se déroule rapidement (Liu et White, 1992 ; Choe et Min, 2006 ; Maszewska *et al.*, 2018).

Le taux d'oxydation dépend fortement du taux de formation de radicaux alkyle d'acides gras ; ce dernier dépend lui-même principalement des types d'acide gras (Liu *et al.*, 2002 ; Choe et Min, 2006). En effet, l'acide linoléique est le plus rapidement oxydé, suivi des acides linoléique et oléique. C'est la raison pour laquelle l'oxydation la plus rapide se produit dans les huiles caractérisées par la plus grande quantité d'acides gras polyinsaturés (environ 68–85%) (Maszewska *et al.*, 2018).

Par conséquent, le suivi de l'évolution de la composition en acides gras dans les huiles de *Quercus* pendant le stockage est un moyen efficace pour évaluer leur état d'oxydation. La composition en acides gras des huiles analysées a été déterminée sous forme d'esters méthyliques par CPG/FID dans les mêmes conditions opératoires citées auparavant (§ 3.1).

#### **3.2.5. Analyse des composés volatils**

La présence ou l'absence des composés volatils particuliers peut également être un bon indicateur de changements de qualité d'huile (Tanouti *et al.*, 2010). Au cours de l'oxydation des huiles végétales, divers composés responsables d'un arôme indésirable sont formés.

L'analyse des composés volatils a été proposée pour évaluer le taux d'oxydation des huiles. Les méthodes chromatographiques (associant la CPG à la technique de l'espace de tête) présentent l'avantage d'être représentatives des composés volatils directement responsables du caractère rance (Judde, 2004).

### **3.2.6. Taux de composés polaires**

La température et l'oxygène sont considérés comme les principaux facteurs affectant la dégradation des huiles. Ils conduisent à l'oxydation des acides gras insaturés et à la polymérisation des triglycérides. Ces facteurs modifient plus ou moins tous les constituants de l'huile en fonction de l'insaturation et de leur quantité initiale dans l'huile d'origine. Par conséquent, les produits altérés provenant des triglycérides seront plus importants quantitativement que les constituants mineurs, car les triglycérides sont les principaux constituants. Ils sont appelés génériquement des composés polaires glycéridiques (Cert *et al.*, 2000).

L'analyse des composés polaires totaux (TCP) dans les huiles est considérée comme un très bon marqueur pour évaluer leur degré d'oxydation et elle donne des informations sur la teneur globale en composés néoformés qui ont une polarité plus élevée que celle des triglycérides (Márquez-Ruiz *et al.*, 1996). La détermination de la composition de la fraction polaire est la méthodologie la plus couramment utilisée pour évaluer l'altération dans les huiles chauffées ou stockées (Cert *et al.*, 2000). Les graisses et les huiles ne doivent pas présenter des teneurs en composés polaires supérieures respectivement à 25 % et 14 %.

Les composés polaires sont des composés peu volatils et sont ainsi plus communément analysés par chromatographie en phase liquide. Leur analyse nécessite de disposer une méthode qui puisse permettre leur extraction, séparation et détection. La méthode utilisée pour déterminer les composés polaires des huiles de *Quercus* est celle qui a été adoptée par AOAC (2003). Le principe de cette méthode repose sur le fractionnement des composés apolaires et polaires des huiles par chromatographie sur colonne de silice. Ensuite, l'analyse de la fraction polaire obtenue est soumise à une chromatographie d'exclusion à haute performance (HPSEC) qui permet de séparer les composants en fonction de leur taille moléculaire.

#### **a) Préparation de la colonne chromatographique**

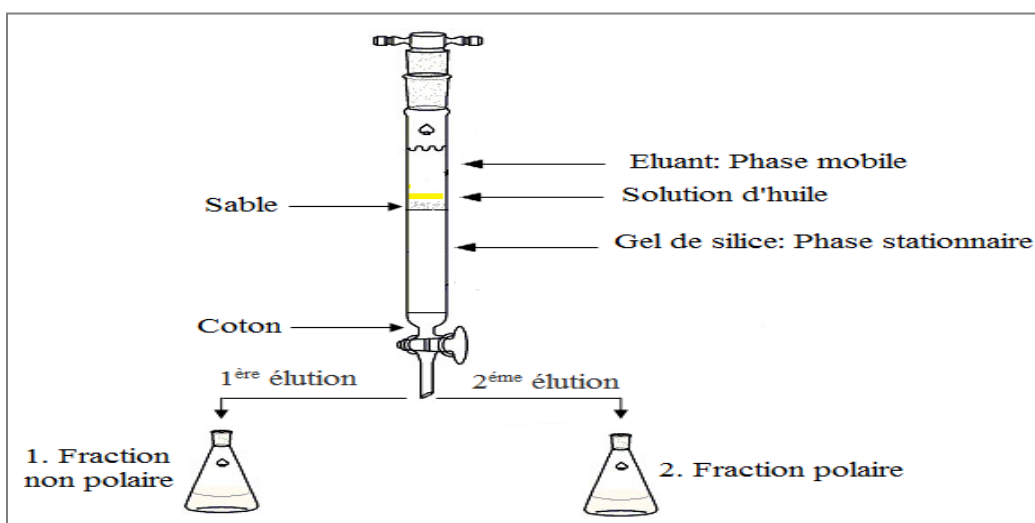
La réalisation d'une colonne impose de respecter certaines règles qui permettront une séparation efficace :

- Placer tout d'abord un morceau de coton au fond de la colonne et le recouvrir d'éluant (mélange d'éther de pétrole/éther diéthylique : 9/1 : V/V), afin d'éliminer l'air emprisonné dans le coton.

- Introduire une suspension constituée de 5 g de gel de silice et 10 ml du solvant éluant dans la colonne (phase stationnaire) à l'aide d'un entonnoir, rincer avec l'éluant et laisser s'écouler.
- Une fois la colonne remplie, ajouter en tête de colonne au dessus de la surface de silice 1 g de sable. Cette couche permet donc de réaliser des dépôts et d'ajouter de l'éluant sans perturber la surface de silice, ce qui empêcherait une bonne séparation.
- Amener le niveau d'éluant au niveau de la surface du sable. On peut alors déposer délicatement la solution de l'huile en haut de colonne afin de ne pas perturber la surface de silice.
- Ouvrir le robinet pour que la solution d'huile arrive au niveau de la silice, rajouter quelques millilitres d'éluant et ouvrir de nouveau le robinet afin de s'assurer que toute la solution soit en tête de la colonne de silice (Figure 20).

### **b) Extraction des composés polaires**

Cette méthode consiste à séparer, sur la colonne de gel de silice préparée, 1 g d'huile en deux fractions (Figure 25). La première, contenant des triglycérides non polaires, a été éluée en utilisant un mélange d'éther de pétrole/éther diéthylique (9/1 : V/V) ; et la seconde, en éluant avec l'éther diéthylique, contient les composés les plus polaires, à savoir les dimères, les polymères, les monomères de triacylgérides oxydés, les diacylglycérols, les monoglycérides et d'autres constituants mineurs polaires.



**Figure 25.** Présentation schématique d'une chromatographie sur colonne

Après élimination de la fraction non polaire et l'évaporation du solvant par un évaporateur rotatif, la fraction polaire a été récupérée dans 5 ml de tétrahydrofur (THF) ensuite filtrée par des filtres nylon de 0,45 mm.

### **c) Analyse des composés polaires**

Les composés polaires, préalablement séparés et récupérés dans le THF, ont ensuite été soumis à une analyse par chromatographie d'exclusion à haute performance (HPSEC), en utilisant du THF comme éluant à un débit de 1 ml/min. L'analyse HPSEC permet de séparer et de quantifier les différentes classes de substances constituant les composés polaires, telles que les oligopolymères de triglycérides (PTG), les triglycérides oxydés (ox-TAG) et les diglycérides (DAG). Le système HPSEC consiste en une pompe série 200 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) avec un injecteur Rheodyne, une boucle de 50 µl, une colonne de protection en PL-gel (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK) de 5 cm de longueur et 7,5 mm de diamètre, et une série de deux colonnes PL-gel (Perkin-Elmer, Beaconsfield, Royaume-Uni) de 30 cm de longueur et 7,5 mm de diamètre chacune. La colonne a été garnie d'un copolymère de styrène-divinylbenzène hautement réticulé avec des particules de 5 µm et un diamètre de pores de 500 Å. Le détecteur était un réfractomètre série 200 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

### **d) Identification des composés polaires**

Les quantités de chaque groupe de composés, à savoir les polymères de triglycérides, les dimères de triglycérides, les monomères de triglycérides oxydés et les diglycérides ont été calculées à partir des surfaces de pics individuels et du pourcentage de composés polaires totaux.

### **3.2.7. Taux de dégradation des antioxydants**

La susceptibilité des huiles à la conservation est liée à leur richesse en acides gras insaturés et à la nature chimique des antioxydants naturels (Chimi, 2005). Les polyphénols et les tocophérols sont les deux principaux composés agissant comme antioxydants pour inhiber l'oxydation des huiles (Velasco et Dobarganes, 2002). Ce sont des composés importants dans les huiles végétales en raison de leur contribution à la stabilité oxydative et aux qualités nutritionnelles de l'huile (Velasco et Dobarganes, 2002 ; Bendini *et al.*, 2006 ; Zungur, *et al.*, 2014). L'analyse des polyphénols et des tocophérols est un facteur important lors de l'évaluation de la qualité de l'huile



en raison de leur contribution à l'amélioration de sa résistance à l'oxydation (Cinquanta *et al.*, 1997).

Ce sont les techniques spectroscopiques et chromatographiques qui permettent d'identifier et de quantifier les composés phénoliques et les tocophérols. Une partie de cette thèse sera dédiée à l'étude de ces composés ainsi que leurs techniques d'analyse.

Le suivi des modifications des composés phénoliques et des tocophérols au fil du temps pourrait constituer un paramètre important pour le contrôle qualité des huiles végétales et leur durée de conservation (Zungur *et al.*, 2014). Cette dernière est liée essentiellement au pourcentage des antioxydants naturels dégradés (taux de polyphénols et/ou tocophérols dégradés). Ce pourcentage est calculé sur la base des teneurs résiduelles en polyphénols et/ou tocophérols déterminées à leurs stabilités oxydatives, déduites des teneurs initiales en polyphénols et/ou tocophérols totaux ; le résultat obtenu est divisé par les mêmes teneurs des polyphénols et/ou tocophérols à l'état initial (avant le test d'oxydation) et exprimé en pourcent (Chimi, 2005).

### **3.3. Test d'oxydation accéléré « Rapidoxy »**

Afin de déterminer la stabilité des huiles d'une façon rapide, il est possible de mesurer leur oxydabilité ou leur résistance à l'oxydation en mettant en œuvre des tests accélérés. Parmi ces tests, on peut citer le test de Schaal ou à l'étuve, le test de Swift ou AOM (Active Oxygen Method) et des tests plus récents, automatisés tels que Rancimat ou OSI (Oxidative Stability of Oils), Rapidoxy, Oxidograph et Oxipress (Cuvelier et Maillard, 2012).

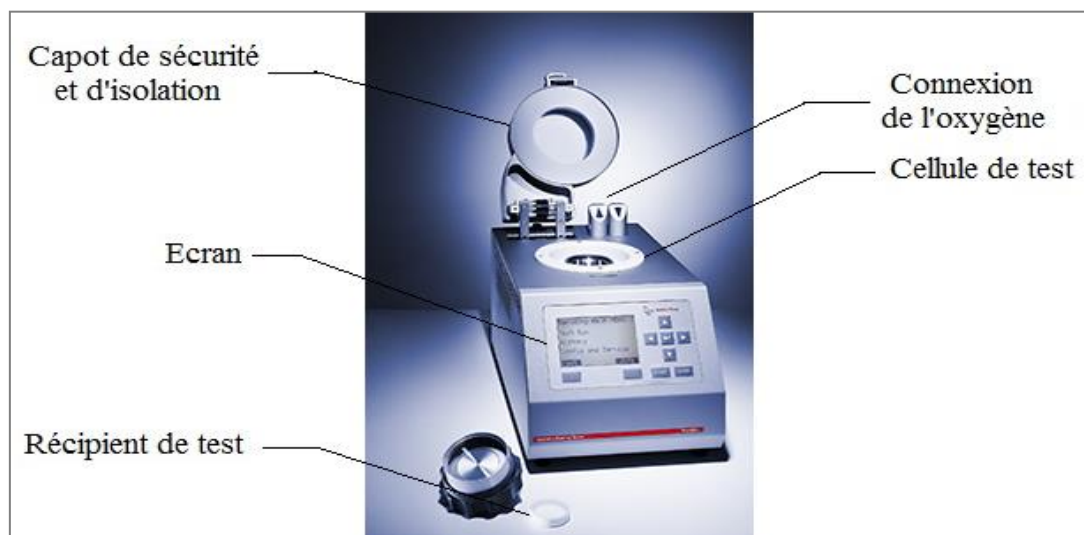
La méthode Rapidoxy, officiellement recommandée, est très populaire et fréquemment utilisée. Pratiquement tous les tests entièrement accélérés et automatisés, sont normalement effectués à une température de 100°C à 140°C. Ce qui implique la mesure de la période d'induction, c'est-à-dire le temps pendant lequel l'huile a une résistance naturelle à l'oxydation due à la présence d'antioxydants naturels qui inhibent l'oxydation (Gertz et Kochhar, 2001).

Dans ce type de tests, le principe consiste à vieillir prématurément les huiles par chauffage à une température élevée, ce qui conduit à l'oxydation de l'huile et la formation des produits de dégradation (acides gras volatils). Ces derniers sont expulsés par un courant d'air et transférés dans une cellule de mesure. Le temps d'induction est déterminé par conductimètre.

La fin de la période d'induction est indiquée lorsque la conductivité se met à augmenter rapidement. Cette augmentation accélérée est provoquée par l'accumulation d'acides gras volatils produits au cours de l'oxydation (Gharby *et al.*, 2011).

Le temps d'induction (IT) des huiles de *Quercus* utilisées dans cette étude, a été déterminé à l'aide d'un instrument de stabilité à l'oxydation : « Rapidoxy » (Anton Paar, Blank enfelde-Mahlow, Allemagne) (Figure 26). C'est un appareil de contrôle automatique permettant de mesurer rapidement la stabilité à l'oxydation des matrices lipidiques, soumises à une oxydation forcée avec augmentation de température et de pression d'O<sub>2</sub> (Difonzo *et al.*, 2017).

La stabilité à l'oxydation a été évaluée en mesurant le TI qui est exprimé par le temps nécessaire pour une chute de 10% de la pression d'oxygène dans les conditions suivantes: T = 140 °C, P = 700 kPa.



**Figure 19.** Photo d'un appareil Rapidoxy (Anton Paar)

Le tableau 9 présente un récapitulatif des suivis de l'oxydation réalisée avec les diverses méthodes utilisées sur les huiles de trois espèces de *Quercus* durant le travail.

**Tableau 9.** Récapitulation des études d'oxydation réalisées sur les huiles de *Quercus*

<b>Paramètres suivis</b>	<b>Méthode de suivi de l'oxydation</b>
Teneur en acides gras libres	Indice d'acide par colorimétrie (méthodes officielles AOCS, 1996)
Taux de peroxydes	Indice mesuré par iodométrie (méthodes officielles AOCS, 1996)
Teneur en diènes conjugués	Mesure par spectrophotométrie UV (méthodes officielles AOCS, 1996)
Profil en acides gras	Dosage par chromatographie en phase gazeuse après méthylation des triglycérides (AOCS, 1993)
Composés volatils	Mesure par chromatographie en phase gazeuse de l'espace de tête HS/SPME -GC/MS
Taux de composés polaires	Chromatographie d'exclusion à haute performance « HPSEC » (AOAC, 2003)
Taux de dégradation des composés antioxydants : Polyphénols et tocophérols	Mesure par spectrophotométrie et chromatographie liquide à haute performance
Evaluation de stabilité à l'oxydation par mesure du temps d'induction (IT)	Test d'oxydation accéléré « Rapidoxy »

#### **4. Etude de l'activité antioxydante des huiles de *Quercus***

Plusieurs études ont été menées sur le fruit de *Quercus* dans le monde (Özcan, 2007 ; Charef *et al.*, 2008 ; Al-Rousan *et al.*, 2013), mais seules quelques-unes d'entre elles ont eu pour objectif d'étudier l'activité antioxydante de l'huile de gland (Tejerina *et al.*, 2011; Iguedl *et al.*, 2015), et aucune étude n'a été réalisée sur la caractérisation physicochimique et technologique de l'huile de gland provenant d'Algérie. Les études effectuées ont montré que le gland et son huile sont des aliments nutritifs et fonctionnels. De plus, aucune étude n'a été réalisée pour étudier le profil phénolique des huiles de *Quercus*. Dans ce cadre, le but de la présente partie est de quantifier et identifier les constituants antioxydants (polyphénols, tocophérols et caroténoïdes) des huiles de trois espèces de *Quercus* déjà citées. En outre, évaluer *in vitro* l'activité antioxydante de ces huiles. Les travaux présentés dans ce chapitre ont été menés au sein de laboratoire « D.I.S.S.P.A », Département des Sciences du Sol, des Plantes et de l'Alimentation, Université de Bari, Italie.

##### **4.1. Analyse des composés phénoliques**

L'analyse des composés phénoliques des huiles présente un grand intérêt étant donné, d'une part, leur rôle d'antioxydants naturels, et d'autre part, leur contribution à la saveur des huiles végétales (Cert *et al.*, 2000).

Une détermination globale, par spectrophotomètre, a été effectuée avec le réactif Folin-Ciocalteu et une autre plus détaillée par HPLC. Ces analyses permettent de caractériser quantitativement et qualitativement les composés phénoliques des huiles de *Quercus* (Figure 27).

##### **4.1.1. Extraction des composés phénoliques**

L'extraction des polyphénols a été réalisée selon la méthode décrite par Squeo *et al.* (2016 ; 2017). Une prise d'essai de 1 g d'huile a été dissoute dans 1 ml d'hexane et 5 ml de méthanol/eau (70:30, v/v). Le mélange a été vortexé pendant 10 min et centrifugé à 6000 tr/min pendant 10 min à 4 °C (centrifugeuse SL 16R, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). La phase méthanolique a été récupérée, centrifugée à nouveau à 9000 tr/min pendant 5 min à 4 °C et finalement filtrée à travers des filtres en nylon à pores de 0,45 µm (VWR International, Center Valley, PA, USA). Les extraits ont été analysés à la fois pour déterminer les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Pour l'analyse par HPLC, le procédé d'extraction des composés phénoliques a été le même, mais avec l'ajout préalable de 250 µl d'une solution d'acide gallique (100 mg l<sup>-1</sup> dans un mélange méthanol/eau (70:30, v/v)) comme étalon interne pour la quantification.

#### **4.1.2. Quantification des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux extraits des huiles de *Quercus* a été effectué par la méthode de Singleton et Rossi (1965) et modifiée par Squeo *et al.* (2016 ; 2017).

Un volume de 100 µl de chaque extrait a été mélangé avec 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Au bout de 4 minutes, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium à 5 % (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ont été ajoutés au mélange et chauffés dans un bain-marie à 40 °C pendant 20 min. Après refroidissement pendant 15 minutes, l'absorbance a été mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Agilent Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis).

Une courbe d'étalonnage ( $R^2 = 0,9979$ ) a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard (Annexe 1) et la teneur en composés phénoliques totaux a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique par Kg d'huile (mg GAE/kg d'huile).

#### **4.1.3. Quantification des flavonoïdes**

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée par une méthode colorimétrique (Cosmai *et al.*, 2013). 500 µl de chaque extrait ont été mélangés à 2 ml d'eau distillée et 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5%. Après 6 minutes, 150 µl d'une solution à 10 % de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) ont été ajoutés et laissés au repos pendant 6 autres minutes; puis, une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (2 ml, 1 M) a été ajoutée au mélange. Ensuite, l'eau distillée a été ajoutée pour porter le volume final à 5 ml et le mélange a été complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. Après une incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 510 nm.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalents de catéchine par kg d'huile (mg CE/Kg d'huile) au moyen d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions ( $R^2 = 0,999$ ) en utilisant la catéchine comme standard (Annexe 2).

#### **4.1.4. Analyse des composés phénoliques par HPLC/DAD**

La présence des composés phénoliques dans les huiles végétales est généralement mise en évidence par des méthodes chromatographiques telle que la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Ces méthodes sont les plus performantes et les plus utilisées pour la séparation et l'analyse des composés phénoliques (Naczki et Shahidi, 2004 ; Stalikas, 2007 ; Khoddami *et al.*, 2013). Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'éluion et des composés phénoliques concernés et sont effectuées, en général, sur une phase inverse (Naczki et Shahidi, 2004 ; Macheix *et al.*, 2005). L'échantillon injecté sera séparé grâce à un mécanisme de partition entre la phase stationnaire et la phase mobile et l'éluion sera basée sur la différence de polarité entre les différents composés du mélange. Les composés élués sont généralement repérés en sortie de colonne par leur absorption en ultraviolet (280, 325 ou 360 nm) ; ils apparaissent alors sous forme de pics sur les chromatogrammes. La surface de chacun des pics est proportionnelle à la concentration du composé qui est alors déterminé à la longueur d'onde choisie, par référence à des composés témoins obtenus commercialement ou à partir d'analyses antérieures (Macheix *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques sont communément détectés, en sortie de la colonne, en utilisant des détecteurs UV-visible, UV à barrette de diode (DAD) et de fluorescence UV. Les spectromètres de masse (MS) couplés à la HPLC sont couramment utilisés pour la caractérisation structurale des composés phénoliques (Schoefs, 2004 ; Ignat *et al.*, 2011).

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé deux types de couplage pour l'analyse des polyphénols des huiles de *Quercus* : HPLC/DAD et HPLC/MS.

L'association de la HPLC avec un détecteur à barrettes diode (Diode Array Detector, DAD) permet une analyse qualitative d'un mélange par l'enregistrement des spectres UV des constituants individualisés, d'une part et permet une analyse quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique rapportée sur une courbe d'étalonnage externe, d'autre part. Cette analyse permet d'obtenir simultanément des réponses pour toutes les longueurs d'onde du spectre, ce qui conduit à une première étape de caractérisation de chacun des composés séparés en comparant leurs spectres d'absorption avec celui de témoins.

L'analyse HPLC/DAD des extraits phénoliques des huiles de *Quercus* a été réalisée selon Baiano *et al.* (2009), à l'aide d'un système de chromatographie (Agilent, modèle G1311A, Santa Clara, Californie, USA) équipé d'un injecteur Rheodyne 7725, une boucle d'échantillon de 20 µl, un détecteur à barrette de diodes (Agilent, modèle G1315Bm) et un intégrateur ChemStation (Agilent) pour l'acquisition de données.

La phase stationnaire est une colonne analytique Nova-Pack C18 (150 x 3,9 mm de diamètre) avec une taille de particules de 4 µm (Waters, Milford, Massachusetts, États-Unis). Les phases mobiles pour l'analyse chromatographique sont : A : eau/acide acétique (98:2, v/v) et B : méthanol/acétonitrile (1:1, v/v) à un débit constant de 1 ml/min. Le programme de gradient du solvant est présenté dans le tableau 10.

**Tableau 5.** Conditions du gradient de solvant utilisé pour l'analyse HPLC

<b>Temps (min)</b>	<b>Solvant A (%)</b> (Eau/acide acétique)	<b>Solvant B (%)</b> (méthanol/acétonitrile)
0 à 30	100	0
30 à 45	70	30
45 à 55	50	50
55 à 65	40	60
65 à 75	0	100

La quantification des composés phénoliques a été réalisée à 280 et 320 nm selon la méthode de l'étalon interne (acide gallique) et sur la base des facteurs de réponse. Les facteurs de réponse ont été déterminés en tenant compte des pourcentages de récupération des composés phénoliques et de l'étalon interne. Le contenu phénolique total (CPT) a été considéré comme la somme des composés phénoliques simples quantifiés et les résultats ont été exprimés en mg GAE kg<sup>-1</sup> d'huile.

Bien que les résultats des séparations des composés phénoliques présents dans les échantillons analysés par HPLC/DAD soient satisfaisants, il s'avère un peu difficile de confirmer des identifications pour ces composés. Mais en combinant les deux techniques HPLC/DAD et LC/MS et en se référant à la littérature, on peut aboutir à des résultats d'analyse très performants.

#### **4.1.5. Analyse des composés phénoliques par LC/MS**

En l'absence de données et d'étalons de références, l'identification des composés phénoliques des huiles étudiées ne peut se faire sans avoir recours aux techniques spectrométriques telles que la

spectrométrie de masse (MS). Les techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse (LC/MS) constituent actuellement l'outil le plus efficace et la meilleure approche analytique pour étudier les polyphénols dans des échantillons végétaux.

Le principe de la MS consiste à ioniser des composés chimiques pour générer des molécules chargées ou des fragments de molécules, à apporter des informations sur leur masse moléculaire et la caractérisation des principaux groupements chimiques présents et à mesurer leur rapport masse sur charge (Sparkman, 2000 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Ignat *et al.*, 2011). Les principales sources d'ionisation utilisées pour analyser les composés phénoliques sont: le bombardement par atomes rapides (FAB), l'ionisation par électrospray (ESI), l'ionisation à la pression atmosphérique (API), y compris l'ionisation chimique à la pression atmosphérique (APCI) et la photo-ionisation à la pression atmosphérique (APPI) (Fulcrand *et al.*, 2008 ; Ignat *et al.*, 2011).

Dans notre travail, la méthode de couplage HPLC-ESI-MS/MS en mode d'ionisation négatif a été appliquée. Sa capacité d'analyser des molécules de poids moléculaire très élevé, est un des plus importants avantages qu'elle présente, en outre, elle peut accepter des débits allant jusqu'à 1 ml/min (Ikonomou *et al.*, 1991; Waridel *et al.*, 2001).

L'analyse par UHPLC-ESI-MS/MS (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, États-Unis) a été réalisée à l'aide d'un système Dionex Ultimate 3000 UHPLC constitué d'une pompe quaternaire (LPG-3400 RS), d'un échantillonneur automatique (TRS WPS-3000), four à colonne (TCC-3000 RS et PDA), couplés par une sonde H-ESI II avec le spectromètre de masse à piège à ions LTQ Velos Pro (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

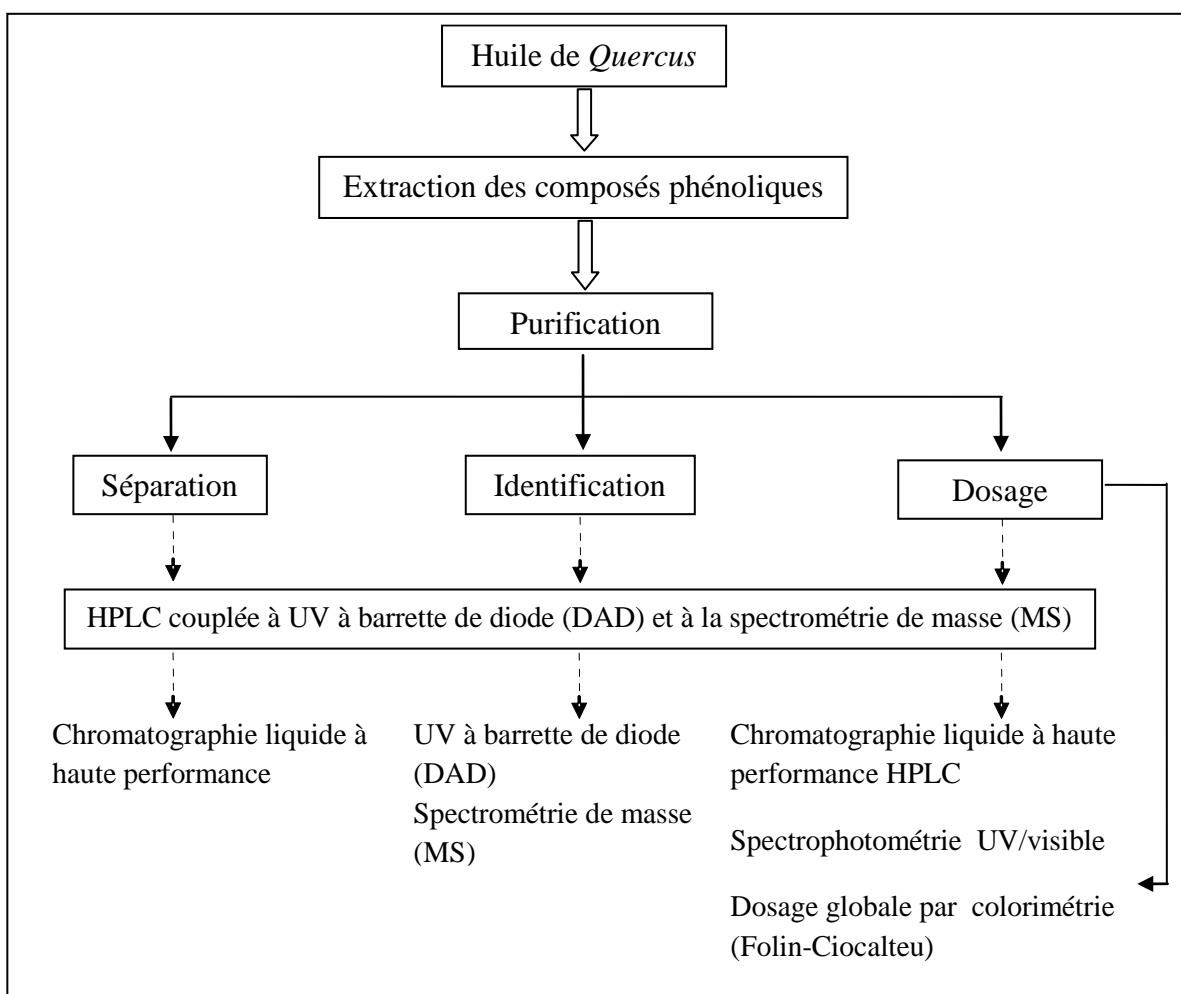
La séparation des composés phénoliques a été réalisée sur une colonne Hipersyl Q C18, de longueur de 100 mm, diamètre interne de 2,1 mm et de taille de particule de 1,9  $\mu\text{m}$ , (Waters, Milford, Massachusetts, États-Unis) maintenue à 30 °C et à un débit constant de 0,2 ml min<sup>-1</sup>. Un gradient binaire a été obtenu en utilisant 0,1 % d'acide formique dans de l'eau (A) et 0,1 % d'acide formique dans de l'acétonitrile (B), de 10 % à 70 % du gradient linéaire de B en 30 minutes.

Les conditions MS sont les suivantes: température capillaire 320 °C; température du dispositif de chauffage à la source 280 °C; gaz utilisé est l'azote à un débit de 7 (unité arbitraire); tension capillaire 2800 V. La source ESI a été utilisée en mode d'ionisation négative. Au cours des analyses, la gamme de masse utilisée est 268 à 950 m/z.



Toutes les données enregistrées d'un rapport m/z de 100 à 1000 u ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Xcalibur v.2 (Thermo Fischer Scientifique).

L'identification des composés phénoliques a été obtenue en combinant les temps de rétention, les ions moléculaires, les spectres de masse (MS<sup>2</sup>) et les données de la littérature (Garcia-Villalba *et al.*, 2017).



**Figure 20.** Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction et l'analyse des composés phénoliques des huiles de *Quercus*

#### 4.2. Analyse des tocophérols

Les tocophérols sont des composés importants dans les huiles végétales en raison de leur contribution à la stabilité oxydative et à la qualité nutritionnelle de l'huile (provitamine E). Ce sont les techniques spectroscopiques et chromatographiques qui permettent d'identifier la fraction

tocophérolique, mais la technique la plus adaptée et la plus recommandée est celle de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Les quatre formes de tocophérols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols) des huiles de *Quercus* étudiées ont été identifiées et quantifiées par la méthode prescrite par Gliszczynska-Swiglio et Sikorska (2004) avec de légères modifications. En bref, 80 mg d'huile ont été dissous dans 1 ml de 2-propanol, vortexés, filtrés à travers des filtres à pores de 0,45 mm puis injectés dans un système RF-UHPLC (Dionex Ultimate 3000 RSLC, Waltham, MA, USA) en phase inverse, équipé d'un détecteur de fluorescence FLD (Dionex 3400RS, Waltham, MA, USA), réglé à la longueur d'onde d'excitation de 295 nm et à l'émission à 325 nm. L'analyse s'effectue selon les conditions opératoires suivantes :

- ✓ Phase stationnaire : colonne analytique Nova-Pack C<sub>18</sub> (150 × 3 mm de diamètre intérieur) ;
- ✓ Phase mobile : acétonitrile/méthanol (1: 1 ,v/v) ;
- ✓ Débit : 1 ml min<sup>-1</sup> ;
- ✓ Volume d'injection : 20  $\mu$ l ;
- ✓ Intégration se fait par le logiciel Chromeleon.

Les différents tocophérols ont été identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux d'étalons, et quantifiés en utilisant des courbes de calibration externes de tocophérol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , et  $\gamma$  standards (Annexe 3). La teneur totale en tocophérol a été calculée en faisant la somme des tocophérols identifiés et quantifiés. Elle est exprimée en mg kg<sup>-1</sup> d'huile.

### **4.3. Etude des pigments**

Outre leur richesse en lipides, les huiles végétales contiennent des composés mineurs qui leur confèrent des qualités organoleptique et nutritionnelle. Parmi ces composés, on trouve les pigments : les chlorophylles et les caroténoïdes.

La détermination de la teneur en pigments chlorophylliens et caroténoïdes dans les huiles de *Quercus* a été effectuée selon les méthodes officielles AOCS (1993).

#### **4.3.1. Détermination de la teneur en chlorophylles**

Les pigments chlorophylliens (principalement la chlorophylle a) sont des indicateurs de la qualité des huiles brutes (Pokorny *et al.*, 1995). En effet, la photo-oxydation des pigments

chlorophylliens entraîne une altération des huiles. Ces pigments excités par des réactions lumineuses, conduisent à la formation de radicaux libres à partir des chaînes grasses insaturées. La chlorophylle se trouve ainsi directement impliquée dans les phénomènes oxydatifs (Ben Tekaya et Hassouna, 2007).

La teneur en pigments chlorophylliens des huiles de *Quercus* a été évaluée en mesurant l'absorbance de chaque échantillon d'huile à 630, 670 et 710 nm. Les mesures de l'absorbance ont été effectuées dans une cuve de 1 cm d'épaisseur à l'aide d'un spectrophotomètre Agilent Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis).

Les teneurs en chlorophylles, exprimées en mg de phéophytine a par kg d'huile, sont données par la formule suivante :

$$\text{Chlorophylle} = 345,3 \times \frac{A_{670} - (0,5 \times A_{630}) - (0,5 \times A_{710})}{L}$$

Où:

A : absorbance à la longueur d'onde respective (nm)

L : épaisseur de la cellule du spectrophotomètre (1cm).

#### **4.3.2. Détermination de la teneur en caroténoïdes**

Les caroténoïdes se présentent sous plusieurs types ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Ils absorbent fortement dans le domaine du visible. Le  $\beta$ -carotène, est généralement le composé le plus abondant et le plus commun dans les corps gras d'origine végétale. Les pigments caroténoïdes présentent des structures voisines et possèdent la propriété d'absorber la lumière entre 400 et 500 nm (Wolf, 1992).

La teneur en caroténoïdes totaux des huiles de *Quercus* a été déterminée en mesurant l'absorbance de 0,25 g d'huile dissoute dans 10 ml d'hexane à 449 nm. L'analyse quantitative a été réalisée par une courbe d'étalonnage de  $\beta$ -carotène ( $R^2 = 0,9987$ ) et la teneur totale en caroténoïde a été exprimée en mg de  $\beta$ -carotène par kg d'huile (Annexe 4).

#### **4.4. Tests de l'activité antioxydante *in vitro***

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Dans cette étude, les huiles de *Quercus* des trois espèces ont fait l'objet d'une évaluation *in vitro* de leur capacité antioxydante à travers deux méthodes choisies: le test du piégeage du radical libre DPPH<sup>+</sup> et le test de réduction du radical-cation ABTS<sup>o+</sup>.

L'activité antioxydante a été évaluée à la fois pour la fraction phénolique et pour l'huile.

#### **4.4.1. Activité antioxydante de la fraction phénolique**

##### **4.4.1.1. Test DPPH**

Le DPPH (1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil) est un radical de couleur violette intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne) se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH (Ramadan, 2010). Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger les radicaux libres. Plus la réduction de l'absorbance du DPPH est importante plus le pouvoir antioxydant des extraits est élevé.

Les extraits phénoliques des huiles étudiées ont été analysés pour déterminer leur capacité à piéger le radical DPPH<sup>+</sup> selon le protocole décrit par Brand-Williams *et al.* (1995), en suivant les modifications proposées par Difonzo *et al.* (2017). Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants présents dans les extraits à piéger le radical DPPH<sup>+</sup> par rapport à celle de l'antioxydant standard le Trolox (Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique).

La réaction a été réalisée directement dans la cuve de mesure : 50 µl de chaque échantillon ont été ajoutés à 950 µl de solution de DPPH (0,08 mM dans de l'éthanol). Après 30 minutes dans l'obscurité, la diminution de l'absorbance a été lue à 517 nm.

Les résultats ont été exprimés en en µmol équivalents de Trolox g<sup>-1</sup> d'huile (µmol TE/g d'huile) au moyen d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions (R<sup>2</sup> = 0,998) en utilisant le Trolox comme standard (Annexe 5).

##### **4.4.1.2. Test ABTS**

L'activité antioxydante des extraits phénoliques a été évaluée sur la base de l'activité de piégeage du radical ABTS<sup>+</sup> (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) par rapport à un antioxydant de référence le Trolox, comme décrit dans Difonzo *et al.* (2017).

Le radical ABTS<sup>+</sup> a été généré par réaction chimique avec du persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). À cette fin, 440 ml de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140 mM) ont été ajoutés à 25 ml d'ABTS (7mM dans H<sub>2</sub>O) et laissés dans l'obscurité à la température ambiante pendant 12 à 16 heures (temps nécessaire à la formation du radical). La solution de travail a été préparée en prenant un volume de la solution précédente et en le diluant dans de l'éthanol jusqu'à ce que son absorbance à 734 nm soit de 0,70 ± 0,02 (Zulueta *et al.*, 2009).

Dans les cuves pour spectrophotométrie, 50 µl de chaque extrait ont été ajoutés à 950 µl de solution ABTS<sup>+</sup> finale. Après 8 minutes, la diminution de l'absorbance a été mesurée à 734 nm. La courbe d'étalonnage du Trolox (Annexe 6) a été utilisée ( $R^2 = 0,999$ ) et les résultats ont été exprimés en µmol d'équivalent Trolox g<sup>-1</sup> d'huile (µmol TE/g d'huile).

#### **4.4.2. Activité antioxydante de l'huile**

L'activité antioxydante de l'huile a été déterminée au moyen du test de capacité de piégeage des radicaux stables du DPPH, selon la même méthode décrite précédemment avec une légère modification. En bref, 50 µl d'huile ont été dissous dans 500 µl d'isooctane, le mélange a été agité par tourbillonnement pendant 1 min et un volume de 50 µl a été mélangé à 950 µl d'une solution d'isooctane de DPPH (0,08 mM).

La diminution de l'absorbance à 515 nm a été mesurée dans des cuves en quartz de 1 cm après 30 minutes et les résultats ont été exprimés en µmol TE g<sup>-1</sup> d'huile (Annexe 5).

### **5. Analyse statistique**

Toutes les analyses ont été effectuées en triple et les résultats ont été rapportés sous la forme de moyenne ± écart-type.

L'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail afin de déterminer s'il existe de différence significative (au seuil choisi  $p < 0,05$ ) entre les valeurs des différents échantillons.

Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA à deux facteurs) a été réalisée afin d'établir une étude comparative entre les différents échantillons et déterminer l'influence du stockage sur la stabilité à l'oxydation de l'huile de *Quercus*.

Dans un but de mettre en évidence les différentes corrélations existant entre les différents paramètres entre eux, nous avons effectué une analyse de corrélations.

Ces études ont été effectuées grâce au logiciel statistique « XLSTAT » (Addinsoft SARL, New York, NY, USA, 2009).

### Chapitre III : Résultats et discussion

Ce chapitre regroupe les résultats de l'extraction de l'huile à partir des fruits de gland, les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimiques des huiles extraites. Il montre aussi les résultats relatifs à leur pouvoir antioxydant ainsi que leur stabilité oxydative.

#### 1. Rendement en huile

Nous rappelons que l'extraction des huiles à partir des fruits de *Quercus* a été effectuée par l'hexane à l'aide du Soxhlet. Pour chacune des espèces étudiées, différents temps d'extraction ont été testés et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11.

**Tableau 6.** Rendement moyen d'extraction des huiles de *Quercus*

Rendement moyen (%)	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
<b>Temps d'extraction :</b>			
<b>2h</b>	6,45 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,77 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,89 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>4h</b>	7,02 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,79 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,39 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>6h</b>	7,05 ± 0,2 <sup>b</sup>	7,83 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,40 ± 0,6 <sup>a</sup>

Les différentes lettres en exposant indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$

Le rendement moyen final en huile brute dans les fruits de *Quercus* varie de 7,05 % pour *Q. ilex* à 8,4% pour *Q. coccifera* avec une valeur intermédiaire de 7,83% pour *Q. suber*. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par León-Camacho *et al.* (2004) et Charef *et al.* (2008) qui ont rapporté des teneurs en huile comprises entre 6 et 9 %.

Le rendement en huile n'évolue pas ou peu entre 2 et 6 heures d'extraction, ce résultat permet de considérer que la totalité de l'huile est extraite pratiquement au bout de 4 heures, temps d'extraction qui a été retenu pour la suite de l'étude.

La moyenne des rendements obtenus pour les trois espèces étudiées ( $7,76 \pm 0,67$  %) indique que les espèces de *Quercus* peuvent être classées parmi les espèces végétales moins riches en matière grasse et elles ne peuvent pas être considérées comme oléagineuses (30-45% d'huile) (Karlenskind, 1992).

Cependant, elles pourraient être considérées comme similaires à d'autres sources d'huile végétale, notamment le cas de l'amarante (6,34% de matière grasse) et du germe de blé (8-14%) (León Camacho *et al.*, 2001 ; Al-Rousan *et al.*, 2013).

L'aspect qualitatif des huiles obtenues, tenant compte de la couleur, de l'odeur et de l'aspect (à 20 °C pendant 24 heures) est récapitulé dans le tableau 12.

**Tableau 7.** Aspect qualitatif des huiles extraites de *Quercus*

Espèces	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
<b>Couleur</b>	Jaune claire	Jaune claire	Jaune orangé
<b>Odeur</b>	Très agréable	Très agréable	Très agréable
<b>Aspect</b>	Limpide	Limpide	Limpide

## 2. Propriétés physico-chimiques des huiles de *Quercus*

Les caractéristiques physicochimiques des huiles extraites des espèces étudiées sont présentées dans le tableau 13.

L'absence de normes référentielles et la rareté d'études sur l'huile de *Quercus*, sont à l'origine de notre option pour les normes de l'huile d'olive (Codex Stant, 1981) et ce, vu les similitudes existant entre ces huiles brutes (ne subissent pas un raffinage).

**Tableau 8.** Caractéristiques physiques et chimiques des huiles de *Quercus*

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>	Huile d'olive
IR	1,453 ± 0,001 <sup>a</sup>	1,453 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,449 ± 0,001 <sup>b</sup>	1,467-1,470
K <sub>232</sub>	1,55 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,63 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,40 ± 0,02 <sup>a</sup>	≤ 3.5
K <sub>270</sub>	0,49 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>b</sup>	≤ 0.9
Δk	0,17 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	≤ 0,15
IA (g/100g)	0,97 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,07 <sup>a</sup>	≤ 2
IP (meq O <sub>2</sub> /kg)	1,50 ± 1,00 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,5 <sup>a</sup>	≤ 15
II (g I <sub>2</sub> /g)	103,68 ± 6,48 <sup>b</sup>	125,28 ± 7,4 <sup>a</sup>	129,6 ± 3,00 <sup>a</sup>	75-94
IS (mg KOH/g)	200,2 ± 1,98 <sup>b</sup>	191,57 ± 3,96 <sup>c</sup>	212,81 ± 3,98 <sup>a</sup>	184-196
TI (g/kg)	16,13 ± 0,55 <sup>c</sup>	19,50 ± 0,2 <sup>a</sup>	17,77 ± 0,4 <sup>b</sup>	≤ 15

IR: indice de réfraction, K<sub>232</sub>: extinction spécifique à 232 nm, K<sub>270</sub>: extinction spécifique à 270 nm ; IA : indice d'acide ; IP: indice de peroxyde, II: indice d'iode, IS : indice de saponification ; TI : teneur en insaponifiable.

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

### **2.1. Indice de réfraction**

A la lecture du tableau 13, les indices de réfraction (IR) des huiles de gland mesurés présentent de grandes similitudes (IR compris entre 1,449 et 1,453), malgré l'existence d'une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre l'huile de *Q. ilex* et les huiles de *Q. suber* et *Q. coccifera*. Ils sont d'ailleurs tout à fait comparables à ceux d'autres huiles végétales telle que l'huile de palmiste qui présente un IR compris entre 1,448 et 1,452 (Hamilton et Rossell, 1986; Codex Stant, 1999).

### **2.2. Extinction spécifique dans l'UV**

L'extinction spécifique des huiles dans l'ultraviolet constitue un paramètre important de leur qualité. En effet, elle permet d'évaluer la présence de produits primaires d'oxydation des acides gras (hydroperoxydes linoléiques, ...) à 232 nm, et les produits secondaires d'oxydation des acides gras (alcools, cétones, ...) à 270 nm (Tchiégang *et al.*, 2005 ; Tanouti *et al.*, 2010). Ce paramètre est fondamentalement affecté par des facteurs endommageant les fruits tels que l'attaque par les mouches, le matériel de la récolte, le transport et le stockage des fruits (Kiritsakis, 2002).

Les valeurs moyennes de l'extinction spécifique dans l'ultraviolet  $K_{232}$  et  $K_{270}$  obtenues pour les huiles de trois espèces de *Quercus* sont données dans le tableau 13. D'après ces résultats, les valeurs de l'extinction spécifique à 232 nm et à 270 nm n'ont pas excédé les limites supérieures établies pour l'huile d'olive. On peut donc suggérer que les huiles étudiées sont dans un état non oxydé sachant qu'elles proviennent des fruits sains, récoltés à la main et fraîchement extraites en respectant les bonnes pratiques.

### **2.3. Indice d'acide**

L'indice d'acide (ou acidité) est un critère de qualité qui permet de déterminer la teneur en acides gras libres provenant d'une dégradation hydrolytique, enzymatique ou chimique des chaînes d'acides gras des triglycérides. Il renseigne sur la stabilité de l'huile ainsi que sur la qualité du fruit (Abaza *et al.*, 2002 ; Tanouti *et al.*, 2011).

Les résultats rapportés dans le tableau 13 montrent que les huiles de gland étudiées présentent des valeurs d'acidité significativement faibles et elles sont situées dans l'intervalle des caractéristiques de qualité des huiles végétales qui est au maximum de 10% (Karleskind et Wolff, 1992). Cette acidité relativement faible indique que les huiles étudiées contiennent une quantité



négligeable d'acides gras libres et cela pourrait être attribué au bon état des fruits de glands et aux précautions prises lors de leur transport et leur stockage. Les valeurs d'acidité des trois huiles de *Quercus* ne présentent aucune différence significative ( $p < 0,05$ ). Par contre, les valeurs observées dans cette étude sont inférieures à celles rapportées par Charef *et al.* (2008), qui ont obtenu des valeurs d'acidité de 5,3 et 5,1 % pour les huiles de *Q. ilex* et *Q. suber* respectivement.

#### **2.4. Indice de peroxyde**

L'indice de peroxyde (IP) est un critère de qualité, il permet d'évaluer l'état d'oxydation des huiles et de contrôler les premières étapes d'une détérioration oxydative (Marmesat *et al.*, 2009). Les valeurs de l'IP obtenues des huiles de *Q. ilex*, *Q. suber* et *Q. coccifera* sont respectivement de l'ordre de 1,5, 0,83 et 1,00 meq d'O<sub>2</sub>/Kg d'huile (Tableau 13). L'analyse de la variance n'a révélé aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les trois huiles analysées. Cet indice dont la valeur reste inférieure ou égale à 1,5 meq d'O<sub>2</sub>/kg d'huile traduit une absence d'oxydation, ce qui est confirmée par la faible présence de diènes conjugués (K<sub>232</sub>) et de composés secondaires de l'oxydation (K<sub>270</sub>).

#### **2.5. Indice d'iode**

L'indice d'iode (II) est un critère de pureté qui donne une indication globale de l'insaturation de l'huile (présence d'acides gras insaturés). Il est en rapport direct avec le degré d'oxydation d'une huile : plus une huile est insaturée plus son indice d'iode est plus élevé (Wolf, 1992).

L'examen de l'II des huiles étudiées (Tableau 13) a permis de montrer qu'elles ont des valeurs comprises entre 103,68 et 129,6 g I<sub>2</sub>/g. Ces valeurs relativement élevées peuvent être une indication de la présence de nombreuses doubles liaisons et par conséquent ces huiles peuvent contenir plus d'acides gras insaturés. Statistiquement, des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été observées entre *Q. ilex* et les deux autres espèces. Cependant, aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) n'a été observée entre *Q. suber* et *Q. coccifera*. En effet, l'II de l'huile de *Q. ilex* est plus faible comparativement à ceux de *Q. suber* et *Q. coccifera*.

Les valeurs de l'II des huiles étudiées sont plus élevées que celle de l'huile d'olive. De même, elles sont plus élevées que celles signalées par Al-Rousan *et al.* (2013) qui ont obtenu des valeurs comprises entre 75,2 et 87,6 g I<sub>2</sub>/g des huiles de *Quercus* originaires de la Jordanie.

## 2.6. Indice de saponification

L'indice de saponification (IS) est un indicateur du poids moléculaire moyen et, par conséquent, de la longueur de la chaîne des acides constituant ce corps gras. Il est inversement proportionnel au poids moléculaire, est d'autant plus élevé que la chaîne carbonée des acides gras est courte (Gohari *et al.*, 2010).

D'après les résultats du tableau 13, l'IS varie significativement ( $p < 0,05$ ) entre les trois huiles examinées. La valeur la plus élevée a été enregistrée par *Q. coccifera* (232,81 mg KOH/g d'huile). Les valeurs de l'IS des trois espèces sont légèrement supérieures à celle de l'huile d'olive (184-196), et en parfait accord avec celle obtenue par Al-Rousan *et al.* (2013). Sachant que l'IS est inversement proportionnel au poids moléculaire, les résultats obtenus indiquent que l'huile de *Quercus* contient des acides gras avec moins d'atomes de carbone par rapport à ceux de l'huile d'olive.

## 2.7. Teneur en insaponifiable

Les matières insaponifiables contenues dans les huiles végétales constituent une variété de substances bioactives non glycéridiques contenant un mélange variable d'hydrocarbures, d'aldéhydes, d'alcools, de stérols, de pigments et de vitamines liposolubles (Gohari *et al.*, 2010).

Les teneurs en matières insaponifiables déterminées pour les huiles de gland sont relativement élevées par comparaison à celle de l'huile d'olive (teneur maximale 15 g/kg) et à celles révélées dans les huiles végétales alimentaires (Codex Stant, 1999). Statistiquement, de légères différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été observées entre les trois huiles analysées.

L'étude des caractéristiques physicochimiques des huiles étudiées révèle une similitude entre l'huile de gland et l'huile d'olive dans la plupart des spécifications et elles sont en harmonies avec d'autres huiles végétales alimentaires reportées dans la littérature.

### 3. Composition chimique des huiles de *Quercus*

#### 3.1. En acides gras

La composition en acides gras des huiles et des graisses peut être un indicateur de leurs stabilités, de leurs propriétés physiques et de leurs valeurs nutritionnelles. Le tableau 14, tiré du profil chromatographique des esters méthyliques d'acides gras (Annexe 7), donne un aperçu de la composition en acides gras individuels et de leurs proportions dans les trois espèces de *Quercus* étudiées.

**Tableau 9.** Composition en acides gras des huiles des espèces de *Quercus* analysées

Acides gras	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>	Huile d'olive
C14:0	0,083 ± 0,003	0,078 ± 0,00	0,071 ± 0,00	≤ 0,1
C16:0	<b>12,13 ± 0,01</b>	<b>12,22 ± 0,02</b>	<b>12,50 ± 0,12</b>	7,5-20,0
C16:1	0,095 ± 0,00	0,088 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,3-3,5
C17:0	0,11 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	-
C17:1	0,068 ± 0,01	0,078 ± 0,00	0,073 ± 0,00	-
C18:0	2,79 ± 0,02	2,74 ± 0,04	2,58 ± 0,02	0,5-5,0
C18:1n9c	<b>69,31 ± 0,06</b>	<b>67,89 ± 0,08</b>	<b>69,08 ± 0,76</b>	55,0-83,0
C18:2n6c	<b>15,01 ± 0,05</b>	<b>15,81 ± 0,12</b>	<b>15,71 ± 0,18</b>	3,5-21,0
C18:3n6	0,69 ± 0,01	0,68 ± 0,00	0,83 ± 0,02	≤ 0,9
C20:0	0,38 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,39 ± 0,01	≤ 0,6
C20:1	0,73 ± 0,03	0,73 ± 0,03	0,80 ± 0,02	≤ 0,4
C22:0	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,19 ± 0,00	≤ 0,2
C22:2	0,069 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,081 ± 0,01	0,0-0,2
ΣAGS	15,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	15,72 ± 0,08 <sup>a</sup>	15,85 ± 0,17 <sup>a</sup>	
ΣAGMI	70,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	68,80 ± 0,13 <sup>c</sup>	70,00 ± 0,80 <sup>b</sup>	
ΣAGPI	15,77 ± 0,06 <sup>b</sup>	16,55 ± 0,13 <sup>a</sup>	16,62 ± 0,25 <sup>a</sup>	
ΣAGI	85,98 ± 0,7 <sup>b</sup>	85,35 ± 0,27 <sup>c</sup>	86,62 ± 1,09 <sup>a</sup>	
ΣAGI/ ΣAGS	5,49	5,43	5,46	

- Non détectable ; C : nombre d'atome de carbone ; AGS : acide gras saturé ; AGMI : acide gras mono- insaturé ; AGPI : acide gras polyinsaturé ; AGI : acide gras insaturé ; ΣAGI / ΣAGS : somme des acides gras insaturés à la somme des acides gras saturés. Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

Comme l'indique le tableau 14, l'huile de *Quercus* semble être une très bonne source d'AGI (acides gras insaturés) avec une teneur de l'ordre de 86 %. L'acide oléique (C18:1)  $\omega$ 9 est l'acide gras insaturé prédominant avec une teneur qui varie entre 67,89 à 69,31%, suivi par l'acide linoléique (C18: 2)  $\omega$ 6. Ce dernier résultat permet de classer l'huile de *Quercus* dans la catégorie des huiles riches en acide oléique. L'acide linoléique (C18: 3)  $\omega$ 3 n'a été révélé qu'en très petite quantité, ne dépassant pas 0,83% dans les trois huiles.

Le somme totale en acides gras saturés : acide myristique (C 14 :0), acide palmitique (C16 :0), acide margarique (C17 :0), acide stéarique (C 18 :0), acide arachidonique (C 20 :0) et acide béhénique (C 22 :0) dans les huiles étudiées est de 15,66-15,85 %. L'acide palmitique a été le principal constituant d'acide gras saturé (environ 12%), suivi par l'acide stéarique (environ 2%). Tandis que les concentrations des autres acides ont été significativement faibles. De mineures variations significatives ( $p < 0,05$ ) des niveaux d'acides gras ont été observées entre les trois espèces étudiées.

Les pourcentages des acides gras obtenus dans la présente étude sont conformes aux résultats des recherches antérieures (Léon-Camacho *et al.*, 2004 ; Al Raoussan *et al.*, 2013), tandis que la teneur en acide oléique obtenue a été plus élevée que celle rapportée dans la littérature. Comme l'indique le tableau 14, la composition en acides gras de l'huile de gland est comparable à celle de l'huile d'olive, en particulier, en ce qui concerne les trois acides gras abondants (acide oléique, acide linoléique et acide palmitique), qui représentent ensemble 95 % des acides gras totaux. La teneur en acide linoléique des échantillons de l'huile de gland est légèrement supérieure à celle de l'huile d'olive.

Par ailleurs, on note la présence dans les huiles analysées de certains acides gras, inhabituellement trouvés dans les huiles végétales, mais en quantité insignifiante à savoir, l'acide margarique (C17 :0) et l'acide heptadécénoïque (C 17 :1). Leur présence en quantité insignifiante dans les huiles de *Quercus* a été déjà rapportée par Léon-Camacho *et al.* (2004) et Al Raoussan *et al.* (2013).

Le rapport AGI/AGS (rapport de la somme des acides gras insaturés à la somme des acides gras saturés) est relativement élevé (5,4) et cette valeur élevée confère à ces huiles une bonne prévention de l'oxydation.

L'analyse des huiles réalisée par la chromatographie en phase gazeuse révèle une prédominance des acides gras insaturés dans ces huiles. Ce constat a été déjà révélé par les méthodes chimiques simples (test de l'indice d'iode : 103,68-129,6), ce qui prouve l'importance de la détermination de ces caractéristiques des huiles dans l'étude préliminaire des matières grasses.

A partir des compositions en acides gras définies précédemment, plusieurs voies de valorisation des huiles de *Quercus* sont possibles :

- Du point de vue technologique, le pourcentage élevé en acide oléique dans l'huile de *Quercus* la rend plus désirable et plus souhaitable en termes de nutrition, en conférant à celle-ci une meilleure tenue et une très grande stabilité à la cuisson et à la friture, car elle s'oxyde moins que les autres huiles riches en acides gras polyinsaturés (soja, arachide, tournesol). Par conséquent, cette huile peut être utilisée comme une alternative aux huiles végétales partiellement hydrogénées.
- Si on considère l'usage alimentaire direct, les acides gras monoinsaturés comme l'acide oléique ont des impacts remarquables comme un élément nutritionnel. De même, plusieurs pathologies peuvent être prévenues ou diminuées par la consommation de quantités suffisantes de graisses insaturées.
- Du point de vue non-alimentaire, plusieurs valorisations peuvent être envisagées (savonnerie, industrie des tensio-actifs, cosmétologie, etc.).

### **3.2.En stérols**

Les stérols présentent un grand intérêt du fait de leur activité antioxydante et de leur impact positif sur la santé (Ramadan et Mörsel, 2002). Le contenu et la composition en stérols fournissent un outil puissant pour l'identification des huiles végétales, pour le contrôle de leur qualité et pour la caractérisation des huiles adultérées (Ramadan et Mörsel, 2002 ; Crane *et al.*, 2005).

Le fractionnement des stérols des huiles de *Quercus* par CPG/FID a donné un ensemble de chromatogrammes (Annexe 8). L'analyse des chromatogrammes des phytostérols obtenus pour les trois huiles a révélé la présence de 9 composés identifiés par comparaison à des chromatogrammes de références analysés dans les mêmes conditions.

La teneur de chaque composé identifié de la fraction stérolique de l'huile de trois espèces de *Quercus* est indiquée dans le tableau 15.

De ces résultats, il ressort que 9 stérols majoritaires se présentent communément dans les trois huiles étudiées, ce qui est évident car les espèces appartiennent à la même famille botanique.

Des teneurs élevées en stérols totaux ont été obtenues, l'huile de *Q. suber* a présenté la teneur la plus significativement élevée soit 2906,51 mg/kg d'huile brute, suivie respectivement de l'huile de *Q. coccifera* avec une teneur de 2767,41 mg/kg et l'huile de *Q. ilex* avec une teneur de 2594,13 mg/kg d'huile brute.

Ce contenu en stérols totaux est considéré comme plus élevé que celui de l'huile d'olive qui se situe entre 1000-1800 mg/kg d'huile.

**Tableau 10.** Répartition (%) et teneur en stérols (mg/kg) des huiles de *Quercus*

Stérols	<i>Q. ilex</i>		<i>Q. suber</i>		<i>Q. coccifera</i>	
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
<b>Cholestérol</b>	3,91±0,05	0,17±0,00	4,47±0,6	0,15±0,02	3,66±0,7	0,13±0,03
<b>Campestérol</b>	52,77±3,6	2,36±0,20	61,69±3,6	2,12±0,12	63,13±3,7	2,20±0,01
<b>Stigmastérol</b>	151,25±4,1	6,76±0,30	140,9±6,4	5,45±0,5	115,11±5,6	4,02±0,02
<b>β-sitostérol</b>	1844,3±14,6	82,44±0,7	2480,2±9,3	85,33±0,66	2543,3±7,3	88,80±0,56
<b>Sitostanol</b>	19,54±1,03	0,87±0,06	22,32±2,2	0,76±0,12	18,43±1,5	0,64±0,02
<b>Δ<sup>5</sup> avénastérol</b>	117,22±3,8	5,24±0,08	158,56±5,2	4,85±0,2	74,61±1,1	2,61±0,18
<b>Δ<sup>5,24</sup> Stigmastadiène</b>	3,63±0,3	0,16±0,01	4,13±0,2	0,14±0,00	11,35±0,5	0,39±0,00
<b>Δ<sup>7</sup> stigmastérol</b>	39,00±3,14	1,74±0,17	11,83±1,7	0,41±0,13	3,773±1,3	0,13±0,04
<b>Δ<sup>7</sup> avénastérol</b>	9,34±0,62	0,42±0,02	22,32±0,21	0,77±0,00	30,08±2,6	1,06±0,39
<b>Stérols totaux</b>	2594,13 <sup>c</sup>	100	2906,51 <sup>a</sup>	100	2767,41 <sup>b</sup>	100

Dans les trois espèces d'huiles étudiées, le β-sitostérol est le stérol prédominant (entre 82,44 % et 88,8 % de l'ensemble des stérols présents). Ce stérol est intéressant pour ses effets nutritionnels et physiologiques potentiellement bénéfiques pour la santé (Jones et Raeini-Sarjaz, 2001). Ce même composé est largement répandu et constitue le principal stérol des huiles végétales. La teneur en β-sitostérol obtenue dans les huiles étudiées est comparable à celle dans l'huile d'olive (85,9%), mais supérieure à celle des huiles végétales conventionnelles (huile d'arachide (62,3%), huile de tournesol (61,9%), huile de soja (48,6%), etc.).

Le stigmastérol est le stérol qui apparaît en deuxième position en termes de quantité avec 4,02-6,76 %. Cette teneur est également voisine de celle de l'huile d'olive (3,19 %). Les stérols majeurs dans l'huile de *Quercus* sont le  $\Delta^5$  avénastérol (2,61-5,24 %) et le campestérol (2,12-2,36 %). Les autres composés stéroliques tels que Cholestérol, Sitostanol,  $\Delta^{5,24}$  Stigmastadiénol,  $\Delta^7$  Stigmastérol et  $\Delta^7$  avénastérol sont présents en très faibles quantités.

Il semblerait que ces résultats soient en accord avec ceux relevés par d'autres auteurs sur des huiles de *Quercus* Espagnoles (Léon-Camacho *et al.*, 2004) et d'autres Jordaniennes (Al Raoussan *et al.*, 2013).

La composition stérolique de l'huile de *Quercus* est particulière, elle diffère de celles de la plupart des huiles conventionnelles comestibles ; par conséquent, elle ne devrait pas être comparée. Cependant, elle présente une similitude remarquable avec la composition stérolique de l'huile d'olive en termes de fractions stéroliques majeures ( $\beta$  sitostérol, stigmastérol, campestérol, avénastérol). En outre, c'est la seule huile, à côté de l'huile d'olive, qui contient un taux particulièrement élevé de  $\beta$ -sitostérol.

### **3.3. En composés volatils**

Les composés volatils, associés aux composés phénoliques, sont responsables des attributs sensoriels des huiles. Ils présentent un grand intérêt car ils ont un impact sur la qualité des huiles et servent à détecter les adultérations (Kalua *et al.*, 2007 ; Guerfel *et al.*, 2012) .

Une simple analyse chimique ne suffit pas pour déterminer la qualité de l'huile de *Quercus*. En effet, les composés volatils qui se développent pendant la process puis pendant le stockage sont capables de modifier l'odeur et la saveur de l'huile (Kalua, 2007; Tanouti *et al.*, 2012).

Bien que les propriétés sensorielles de l'huile d'olive soient bien connues (IOOC, 1996), aucune information n'est disponible sur les caractéristiques sensorielles des huiles de *Quercus*. Pour cela, l'identification des composés responsables des différents attributs sensoriels serait d'un grand intérêt pour le contrôle de la qualité.

Le tableau 16 présente les résultats relatifs aux composés volatils déterminés dans les huiles de *Quercus* par SPME-GC/MS.

Le tableau 16 a été établi à partir des pics des chromatogrammes obtenus par GC/MS (Annexe 9). Au total, 42 composés volatils, appartenant à différentes classes chimiques, ont été détectés dans

l'espace de tête des huiles analysées. Les principales classes de composés volatils identifiées sont : les aldéhydes, les alcools, les esters, les cétones, les acides carboxyliques, les hydrocarbures et les terpènes.

**Tableau 11.** Profils en composés volatils des huiles de *Quercus*

<b>Composés volatils</b>	<b><i>Q. ilex</i></b>	<b><i>Q. suber</i></b>	<b><i>Q. coccifera</i></b>
<b><u>Aldéhydes</u></b>			
Hexanal	n.d.	0,80±0,09	n.d.
Nonanal	0,06±0,01	0,01±0,00	0,04±0,01
Trans-2-hexéanal	0,24±0,01	0,55±0,02	n.d.
Benzaldéhyde	1,05±0,36	1,08±0,18	0,87±0,10
Benzène-acétaldéhyde	0,44±0,16	0,61±0,1	n.d.
Phénylacétaldéhyde	n.d.	n.d.	0,82±0,16
2-furancarbox-aldéhyde,5-méthyl-	0,34±0,17	n.d.	n.d.
<b>Σ Aldéhydes</b>	<b>2,14±0,71<sup>b</sup></b>	<b>3,06±0,4<sup>a</sup></b>	<b>1,74±0,28<sup>c</sup></b>
<b><u>Alcools</u></b>			
Ethanol	1,56±0,02	1,6±0,17	n.d.
Linalol	n.d.	n.d.	1,21±0,2
<b>Σ Alcools</b>	<b>1,57±0,02<sup>b</sup></b>	<b>1,7±0,17<sup>a</sup></b>	<b>1,22±0,2<sup>c</sup></b>
<b><u>Esters</u></b>			
Acétate d'éthyle	1,56±0,08	0,5±0,1	0,41±0,00
Acide acétique, butyl ester	4,09±0,24	4,49±0,55	4,57±0,06
Acétate de 1-méthoxy-2-propyle	4,61±0,17	n.d.	2,32±0,02
Acide hexanoïque, éthyl ester	0,23±0,01	n.d.	n.d.
Acide benzoïque, 2-hydroxy-,éthyl ester	1,05±0,01	n.d.	n.d.
Butanoate d'hexyle	0,19±0,00	n.d.	0,13±0,08
<b>Σ Esters</b>	<b>11,75±0,51<sup>a</sup></b>	<b>5,0±0,65<sup>c</sup></b>	<b>7,43±0,17<sup>b</sup></b>
<b><u>Cétones</u></b>			
2-Pentanone	1,12±0,88	0,47±0,04	0,23±0,01
3-Penten-2-one, (E)-	1,92±0,01	1,62±0,08	1,17±0,04
2-Cyclopentène-1,4-dione	0,27±0,03	n.d.	0,11±0,01
Acétophénone	0,19±0,06	1,23±0,64	n.d.
<b>Σ Cétones</b>	<b>3,51±0,98<sup>a</sup></b>	<b>3,33±0,8<sup>a</sup></b>	<b>1,51±0,06<sup>b</sup></b>



<b><u>Acides carboxyliques</u></b>			
Acide acétique	10,10±1,08	7,49±0,5	6,47±0,3
Acide propionique	0,08±0,01	n.d.	n.d.
<b>Σ Acides carboxyliques</b>	<b>10,18±1,09<sup>a</sup></b>	<b>7,49±0,5<sup>b</sup></b>	<b>6,47±0,3<sup>c</sup></b>
<b><u>Terpène et lactones</u></b>			
Sabinène	7,82±0,4	6,09±0,6	7,65±0,43
3-Carène	1,18±0,12	n.d.	1,83±0,09
β-Pinène	0,32±0,05	n.d.	0,86±0,10
D-Limonène	24,16±3,48	23,15±3,08	26,91±2,9
beta-myrcène	n.d.	1,00±0,34	1,06±0,02
p-Cymene	n.d.	n.d.	0,13±0,01
Camphène	n.d.	n.d.	0,22±0,02
Myrcène	n.d.	n.d.	1,11±0,19
(Z)-Ocimène	n.d.	n.d.	0,34±0,01
α- Ocimène	n.d.	n.d.	0,29±0,05
m- Cymène	n.d.	0,59±0,12	n.d.
O-Cymène	0,20±0,01	0,97±0,06	1,82±0,23
Butyrolactone	1,99±0,02	1,76±0,15	0,59±0,04
delta-hexalactone	4,49±0,03	n.d.	n.d.
<b>Σ Terpène et lactones</b>	<b>40,16±4,12<sup>b</sup></b>	<b>33,6±4,35<sup>a</sup></b>	<b>42,83±4,07<sup>a</sup></b>
<b><u>Hydrocarbures</u></b>			
n-Octan	n.d.	2,18±0,1	n.d.
Octane, 3-éthyle	n.d.	0,52±0,02	n.d.
<b>Σ Hydrocarbures</b>	<b>n.d.</b>	<b>2,61±0,12</b>	<b>n.d.</b>
<b><u>Autres composés</u></b>			
Furfural	3,27±0,07	2,28±0,09	1,53±0,04
Phénol, 2-méthoxy-	2,45±0,06	0,43±0,13	2,24±0,5
Phénol	5,18±0,27	3,34±0,85	2,60±0,45
Benzène, 1-éthyl-2-méthyl-	n.d.	2,53±0,4	0,47±0,01
Benzène, 1,2,3-triméthyl-	n.d.	4,99±1,29	1,95±0,24
n.d : non détectable			
Σ : Somme			

Selon les résultats du tableau 16, les composés terpéniques constituent la classe la plus représentative de composés volatils (représentant environ 33,6 à 40,16 % de l'ensemble des composés volatils), parmi lesquels le D-limonène est le composé le plus abondant dans les trois huiles étudiées avec plus de 23 %. Un autre composé terpénique présent à des concentrations relativement élevées a été détecté : le sabinène (environ 7%).

Parmi les autres classes de composés volatils, nous avons détecté par ordre décroissant : les esters (5-11,75 %), les acides (6,47-10,18 %), les cétones (1,51-4,06 %), les aldéhydes (1,74-3,06 %), les alcools (1,22-1,7%) et d'autres composés volatils mineurs.

Comme le montre le tableau 5, la composition chimique de la fraction volatile des huiles de *Quercus* varie considérablement en fonction de l'espèce. Quantitativement, des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été mises en évidence pour les différentes classes de composés volatils entre les huiles étudiées. Il est à signaler que la plupart des composés ont été détectés dans toutes les huiles de gland, à l'exception de certains composés volatils, présents exclusivement dans certains échantillons, tels que le linalol dans l'huile de *Q. coccifera*, l'acide propionique l'huile de *Q. ilex* et le m-cymène l'huile de *Q. suber*. En effet, ces composés caractéristiques d'espèces peuvent être considérés comme des biomarqueurs de ces espèces.

Les variations mineures du profil des composés volatils observées pourraient être liées à l'effet espèce, les conditions environnementales et la maturité du fruit de gland. L'huile de *Q. coccifera* a été caractérisée par les plus fortes concentrations de terpènes, tandis que l'huile de *Q. ilex* a présentée les teneurs les plus élevées en esters et en acides.

Les aldéhydes et les alcools ont été les composés volatils les moins abondants dans les trois huiles de gland. Il est reconnu que, les aldéhydes, dérivés de l'oxydation de l'acide linoléique, et les alcools, issus du processus de fermentation des fruits, sont responsables des attributs négatifs et génèrent un mauvais goût dans les huiles (Angerosa, 2000 ; Morales *et al.*, 2005 ; Caponio *et al.*, 2015). Le faible pourcentage de ces deux composés volatils indique que les huiles étudiées sont dans un état non oxydé, ce qui est confirmé par les analyses chimiques précédentes (K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub> et IP).

Plusieurs esters ont été détectés et représentent 5 à 11,75% de l'ensemble des substances volatiles. L'acide acétique butyl ester a été significativement l'ester le plus abondant dans les trois

espèces, alors que l'acétate d'éthyle a été présent en faible quantité. En ce qui concerne les cétones, le composé le plus abondant a été le 3-penten-2-one, (E)- suivi du 2-pentanone.

Parmi les acides carboxyliques, l'acide acétique a été détecté avec des différences significatives ( $p < 0,05$ ), entre les trois huiles étudiées, alors que l'acide propionique n'a été présent que dans l'huile de *Q. ilex* et à une concentration très faible. Les acides carboxyliques sont liés à des sensations acides et piquantes et contribuent aux odeurs de transpiration et de rance, ce qui correspond aux attributs négatifs dans les huiles (Kalua *et al.*, 2007). Ainsi, ce résultat indique un bon niveau de qualité des échantillons d'huiles examinés et une faible incidence des phénomènes d'auto-oxydation.

Du fait que ces composés volatils ont été trouvés dans les trois huiles pures et fraîches, il est présumé qu'ils peuvent être considérés comme des biomarqueurs spécifiques des espèces du genre *Quercus*.

Comme il s'agit de la première étude sur la fraction volatile de l'huile de *Quercus*, nous pouvons affirmer que les huiles de *Quercus* se sont avérées contenir des profils en composés volatils spécifiques.

## 4. Activité antioxydante des huiles de *Quercus*

### 4.1. Profils des composés phénoliques

Les teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/kg d'huile) et en flavonoïdes (mg CE/kg d'huile) sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire établies (courbes d'étalonnage, Annexe 1 et 2). Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 17.

**Tableau 12.** Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/kg) et en flavonoïdes (mg CE/kg) des huiles de *Quercus*

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
CPT *	195,64 ± 3,18 <sup>c</sup>	322,06 ± 7,29 <sup>b</sup>	436,86 ± 4,90 <sup>a</sup>
CPT **	180,88 ± 3,44 <sup>c</sup>	319,74 ± 17,47 <sup>b</sup>	376,47 ± 22,83 <sup>a</sup>
FT	131,60 ± 3,50 <sup>a</sup>	122,99 ± 1,65 <sup>b</sup>	105,70 ± 0,86 <sup>c</sup>

CPT \* : Composés phénoliques totaux quantifiés par les méthodes de Folin Ciocalteu ; CPT \*\* : Composés phénoliques totaux quantifiés par HPLC-DAD ; FT: Flavonoïdes totaux. Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

Les huiles des espèces de *Quercus* analysées contiennent une quantité appréciable en composés phénoliques. Ce résultat a été confirmé à la fois par la méthode de Folin-Ciocalteu et par la quantification par HPLC-DAD. Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été constatées entre les trois espèces, avec des valeurs significativement plus élevées pour *Q. coccifera* suivie de *Q. suber* et *Q. ilex*.

Les teneurs en polyphénols totaux évaluées à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu sont supérieures à celles quantifiées par HPLC. Cette différence est due vraisemblablement au fait que le dosage par le Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, où beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).

Les huiles de gland étudiées semblent être caractérisées par des teneurs en CPT plus élevées que celles déjà citées pour les huiles de gland de *Quercus* originaires des autres pays du bassin méditerranéen (Al-Rousan *et al.*, 2013). En outre, les teneurs en CPT de ces huiles sont comparables à celles d'autres huiles végétales de bonne qualité, telle que l'huile d'olive extra vierge. En particulier, les huiles de *Q. coccifera* et de *Q. suber* ont montré des valeurs similaires à celles des huiles d'olive riches en polyphénols qui se caractérisent par un goût amer et piquant

intense (Rotondi *et al.*, 2010). D'autre part, l'huile de *Q. ilex* a présenté une teneur en CPT plus comparable aux huiles d'olives douces, qui sont moins riches en polyphénols.

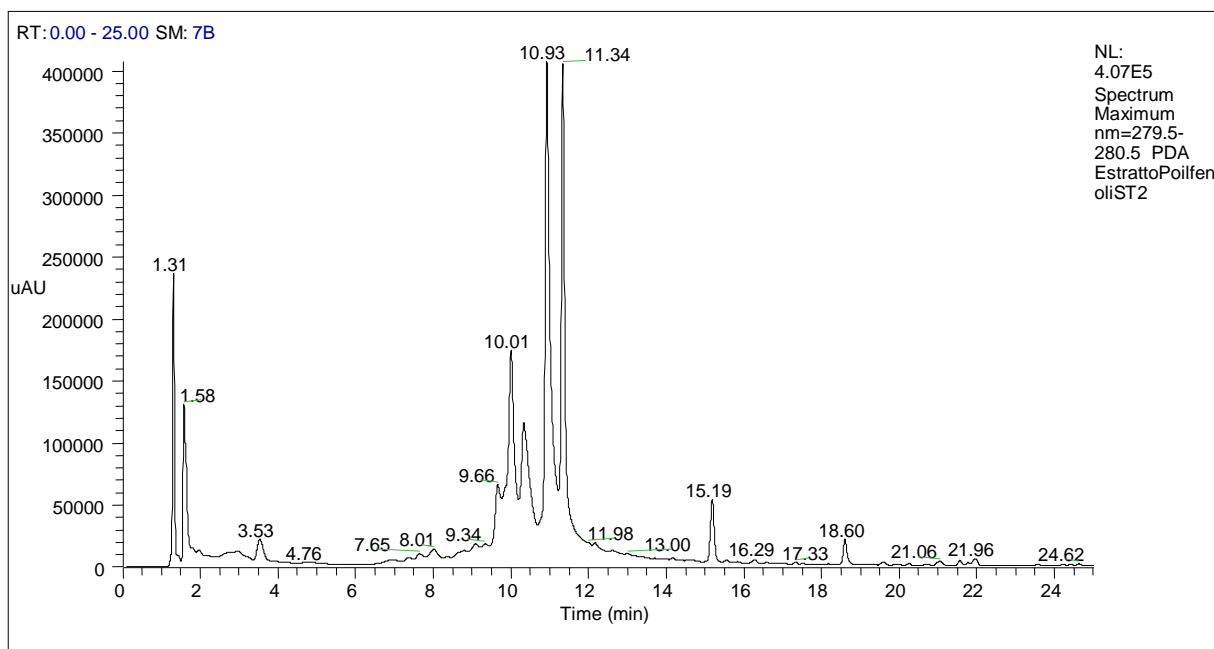
Concernant les flavonoïdes totaux, leur teneur varie entre 105,70 et 131,60 mg CE/kg d'huile. Ces résultats montrent que les trois huiles étudiées sont riches en flavonoïdes. De même, des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été observées entre les trois espèces étudiées. En effet, l'huile de *Q. ilex* a présenté la teneur la plus élevée, suivie de *Q. suber* et de *Q. coccifera* (Tableau 17).

Les huiles de *Quercus* se distinguent des autres huiles végétales par leurs teneurs remarquables en flavonoïdes. Par exemple, dans les huiles d'olive vierges, la teneur en flavonoïdes est généralement faible, allant de quelques mg kg<sup>-1</sup> à environ 50 mg kg<sup>-1</sup> d'huile (Tamborrino *et al.*, 2017; de Torres *et al.*, 2018).

Pour l'identification des composés phénoliques des huiles étudiées, nous rappelons que la chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) équipée d'une source d'ionisation ESI (ionisation par électrospray) a été utilisée. L'acquisition des données spectrales en mode négatif (fournissant les ions [M-H]<sup>-</sup>) nous a permis d'obtenir des spectres MS avec un meilleur rapport m/z. Le tableau 18 regroupe, en fonction du mode d'ionisation choisi, les rapports m/z caractéristiques de leur ion moléculaire [M-H]<sup>-</sup> et de leurs principaux ions fragments.

Les données obtenues ont montré que, mis à part les quantités, les profils phénoliques obtenus pour les trois huiles étudiées ont été assez similaires, en particulier dans le cas des *Q. suber* et *Q. coccifera*, qui ont été presque identiques (Annexe 10).

La Figure 28 montre un exemple de chromatogramme de l'extrait méthanolique de l'huile de *Quercus*, tandis que les résultats de l'identification des composés phénoliques sont présentés dans les tableaux 18 et 19.



**Figure 21.** Chromatogramme LC-PDA-MS à 280 nm des composés phénoliques de l'huile de *Q. coccifera*

Les temps de rétention correspondant aux composés sont énumérés dans le tableau 18.

Vingt (20) composés ont été détectés dans l'extrait méthanolique des huiles de gland analysées par LC-MS/MS, dont douze (12) d'entre eux ont été identifiés par comparaison avec des standards, des données chromatographiques et MS de la littérature (Gracia-Villalba *et al.*, 2017).

Il a été constaté que les composés les plus abondants de l'huile de *Quercus* appartiennent à la classe des dérivés des tanins hydrolysables sous forme d'esters galloyliques de glucose (gallotannins), d'esters d'hexahydroxydiphényle de glucose (ellagitannins) et d'associations d'esters galloyle et d'hexahydroxydiphényle de glucose (HHDP-glucose).

Les principaux esters galloyliques de glucose détectés sont : digalloyl hexose, trigalloyl-glucose et tetragalloyl-pentoside. En effet, la présence de digalloyl hexose (pic 1) est marquée par un ion  $m/z$  483 ( $[M-H]^-$ ) et par des ions fils  $m/z$  313, 423, 331 et 271.

Cinq (5) combinaisons isomères d'esters de galloyle et d'hexa-hydroxy-diphényle de glucose ont été détectées sous la forme de digalloyl- HHDP-glucose qui a donné un ion  $m/z$  785 avec des ions fils  $m/z$  301, 633, 615; et de trigalloyl- HHDP-glucose qui a été identifié à  $m/z$  937.

**Tableau 13.** Identification des composés phénoliques individuels  
des huiles de *Quercus* réalisée par le système UHPLC-ESI-MS / MS

N°	TR	$\lambda$ max	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Composés identifiés	Fragments MS/MS *
1	1,61	270	483	Digalloylhexose	313(100), 423(76), 331(62), 271(26)
2	1,86	270	933	Castalagine	631(100), 915(80), 889(35), 871(30)
3	2,51	270	783	Di-HHDP - hexoside (Pédunculagine)	301(100), 481(45), 765(35), 275(25)
4	2,97	272	785	Digalloyl- HHDP - glucose	301(100), 633(46), 615(25)
5	3,71	272	935	Galloyl-bis HHDP- hexoside (Casuarictine)	633(100), 917(60), 873(30)571(20), 659(20), 301(10)
6	4,76	269	387/785	Digalloyl- HHDP- glucose (785)	387→207(100), 163(35), 369(19); 785→301(100), 483(64), 633(34)
7	7,00	267	635	Trigalloyl- glucose	465(100), 483(30)
8	7,65	277/357	197	NI	-
9	8,01	263/361	787	Tétragalloyl- pentoside	635(100), 617(30)
10	8,37	261	709	NI	633(100), 634(24), 635(12)
11	8,80	274	557	NI	539(100)
12	9,66	278	787/937	Tétragalloyl- pentoside (787), Trigalloyl- HHDP- glucose (937)	787→635(100), 617(30), 465(10); 937→767(100), 301(80), 465(50), 785(40), 741(40), 419(20)
13	10,09	280	787/861	Tétragalloyl- pentoside (787), glucose-trigalloyl- HHDP(937)	787→617(100), 635(15), 465(10), 573(5); 861→785(100), 937(80), 776(40), 765(20), 700(20)
14	10,42	280	861	NI	785(100), 937(80), 776(40), 765(20), 700(20)
15	11,01	280	937	Trigalloyl- glucose - HHDP	769(100), 917(30), 852(30), 861(29), 617(8), 465(8), 301(10)
16	11,41	280	469/939	Pentagalloyl- glucose (939)	469→393(100), 769(70),317(10), 617(10); 939→769(100), 787(10),
17	12,54	220	724	NI	677(100)
18	13,42	220	837	NI	791(100)
19	15,27	280	-	NI	-
20	18,69	282/309	357	NI	342(100), 233(60), 189(40),

TR : Temps de rétention ; [M-H]<sup>-</sup> (m/z) : ion moléculaire ; NI : Non identifié, HHDP : hydroxy-diphényle ; \* : Les numéros entre parenthèses représentent l'abondance relative des ions énumérés dans MS/MS

Le pic 2 indique la présence d'une Castalagine dont les fragmentations sont l'ion m/z 933 ([M-H]<sup>-</sup>) et les ions fils m/z 631, 915, 889 et 871. L'ion m/z 935 ([M-H]<sup>-</sup>) (pic 5) et les ions fils m/z 633, 917, 873, 571, 659 et 301 correspondent au galloyl-bis HHDP-glucose (Casuarictine). Dans certains cas, une co-élution s'est produite, comme dans le cas des pics sortant à 9,66 et 10,09 min, qui présentent des ions moléculaires à m/z 787 et m/z 937 respectivement.

Certains composés n'ont pas été identifiés car ils présentent un schéma de fragmentation qui ne correspond à aucune substance connue dans la littérature. Nous avons supposé que l'ion moléculaire à m/z 197 [M-H]<sup>-</sup> (pic 8) correspond à l'acide syringique. Cependant, il a été impossible de déterminer l'identité de l'acide syringique en raison de la très faible intensité du signal par rapport au bruit.

Les quantités des composés phénoliques (mg GAE/kg d'huile) identifiés et évaluées à partir des profils HPLC sont récapitulées dans le tableau 19.

Comme l'indique ce tableau, les concentrations des principaux composés phénoliques identifiés ont été évaluées à partir des profils HPLC, et la teneur totale en composés phénoliques a été calculée comme la somme des composés phénoliques identifiés. Une grande variabilité a été observée dans la teneur en composés phénoliques des espèces étudiées. L'espèce *Q. coccifera* a présenté la plus grande diversité et la plus grande quantité de tanins hydrolysables par rapport aux autres espèces.

Ces données, bien qu'elles résultent d'une méthode semi-quantitative, pourraient offrir une compréhension plus précise des caractéristiques des huiles de gland et elles confirment la quantité phénolique élevée obtenue par la méthode de Folin-Ciocalteu. D'après les données du même tableau, le composé correspondant au pic 15 révélé à 11,01 min, présente le principal composé de la fraction phénolique des huiles étudiées.



**Tableau 14.** Teneurs moyennes des composés phénoliques (mg GAE/kg d'huile)  
des huiles de *Quercus* identifiés par HPLC

<b>Composés phénoliques</b>	<b><i>Q. ilex</i></b>	<b><i>Q. suber</i></b>	<b><i>Q. coccifera</i></b>
Digalloylhexose	1,73 ± 0,27	1,26 ± 0,20	1,22 ± 0,14
Castalagine	2,01 ± 0,07	1,45 ± 0,12	1,52 ± 0,02
Di-HHDP - hexoside (Pédunculagine)	0,14 ± 0,00	1,22 ± 0,00	1,12 ± 0,06
Digalloyl- HHDP - glucose	0,26 ± 0,01	3,00 ± 0,2	2,36 ± 0,32
Galloyl-bis HHDP- hexoside (Casuarictine)	0,22 ± 0,02	1,93 ± 0,06	2,29 ± 0,24
Digalloyl- HHDP- glucose	-	1,32 ± 0,05	3,88 ± 0,20
Trigalloyl- glucose	1,49 ± 0,02	3,32 ± 0,22	4,87 ± 0,36
NI	-	3,91 ± 0,72	2,79 ± 0,59
Tétragalloyl- pentoside	1,98 ± 0,09	6,06 ± 0,22	6,55 ± 0,61
NI	1,61 ± 0,2	5,27 ± 0,31	6,75 ± 0,10
NI	-	5,15 ± 0,25	6,1 ± 0,16
Tétragalloyl- pentoside, Trigalloyl- HHDP- glucose	-	17,52 ± 0,48	21,26 ± 0,6
Tétragalloyl- pentoside , glucose-trigalloyl- HHDP	20,83 ± 0,11	28,13 ± 1,58	34,82 ± 1,74
NI	13,4 ± 0,47	22,28 ± 0,98	27,27 ± 1,35
Trigalloyl- glucose - HHDP	81,89 ± 10,0	101,47 ± 5,6	129,15 ± 8,1
Pentagalloyl- glucose	10,75 ± 0,24	20,90 ± 0,38	20,22 ± 1,19
NI	1,79 ± 0,01	4,63 ± 0,66	2,31 ± 0,68
NI	24,02 ± 0,28	50,51 ± 2,5	56,05 ± 3,22
NI	2,10 ± 0,04	8,80 ± 0,67	9,06 ± 0,53
NI	2,19 ± 0,03	3,11 ± 0,15	3,42 ± 0,16
<b>Total</b>	<b>180,88 ± 3,44<sup>c</sup></b>	<b>319,74 ± 17,5<sup>b</sup></b>	<b>376,47 ± 22,8<sup>a</sup></b>

- Traces

NI : non identifié

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

Les huiles étudiées ont présenté des teneurs en CPT plus comparables aux huiles d'olives, comme il a été démontré précédemment, cependant, il convient de souligner que les types de composés phénoliques détectés dans les huiles de *Quercus* sont complètement différents de ceux présents dans les huiles d'olives.

Les composés phénoliques présents dans les huiles de *Quercus*, de par leur activité antioxydante, peuvent contribuer au maintien de la qualité de celle-ci.

#### 4.2. Profils des tocophérols

Les tocophérols sont des constituants importants dans la fraction insaponifiable en raison de leurs actions vitaminiques et antioxydantes. Les chromatogrammes des huiles obtenus (Figure 29) et les courbes de calibration externes de tocophérols individuels étalons (Annexe 3), nous ont permis d'aboutir aux résultats mentionnés dans le tableau 20.

**Tableau 15.** Concentrations moyennes des tocophérols (mg/kg d'huile brute) des huiles *Quercus*

<b>Tocophérols</b>	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>	<b>Huile d'olive</b>
$\alpha$ -tocophérol	244,66 ± 6,51	126,94 ± 5,25	138,09 ± 4,64	240
( $\beta + \gamma$ )-tocophérols	403,59 ± 5,87	389,60 ± 4,42	422,02 ± 2,42	Tr
$\delta$ - tocophérol	16,33 ± 0,90	13,66 ± 1,61	19,73 ± 0,33	Tr
Tocophérols totaux	664,58 <sup>a</sup>	530,16 <sup>c</sup>	579,84 <sup>b</sup>	240

Tr : trace

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

L'analyse des huiles de *Quercus* par HPLC a donné des teneurs en tocophérols totaux comprises entre 530,16 et 664,58 mg/kg d'huile brute. Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été révélées entre les teneurs en tocophérols totaux des trois espèces de *Quercus*. Ces valeurs témoignent de la richesse des huiles étudiées en tocophérols totaux par rapport à l'huile d'olive où la teneur en tocophérols totaux ne dépasse pas 240 mg/kg d'huile (Kiritsakis *et al.*, 1998).

L'analyse des tocophérols nous a permis aussi d'identifier et de quantifier quatre isomères :  $\alpha$  - tocophérol, ( $\beta + \gamma$ )-tocophérols et  $\delta$ - tocophérol. Les deux isomères ( $\beta + \gamma$ )-tocophérols sont les formes les plus prédominants dans les trois huiles étudiées avec une teneur comprise entre 389,60 et 422,02 mg/kg d'huile, alors que des petites quantités de  $\delta$ -tocophérol (allant de 2,5 à 3,4%) ont été observées.

A la lumière de ces résultats (Figure 29, Tableau 20), nous remarquons que les huiles de *Q. suber* et *Q. coccifera* ont présenté des profils de tocophérols similaires, ce qui est tout à fait différent de celui de *Q. ilex*. En effet, Les deux isomères ( $\beta + \gamma$ )-tocophérols des huiles de *Q. suber* et *Q.*

*coccifera* représentent plus de 70 % de la teneur totale en tocophérol. En revanche, l'huile de *Q. ilex* a présenté la teneur significativement la plus élevée en  $\alpha$ -tocophérol (> 35 % des tocophérols totaux). L'huile de *Q. ilex* a également montré une teneur significativement plus élevée en tocophérols totaux, alors que l'huile de *Q. suber* a montré la plus faible teneur significative en formes de tocophérols individuels et en teneur des tocophérols totaux.

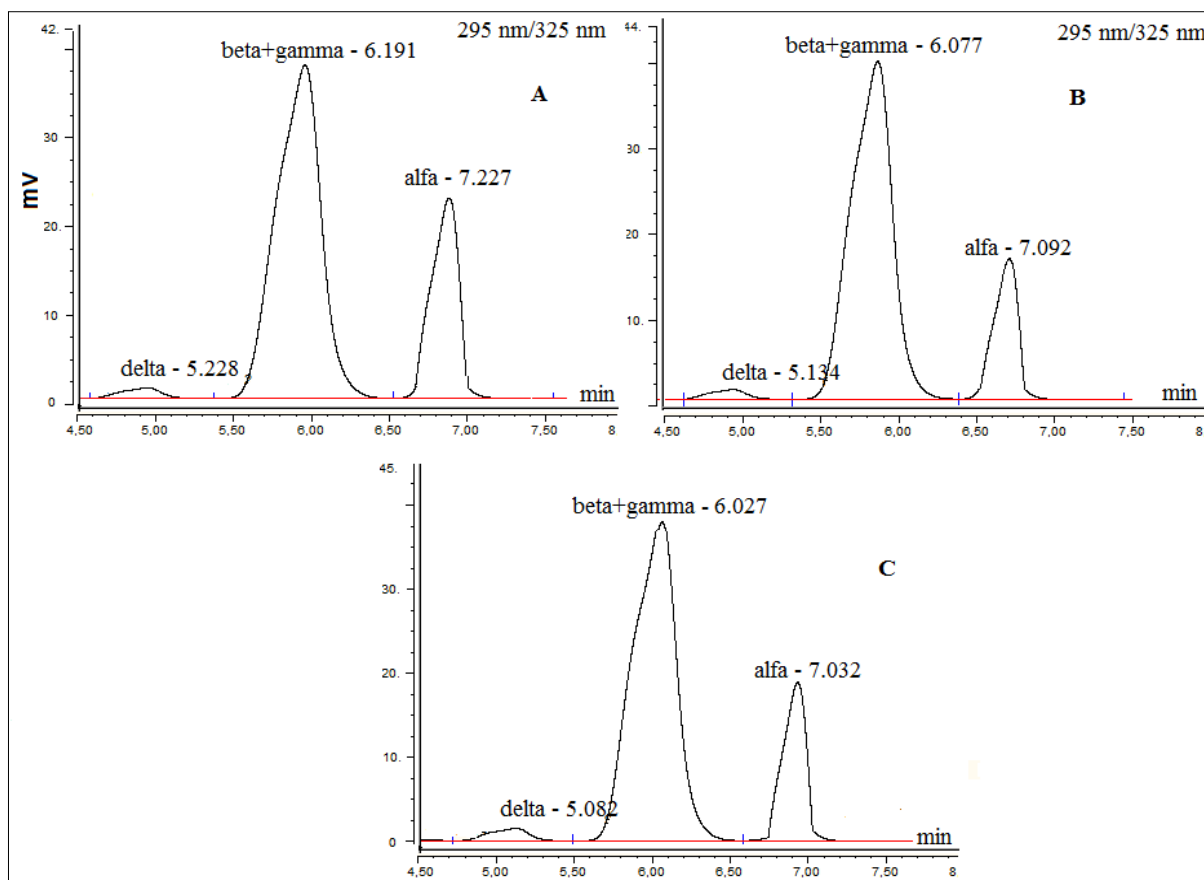
La prédominance des ( $\beta + \gamma$ )-tocophérols par rapport aux autres formes de tocophérols, dans l'huile de *Quercus*, a été rapportée dans la littérature (León-Camacho *et al.*, 2004 ; Al-Rousan *et al.*, 2013). La valeur des ( $\beta + \gamma$ )-tocophérols de nos huiles est un peu plus élevée que celle donnée par León-Camacho *et al.* (2004). A l'inverse, Al-Rousan *et al.* (2013) ont trouvé des valeurs plus élevées.

La valeur d' $\alpha$ -tocophérol des huiles analysées (126,94 - 244,66 mg/kg) est supérieure à celle citée dans la littérature, excepté celle rapportée par Al-Rousan *et al.* (2013) qui a été de l'ordre de 141-230 mg/kg d'huile et donc dans le même intervalle. Enfin, la teneur en  $\delta$ -tocophérol obtenue est supérieure à celle rapportée dans la littérature. La différence entre la teneur en tocophérols de nos huiles et celle donnée par la littérature est due probablement à des facteurs pédoclimatiques, l'espèce et la zone de provenance du fruit.

Comparativement à d'autres huiles végétales alimentaires (Harwood et Quinn, 2000 ; Cuvelier *et al.*, 2003), les huiles des fruits de *Quercus* peuvent être classées parmi les huiles végétales riches en tocophérols. La plupart des huiles végétales contiennent de l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérols. Le  $\delta$ -tocophérol, l'antioxydant le plus efficace que les autres formes des tocophérols, existe en quantité non négligeable dans l'huile de *Quercus* (13,66-19,73 mg/kg d'huile) et seulement dans quelques huiles végétales, comme l'huile de coton, l'huile de germe de blé, l'huile de soja, l'huile de ricin et l'huile d'arachide (Harwood et Quinn, 2000 ; Cuvelier *et al.*, 2003).

L'activité antioxydante de l' $\delta$ -tocophérol et le  $\gamma$ -tocophérol excède celle de l' $\alpha$ -tocophérol, ce qui confère une très grande stabilité oxydative à l'huile de *Quercus* et lui procure une certaine protection durant le stockage et la transformation.

Comme cité précédemment, la teneur en huile dans les fruits du *Quercus* est faible (de l'ordre 8 %) mais la teneur en tocophérols est élevée, donc on peut utiliser ces huiles comme des antioxydants ou à des fins thérapeutiques.



**Figure 22.** Chromatogrammes typiques des tocophérols des huiles étudiées A: *Q. ilex*;  
 B: *Q. suber*; C: *Q. coccifera*

### 4.3. Profils des pigments

Les teneurs moyennes en caroténoïdes (mg de  $\beta$ -carotène /kg d'huile) et en pigments chlorophylliens (mg de phéophytine a /kg d'huile) des échantillons d'huiles obtenues sont rapportées dans le tableau 21.

**Tableau 16.** Teneurs moyennes en caroténoïdes et en pigments chlorophylliens des huiles de *Quercus*

Pigments	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
Caroténoïdes	42,29 ± 1,46 <sup>b</sup>	66,33 ± 0,90 <sup>a</sup>	43,13 ± 0,60 <sup>b</sup>
chlorophylles	1,88 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,02 <sup>c</sup>

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

A la lecture du tableau 21, les huiles étudiées ont présenté de faibles teneurs de chlorophylles totales, alors que les teneurs en caroténoïdes totaux sont nettement élevées. L'huile de *Q. suber* a présenté le contenu le plus significatif des deux pigments.

Globalement, les teneurs insignifiantes des pigments chlorophylliens, ainsi que les teneurs élevées des caroténoïdes, bien connus comme étant des inhibiteurs efficaces de la photo-oxydation, nous ont permis de suggérer que les huiles des espèces de *Quercus* pourraient être assez stables à l'oxydation, en particulier lors d'une exposition à la lumière (Psomiadou et Tsimidou, 2002 ; Choe et Min, 2006).

Par rapport à la littérature consultée, aucune donnée sur les caroténoïdes et les pigments chlorophylliens de l'huile de *Quercus* n'a été rapportée. Cependant, on peut considérer l'huile de *Quercus* comme une huile assez semblable aux autres huiles végétales connues (huiles de tournesol, d'arachide, de soja et de colza) (Karleskind, 1992).

#### 4.4. Activité antioxydante des huiles de *Quercus*

Nous rappelons que l'activité antioxydante des huiles de *Quercus* a été mesurée par deux tests : le test du piégeage du radical libre DPPH<sup>+</sup> et le test de réduction du radical-cation ABTS<sup>o+</sup>. Ces deux méthodes sont couramment utilisées pour analyser les extraits des fruits et des plantes.

Le tableau 22 donne un aperçu de l'activité antioxydante de la fraction phénolique évaluée par les tests DPPH et ABTS, et celle des huiles évaluée par le test DPPH.

**Tableau 17.** Activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET /g d'huile}$ )  
des huiles de *Quercus*

Espèces	Fraction phénolique		Huile
	DPPH	ABTS	DPPH
<i>Q. ilex</i>	1,27 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,56 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	2,92 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
<i>Q. suber</i>	2,69 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	3,23 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	3,88 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
<i>Q. coccifera</i>	3,34 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	3,79 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	4,32 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

Comme le montre le tableau 22, l'analyse de l'activité antioxydante montre une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les trois espèces de *Quercus*.

La capacité de balayage des radicaux DPPH<sup>+</sup> et ABTS<sup>o+</sup> est variable entre les différentes fractions phénoliques des huiles de *Quercus*. Elle est beaucoup plus importante dans la fraction de *Q. coccifera* suivie de la fraction de *Q. suber* par rapport à celle de *Q. ilex* qui a présenté la faible activité. Ce résultat est probablement dû à la richesse de l'espèce *Q. coccifera* en agents antioxydants.

Cantos *et al.* (2003) ont obtenu des résultats similaires en mesurant l'activité antioxydante de la fraction phénolique pour les trois espèces de *Quercus* en utilisant les deux radicaux.

Au vu des valeurs de l'activité antioxydante enregistrées (Tableau 22), nous pouvons déduire que les huiles de *Q. coccifera* détiennent la capacité antioxydante la plus élevée par rapport aux autres huiles. L'activité antioxydante significativement élevée des huiles de *Quercus* est due à l'effet inductif des antioxydants naturels présents dans ces huiles tels que les tocophérols, les composés phénoliques et les caroténoïdes qui réduisent et décolorent les radicaux libres (DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>o+</sup>) en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Turkmen *et al.*, 2007 ; Servili *et al.*, 2009).

Après l'identification des composés phénoliques des huiles de *Quercus* par LC-MS/MS, il s'est avéré que les composés les plus abondants sont des dérivés de tanins hydrolysables. Ces derniers ont déjà montré leur potentiel prometteur en tant qu'antioxydant dans le domaine agroalimentaire (Okamura *et al.*, 1993 ; Gülçin *et al.*, 2010 ; Medini *et al.*, 2014). Cela nous laisse suggérer que non seulement la quantité de polyphénols, mais aussi le type de polyphénols ont contribué dans l'activité de piégeage contre ces radicaux.

Étant donné qu'aucune expérience préalable sur l'activité antioxydante des huiles de *Quercus* n'a été rapportée, la fiabilité des résultats dans la présente étude est difficile à établir.

Des corrélations entre l'activité antioxydante et les différentes variables mesurées ont été recherchées pour explorer d'éventuelles interdépendances. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 23.

**Tableau 18.** Matrice de corrélations linéaires entre les composés antioxydants et la capacité antioxydante

Variables	Coefficient de corrélation r	P
CPT <sup>a</sup> - DPPH*	0,983	**
CPT <sup>a</sup> – ABTS	0,956	**
CPT <sup>b</sup> - DPPH*	0,785	*
CPT <sup>b</sup> – ABTS	0,868	**
Flavonoïdes - DPPH*	0,936	**
Flavonoïdes –ABTS	0,982	**
CPT <sup>a</sup> - DPPH**	0,982	**
CPT <sup>b</sup> - DPPH**	0,822	**
Flavonoïdes - DPPH**	0,962	**
Tocophérols - DPPH**	0,593	*
Caroténoïdes - DPPH**	0,235	*

CPT<sup>a</sup> : Composés phénoliques totaux quantifiés par les méthodes de Folin Ciocalteu ; CPT<sup>b</sup> : Composés phénoliques totaux quantifiés par HPLC-DAD ; DPPH\* : activité antioxydante de la fraction phénolique ; DPPH\*\* : activité antioxydante de l'huile. \* ( $p < 0,05$ ) corrélation significative ; \*\* ( $p < 0,01$ ): corrélation très significative

Une forte corrélation significative ( $p < 0,01$ ) a été observée entre la capacité de piégeage des radicaux libres (DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>o+</sup>) et le contenu phénolique total. De même, de fortes corrélations ( $p < 0,01$ ) ont été également observées entre les teneurs en flavonoïdes et leurs propriétés antioxydantes.

Les huiles de *Quercus* ont à leur tour donné de fortes corrélations entre leurs teneurs en composés phénoliques et en tocophérols et leur pouvoir antioxydant. A l'inverse, un faible coefficient de corrélation ( $r = 0,235$ ) a été enregistré entre l'activité antioxydante et les teneurs en caroténoïdes des huiles étudiées ce qui signifie l'absence de leur interdépendance.

Par ailleurs, une corrélation positive a été constatée entre la capacité antioxydante et la teneur en composés phénoliques. Ce constat signifie que les composés phénoliques sont les principaux contributeurs aux propriétés antioxydantes de ces huiles.

## 5. Stabilité oxydative des huiles de *Quercus*

### 5.1. Indices de qualité

Les huiles de *Quercus* extraites et analysées dans cette étude ont révélé de bonnes qualités initiales (T0), et ceci par rapport aux valeurs de l'acidité, de l'indice de peroxyde et de l'absorbance en UV. Après 180 jours de stockage (T6), chacune des huiles de *Quercus* a été analysée pour ses caractéristiques qualitatives, et l'ensemble des résultats obtenus est reporté dans le tableau 24. La figure 30 montre l'évolution des taux d'acides gras libres, des valeurs de l'indice de peroxyde, de  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  et  $\Delta K$  après 6 mois de stockage des huiles de *Quercus*.

**Tableau 19.** Caractéristiques qualitatives des huiles de *Quercus* après stockage

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
IA <sub>2</sub> (g/100g)	1,30 ± 0,19 <sup>b</sup>	2,87 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,18 <sup>b</sup>
IP (meq O <sub>2</sub> /kg)	1,94 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,38 <sup>a</sup>
K <sub>232</sub>	1,56 ± 0,004 <sup>c</sup>	2,00 ± 0,015 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,004 <sup>a</sup>
K <sub>270</sub>	0,50 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>c</sup>
Δk	0,17 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>

IA : indice d'acide ; IP: indice de peroxyde, K<sub>232</sub>: extinction spécifique à 232 nm, K<sub>270</sub>: extinction spécifique à 270 nm ; Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

#### 5.1.2. Acidité

A la lecture du tableau 24, la valeur minimale de l'IA est enregistrée par l'huile de *Q. ilex*, tandis que la valeur maximale est notée chez l'huile de *Q. Suber*.

Les résultats illustrés dans la figure 30 montrent que, pour les trois espèces de *Quercus*, de légères variations des valeurs de l'IA au cours du stockage ont été enregistrées. L'analyse de variance indique un effet significatif ( $p < 0,05$ ) du stockage sur la qualité des huiles étudiées.

Nous rappelons qu'à T0, l'huile de *Q. suber* a montré la valeur d'acidité la plus élevée (1,13 ± 0,14 g/100g d'huile). A T6, cette huile a donné à nouveau la valeur la plus élevée par rapport aux autres huiles, qui est environ deux fois plus élevée que celle de l'huile fraîche. En effet, l'augmentation des acides gras libres est due vraisemblablement à la dégradation hydrolytique des triglycérides au cours du stockage.



Globalement, cette évolution des acides gras libres dans les huiles de *Quercus*, après stockage, est supérieure à celle d'autres huiles végétales comestibles telles que l'arachide, le maïs, le colza, le son de riz et le pépin de raisin (Maszewska *et al.*, 2018).

### **5.1.2. Indice de peroxyde**

Plusieurs paramètres peuvent décrire l'état oxydatif des huiles. L'un de ces paramètres est l'indice de peroxyde (IP) qui augmente pendant le stockage (Zungur *et al.*, 2014). La valeur initiale (T0) de l'IP des huiles de *Quercus* étudiées est comprise entre 0,83 et 1,50 meq d'O<sub>2</sub>/kg, puis elle augmente pour atteindre 1,46-1,94 meq d'O<sub>2</sub>/kg après 180 jours de stockage (T6) (Tableau 24). L'huile de *Q. ilex* a révélé des valeurs légèrement supérieures de l'IP, mais aucune différence significative n'a été observée ( $p < 0,05$ ) entre les trois huiles de *Quercus*.

D'après la figure 30, des différences significatives entre les huiles fraîches (T0) et les huiles stockées (T6) ont été constatées.

Généralement, un produit avec un indice de peroxyde compris entre 1 et 5 meq O<sub>2</sub>/kg d'huile pourrait être caractérisé par un faible état d'oxydation (Pragasam *et al.*, 2015). Pour la durée de stockage testée (180 jours), les huiles de gland analysées répondent à cette caractéristique.

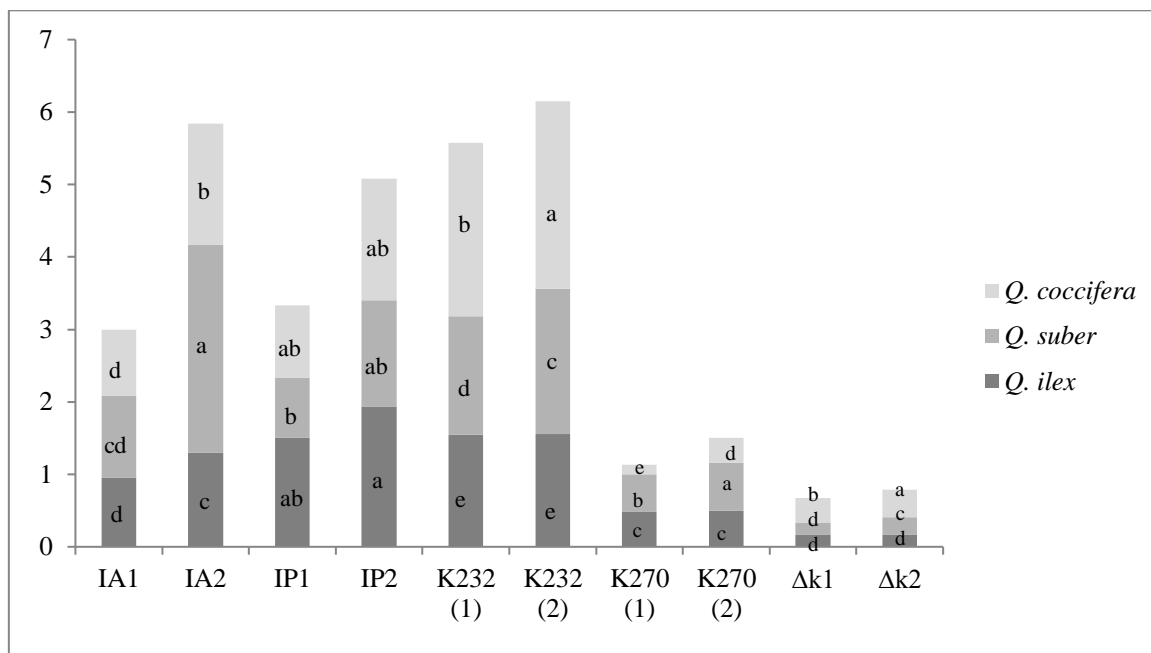
### **5.1.3. Extinction spécifique dans l'UV à 232 et 270 nm**

Similaire à l'IP, nous rappelons que la mesure dans l'UV des diènes conjugués à 232 nm et des triènes conjugués à 270 nm, est une méthode rapide de contrôle de la dégradation oxydative des huiles végétales qui peut également être utilisée pour évaluer la stabilité du produit à l'oxydation (Wanasundara *et al.*, 1995).

A T0, les huiles de *Q. coccifera* et de *Q. ilex* ont présenté respectivement les valeurs les plus élevées et les plus basses de K<sub>232</sub> et K<sub>270</sub>. Après stockage (à T6), ces valeurs sont restées presque constantes pour *Q. ilex*, tandis qu'une légère augmentation a été observée pour *Q. coccifera*. L'huile de *Q. Suber* a commencé par une valeur intermédiaire mais elle a enregistré la plus forte augmentation d'absorption à 232 et à 270 nm par rapport aux autres huiles. De même, l'augmentation relative de  $\Delta K$  a été nettement plus marquée dans *Q. Suber*, suivie de *Q. coccifera* et enfin de *Q. ilex* (Figure 30).

Les résultats obtenus confirment le constat soulevé pour l'IP. Ils mettent en évidence une grande différence dans la stabilité de l'huile de gland. En effet, cela est dû probablement à l'effet espèce

où l'huile de *Q. Suber* s'est montré la plus susceptible à l'oxydation. Nous ajoutons aussi que cette variabilité pourrait être due aux caractéristiques particulières des différentes huiles de gland en termes de composition en acides gras et de composés antioxydants.



**Figure 23.** Evolution des caractéristiques de qualité des huiles étudiées avant (T0) et après stockage (T6)

1 : à T0 ; 2 : à T6 ; Les différentes lettres indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$  déterminée par ANOVA à deux facteurs.

## 5.2. Composition en acides gras

Le suivi de l'évolution de la composition en acides gras dans les huiles pendant le stockage est un moyen efficace pour évaluer leur état d'oxydation (Douzane et Bellal, 2004 ; Marinova *et al.*, 2012).

Le tableau 25 regroupe les résultats de la composition en acides gras des huiles de *Quercus* après stockage, et la figure 31 montre la variation des teneurs totales en acides gras saturés, mono- et polyinsaturés avant et après stockage des huiles de *Quercus*.

Les résultats obtenus ont montré qu'après 180 jours de stockage, de légères modifications de la teneur en acides gras ont été observées dans les trois huiles de *Quercus*. Les teneurs moyennes en acides gras insaturés des huiles de *Q. ilex* et de *Q. coccifera* ont diminué d'environ 4% par rapport à leurs teneurs initiales. Cette diminution a été accompagnée d'une augmentation

d'environ 5% des teneurs en acides gras saturés. L'huile de *Q. Suber* a été caractérisée par la plus faible diminution de la teneur en acides gras insaturés (environ 2%).

**Tableau 20.** Composition en acides gras des huiles de *Quercus* après stockage

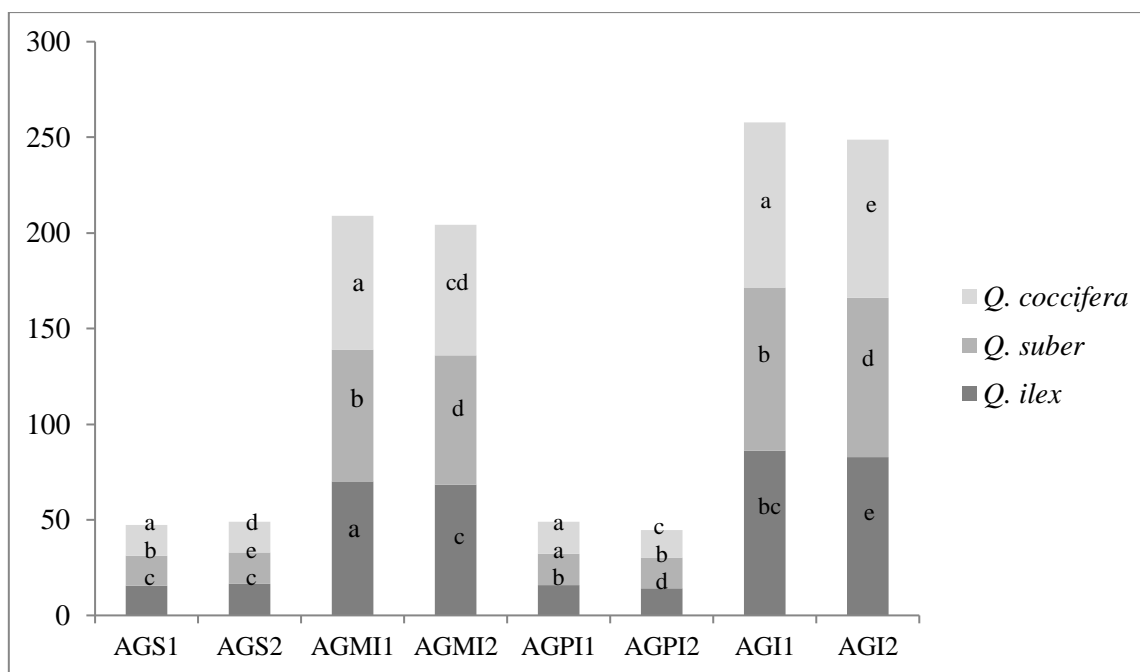
<b>Acides gras</b>	<b><i>Q. ilex</i></b>	<b><i>Q. suber</i></b>	<b><i>Q. coccifera</i></b>
C14:0	0,059±0,00	0,071±0,002	0,073±0,002
C16:0	<b>12,87±0,06</b>	<b>12,80±0,029</b>	<b>12,77±0,04</b>
C16:1	0,046±0,002	0,075±0,007	0,045±0,003
C17:0	0,103±0,001	0,103±0,001	0,092±0,001
C17:1	0,05±0,004	0,071±0,004	0,061±0,013
C18:0	2,92±0,007	2,67±0,01	2,83±0,011
C18:1n9c	<b>67,50±0,001</b>	<b>67,00±0,02</b>	<b>67,30±0,004</b>
C18:2n6c	<b>13,70±0,005</b>	<b>15,07±0,02</b>	<b>13,89±0,005</b>
C18:3n6	0,4±0,006	0,38±0,005	0,39±0,005
C20:0	0,57±0,008	0,65±0,07	0,61±0,05
C20:1	0,68±0,006	0,65±0,07	0,71±0,03
C22:0	0,18±0,004	0,20±0,015	0,18±0,007
C22:2	0,052±0,005	0,065±0,006	0,068±0,003
ΣAGS	16,53±0,08 <sup>a</sup>	16,22±0,05 <sup>c</sup>	16,35±0,04 <sup>b</sup>
ΣAGMI	68,28±0,03 <sup>a</sup>	67,80±0,2 <sup>a</sup>	68,13±0,74 <sup>a</sup>
ΣAGPI	14,33±0,02 <sup>c</sup>	15,78±0,5 <sup>a</sup>	14,57±0,05 <sup>b</sup>
ΣAGI	82,61 ± 0,06 <sup>b</sup>	83,58±0,8 <sup>a</sup>	82,7± 0,81 <sup>b</sup>

AGS : acide gras saturé ; AGMI : acide gras mono- insaturé ; AGPI : acide gras polyinsaturé ; AGI : acide gras insaturé. Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

Il semble que cette légère variation de la composition en acides gras des huiles étudiées est attribuée à leur faible teneur en acide linoléique qui est plus sensible à l'oxydation et à leur forte teneur en acide oléique qui est moins prêt à s'oxyder. En outre, cette faible variation pourrait également être due à la teneur élevée en antioxydants naturels, notamment les composés phénoliques, les tocophérols et les caroténoïdes des huiles de *Quercus* confirmés par des résultats obtenus précédemment (§ 7.4).

Ce constat signifie donc que la stabilité des huiles de *Quercus* étudiées dépend de la composition en acides gras et en composés antioxydants, et que la diminution de la stabilité peut être accélérée

par une augmentation du temps de stockage; responsable des modifications des caractéristiques physicochimiques et organoleptiques des huiles.



**Figure 24.** Variation des teneurs totales en acides gras des huiles de *Quercus* gras avant (T0) et après stockage (T6)

1 : à T0 ; 2 : à T6 ; Les différentes lettres indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$  déterminées par ANOVA à deux facteurs.

### 5.3. Composés volatils

L'analyse des composés volatils a été proposée pour évaluer le taux d'oxydation des huiles. Au cours du stockage des huiles végétales brutes et raffinées, divers composés volatils responsables d'un arôme indésirable sont formés (Cert *et al.*, 2000).

Le tableau 26 présente le profil des composés volatils des huiles de *Quercus* obtenu après 180 jours de stockage.

Le stockage de l'huile de gland pendant 180 jours a provoqué une diminution de la teneur de certains composés, une augmentation d'autres et l'apparition de certains composés volatils dérivés de l'oxydation en faibles quantités. Ces faibles quantités de composés volatils générés au cours du stockage par l'oxydation témoignent du haut niveau de qualité des fruits de départ.

**Tableau 21.** Profils volatils des huiles de *Quercus* après stockage

<b>Composés volatils</b>	<b><i>Q. ilex</i></b>	<b><i>Q. suber</i></b>	<b><i>Q. coccifera</i></b>
<b><u>Aldéhydes</u></b>			
Hexanal	0,25±0,02	1,26±0,1	0,79±0,00
Nonanal	0,24±0,17	0,37±0,02	0,44±0,00
<i>Trans</i> -2-hexéanal	0,25±0,02	0,9±0,57	n.d.
<i>Trans</i> -2-pentenal	0,21±0,09	n.d.	n.d.
<i>Trans</i> -2-Heptenal	0,05±0,00	n.d.	n.d.
Benzaldéhyde	1,60±0,12	1,29±0,23	1,47±0,07
Benzène-acétaldéhyde	1,04±0,26	2,33±0,14	n.d.
Phénylacétaldéhyde	n.d.	n.d.	n.d.
2-furancarbox-aldéhyde,5-méthyl-	1,03±0,15	n.d.	0,26±0,1
<b>Σ Aldéhydes</b>	<b>3,68 ± 0,84<sup>b</sup></b>	<b>6,16 ± 1,07<sup>a</sup></b>	<b>2,97 ± 0,18<sup>c</sup></b>
<b><u>Alcools</u></b>			
Ethanol	2,96±0,39	2,59±0,71	0,16±0,02
Pentanol	0,35±0,04	0,57±0,09	n.d.
Alcool furfurylique	0,42±0,18	n.d.	0,11±0,01
2-Heptanol	n.d.	0,53±0,48	n.d.
2-Octanol	0,98±0,48	0,34±0,3	n.d.
alfa-Terpineol	n.d.	n.d.	0,29±0,06
Linalol	n.d.	n.d.	3,43±0,86
<b>Σ Alcools</b>	<b>4,72±1,09<sup>a</sup></b>	<b>4,03±1,58<sup>b</sup></b>	<b>3,99±0,95<sup>c</sup></b>
<b><u>Esters</u></b>			
Acétate d'éthyle	1,17±0,00	n.d.	0,30±0,04
Acide acétique, butyl ester	4,07±0,2	4,23±0,12	4,44±0,1
Acétate de 1-méthoxy-2-propyle	4,33±0,01	n.d.	1,63±0,02
Acide hexanoïque, éthyl ester	0,21±0,00	n.d.	n.d.
Acide benzoïque, 2-hydroxy-,éthyl ester	n.d.	n.d.	n.d.
Butanoate d'hexyle	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Σ Esters</b>	<b>9,78±0,22<sup>a</sup></b>	<b>4,24±0,12<sup>c</sup></b>	<b>6,37±0,15<sup>b</sup></b>
<b><u>Cétones</u></b>			
2-Pentanone	1,75±0,00	0,77±0,01	0,93±0,02
3-Penten-2-one, (E)-	2,12±0,02	2,03±0,00	1,55±0,09
2-Cyclopentène-1,4-dione	n.d.	n.d.	n.d.

Acétophénone	0,75±0,01	1,91±0,64	n.d.
Acétylacétone	n.d.	1,23±0,01	n.d.
<b>Σ Cétones</b>	<b>4,62±0,03<sup>b</sup></b>	<b>5,47±0,65<sup>a</sup></b>	<b>2,05±0,09<sup>c</sup></b>
<b><u>Acides carboxyliques</u></b>			
Acide acétique	14,52±2,26	11,17±0,8	7,33±0,40
Acide propionique	0,38±0,09	n.d.	n.d.
<b>Σ Acides carboxyliques</b>	<b>14,9±2,35<sup>a</sup></b>	<b>11,17±0,8<sup>b</sup></b>	<b>7,33±0,40<sup>c</sup></b>
<b><u>Terpène et lactones</u></b>			
Sabinène	6,68±0,4	5,21±0,5	6,7±0,24
3-Carène	0,16±0,00	n.d.	0,53±0,14
β-Pinène	n.d.	n.d.	n.d.
D-Limonène	23,82±1,4	22,65±1,25	23,15±1,62
beta-myrcène	n.d.	0,86±0,07	0,76±0,08
p-Cymene	n.d.	n.d.	n.d.
Camphène	n.d.	n.d.	n.d.
Myrcène	n.d.	n.d.	n.d.
(Z)-Ocimène	n.d.	n.d.	n.d.
α- Ocimène	n.d.	n.d.	n.d.
m- Cymène	n.d.	n.d.	n.d.
O-Cymène	n.d.	n.d.	0,77±0,00
Butyrolactone	0,29±0,00	1,06±0,05	0,25±0,00
delta-hexalactone	4,12±0,12	n.d.	n.d.
<b>Σ Terpène et lactones</b>	<b>35,08±1,93<sup>a</sup></b>	<b>29,78±1,87<sup>c</sup></b>	<b>32,14±2,09<sup>b</sup></b>
<b><u>Hydrocarbures</u></b>			
n-Octan	n.d.	1,66±0,71	n.d.
Octane, 3-éthyle	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Σ Hydrocarbures</b>	<b>n.d.</b>	<b>1,66±0,71<sup>b</sup></b>	<b>n.d.</b>
<b><u>Autres composés</u></b>			
Furfural	2,76±0,12	2,01±0,65	1,1±0,05
Furfural	2,07±0,06	n.d.	2,14±0,22
Phénol, 2-méthoxy-	4,46±0,24	2,18±0,29	2,04±0,24
Phénol	n.d.	2,42±0,1	n.d.
Benzène, 1-éthyl-2-méthyl-	n.d.	4,47±1,22	1,57±0,03
Benzène, 1,2,3-triméthyl-	<b>9,29±0,42<sup>b</sup></b>	<b>11,08±2,2<sup>a</sup></b>	<b>6,86±0,54<sup>c</sup></b>

n.d : non détectable  
Σ : Somme

---

Comme l'indique le tableau 26, les niveaux d'aldéhydes, d'alcools, de cétones et d'acides dans les échantillons d'huile ont significativement augmenté après 180 jours de stockage. Les quantités relatives de ces composés, qui dérivent de la lipoxygénase, dépendent de l'activité et du niveau de chaque enzyme impliquée dans cette réaction biochimique. Par exemple, le *trans*-2-hexenal provient de l'oxydation de l'acide linoléique opéré par la lipoxygénase, tandis que l'hexanal provient de l'oxydation de l'acide linoléique (Baiano *et al.*, 2016). Ces composés sont responsables du goût d'amande et amère des huiles. L'huile de *Q. suber* a montré l'évolution la plus significative des composés d'oxydation par rapport aux autres espèces.

L'augmentation de la teneur de ces composés a été accompagnée par l'augmentation du rapport hexanal/nonanal, indice approprié pour détecter le début de l'oxydation de l'huile et suivre son évolution (Caponio *et al.*, 2016).

Tous les esters, terpènes et hydrocarbures détectés ont sensiblement diminué après stockage, ce qui témoigne d'une augmentation du niveau d'oxydation, confirmée par le comportement des aldéhydes et des alcools. Les composés terpéniques, qui représentent environ 40% des composés volatils, ont montré une diminution significative pendant le stockage. Cela est principalement dû à l'évolution du D-limonène et du sabinène, qui ont diminué de manière significative pendant le stockage.

#### **5.4. Composés polaires**

Pour le contrôle de la qualité des huiles stockées, la détermination de la fraction polaire totale est une méthode standard approuvée (Cert *et al.*, 2000 ; Marinova *et al.*, 2012). Cette analyse a permis de séparer et de quantifier les différentes classes de substances d'oxydation et d'hydrolyse des triglycérides, à savoir les oligopolymères de triglycérides (PTG), les triglycérides oxydés (ox-TG), les diglycérides (DG) et d'autres constituants polaires qui constituent des paramètres fiables pour l'évaluation du niveau de dégradation des lipides (Cert *et al.*, 2000 ; Caponio *et al.*, 2005).

Les différentes classes de la fraction polaires des huiles de *Quercus*, obtenues immédiatement après extraction et après stockage par HPSEC, sont représentées dans le tableau 27.

**Tableau 22.** Pourcentage des composés polaires des huiles de *Quercus* fraîches et stockées

Paramètres	PTG	ox-TG	DG	TPC (%)
<b>T0</b>				
<i>Q. ilex</i>	Traces	0,35 ± 0,00	1,08 ± 0,04	1,45 ± 0,04 <sup>d</sup>
<i>Q. suber</i>	Traces	0,40 ± 0,014	1,73 ± 0,05	2,14 ± 0,06 <sup>b</sup>
<i>Q. coccifera</i>	Traces	0,36 ± 0,00	0,86 ± 0,03	1,23 ± 0,01 <sup>e</sup>
<b>T6</b>				
<i>Q. ilex</i>	Traces	0,5 ± 0,015	1,44 ± 0,06	2,00 ± 0,08 <sup>c</sup>
<i>Q. suber</i>	Traces	0,41 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,42 ± 0,00 <sup>a</sup>
<i>Q. coccifera</i>	Traces	0,40 ± 0,03	0,96 ± 0,08	1,37 ± 0,12 <sup>d</sup>

T0 : huiles analysées après extraction ; T6 : huiles analysées après 6 mois de stockage; TPC : composés polaires totaux ; PTG : oligopolymères de triglycérides ; ox-TG : triglycérides oxydés ; DG : diglycérides. Les différentes lettres en exposant indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$  déterminée par ANOVA à deux facteurs.

Comme le montre le tableau 27, à T0, les teneurs totales en composés polaires (TPC) des trois huiles examinées ont été faibles, avec de légères différences significatives entre les trois espèces (Annexe 11). Les ox-TG peuvent donner des indications sur les niveaux d'oxydation primaire, alors que les PTG soulignent une nature d'oxydation secondaire. La présence de ces composés avec des teneurs très faibles indique que les huiles de *Quercus* fraîches sont dans un état non oxydé.

Cependant, après 180 jours de stockage, une légère augmentation des composés polaires totaux (TPC) a été observée pour les huiles de *Q. coccifera* et *Q. Suber*. Ils augmentent respectivement de 11% et 13%, tandis que les huiles de *Q. ilex*, passant de 1,45 à 2,00%, ont présenté une augmentation plus significative (environ 38%) du niveau de TPC par rapport aux autres huiles. L'augmentation de la teneur de TPC dans les huiles de *Quercus* a été principalement due à l'accumulation de diglycérides et de triglycérides oxydés, résultant d'une altération hydrolytique et oxydante au cours du stockage. Ces substances ont considérablement augmenté dans les trois huiles.

Dans tous les cas, les résultats obtenus restent inférieurs à la limite (14 %) (Afssa, 2007), ce qui montre un faible niveau d'oxydation dans toutes les huiles analysées.



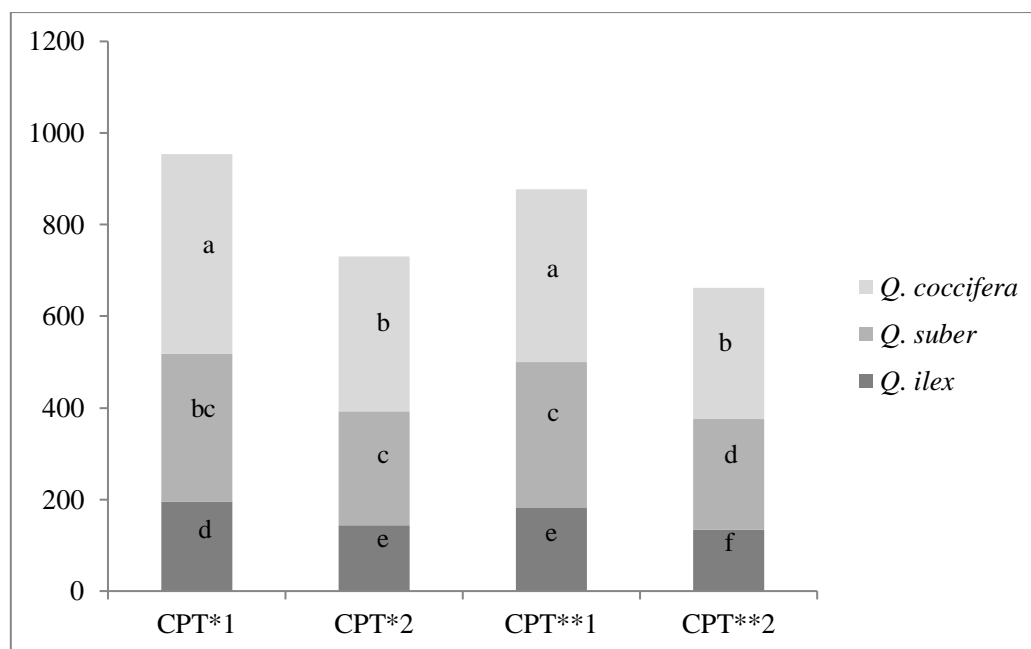
## 5.5. Composés antioxydants

L'analyse des composés phénoliques et des tocophérols est un facteur important pour évaluer la qualité des huiles alimentaires. En effet, plusieurs auteurs notamment Cinquanta *et al.* (1997) et Esti *et al.* (1998) ont rapporté que les teneurs de ces composés naturels sont corrélées avec la durée de conservation, de par leurs activités antioxydantes.

De même, Zungur *et al.* (2014) ajoutent que le suivie de la variation des composés phénoliques et/ou des tocophérols au fil du temps pourraient constituer un paramètre de contrôle de qualité important des huiles alimentaires.

### 5.5.1. Composés phénoliques

Le tableau 28 présente les teneurs moyennes en composés phénoliques totaux ainsi que le profil phénolique des huiles de *Quercus* après stockage. La figure 32 montre l'évolution de ces paramètres avant et après stockage.



**Figure 25.** Evolution des composés phénoliques totaux pendant le stockage

CPT\* : Composés phénoliques totaux quantifiés par les méthodes de Folin Ciocalteu ; CPT\*\* : Composés phénoliques totaux quantifiés par HPLC-DAD ; 1 : à T0 ; 2 : à T6 ; Les différentes lettres indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$  déterminées par ANOVA à deux facteurs.

Les huiles des espèces de *Quercus* analysées immédiatement après extraction (T0) ont montré des teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) significativement élevées comme il a été montré

précédemment (Tableau 17). Cette teneur a été diminuée significativement pendant le stockage par rapport à la valeur initiale (Figure 32).

La diminution de la concentration phénolique la plus remarquable a été détectée pour l'huile de *Q. ilex* (environ 27%), tandis que les huiles de *Q. Suber* et *Q. coccifera* ont présenté une diminution relativement moins significative (environ 23%). La réduction de la teneur totale en polyphénols dans les huiles après 180 jours de stockage résulte, selon Cinquanta *et al.* (1997), des réactions d'oxydation et d'hydrolyse, qui augmentent pendant le stockage.

**Tableau 23.** Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/kg) et profils phénoliques des huiles de *Quercus* après stockage

<b>Paramètres</b>	<b><i>Q. ilex</i></b>	<b><i>Q. suber</i></b>	<b><i>Q. coccifera</i></b>
CPT*	143,47±3,72 <sup>c</sup>	249,45±5,70 <sup>b</sup>	337,48±5,32 <sup>a</sup>
CPT**	133,46±4,06 <sup>c</sup>	241,85±4,22 <sup>b</sup>	286,37±4,11 <sup>a</sup>
<b><u>Profils phénolique</u></b>			
Digalloylhexose	1,48±0,05	n.d.	1,17±0,06
Castalagine	1,9±0,002	0,67±0,13	1,47±0,02
Di-HHDP - hexoside (Pédunculagine)	n.d.	n.d.	1,09±0,09
Digalloyl- HHDP - glucose	0,25±0,00	1,69±0,17	1,67±0,03
Galloyl-bis HHDP- hexoside (Casuarictine)	0,21±0,002	1,35±0,32	2,04±0,02
Digalloyl- HHDP- glucose	n.d.	0,88±0,07	2,46±0,16
Trigalloyl- glucose	1,31±0,5	2,57±0,50	3,78±0,29
Tétragalloyl- pentoside	1,78±0,16	4,69±0,16	5,70±1,24
Tétragalloyl- pentoside, Trigalloyl- HHDP- glucose	n.d.	14,16±0,77	18,16±1,56
Tétragalloyl- pentoside , glucose- trigalloyl- HHDP	17,85±1,4	22,93±1,18	31,81±2,02
Trigalloyl- glucose - HHDP	63,38±4,9	81,28±2,98	113,52±2,8
Pentagalloyl- glucose	7,21±0,4	15,30±1,28	18,23±1,07
NI	36,99±1,78	96,21±2,23	85,09±2,14

CPT\* : Composés phénoliques totaux quantifiés par les méthodes de Folin Ciocalteu ; CPT\*\* : Composés phénoliques totaux quantifiés par HPLC-DAD ; NI : Non identifié ; n.d : non détectable. Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

En ce qui concerne le profil phénolique, à T0, les composés les plus représentatifs dans les trois huiles étudiées ont été le trigalloyl-HHDPD-glucose, suivis du tétragalloyl-pentoside et du pentagalloyl-glucose, alors que les autres composés ont été détectés en très faibles quantités.

Après stockage (T6), une forte diminution de ces composés a été enregistrée. Cette diminution significative pourrait être due à l'effet protecteur des composés phénoliques montrant leur potentiel en tant qu'antioxydant naturel. De tels résultats pourraient expliquer la stabilité des paramètres de qualité de l'huile obtenus précédemment (Tableau 24).

En effet, le contenu phénolique des huiles peut être influencé par plusieurs paramètres tels que la méthode d'extraction de l'huile (Perez-Jimenez et Saura-Calixto, 2006), la température et la période de stockage (Zungur *et al.*, 2014), ainsi que la matrice d'huile (Tripoli *et al.*, 2005).

### 5.5.2. Tocophérols

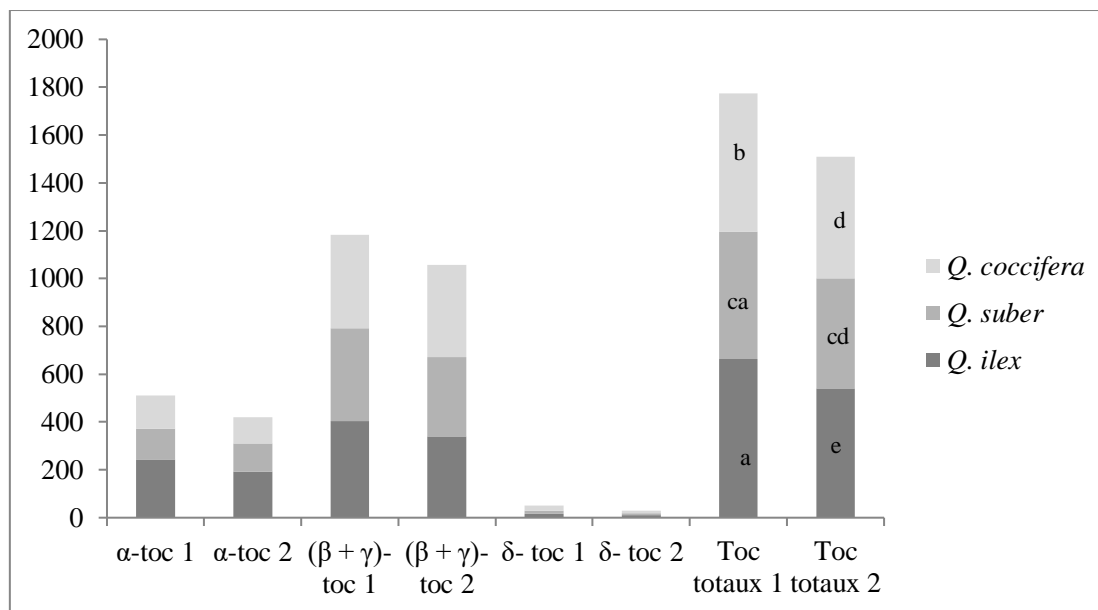
Les tocophérols des huiles étudiées ont été quantifiés et identifiés après 180 jours de stockage par HPLC et les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 29. La figure 33 montre la variation de ces composés avant et après stockage.

**Tableau 24.** Concentrations moyennes des tocophérols (mg/kg d'huile brute)  
des huiles de *Quercus* après stockage

<b>Tocophérols</b>	<b><i>Q. ilex</i></b>	<b><i>Q. suber</i></b>	<b><i>Q. coccifera</i></b>
$\alpha$ -tocophérol	191,42 $\pm$ 3,09	119,03 $\pm$ 0,64	110,38 $\pm$ 0,64
( $\beta$ + $\gamma$ )-tocophérols	339,89 $\pm$ 6,04	331,82 $\pm$ 2,18	385,88 $\pm$ 2,19
$\delta$ - tocophérol	9,86 $\pm$ 0,07	8,86 $\pm$ 0,3	11,37 $\pm$ 0,73
Tocophérols totaux	541,18 <sup>a</sup>	459,88 <sup>c</sup>	507,64 <sup>b</sup>

La teneur initiale des tocophérols totaux des huiles de *Quercus* étudiées est comprise entre 530,16 et 664,58 mg/kg d'huile, puis cette valeur diminue pour atteindre 459,88 -541,18 mg/kg d'huile après stockage (Tableau 29). Ces résultats ont montré qu'après 180 jours de stockage, d'importantes modifications de la teneur en tocophérols ont été observées dans les trois huiles de *Quercus* et des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été observées entre les huiles fraîches et stockées (Figure 33).

Sur le plan quantitatif, la diminution la plus importante des tocophérols a été enregistrée par les huiles de *Q. ilex* (environ 19%), qui ont montré des teneurs plus significatives à T0 et à T6. Qualitativement, les trois types de tocophérols ont été affectés par le stockage, mais leur distribution relative reste pratiquement inchangée:  $(\beta + \gamma)$ -tocophérols >  $\alpha$ -tocophérol >  $\delta$ -tocophérol.



**Figure 26.** Variation des tocophérols avant et après stockage

1 : à T0 ; 2 : à T6 ; Les différentes lettres indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$  déterminée par ANOVA à deux facteurs.

### 5.5.3. Taux de dégradation des polyphénols et des tocophérols

La durée de conservation des huiles est liée essentiellement au pourcentage des antioxydants naturels dégradés (taux de polyphénols et/ou tocophérols dégradés). Après 180 jours de stockage, une réduction significative des teneurs moyennes en polyphénols et en tocophérols a été enregistrée et le pourcentage de cette réduction est donné dans le tableau 30.

**Tableau 25.** Taux (%) des polyphénols et des tocophérols dégradés pendant le stockage

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
Polyphénols totaux dégradés*	26,66	22,54	22,74
Polyphénols totaux dégradés**	26,21	24,36	23,93
Tocophérols dégradés	18,56	13,25	12,45

\* : Taux dégradé des composés phénoliques totaux quantifiés par les méthodes de Folin Ciocalteu ; \*\* : Taux dégradé des composés phénoliques totaux quantifiés par HPLC-DAD

Les résultats obtenus indiquent que jusqu'au 6 mois de stockage, les huiles de *Quercus* présentent une stabilité significative correspondant à un taux relativement faible de polyphénols et des tocophérols dégradés. Cela signifie que ces huiles sont susceptibles d'être conservées pendant une longue période dans les mêmes conditions expérimentales.

Comparativement à la diminution obtenue des composés phénoliques, la diminution des tocophérols dans les trois huiles a été moins importante (Tableaux 28,29, et 30).

La tendance différente observée pour les substances à activité antioxydante peut être attribuée à leurs mécanismes d'action spécifiques. Les composés phénoliques agissent en donnant un électron pour pouvoir interrompre la réaction radicalaire de l'oxydation (Cuppett *et al.*, 1997 ; Caponio *et al.*, 2005). Tandis que les tocophérols agissent à la fois comme donneurs d'électrons, ralentissant la réaction oxydative, et comme accepteurs d'électrons, déterminant le piégeage de l'oxygène singulet, pour inhiber la photooxydation des lipides (Morelló *et al.*, 2004 ; Caponio *et al.*, 2005).

Néanmoins, les huiles de *Quercus* ont été conservées dans des flacons bruns (à l'obscurité), et dans ce cas la réaction principale est une auto-oxydation et les substances phénoliques semblent être impliquées plus que les autres antioxydants dans la protection des huiles de *Quercus* à l'oxydation.

## 5.6. Stabilité oxydative

Pour obtenir une image complète de la stabilité oxydative de huiles de *Quercus*, nous avons déterminé le temps d'induction, qui est défini comme la période pendant laquelle l'huile présente une résistance naturelle à l'oxydation, en raison de la présence d'antioxydants naturels (Marinova *et al.*, 2012). Le temps d'induction (IT) des huiles étudiées a été déterminé par le test Rapidoxy à 140 °C et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 31.

**Tableau 26.** Temps d'induction (min) des huiles de *Quercus* avant et après stockage

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
IT <sub>1</sub>	215,62 ± 4,7 <sup>d</sup>	284,04 ± 5,9 <sup>b</sup>	381,23 ± 7,7 <sup>a</sup>
IT <sub>2</sub>	166,94 ± 2,9 <sup>f</sup>	195,87 ± 3,2 <sup>e</sup>	265,58 ± 7,8 <sup>c</sup>

IT<sub>1</sub> : Temps d'induction des huiles à T0; IT<sub>2</sub> : Temps d'induction des huiles à T6. Les différentes lettres indiquent des différences significatives à  $p < 0,05$  déterminée par ANOVA à deux facteurs.

Les trois huiles étudiées ont montré une importante stabilité à l'oxydation à T0 et des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été observées entre les trois espèces. Comme l'indique le tableau 31, la durée d'induction à 140 °C varie de 4 h à 6,35 h, ce qui indique une grande stabilité à l'oxydation des huiles de *Quercus*. Parmi les trois huiles testées, la période d'induction la plus courte a été observée avec l'huile de *Q. ilex* (4 h). Une période d'induction plus courte signifie une stabilité à l'oxydation plus faible. Cependant, l'huile de *Q. coccifera* a été la plus stable (6,35 h). La grande stabilité de l'huile de *Q. coccifera* est probablement due à sa plus grande richesse en composés phénoliques, ce qui peut expliquer la valeur inférieure de l'huile de *Q. ilex* qui a montré la faible teneur en composés phénoliques. En outre, nous avons constaté que l'huile de *Q. suber* a présenté une stabilité intermédiaire par rapport aux autres huiles.

Après 180 jours de stockage, il a été constaté que le temps d'induction (TI) a diminué de manière significative pour les trois huiles étudiées dans l'ordre suivant: *Q. ilex* < *Q. coccifera*  $\approx$  *Q. suber*. Cette réduction de la période d'induction des huiles est principalement due à leur composition en acides gras qui est plus de 80 % d'acides gras insaturés.

Comparativement à d'autres huiles végétales, l'huile de *Quercus* est plus résistante contre l'oxydation. Cela est dû à de multiples facteurs tels que la teneur relativement faible en acides gras polyinsaturés (environ 16%), le taux élevé d'acides gras monoinsaturés (principalement l'acide oléique qui présente environ 69%) et la présence de certains antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes et polyphénols). La stabilité de l'huile de *Quercus* dépend également de la présence de substances pro-oxydantes ainsi que de facteurs liés aux conditions de stockage. Le niveau de dégradation d'une huile résulte d'un équilibre de tous ces facteurs (Di Giovacchino *et al.*, 2002 ; Caponio *et al.*, 2005).

## **Conclusion**

Il ressort de l'étude de la composition biochimique, les conclusions suivantes :

Le rendement moyen en huile obtenu:  $7,76 \pm 0,67$  %. Le gland de *Quercus* peut être classé parmi les fruits relativement pauvres en matière grasse.

Les propriétés physico-chimiques des huiles étudiées sont majoritairement similaires avec celles de l'huile d'olive. Les indices de qualité (indices d'acide, de peroxyde et de l'extinction spécifique à 270 nm et à 232nm) assez bas témoignent de la parfaite stabilité des huiles extraites. Les indices de structure (indices d'iode et de saponification) relativement élevées reflètent la richesse des huiles étudiées en acides gras insaturés à chaîne carbonée moyenne. Quand aux insaponifiables, les huiles de *Quercus* présentent des teneurs (16,13-19,50 g/kg d'huile) relativement plus élevées que celles de l'huile d'olive et d'autres huiles végétales.

Du point de vue de la composition en acides gras, il ressort que les huiles de *Quercus* se caractérisent par la présence d'un large éventail d'acides gras caractéristiques des huiles végétales (C14: 0 à C22: 0). Les huiles étudiées sont relativement riches en acides gras insaturés AGI (85,98 %), constitués en grande partie d'acide oléique (68,76 %) et d'acide linoléique (15,51 %), ce qui montrent l'importance de ces huiles du point de vue alimentaire. Les acides gras saturés à faible teneur (15,74 %) sont représentés principalement par l'acide palmitique (12,28 %) et l'acide stéarique (2,7 %).

Pour ce qui est de la composition en stérols : des teneurs élevées en stérols totaux ont été obtenues dans les trois huiles étudiées (2594,13-2767,41 mg/kg d'huile). Ce sont surtout le  $\beta$ -sitostérol (82,44-88,8 %), le stigmastérol (4,02-6,76 %), le  $\Delta^5$  avénastérol (2,61-5,24%), et le campestérol (2,12-2,36%). Les autres composés stéroliques tels que le cholestérol, le sitostanol,  $\Delta^5$ , <sup>24</sup> stigmastadiénol,  $\Delta^7$  stigmastérol et  $\Delta^7$  avénastérol sont présents mais en très faibles quantités.

Concernant les composés volatils présents dans les huiles de *Quercus*, 42 composés volatils, appartenant à différentes classes chimiques (aldéhydes, les alcools, les esters, les cétones, les acides carboxyliques, les hydrocarbures et les terpènes) ont été identifiés. Les composés terpéniques constituent la classe la plus représentative de composés volatils dont le D-limonène a été le composé volatil le plus abondant dans les trois espèces (plus de 23%).

De l'étude des composés fonctionnels et du potentiel antioxydant, il ressort :

Une richesse des huiles étudiées en polyphénols totaux (195,64-436,86 mg GAE/kg d'huile), en flavonoïdes (105,70-236,54 mg de catéchine /Kg) et en caroténoïdes (42,29-66,33 mg/kg) a été révélée.

L'analyse LC/MS a permis d'identifier vingt (20) composés phénoliques dont les plus abondants sont des dérivés de tanins hydrolysables sous forme d'esters galloyliques de glucose (gallotannins) et d'esters d'hexahydroxydiphényle de glucose (ellagitannins).

Pour ce qui est de l'étude des tocophérols, l'analyse a permis d'identifier 4 isomères ( $\alpha$ ,  $\beta+\gamma$ , et  $\delta$ -tocophérols) avec une prédominance de l'isomère ( $\beta+\gamma$ )-tocophérols. Le taux global en tocophérols est très intéressant puisqu'il atteint 664,58 mg/kg d'huile. Cette richesse des huiles étudiées en composés phénoliques et en tocophérols leur confèrent un pouvoir de longue conservation et une aptitude vitaminique assurée.

L'évaluation des propriétés antioxydantes révèle que toutes ces huiles manifestent une forte activité et plus particulièrement l'huile de *Q. coccifera*. De plus, une corrélation positive entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés polyphénoliques et en tocophérols a été obtenue.

Le suivi de l'état d'oxydation des huiles de *Quercus* pendant 180 jours de stockage montre une légère variation des indices de qualité (indice d'acide, indice de peroxyde,  $K_{232}$  et  $K_{270}$ ). Les valeurs d'acidité, de peroxydes et d'absorbance en UV répondent aux caractéristiques de qualité même après 180 jours de stockage.

De légères modifications de la teneur en acides gras ont été observées dans les trois huiles de *Quercus*. Une diminution des teneurs totales en acides gras insaturés d'environ 4%, par rapport à leurs teneurs initiales, a été accompagnée d'une augmentation d'environ 5% des teneurs en acides gras saturés.

L'apparition de certains composés volatils dérivés de l'oxydation en faibles quantités tels que le *trans*-2-hexéanal et le *trans*-2-pentenal générés de l'oxydation de l'acide linoléique. Une augmentation des niveaux d'aldéhydes, d'alcools, de cétones et d'acides accompagnée d'une diminution des esters, terpènes et hydrocarbures a été détectée, ce qui témoigne une augmentation du niveau d'oxydation.



Les huiles de *Quercus* fraîches renferment des quantités négligeables de composés polaires (DG  $\leq 1,70$ , ox-TG  $\leq 0,40$  et de quantités négligeables de PTG). Après 180 jours de stockage, une légère augmentation de la teneur en composés polaires totaux (TPC) a été observée.

Les résultats de l'évaluation de la stabilité oxydative par le test de Rapidoxy indiquent que l'huile de gland est très résistante vis-à-vis de l'oxydation forcée (jusqu'à 6,35 h de résistance). Une réduction significative de cette résistance a été observée après stockage.

L'augmentation de la dégradation oxydative a été accompagnée d'une diminution des niveaux de substances caractérisées par une activité antioxydante (composés phénoliques et tocophérols).

Sur la base des résultats obtenus, les conclusions suivantes ont pu être établies :

- L'huile des *Quercus* se distingue par une composition chimique spécifique lui confère des propriétés intéressantes sur le plan nutritionnel et technologique.
- L'huile des *Quercus* est une bonne source d'antioxydants naturels, contenant des composés phénoliques, des caroténoïdes et des tocophérols.
- L'huile des *Quercus* présente une bonne résistance à l'oxydation par rapport à leur teneur en acides gras polyinsaturés. Ceci est dû à de multiples facteurs tels que la présence de certains antioxydants naturels à un niveau relativement élevé, qui sont bénéfiques pour la stabilité de l'huile pendant le stockage.

## Références bibliographiques

- Afssa (2007). Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Maisons-Alfort, Saisine n° 2007-SA-0072.
- AOAC (2003). Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 17th ed. Arlington: AOAC Press. Method 982.27.
- AOCS (1993). Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils, method Cc 13i-96. In Official methods and recommended practices of the American Oil Chemistry Society (Firestone, D. ed) 4th ed. AOCS Press, Washington, DC
- AOCS (1993). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society; AOCS Press: Champaign, IL, USA, method Ch 12b-92.
- AOCS (1996). Official methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' society: Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes. Illinois: AOCS Press.
- Aderian J., Potus J. & Frangne R. (2003). La science alimentaire de A à Z. 3<sup>ème</sup> édition. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 404-405.
- Alais C., Linden G. & Midlo L. (2003). Biochimie alimentaire. Ed : Dunod, 245 (5) :51-71.
- Alais C, Linden G, & Miclo L. (2008). Biochimie Alimentaire, 6<sup>ème</sup> Edition de l'abrégé ed: Dunod, Paris, 67-71.
- Alais C. (2003). Biochimie alimentaire. 5<sup>ème</sup> édition. Dunod. Paris. 250p.
- Al-Rousan W. M., Ajo R. Y., Al-Ismaïl K. M., Attlee A., Shaker R. R., & Osaili T. M. (2013). Characterization of acorn fruit oils extracted from selected Mediterranean *Quercus* species. *Grasas Aceites*, 64, 554-560.
- Aluyor E.O., Ozigagu C. E., Oboh O. I. & Aluyor P. (2009). Chromatographic analysis of vegetable oils: A review. *Academic Journals*, 4(4): 191-197.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C., & Vito R. (2000). Virgin olive oil odour notes : their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*, 68, 283-287.
- Aparicio R. & Aparicio-Ruiz R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 88, 93-104.
- Applequist W. L., Avula B., Schaneberg B. T., Wang Y. H., & Khan I. A. (2006). Comparative fatty acid content of seeds of four Cucurbita species grown in a common (shared) garden. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 606-611.

- Arthur C. L., & Pawliszyn J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- Baiano A., Gambacorta G., Terracone C., Previtali M. A., Lamacchia C., & La Notte E. (2009). Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of food science*, 74(2), C177-C183.
- Baiano A., Previtali M. A., Viggiani I., Varva G., Squeo G., Paradiso V. M., ... & Caponio F. (2016). As oil blending affects physical, chemical, and sensory characteristics of flavoured olive oils. *European Food Research and Technology*, 242(10), 1693-1708.
- Bendini A., Cerretani L., Vecchi S., Carrasco Pancorbo A. & Lercker G. (2006). Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4880-4887.
- Berset C. & Cuvelier M. E. (1996). Revue: méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des aliments*, 16, 219-245.
- Berset C. (2006). Antioxydants phénoliques-structure, propriétés, sources végétales. *Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier. Paris, Lavoisier*, 265-294.
- Blasco C., Fernández M., Picó Y. & Font G. (2004). Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organo phosphorus insecticides in honey by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1030(1-2), 77-85.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E. & Berset C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cantos E., Espín J. C., López-Bote C., de la Hoz L., Ordóñez J. A. & Tomás-Barberán F. A. (2003). Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus spp.*), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6248–6255.
- Caponio F., Bilancia, M. T., Pasqualone A., Sikorska E. & Gomes T. (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology*, 221(1-2), 92-98.
- Caponio F., Summo C., Paradiso V. M. & Pasqualone A. (2014b). Influence of decanter working parameters on the extra virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1626-1633.
- Caponio F., Squeo G., Monteleone J. I., Paradiso V. M., Pasqualone A. & Summo C. (2015). First and second centrifugation of olive paste: Influence of talc addition on yield, chemical composition and volatile compounds of the oils. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 439-445.

- Caponio F., Squeo G., Summo C., Paradiso V. M. & Pasqualone A. (2016). Talc effect on the volatiles of virgin olive oil during storage. *Italian Journal of Food Science*, 28(4), 705-715.
- Charef M., Youski M., Saidi M. & Stocker P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), Pistacia lentiscus seeds growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85, 921-924.
- Chimi H. (2005). Conservations comparées de l'huile d'argane et de l'huile d'olive. *Cahiers Agricultures*, 14(5), 467-471.
- Chira K., Suh J.H., Saucier C. & Teissèdre P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.
- Choe E. & Min D.B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186.
- Cert A., Moreda W. & Pérez-Camino M. C. (2000). Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 131-148.
- Cinquanta L., Esti M. & La Notte E. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American oil chemists' society*, 74(10), 1259-1264.
- Crane, S., Aurore, G., Joseph, H., Mouloungui, Z., & Bourgeois, P. (2005). Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in *Calophyllum calaba* L. oil from Guadeloupe. *Phytochemistry*, 66(15), 1825-1831.
- Croguennec T. (2006). Oxydation des lipides. In *Science des aliments*. Ed. Tec & Doc, pp. 95-120.
- Codex Alimentarius Commission (1981). Norme pour les huiles d'olive et les huiles de grignons d'olive, Codex Stan 33-1981. Adoptée en 1981. Révisée en 1989, 2003, 2015, 2017. Amendée en 2009, 2013.
- Codex Alimentarius Commission. (1999). Norme pour les huiles végétales portant un nom spécifique, Codex Stan 210-1999 Adoptée en 1999. Révisée en 2001, 2003, 2009, 2017. Amendée en 2005, 2011, 2013, 2015.
- Cosmai L., Summo C., Caponio F., Paradiso V. M. & Gomes T. (2013). Investigation on volatile profile, lipid fraction degradation and antioxidant content of tomato-based pâtés as a function of ingredient formulation. *International Food Research Journal*, 20(6), 3141.
- Cuppett S., Schnepf M. & Hall C. (1997). Natural antioxidants-Are they a reality? In: Shahidi F. (ed) *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. AOCS Press, Champaign, IL, USA, 12-24.

- Cuvelier M. E., Richard H. & Berset C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationship. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(2), 324-325.
- Cuvelier C., Dotreppe O. & Istasse L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét.*, 147, 315-324.
- Cuvelier M. E. & Maillard M. N. (2006). Comment évaluer l'efficacité des antioxydants alimentaires? *Science des Aliments*, 27(4-5), 259-282.
- Cuvelier C., Cabaraux J. F., Dufrasne I., Hornick J.-L. & Istasse L. (2004). Acides gras nomenclature et sources alimentaires. *Ann. Méd. Vét.*, 148, 133-140.
- Cuvelier M. E. & Maillard M. N. (2012). Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 19(2), 125-132.
- De Souza R. F. & De Giovanni W. F. (2004). Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2), 97-104.
- de Torres A., Espínola F., Moya M., Alcalá S., Vidal A. M. & Castro E. (2018). Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. *LWT*, 90, 22-30.
- Difonzo G., Russo A., Trani A., Paradiso V.M., Ranieri M., Pasqualone A., Summo C., Tamma G., Silletti R. & Caponio F. (2017). Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: antioxidant characterization and biological activity. *J Fun Foods*, 31, 63-70.
- Di Giovacchino L., Mucciarella M.R., Costantini N., Ferrante M.L. & Surricchio G. (2002). Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. *J Am Oil Chem Soc*, 79(4), 339-344.
- Drissi A., Bennani H., Giton F., Charrouf Z., Fiet J. & Adlouni A. (2006). Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert, an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer investigation*, 24(6), 588-592.
- Douzane M. & Bellal M. (2004). Etude des caractéristiques physico-chimiques des huiles de quelques variétés populations d'olive de la région de Bejaïa. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, (22), 86-93.
- Dubois V., Breton S., Linder M., Fanni J. & Parmentier M. (2008). Proposition de classement des sources végétales d'acides gras en fonction de leur profil nutritionnel. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 15(1), 56-75.
- Esti M., Cinquanta L. & La Notte E. (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 32-35.

- Ferriara-Dias S., Valente D. & Abreu J. (2003). Pattern recognition of acorns from different *Quercus* species based on oil content and fatty acid profile. *Grasas y Aceites*, 54(4), 384-391.
- Frankel E. N. (1998). Lipid Oxidation. *The Oily Press Dundee*. Scotland. LTD., Bridgewater.
- Frénot M. & Vierling E. (2002). Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant-2e édition, 304 p.
- Fulcrand H., Mané C., Preys S., Mazerolles G., Bouchut C., Mazauric J. P., ... & Cheynier V. (2008). Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 69(18), 3131-3138.
- García-Villalba R., Espín J. C., Tomás-Barberán F. A. & Rocha-Guzmán N. E. (2017). Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 38-46.
- Gertz C. & Kochhar S. P. (2001). A new method to determine oxidative stability of vegetable fats and oils at simulated frying temperature. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 8(1), 82-88.
- Gharby S., Harhar H., Kartah B., El Monfalouti H., Maata N., Guillaume D. & Ben T. (2011). Influence de l'origine du fruit (terroir, caprin) et de la méthode d'extraction sur la composition chimique, les caractéristiques organoleptiques et la stabilité de l'huile d'argane. *Actes du Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir*, 203-214.
- Gliszczyńska-Świgło A. & Sikorska E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048(2), 195-198.
- Gohari Ardabili A., Farhoosh R. & Haddad Khodaparast M. H. (2011). Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaca*) grown in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 1053-1063.
- Giuffrè A. M., Louadj L., Poiana M. & Macario A. (2012). Composition en stérols des huiles extraites d'olives de cultivars de la province de Reggio Calabria (Sud d'Italie). *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 89, 177-183.
- Guilloton M. & Quintard B. (2003). Biochimie. Ed. Masson, Paris, 96 p.
- Gülçin İ., Huyut Z., Elmastaş M. & Aboul-Enein H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- Gunstone F.D., Harwood J. L. & Dijkstra A. J. (2007). *The lipid handbook with CD-ROM*. 3<sup>rd</sup> Ed. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1472 p.
- Gunstone F. (2009). *Oils and fats in the food industry* 1st Ed., John Wiley and Sons, Dundee, UK.

- Gutiérrez Alvarez L. F. (2007). Extraction et caractéristiques des huiles de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides* L.). Thèse de Maître ès sciences, Université Laval, Québec. 100 p.
- Graille J., (2003). Lipides et Corps Gras Alimentaires, *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*, Lavoisier, Tec et Doc, Paris, 469 p.
- Goupy P., Dufour C., Loonis M. & Dangles O. (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 615-622.
- Guerfel M., Ben Mansour M., Ouni Y., Guido F., Boujnah D. & Zarrouk M. (2012). Triacylglycerols composition and volatile compounds of virgin olive oil from Chemlali cultivar: comparison among different planting densities. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-6.
- Halliwell B. (1999). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*, 9, 1-32.
- Hamilton R. J. & Rossell J. B. (1986). *Analysis of oils and fats*. Elsevier Applied Science Publishers, London, Ch. 3, p. 123.
- Harwood J. & Aparicio R. (2000). *Handbook of olive oil: Analysis and properties*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 620 p.
- Hennebelle T., Sahpaz S. & Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Hennen G. (1995). Les matériaux biologiques de base. In : Hennen G., Biochimie 1er cycle. Dunod, Paris, 8-35.
- Ignat I., Volf I. & Popa V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Igueld S. B., Abidi H., Trabelsi-Ayadi M. & Chérif J. K. (2015). Study of physicochemicals characteristics and antioxidant capacity of cork oak acorns (*Quercus suber* L.) grown in three regions in Tunisia. *J. Applied Pharmaceut. Sci*, 5, 26-32.
- Ikonomou M. G., Blades A. T. & Kebarle P. (1991). Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance. *Analytical Chemistry*, 63(18), 1989-1998.
- Ismail A., Marjan Z. M. & Foong C. W. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87(4), 581-586.
- IOOC. (1996). International Olive Oil Council. Organoleptic evaluation of virgin olive oil. COI/T.20/ Document N.15/Rev.1. Madrid.

- Jaraula C. M., Kenig F., Doran P. T., Priscu J. C. & Welch K. A. (2008). SPME-GCMS study of the natural attenuation of aviation diesel spilled on the perennial ice cover of Lake Fryxell, Antarctica. *Science of the total environment*, 407(1), 250-262.
- Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E. & Vivanco J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food chemistry*, 83(4), 547-550.
- Jones P. J., & Raeini-Sarjaz M. (2001). Plant sterols and their derivatives: the current spread of results. *Nutrition reviews*, 59(1), 21-24.
- Judde A. (2004). Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications?. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 11(6), 414-418
- Kalua C. M., Allen M. S., Bedgood Jr 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
- Karlenskind A. (1992). Manuel des Corps Gras. Tome 1 Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, pp 116-226.
- Karleskind A. & Wolff J. P. (1992). Manuel Fats. *Fats Manual, Karleskind, A. (Ed)*, 1-787.
- Khoddami A., Wilkes M. & Roberts T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kim H. J., & Min D. B. (2008). Tocopherol stability and prooxidant mechanisms of oxidized tocopherols in lipids. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 3, 435-448.
- Kiritsakis K., Lenert E. B., Willet W. C. & Hernandez R. J. (1998). Olive Oil from the Tree to the Table. 2nd edition, Trumbull, CT: Food & Nutrition Press. Inc., 06611. USA. pp. 123.
- Kiritsakis A. & Christie W. W. (2000). Analysis of edible oils. In *Handbook of olive oil* (pp. 129-158). Springer, Boston, MA.
- Kiritsakis A., Kanavouras A. & Kiritsakis K. (2002). Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 628-638.
- Laguerre M., Lopez Giraldo L. J., Lecomte J., Pina M. & Villeneuve P. (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL. Oléagineux Corps gras Lipides*, 14(5), 278-292.
- Lecerf J.M. (2011). Les huiles végétales particularités et utilités. *Médecine des maladies Métaboliques* (5) 3, 257-262.



- Ledoux M., Chardigny J. M., Darbois M., Soustre Y., Sébédio J. L. & Laloux L. (2005). Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(5), 409-425.
- Léger C. L. (2006). Anti-oxydants d'origine alimentaire: diversité, modes d'action anti-oxydante, interactions. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(1), 59-69.
- Legrand P. (2010). Les nouveaux ANC en acides gras - Une actualisation nécessaire. *Cholé Doc*, 118, pp 3.
- León-Camacho M., Garcia-Gonzalez D.L. & Aparicio R. (2001). A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus*L.) oil fatty profile. *Eur. Food Res. Technol.* 213(4), 349-355
- León-Camacho M., Viera-Alcaide I. & Vicario I. M. (2004). Acorn (*Quercus* spp.) fruit lipids: saponifiable and unsaponifiable fractions: a detailed study. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(5), 447-453.
- Liu H. R., & White P. J. (1992). Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid compositions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(6), 528-532.
- Liu Q., Singh, S. & Green A. (2002). High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(sup3), 205S-211S.
- Macheix J. J. (1996). Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle?. *Acta botanica gallica*, 143(6), 473-479.
- Macheix J. J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques et Universitaires Romandes..
- Marais J. P., Deavours B., Dixon R. A. & Ferreira D. (2006). The stereochemistry of flavonoids. In *The science of flavonoids* (pp. 1-46). Springer, New York, NY.
- Marc F., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. & Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *médecine/sciences*, 20(4), 458-463.
- Marinova E. M., Seizova K. A., Totseva I. R., Panayotova S. S., Marekov I. N. & Momchilova S. M. (2012). Oxidative changes in some vegetable oils during heating at frying temperature. *Bulgarian Chemical Communications*, 44(1), 57-63.
- Marmesat S., Morales A., Velasco J., Ruiz Méndez M. & Dobarganes M. C. (2009). Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y Aceites*, 60(2), 155-160.

- Márquez-Ruiz G., Jorge N., Martín-Polvillo M. & Dobarganes M. C. (1996). Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. *Journal of Chromatography A*, 749(1-2), 55-60.
- Masson O. (2007). Biochimie : Bases biochimiques de la diététique, 2<sup>ème</sup> édition, Lavoisier ED.
- Maszewska M., Florowska A., Dłużewska E., Wroniak M., Marciniak-Lukasiak K. & Żbikowska A. (2018). Oxidative Stability of Selected Edible Oils. *Molecules*, 23(7), 1746.
- Matthäus B., Guillaume D., Gharby S., Haddad A., Harhar H. & Charrouf Z. (2010). Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food chemistry*, 120(2), 426-432.
- McPhail D. B., Hartley R. C., Gardner P. T. & Duthie G. G. (2003). Kinetic and stoichiometric assessment of the antioxidant activity of flavonoids by electron spin resonance spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6), 1684-1690.
- Medini F., Fellah H., Ksouri R. & Abdelly C. (2014). Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for science*, 8(3), 216-224.
- Mehinagic E., Bourles E. & Jourjon F. (2011). Composés des fruits d'intérêt nutritionnel : impact des procédés de transformation sur les polyphénols. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture*, 43(6), 364.
- Min D. B. & Boff J. M. (2002). Lipid oxidation of edible oil. *Food Science and Technology-New York, Marcel Dekker*, 335-364.
- Mochizuki M., Yamazaki S. I., Kano K. & Ikeda T. (2002). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569(1-3), 35-44.
- Morales M. T., Luna G. & Aparicio R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91(2), 293-301.
- Morelló J. R., Motilva M. J., Tovar M. J. & Romero M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.
- Morin O. & Pagès-Xatart-Parès X. (2012). Huiles et corps gras végétaux: ressources fonctionnelles et intérêt nutritionnel. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 19(2), 63-75.
- Nacz M. & Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

NF ISO 8262-3 2006. Détermination de la teneur en matière grasse. Association Française de Normalisation AFNOR, Paris, France.

Norris S. (2005). *Les gras trans : Le fardeau pour la santé*. Library Bibliothèque of Parliament. PRB 05-21F, 1-9.

Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. & Takahara Y. (1993). Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33(3), 557-561.

Özcan T. (2007). Characterization of Turkish *Quercus* L. taxa based on fatty acid compositions of the acorns. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 653–662.

Percheron F., Perlés R. & Foglietti M. J. (1981). Abrégé de la biochimie générale. In « chromo protéides, glucides, lipides : oxydations biologiques, interrelations métaboliques ». Tome2. Ed. Masson, Paris, 442-469

Perez-Jimenez J. & Saura-Calixto F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39, 791-800.

Pietta P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.

Poisson J.P. & Narce M. (2003). Corps gras alimentaires : aspect chimiques, biochimiques et nutritionnels. *Lipides et corps gras alimentaires*. Ed Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 1-50.

Pokorny J., Kalinova L. & Dysseler P. (1995). Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils: Results of a collaborative study and the standardized method (Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 67(10), 1781-1787.

Pokorny J. (2003). Problème de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. *Lipides et corps gras alimentaires*, 60-63.

Popovici C., Saykova I. & Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4, 25-39

Pragasam A., Naik V. M. & Tallur P. N. (2015). Assessment of Physico-Chemical Characteristic Deterioration of Lipids by FTIR Spectra for Successively Used Soy Bean and Sunflower Oils in Frying Spice Food Stuffs. *Journal of Applied Chemistry*, 8, 47-51.

Psomiadou E. & Tsimidou M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *J. Agric. Food Chem.* 50, 716-721.

Psotová J., Lasovsky J. & Vicar J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 147(2), 147-53.

- Rakić S., Povreović D. Tešević V., Simić M. & Maletić R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 416-423.
- Ramadan M. & Mörseel J. T. (2002). Oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit-seeds. *European Food Research and Technology*, 215(3), 204-209.
- Ramadan M. F. (2010). Rapid antiradical method for screening deep fried oils. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 47-50.
- Ran-Ressler R. R., D. Sim A. M. O'Donnell-Megaró D. E. Bauman D. M. Barbano & Brenna J. T. (2011). Branched chain fatty acid content of United States retail cow's milk and implications for dietary intake. *Lipids*, 46(7), 569-576.
- Règlement (CEE) Européen N°2568/91 (1991). Relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes y afférentes. JOCE du 05 septembre 2003
- Rivera S. M. & Canela-Garayoa R. (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 1-10.
- Rolland Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 11(6), 419-424.
- Rotondi A., Alfei B., Magli M. & Pannelli G. (2010). Influence of genetic matrix and crop year on chemical and sensory profiles of Italian monovarietal extra-virgin olive oils. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2641-2648.
- Salas J. J., Bootello M. A., Martínez-Force E. & Garcés R. (2009). Tropical vegetable fats and butters: properties and new alternatives. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 16(4-5-6), 254-258.
- Schmidt K. & Podmore I. D. (2015). Solid phase microextraction (SPME) method development in analysis of volatile organic compounds (VOCS) as potential biomarkers of cancer. *Journal of Molecular Biomarker & Diagnosis*, 6(6).
- Schoefs B. (2004). Determination of pigments in vegetables. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 217-226.
- Servili M., Esposito S., Fabiani R., Urbani S., Taticchi A., Mariucci F., Selvaggini R. & Montedoro G.F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and Organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17(2), 76-84.
- Shahidi F. (2005). Quality assurance of fats and oils. In: Shahidi F. (ed) *Bailey's Industrial Oil & Fat Products*, vol 1, 6th edn. Wiley, New York, pp 565-576.
- Shahidi F. & Zhong Y. (2005). Antioxidants: regulatory status. *Bailey's industrial oil and fat products*, 1, 491-512.

- Singleton V. L. & Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Skoog D. A., Holler F. J. & Nieman T. A. (2003). *Principes d'analyse instrumentale*. De Boeck Supérieur, Paris, 960 p.
- Smouse T. H. (1995). Factors affecting oil quality and stability. *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*, 17-36.
- Sparkman O. D. (2000). Mass spectrometry desk reference. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(11), 114.
- Squeo G., Silletti R., Summo C., Paradiso V. M., Pasqualone A. & Caponio F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chem.*, 209, 65–71.
- Squeo G., Tamborrino A., Pasqualone A., Leone A., Paradiso V. M., Summo C. & Caponio F. (2017). Assessment of the influence of the decanter set-up during continuous processing of olives at different pigmentation index. *Food Bioprocess Technol*, 10, 592–602.
- Stahl W. & Sies H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- Stalikas C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
- Tamborrino A., Squeo G., Leone A., Paradiso V. M., Romaniello R., Summo C., ... & Caponio F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205, 34-46.
- Tan C. P., Man Y. C., Selamat J. & Yusoff M. S. A. (2001). Application of Arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(11), 1133.
- Tanouti K., Serghini-Caid H., Sindic M., Wathelet J. P., Bouseta A. & Elamrani A. (2012). Volatile compounds, profiles of virgin olive oils produced in the eastern Morocco: oxidative stability and sensory defects. *Journal of Food Research*, 1(4), 194.
- Tanouti K., Elamrani A., Serghini-Caid H., Khalid A., Bahetta Y., Benali A., ... & Khiar M. (2010). Caractérisation d'huiles d'olive produites dans des coopérative pilotes (lakrarma et kenine) au niveau du Maroc Oriental. *Les technologies de laboratoire*, 5(18).
- Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M. & El-Elimat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*, 104(4), 1372-1378.

- Tchiégang C., Dandjouma A., Kapseu C. & Parmentier M. (2005). Optimisation de l'extraction de l'huile par pressage des amandes de *Ricinodendron heudelotii* Pierre ex Pax. *Journal of food engineering*, 68(1), 79-87.
- Tejerina D., García-Torres S., de Vaca M. C., Vázquez F. M. & Cava R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: Intra-and inter-annual variations. *Food Chemistry*, 124(3), 997-1004.
- Tekaya I. B. & Hassouna M. (2005). Étude de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge extra tunisienne au cours de son stockage. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 12(5-6), 447-454.
- Tekaya I. B., & Hassouna M. (2007). 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. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 14(1), 60-67.
- 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, 98-112.
- 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.
- Vas G. & Vekey K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of mass spectrometry*, 39(3), 233-254.
- Velasco J. & Dobarganes C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 661-676.
- Villière A. & Genot C. (2006). Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(2-3), 152-159.
- Verleyen T., Kamal-Eldin A., Dobarganes C., Verhé R., Dewettinck K. & Huyghebaert A. (2001). Modeling of  $\alpha$ -tocopherol loss and oxidation products formed during thermoxidation in triolein and tripalmitin mixtures. *Lipids*, 36(7), 719-726.
- Verleyen T. (2002). Stability of minor components during vegetable oil refining. Applied biological sciences: *Chemistry. University of Gent. Gant*. 277.
- Wanasundara, P. K. J. P. D. & Shahidi, F. (2005). Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Vol. 1, 6th ed.; Shahidi, F., Ed. John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, pp 431-489.

- Wanasundara U. N., Shahidi F. & Jablonski C. R. (1995). Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils. *Food Chemistry*, 52(3), 249-253.
- Waridel P., Wolfender J. L., Ndjoko K., Hobby K. R., Major H. J. & Hostettmann K. (2001). Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *Journal of Chromatography A*, 926(1), 29-41.
- Warner K. & Eskin N. A. M. (1995). *Methods to access quality and stability of oils and fat-containing foods*. The American Oil Chemists Society AOCS press, Champaign.
- Willimas M.A. (1997). Extraction of lipids from natural sources. In *Lipid Technologies and Applications*, edited by Gunstone F. D. and Padley F.B., Marcel Dekker Inc., New York, 834 p.
- Wolf J. P. (1992). *Manuel des corps gras*, Ed. Lavoisier, Paris.
- Young A. J. & Lowe G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 385(1), 20-27.
- Zheng W. & Wang S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- Zimmer N. & Cordesse R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions Animales* 3 (9), 167-179.(1996).
- Zulueta A., Esteve M. J. & Frígola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316.
- Zungur A., Koç M., Yalçın B., Kaymak-Ertekin F. & Ötleş S. (2014). Storage stability of microencapsulated extra virgin olive oil powder. In *9th Baltic Conference on Food Science and Technology Food for Consumer Well-Being FOODBALT* (pp. 257-261).

*Troisième partie :*  
*Le fruit de Quercus pour l'élaboration d'un*  
*biscuit*



## **Introduction**

L'intérêt des aliments, riches en fibres alimentaires et en antioxydants naturels, s'est accru au cours des dernières décennies et l'importance de ces constituants alimentaires a conduit à la création d'un vaste marché pour les produits et les ingrédients riches en fibres et en antioxydants (Ajila *et al.*, 2008).

En raison de l'absence de gluten, la farine de gland a été proposée comme un nouvel ingrédient pour la production d'aliments sans gluten, tels que le pain et les biscuits (Korus *et al.*, 2015, 2017 ; Molavi *et al.*, 2015). L'utilisation de la farine de gland a également été proposée dans la production de pain à base de blé et d'orge (Švec *et al.*, 2018). Toutefois, l'ajout de farine de gland a détérioré les attributs sensoriels en diminuant le volume spécifique du pain. Ces résultats sont liés à un effet négatif sur les propriétés viscoélastiques de la pâte, principalement en raison de l'absence de gluten et de la présence de fibres dans la farine ajoutée. Les biscuits, au contraire, pourraient mieux tolérer l'ajout de farine de gland que le pain, car leur friabilité caractéristique exige un faible réseau de gluten. De plus, les biscuits sont des produits de boulangerie populaires, consommés quotidiennement, et ont une longue durée de vie, toutes caractéristiques qui les rendent aptes à l'ajout d'ingrédients fonctionnels (Pasqualone *et al.*, 2014).

Au niveau de cette partie, nous avons visé à étudier la possibilité d'utiliser la farine de gland comme ingrédient nouveau et sain dans les biscuits à base de blé. Après avoir analysé et comparé les caractéristiques physico-chimiques de la farine de gland obtenue chez trois espèces différentes de *Quercus*. La farine la plus antioxydante a été utilisée, et son effet sur les propriétés physico-chimiques et les caractéristiques sensorielles des biscuits ont été évaluées.

## **Chapitre I : Etude bibliographique**

### **1. Définition du biscuit**

L'origine du mot biscuit est "Bis-Cuit" signifie "cuit deux fois". A ses débuts, le biscuit étant en effet une sorte de galette nécessitant une première cuisson, puis un passage dans des compartiments au-dessus du four pour réduire sa teneur en humidité (Kiger et Kiger, 1967; Boudreau et Menard, 1992).

Les biscuits sont l'un des principaux produits de confiserie, ils constituent une catégorie très hétérogène comprenant un large éventail de produits. D'après Lanza (2006), on entend, généralement par le terme biscuit, un petit produit au four, sucré, sec et friable, obtenu principalement à partir de farines de céréales.

Selon Broutain (2001), le biscuit est un produit sec obtenu à partir d'une cuisson d'une pâte constituée d'un mélange de farines alimentaires (blé et autres céréales et/ou légumineuses locales), de matières sucrantes, de matières grasses et de tout autre produit alimentaire, parfums et autres condiments autorisés. Après la cuisson, le biscuit doit conserver ses qualités organoleptiques et commerciales durant une période supérieure à un mois.

### **2. Classification des biscuits**

Il n'existe pas une classification officielle des biscuits en raison de la très grande variété des productions et de la multiplicité des composants pouvant entrer dans les diverses fabrications. L'une des classifications connues des biscuits est celle basée sur leur formulation et leur méthode de fabrication (Whiteley, 1979 ; Eneche, 1999 ; Gallagher, 2008). Selon Whiteley (1979) et Eneche (1999), les biscuits sont divisés, en fonction de la teneur en graisse et en sucre, en biscuits à pâte dure et à pâte molle

#### **2.1. Biscuits à pâtes molles**

La majorité des biscuits consommés dans le monde sont fabriqués à partir de pâtes molles. Les formulations de pâtes molles contiennent des niveaux élevés de graisse et de sucre, ce qui donne des pâtes cohésives et plastiques, mais manquent d'extensibilité et d'élasticité, en raison du développement limité du réseau de gluten. Les pâtes molles s'adressent à la pâtisserie industrielle. Il s'agit à la fois de biscuits secs, tels que boudoirs, langues de chat et d'articles moelleux tels que génoises, madeleines, cakes, macarons Les biscuits à pâte molle sont

généralement formés par moulage rotatif, par extrusion et découpe ou par laminage et découpe. Les pâtes formées ont tendance à conserver leur forme jusqu'à la cuisson, mais ensuite elles s'étalent ou coulent, devenant plus minces (Gallagher, 2008).

## **2.2. Biscuits à pâtes dures**

Ces biscuits sont caractérisés par une pâte à consistance ferme et un réseau de gluten plus développé. Les teneurs en matières grasses et en sucre de la formulation sont faibles par rapport à la farine, les pâtes sont à la fois élastiques et extensibles et nécessitent un brassage intensif. Les pâtes dures peuvent être similaires aux pâtes à pain. Les pâtes dures donnent naissance au type de biscuits secs sucrés et salés : casse croûte, sablés, petit beurre, etc. Elles sont généralement laminées et feuilletées avant d'être découpées ou estampées. Les morceaux formés vont généralement se contracter en raison de la qualité élastique du gluten (Gallagher, 2008).

## **3. Principaux ingrédients des biscuits**

Les biscuits peuvent être considérés comme des produits alimentaires simples à base de céréales. Les ingrédients de base des biscuits comprennent la farine, le sucre et la matière grasse. Les différentes combinaisons de leurs ingrédients donnent naissance à un large éventail de produits avec de formes et de textures diverses (Brennan et Samyue, 2004 ; Ardent *et al.*, 2009 ). Les biscuits peuvent également contenir certains ingrédients mineurs, tels que les œufs, les levures, le sel, le lait, et les émulsifiants, qui servent à améliorer la couleur, la saveur, la texture et la consistance (Manley, 1998 ; Pereira *et al.*, 2013).

En terme de qualité, les biscuits sont fortement influencés par les propriétés physico-chimiques de leurs pâtes (Manohar et Rao, 2002), qui sont à leur tour influencées par la composition de la farine en protéines et en amidon, la teneur en matière grasse et en eau et les paramètres de cuisson (Baltsavias *et al.*, 1999; Brennan et Samyue, 2004).

### **3.1. Farine**

La farine est l'ingrédient de base dans la fabrication du biscuit et probablement la plus variable (Whiteley, 1979). Malgré la diversité des produits rencontrés en biscuiterie, la farine de blé reste la matière première principale de ce secteur (Feillet, 2000; Gallagher, 2008). Généralement, les farines utilisées pour la fabrication des biscuits sont obtenues après la mouture des graines de blé tendre, avec une faible teneur en amidon endommagé (Gallagher, 2008).

D'après Feillet (2000) et Roussel (2005), la valeur technologique d'une farine est son aptitude à être valorisée en biscuiterie. Elle doit s'adapter à des techniques de transformation aussi diverses pour la fabrication des biscuits. Elle se caractérise principalement par une « machinabilité » de la pâte, c'est à dire une résistance à un certain degré de brisure en donnant un biscuit de qualité. De même selon Brennan et Samyue (2004), la valeur biscuitière dépend principalement des caractéristiques intrinsèques de la farine, comme la quantité et la qualité des protéines, état de l'amidon, qui ont une influence quantitativement et qualitativement importante sur la qualité du produit fini.

Pour une farine biscuitière, la teneur en protéines doit être comprise entre 7 et 10 %. Elle doit rester inférieure à 11 %, car dans une farine trop forte, l'élasticité élevée de la pâte provoque son rétrécissement, avec l'inconvénient de donner des biscuits petits et épais (Feillet, 2000; Hazelton *et al.* 2004).

### **3.2.Matière grasse**

La matière grasse est un ingrédient extrêmement important dans la fabrication des biscuits. Elle contribue à la plasticité de la pâte et influe les qualités texturales et organoleptiques du biscuit (Kiger et Kiger, 1967; Gallagher, 2008). La fonction principale de la matière grasse est de fabriquer davantage des produits tendres et des pâtes plus molles.

Elle lubrifie la structure en se dispersant dans la pâte pendant le mélange, ce qui empêche l'amidon et les protéines de former un réseau glutineux. La formation d'un réseau de gluten est inhibée si la graisse recouvre la farine avant qu'elle puisse être hydratée. Par conséquent, la consistance désirée de la pâte peut être obtenue en augmentant la teneur en graisse tout en diminuant la quantité d'eau (Baltsavias *et al.*, 1999 ; Manohar et Rao, 2002 ; Gallagher, 2008).

### **3.3.Sucre**

Le saccharose est le principal sucre utilisé dans l'industrie du biscuit. En plus de son pouvoir sucrant, il affecte la texture, les dimensions, la couleur, la dureté et l'état de surface des biscuits. Le sucre peut inhiber le développement du gluten pendant le pétrissage et provoquer un ramollissement de la pâte en entrant en compétition avec la farine pour la disponibilité de l'eau (Feillet, 2000; Gallagher, 2008).

Le sucre influence les propriétés mécaniques des biscuits. Il peut agir en tant qu'agent de durcissement en se cristallisant lorsque le biscuit refroidit, rendant ainsi le produit croustillant.

Cependant, une quantité modérée de saccharose pouvait agir comme agent adoucissant dans les biscuits, en raison de la capacité du saccharose à retenir l'eau (Menard *et al.*, 1992 ; Gallagher, 2008).

En outre, le sucre joue un rôle important dans le développement de la couleur du biscuit pendant la cuisson. Sa caramélisation donne la couleur recherchée de la face extérieure du biscuit et permet d'atteindre différentes nuances (Menard *et al.*, 1992).

### **3.4.Eau**

L'eau, considérée souvent tant qu'ingrédient, est essentiel dans la formation de la pâte. L'eau est nécessaire pour la solubilisation des autres ingrédients, pour l'hydratation des protéines et des carbohydrates et pour le développement du réseau de gluten. Elle affecte la nature des interactions entre les divers constituants de la formule et contribue à la structuration de la pâte.

L'eau détermine en grande partie les propriétés rhéologiques de la pâte (cohésion, consistance, viscoélasticité...). L'ajout d'eau à la formule réduit la viscosité et l'élasticité de la pâte et augmente son extensibilité. L'augmentation du volume d'eau produit également une réduction de la consistance, une augmentation de la fluidité et de l'adhérence de la pâte. En revanche, si la proportion de l'eau est trop basse, la pâte devient fragile et montre une formation marquée de croûte due à la déshydratation rapide à la surface (Maache-Rezzoug *et al.*, 1998 ; Baltsavias *et al.*, 1999 ; Chevallier *et al.*, 2000).

### **4. Pâte biscuitière**

La pâte est le produit intermédiaire entre la farine et le biscuit et de ses qualités dépend la réussite industrielle finale. En effet, la rhéologie de la pâte est d'importance considérable dans la fabrication de biscuit. La pâte à biscuits doit être suffisamment cohésive mais ne possède pas les caractéristiques extensibles et élastiques des pâtes à pain (Maache-Rezzoug *et al.*, 1998).

À cause du faible réseau de gluten développé, la texture du biscuit cuit est attribuée à la gélatinisation de l'amidon et au sucre plutôt qu'au réseau de protéines/amidon. Le développement du gluten est minimal et sert uniquement à fournir une cohésion pour la manipulation. La pâte à biscuit devrait être peu élastique, pour empêcher le rétrécissement après le découpage, mais suffisamment souple et extensible pour permettre une mise en forme facile et stable des produits.

En outre, le réseau glutineux devrait être légèrement développé pour que la pâte soit cohésive sans être trop élastique (Contamine *et al.*, 1995; Gallagher, 2008).

## **5. Cuisson des biscuits**

La cuisson est sans aucun doute l'étape fondamentale qui détermine les caractéristiques souhaitées du produit. Les phénomènes qui se produisent pendant la cuisson sont à la fois chimiques : dénaturation du gluten, gélatinisation partielle de l'amidon, réaction de Maillard et caramélisation des sucres ; et physiques : évaporation de l'eau, expansion du mélange due à la dilatation thermique des gaz produits dans le mélange (Menard, 1992 ; Chevallier *et al.*, 2000 ; Pereira *et al.*, 2013).

Ces changements sont essentiellement causés par les transferts de matière et de chaleur qui affectent les constituants majoritaires de la pâte. La cuisson est un processus qui dépend des propriétés intrinsèques du biscuit et des facteurs extérieurs comme la température, l'humidité et la vitesse de l'air dans le four. Elle détermine les propriétés physiques du biscuit y compris les dimensions (diamètre et épaisseur), le poids et le teneur en eau du biscuit (Cronin et Preis, 2000).

## **6. Critères de qualité d'un biscuit**

Les attributs de la qualité les plus importants dans les aliments sont les caractéristiques sensorielles et nutritionnelles. Dans le cas des biscuits, il s'agit de satisfaire à des contraintes dimensionnelles, de poids, de goût, de couleur et de texture. Ces deux dernières sont les paramètres les plus importants dans l'appréciation qualitative d'un biscuit. La qualité du biscuit est également gouvernée par la nature et la quantité des ingrédients utilisés (Maache-Rezzoug *et al.*, 1998).

Les nombreuses réactions qui se déroulent pendant la cuisson (réaction de Maillard, de caramélisation, l'oxydation des lipides) sont connues pour influencer la qualité globale des biscuits (Ledl *et al.*, 1990). A titre d'exemple, les composants volatils responsables des attributs du goût sont produits sous l'effet de la chaleur, de l'oxydation, de l'activité non enzymatique sur les protéines, la matière grasse et les carbohydrates (ex. réaction de Maillard) (Fellows, 2000).

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

En raison de la demande des consommateurs pour des aliments plus sains et diversifiés, l'industrie alimentaire oriente le développement de nouveaux produits vers le secteur des aliments et des ingrédients fonctionnels. À cet égard, la possibilité de valoriser des ressources naturelles fonctionnelles dans l'industrie alimentaire semble très prometteuse (Pasqualone *et al.*, 2014).

Les biscuits pourraient représenter un bon candidat pour l'ajout d'ingrédients fonctionnels parce qu'ils sont populaires, consommés quotidiennement et ils ont une longue durée de vie. De nombreux biscuits fonctionnels ont été formulés, principalement avec des propriétés antioxydantes (Mohsen *et al.*, 2009 ; Hassan *et al.*, 2012). De plus, divers ingrédients ont été évalués en tant que sources de composants actifs pour la préparation de biscuits fonctionnels : farine de moutarde dégraissée, tourteau de lin, huile de lin (Hassan *et al.*, 2012).

D'autres chercheurs, principalement pour augmenter la teneur en fibres, ont proposé l'enrichissement des biscuits en plusieurs sous-produits, tels que le zeste de mangue (Ajila *et al.*, 2008), les épluches de pomme de terre (Abd-El-Magied, 1991), ou le son de céréales (Sudha *et al.*, 2007).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons principalement à l'évaluation de la valeur nutritionnelle de la farine de gland, son utilisation pour l'élaboration d'un biscuit fonctionnel et la caractérisation du produit fini.

L'ensemble du travail présenté dans ce partie a été mené au niveau de laboratoire « DI.S.S.P.A », Département des Sciences du Sol, des Plantes et de l'Alimentation, Université de Bari, Italie.

### **1. Préparation de la farine de gland**

La farine de trois espèces de *Quercus* utilisée dans cette étude a été préparée comme décrit précédemment (partie1 § 2.3). La farine a été conservée à  $-20$  °C et les prélèvements pour analyses ont été effectués au fur et à mesure des besoins.

## **2. Propriétés physiques des farines**

### **2.1. Couleur**

Un spectrocolorimètre (CM-700d Konica Minolta Sensing, Osaka, Japon) est utilisé pour mesurer (par contact) la couleur de la farine. La surface à caractériser est placée sous un éclairage diffus de type D65 (lampe à Xénon Pulsé), normalisé par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE).

Seule la lumière réfléchiée perpendiculairement à la surface de l'échantillon est récupérée et transformée par des photorécepteurs en signaux électriques qui sont, par la suite, amplifiés et convertis en données numériques. Ces dernières correspondent aux spécifications de couleur de l'échantillon.

Les résultats obtenus, élaborés avec le logiciel Spectral Magic TM NX Lite, ont été exprimés sous forme de trois coordonnées :  $L^*$  : luminance ou clarté,  $a^*$  : index rouge-vert et  $b^*$  : index jaune-bleu. L'index brun :  $100-L^*$  est également calculé (Pasqualone *et al.*, 2015).

### **2.2. Granulométrie**

La granulométrie est l'étude de la distribution de la taille des particules d'une farine. Elle représente le principal facteur influençant les propriétés rhéologiques des farines. De façon générale, les propriétés d'usage (rhéologie, capacité d'absorption d'eau...) des poudres dépendent fortement de la taille, de la distribution de taille et de la forme des particules qui les composent (Scher *et al.*, 1998).

La granulométrie des différentes farines est estimée par fractionnement d'une prise d'essai de 100 g à travers une tamiseuse qui comprend 5 tamis organisés selon le diamètre des pores du haut vers le bas comme suit : 425, 300, 212, 150 et 106  $\mu\text{m}$ , en plus d'un fond ramasseur et procéder à l'agitation pendant 15 min ; une fois le tamisage est terminé, desserrer le couvercle et peser l'extraction ( $m_1$ ) de chaque tamis (Doukani, 2015).

Les résultats obtenus pour la granulométrie sont calculés selon la formule suivante :

$$\textit{Granulométrie} = m_1/m_0 \times 100$$

$m_1$  : Masse retenue des tamis après tamisage en (g).

$m_0$  : Masse de la prise d'essai en (g).



### **3. Composition biochimique des farines**

#### **3.1. Teneur en eau**

La teneur en eau (TE) a été déterminée à 105 °C au moyen d'un analyseur d'humidité automatique (Mod. MAC 110/NP; Radwag Wagi Elektroniczne, Radom, Pologne).

#### **3.2. Taux de cendres**

La teneur en matière minérale des farines est déterminée par incinération d'une prise d'essai de 3 à 5 g de farine à 550 °C suivant la méthode AACC (1995), dans un four à moufle.

La minéralisation est poursuivie jusqu'à combustion totale de la matière organique. La teneur en cendres (TC ; exprimée en%) est la masse de produit restant après incinération rapportée à la matière sèche totale du produit.

#### **3.3. Teneur en protéines**

La teneur en protéines (N) a été déterminée conformément à la méthode AACC 46-11.02 (AACC, 2000), basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  par l'action oxydative de l'acide sulfurique fumant sur la matière organique en présence d'un catalyseur.

Une prise d'essai de 1 g d'échantillon est introduite dans un matras de Kjeldahl, puis 20 ml d'acide sulfurique pur et une pincée de catalyseur de minéralisation y sont ajoutés. La minéralisation se fait sur une rampe électrique en trois phases : une première phase à une température de 180 °C pendant 2 heures, une seconde phase à une température de 280 °C pendant 15 minutes et une phase finale à une température de 420 °C pendant 45 minutes. La minéralisation permet l'oxydation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale (sulfate d'ammonium).

Dans l'appareil à distiller semi-automatique, le contenu du matras de Kjeldahl est additionné de lessive de soude (NaOH).

L'ammoniaque dégagée se combine instantanément avec la vapeur d'eau pour donner l'hydroxyde d'ammonium. Celui-ci, entraîné par la vapeur, se condense dans le réfrigérant et est finalement récupéré dans une solution d'acide borique (4%).

L'ammoniaque récupéré sous forme de borate d'ammonium est titré par de l'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,01N) en présence de l'indicateur coloré. Ce dernier est un mélange de bleu de

méthylène et de rouge de méthyle (3%). La titration s'achève au virage du milieu du vert au violet.

Le volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versé correspond à l'ammonium contenu dans le tube de départ. Le pourcentage d'azote (N) dans la matière sèche est enfin déduit de la formule suivante :

$$Nt = \frac{(V1 - V0) \times N \times 14}{1000 \times m} \times 100$$

V<sub>1</sub> : volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilisé pour la titration de l'échantillon (mL) ;

V<sub>0</sub> : volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nécessaire à la titration du blanc (mL) ;

m : masse de l'échantillon (g) ;

14 : masse atomique de l'azote.

Le coefficient de conversion de l'azote en protéines totales (PT) est de 6,25.

### **3.4.Teneur en lipides extractibles**

La teneur en lipides (TL) a été réalisée selon la méthode « Soxhlet » normalisée par AFNOR (NF ISO 8262-3, 2006), en utilisant l'éther diéthylique comme solvant. Le dosage des lipides est réalisé en suivant le même protocole décrit précédemment (partie 2, § 2.1.2).

### **3.5.Teneur en fibres brutes**

La teneur en fibres des farines de gland a été déterminée en utilisant la procédure AOAC 991- 43 (1995), basée sur une combinaison de méthodes enzymatique et gravimétrique.

Une prise d'essai de 0,5 g d'échantillons a été soumise à une digestion enzymatique séquentielle par l' $\alpha$ -amylase thermostable, la protéase et l'amyloglucosidase pour éliminer les protéines et l'amidon présents dans l'échantillon.

A chaque échantillon digéré, 225 ml d'éthanol ont été ajoutés pour précipiter les fibres solubles. Les résidus sont ensuite filtrés, lavés avec de l'éthanol et l'acétone et séchés à l'étuve à 105 °C pendant 24 h.

Après séchage à l'étuve, les résidus fibreux sont pesés. Les teneurs en protéines résiduelles et en cendres sont déterminées sur les résidus fibreux : une moitié du résidu a été utilisée pour la détermination du taux de cendres par incinération dans un four à moufle pendant 5 heures à 525 °C et l'autre moitié a servi à la détermination des protéines résiduelles.

Le taux de fibres (TF) exprimé en gramme pour 100 g de matière sèche dans les échantillons de gland a été déterminé par la différence entre le poids du résidu sec et celui des protéines résiduelles et des cendres.

$$TF = \frac{[m_1 - (P + C)]}{m_0} \times 100$$

Où :

$m_1$  : masse du résidu;

P : masse des protéines résiduelles;

C : masse des cendres ;

$m_0$  : masse de la prise d'essai.

### **3.6. Teneur en glucides totaux**

La teneur en glucides totaux (TG) en g pour 100 g de matière sèche est calculée par différence:

$$TG = 100 - (TE + TC + PT + TL + TF)$$

Où:

TE : teneur en eau ;

TC : teneur en cendres ;

PT : teneur en protéines totales ;

TL : teneur en lipides totaux ;

TF : teneur en fibre.

## **4. Propriétés antioxydantes des farines**

### **4.1. Détermination des composés phénoliques**

#### **4.1.1. Extraction des composés phénoliques**

L'extraction des polyphénols à partir des farines des glands a été réalisée selon la méthode décrite par Difonzo *et al.* (2017) avec quelques modifications.

Approximativement, 5 g d'échantillon ont été ajoutés à 50 ml d'éthanol/eau (30 : 70, v/v). Le mélange a été soumis à un traitement par ultrasons (CEIA, Viciomaggio, Italy) pendant 35 minutes à la température ambiante. Les extraits obtenus ont été filtrés sur du papier filtre Whatman (GE Healthcare, Milan, Italie), puis ils ont été filtrés avec des filtres en nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich) et utilisés pour la caractérisation chimique.

Les extraits ont été analysés pour déterminer les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

#### **4.1.2. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée selon le protocole cité par Singleton et Rossi (1965) avec les modifications rapportées par Squeo *et al.* (2016 ; 2017).

Le dosage des polyphénols totaux de la farine de gland a été effectué selon les mêmes étapes opératoires citées auparavant (partie 2, §1.2.1.2), en utilisant le réactif du Folin-Ciocalteu et une courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $R^2 = 0,9979$ ).

La teneur en composés phénoliques totaux a été exprimée en mg équivalents d'acide gallique par 100 g de matière sèche (mg GAE/100g).

#### **4.1.3. Dosage des flavonoïdes**

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée par une méthode colorimétrique selon Cosmai *et al.* (2013) en utilisant le réactif de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et la catéchine comme standard ( $R^2 = 0,999$ ) comme cité précédemment (partie 2, §1.2.1.3).

Les résultats ont été exprimés en mg de catéchine équivalent par 100 g de matière sèche (mg CE/100g).

#### **4.2. Détermination de l'activité antioxydante**

L'activité antioxydante des extraits phénoliques de la farine de gland a été évaluée sur la base de leur capacité à piéger les radicaux  $ABTS^+$  et  $DPPH^+$  selon la méthode citée par Difonzo *et al.* (2017) et en suivant le même protocole décrit précédemment (partie 2, §1.3). Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  de matière sèche.

### **5. Elaboration des biscuits**

#### **5.1. Formules à tester pour la préparation**

Après l'analyse des trois farines des espèces de *Quercus* retenues dans cette étude, nous avons choisi une seule farine pour la préparation du biscuit. Cette dernière a été choisie sur la base de sa richesse en composés antioxydants.

Le biscuit a été préparé par une substitution partielle de la farine de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) par la farine de gland. Pour la préparation et l'estimation de la qualité des biscuits, trois niveaux de substitution ont été testés :

- ✓ Un biscuit témoin à 0% de farine de gland (contrôle);

- ✓ Un biscuit à 30% de farine de gland (30 g/100 g) (Q30) ;
- ✓ Un biscuit à 60% de farine de gland (60 g/100 g) (Q60).

Ces taux de substitution ont été choisis en tenant compte des normes de spécifications techniques sur les biscuits, des objectifs nutritionnels visés et des caractéristiques organoleptiques des produits finaux.

La farine de blé tendre utilisée est une farine commerciale dont la composition est représentée dans le tableau 32.

**Tableau 27.** Composition moyenne de la farine de blé tendre (pour 100g)

<b>Ingrédients</b>	<b>Composition</b>
Teneur en eau	12,7
Lipides (g)	1,1
Protéines (g)	10,8
Glucides (g)	72,7
Fibres (g)	2,5
Cendres (g)	0,5

## **5.2. Protocole de préparation**

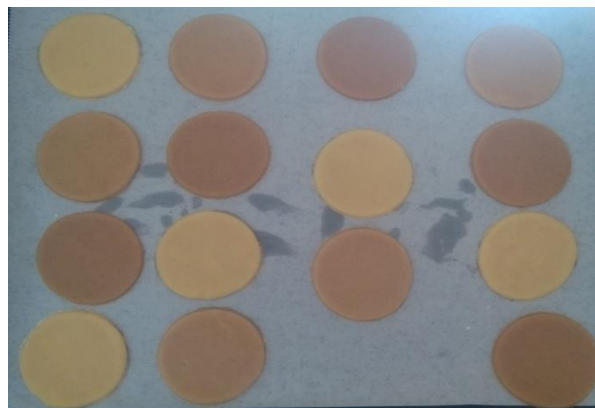
En plus de la farine, les autres ingrédients utilisés pour l'élaboration du biscuit, comme le sucre (saccharose) et l'huile d'olive extra vierge, ont été achetés chez des détaillants locaux.

La recette de préparation de biscuit utilisée (développée par le laboratoire « DI.S.S.P.A » université Bari, Italie) a été mise au point lors des études précédentes visant à optimiser les quantités des différents ingrédients et leur mélange (Pasqualone *et al.*, 2014).

Le procédé consiste à : i) mélanger de la farine (100 g ; soit 100 g de farine de blé : biscuit témoin ; soit 30 g de gland et 70 g de blé tendre : biscuit Q30 ; soit 60 g de gland et 40 g de blé tendre : biscuit Q60 ) , le sucre (35 g) et l'huile d'olive extra vierge (14 ml) par un malaxeur à spirale pendant 7 min ; ii) ajouter de l'eau (25 ml) et pétrir pendant 10 min pour former une pâte lisse et homogène; et iii) étaler la pâte à l'aide d'un rouleau à pâtisserie sur une épaisseur de 6 mm, façonner des biscuits ronds (4,5 cm de diamètre) et cuire au four électrique (four Smeg SI 850 RA-5, Smeg SpA, Guastalla, Italie) pendant 15 min à 160 °C.

Avant la cuisson, les biscuits ont été placés dans un plateau en métal selon un schéma à blocs aléatoire (Figure 34), de sorte que les trois types de biscuits considérés rencontraient les mêmes sources de variabilité afin de minimiser l'effet de leur emplacement (effets de bord).

C	Q30	Q60	Q30
Q30	Q60	C	Q60
Q60	C	Q30	C
C	Q30		Q60



**Figure 27.** Arrangement des biscuits crus dans le plat à four

C : contrôle ; Q30 : biscuit avec 30% de la farine de *Quercus* ; Q60 : biscuit avec 60% de la farine de *Quercus*

Les biscuits ont été finement broyés pour toutes les analyses à l'exception des déterminations sensorielles, texturales et colorimétriques.

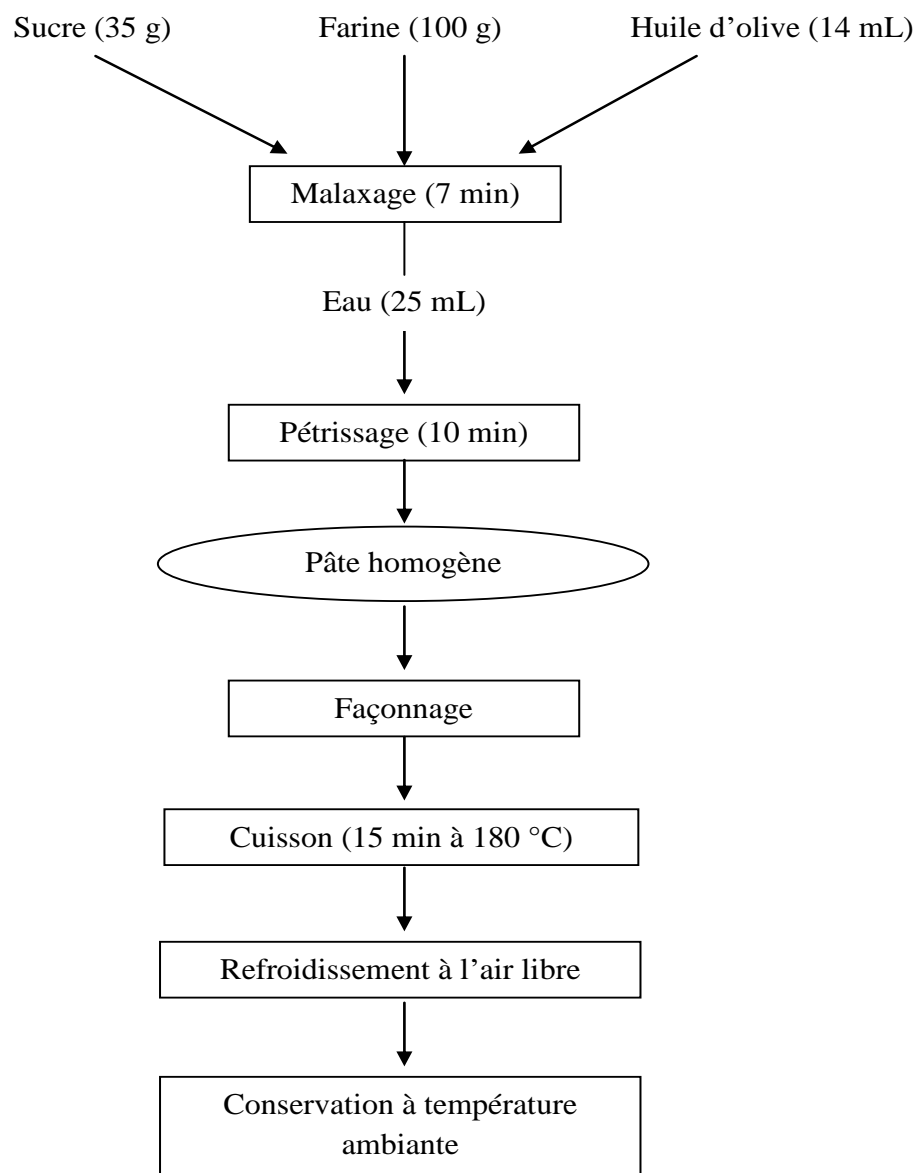
Le tableau 33 récapitule les différents ingrédients utilisés pour la préparation des biscuits.

**Tableau 28.** Liste des ingrédients incorporés dans les biscuits formulés

Ingrédients	Contrôle	Q30	Q60
Farine de blé tendre (g)	100	70	40
Farine de gland (g)	-	30	60
Sucre (g)	35	35	35
Huile d'olive (ml)	14	14	14
Eau (ml)	25	25	25

Q30 : biscuit avec 30% de la farine de *Quercus* ; Q60 : biscuit avec 60% de la farine de *Quercus*.

La figure 35 résume les différentes étapes de préparation des biscuits.



**Figure 28.** Diagramme adopté pour la préparation des biscuits

## **6. Tests d'appréciation des biscuits formulés**

### **6.1. Caractérisation physique des biscuits formulés**

#### **6.1.1. Activité de l'eau**

La mesure de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) des biscuits a été effectuée, après les avoir broyés, en utilisant un awmètre (AQUALAB Dew Point 4T).

L'échantillon remplissant une coupelle en plastique, est placé dans l'enceinte de mesure de l'appareil thermostaté à température fixée (25°C) jusqu'à établissement d'un équilibre entre l'air de la cellule et l'échantillon : l'humidité relative de l'air égale à l' $a_w$  de l'échantillon est donnée par un capteur capacitif.

#### **6.1.2. Teneur en eau**

La teneur en eau (TE) a été déterminée à 105 °C au moyen d'un analyseur d'humidité automatique (Mod. MAC 110/NP; Radwag Wagi Elektroniczne, Radom, Pologne).

#### **6.1.3. Mesure de la couleur**

Des évaluations colorimétriques de l'index rouge-vert ( $a^*$ ), de l'index jaune-bleu ( $b^*$ ) et de l'index brun ( $100-L^*$ ) ont été effectuées en utilisant un spectrocolorimètre CM-700d (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japon) comme décrit précédemment (§ 2.2.1).

#### **6.1.4. Détermination des caractéristiques dimensionnelles**

Les caractéristiques physiques des biscuits, avant et après la cuisson, ont été mesurées en termes d'épaisseur et de diamètre avec un calibre. Les valeurs mesurées ont été utilisées pour calculer les grandeurs suivantes :

- ✓ Augmentation du diamètre après cuisson = (diamètre après cuisson – diamètre avant cuisson) / diamètre avant cuisson x 100;
- ✓ Augmentation de l'épaisseur après cuisson = (épaisseur après cuisson – épaisseur avant cuisson) / épaisseur avant cuisson x 100;
- ✓ Facteur d'expansion (Augmentation en surface) = (surface des biscuits après la cuisson – surface des biscuits avant la cuisson) / surface des biscuits avant cuisson x 100 ;
- ✓ Rapport de propagation après la cuisson = diamètre après la cuisson / épaisseur après la cuisson.



Ces grandeurs ont été déterminées conformément à la méthode AACC 10-50.05 (2000). Six biscuits ont été analysés pour chaque paramètre.

#### **6.1.5. Texture**

La texture est l'ensemble des propriétés rhéologiques et structurales perceptibles par les récepteurs mécaniques, tactiles, visuels et auditifs.

Les propriétés texturales des biscuits, en termes de force de rupture ( $\text{N}/\text{mm}^2$ ) ont été déterminées par un test de flexion en trois points à température ambiante, en utilisant un texturomètre Zwick (Z1.0 TN, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Allemagne) selon la méthode AACC 76-21.01 (2000).

Le test de flexion est utilisé pour les matériaux durs mais aussi fragiles, tout comme les biscuits, pour lesquels les tests de compression ou de traction ne sont pas utiles. Dans le test de flexion en trois points, il y a deux points d'appui sous l'échantillon et un point au-dessus de l'échantillon dans lequel une force de pression est appliquée (Figure 36). En pratique, dans le test de flexion, la partie supérieure est comprimée alors que la partie inférieure est tendue (Bensel *et al.*, 2018).

Les biscuits étudiés ont été placés, avec leur surface supérieure vers le bas, sur deux supports de 5 mm de diamètre, distants de 4 cm. Pour la détermination de la résistance à la flexion, la vitesse de test a été maintenue à une vitesse constante de 5 mm/min.

Un piston a été utilisé pour appliquer une force verticale allant jusqu'à 2 kN au centre des biscuits. Le mouvement à la baisse s'est poursuivi jusqu'à la rupture du biscuit. La force maximale nécessaire pour casser le biscuit est exprimée en  $\text{N}/\text{mm}^2$ . Pour chaque type d'échantillon, sept biscuits ont été testés.

L'analyse des données obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel de test Xpert II (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Allemagne).



**Figure 29.** Test de flexion en trois points par texturomètre Zwick

## **6.2. Propriétés antioxydantes des biscuits**

L'extraction des polyphénols à partir des biscuits, après les avoir broyés, a été réalisée selon la méthode décrite par Difonzo *et al.* (2017) comme décrit précédemment (§ 2.4.1.1).

Le dosage de polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué respectivement par les méthodes de Folin Ciocalteu et de chlorure d'aluminium selon les mêmes protocoles cités auparavant.

L'évaluation de la capacité antioxydant des extraits phénoliques des biscuits a été réalisée par les deux testes ABTS et DPPH selon la même méthode citée précédemment.

## **6.3. Etude de la stabilité oxydative des biscuits**

La stabilité à l'oxydation des biscuits, à savoir la stabilité de leur fraction lipidique, a été évaluée par un test accéléré, en le soumettant à des conditions de température et de pression élevées.

Le temps d'induction (IT), de trois types de biscuit étudiés, a été déterminé à l'aide d'un instrument de stabilité à l'oxydation : « Rapidoxy » (Anton Paar, Blank enfelde-Mahlow, Allemagne) dans les mêmes conditions opératoires citées auparavant (partie 2, § 4.2.4).

#### **6.4. Analyse des composés volatils des biscuits**

La fraction volatile, responsable de la saveur et l'arôme des biscuits, a été analysée par la technique de micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME) couplée à une chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (GC / MS) comme décrit auparavant (partie 2, § 3.3).

#### **6.5. Analyse sensorielle des biscuits**

L'évaluation de la qualité organoleptique des biscuits est faite par analyse sensorielle. Les biscuits formulés sont appréciés par un test descriptif quantitatif comme décrit par Pasqualone *et al.* (2011). Ce test est réalisé sur un panel constitué de 8 dégustateurs formés, âgés de 20 à 60 ans, comprenant des enseignants, du personnel technique et des étudiants du Département des Sciences du Sol, des Plantes et de l'Alimentation, Université de Bari, Italie.

Les trois types de biscuit, identifiés par un code alphanumérique et placés dans des assiettes en plastique, ont été évalués à deux reprises.

Les descripteurs des propriétés organoleptiques retenus pour l'évaluation des biscuits sont : l'aspect visuel (couleur), la texture (friabilité), l'odeur et le goût et des attributs de texture perçus dans la bouche (sécheresse, astringence, grain) (Tableau 34).

Les panélistes ont évalué l'intensité de chaque descripteur avec une échelle de notation allant de 0 à 9 (0 : minimum; 9 : intensité maximale) dans la fiche d'évaluation présentée dans l'annexe 12.

Ce test est complété par un test de classement dans lequel les dégustateurs ont à classer les trois types de biscuit par ordre de préférence de 1 à 3, pour déterminer l'acceptabilité des biscuits.

**Tableau 29.** Descripteurs sensoriels décrivant la texture et l'aspect général des biscuits formulés

<b>Sensation</b>	<b>Descripteur</b>	<b>Définition</b>
Aspect visuel	Couleur des biscuits	Nuance de couleur (du foncé au clair)
Olfactive	Odeur	Intensité de l'odeur du son Intensité de l'odeur du caramel
En bouche	Goût	Perception plus ou moins intense du goût sucré et amer ;
	Sécheresse	Sécheresse perçue à la surface du biscuit ;
	Granulosité	Perception granuleuse à la fin de la mastication
Texture	Friabilité	Capacité des biscuits de se casser entre les doigts, produisant des miettes

## **7. Analyse statistique**

Les déterminations chimiques ont été effectuées en triple, tandis que les évaluations colorimétriques ont été effectuées avec cinq répétitions.

Une analyse de variance à un facteur (ANOVA), suivie du test Tukey HSD pour les comparaisons multiples ont été effectuées à l'aide du logiciel XLStat (Addinsoft SARL, New York, NY, USA). Les différences significatives ont été déterminées à  $p \leq 0,05$ .

## Chapitre II : Résultats et discussion

L'ensemble des résultats de la caractérisation physico-chimique des farines de glands est représenté dans ce chapitre. Elle regroupe également les résultats relatifs à l'aptitude technologique de ces farines par le biais de l'élaboration d'un biscuit composite de farine de blé tendre et de farine de gland puis l'appréciation de ses qualités nutritionnelle et organoleptique.

### 1. Caractéristiques physico-chimiques des farines

Nous rappelons que l'objectif de cette évaluation est de caractériser les farines issues de trois espèces de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. suber* et *Q. coccifera*) en mettant en valeur la farine la plus appropriée, du point de vue nutritionnel, pour la préparation de biscuit.

#### 1.1. Propriétés physiques

##### 1.1.1. Granulométrie

La granulométrie est une caractérisation fondamentale des farines. Elle permet d'avoir une idée sur la finesse des particules et permet de prévoir son comportement lors de l'hydratation (Godon et Loisel, 1997).

Les résultats de la classification granulométrique ont permis de séparer cinq fractions caractéristiques des farines exprimées en pourcentage massique (Tableau 35).

**Tableau 30.** Granulométrie des farines de gland (en % de la masse)

Type de farines	Taille des particules (%)					Total
	300-425 µm	212-300 µm	150-212 µm	106-150 µm	<106 µm	
<i>Q. ilex</i>	1,43	9,20	17,74	64,70	5,41	98,48
<i>Q. suber</i>	2,08	6,31	23,37	61,90	4,15	97,81
<i>Q. coccifera</i>	0,66	6,34	19,90	67,44	3,52	97,86

Les différentes farines étudiées sont principalement constituées de particules de diamètre inférieur à 212 µm. Ces résultats concordent avec la norme Codex Stan pour la farine de blé établie par Codex Alimentarius (1995), selon laquelle l'appellation « farine » désigne tout broyat de granulométrie inférieur à 212 µm. Les deux classes granulométriques 212 µm et 150 µm constituent pour les trois échantillons de gland la grande proportion de farine. Les trois farines de

gland sont très proches dans leur répartition granulométrique, et la farine de *Q. suber* présente la farine la plus fine avec un pourcentage de 87,34 %.

### 1.1.2. Couleur

L'aspect, principalement la couleur, est un attribut important de la qualité des farines, ce qui affecte la commercialisation de la farine et l'acceptabilité des produits (Moorthy, 2002). Les coordonnées  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  et IB des farines de gland, ainsi que ceux de la farine de blé tendre utilisée, sont regroupées dans le tableau 36.

**Tableau 31.** Paramètres de couleur de farines de gland

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>	Farine de blé
$L^*$	62,08 ± 0,07 <sup>c</sup>	62,45 ± 0,00 <sup>b</sup>	62,62 ± 0,06 <sup>a</sup>	89,77 ± 0,57
$a^*$	5,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,92 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,01 ± 0,01 <sup>b</sup>	-0,50 ± 0,02
$b^*$	21,73 ± 0,09 <sup>b</sup>	22,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	20,74 ± 0,06 <sup>c</sup>	10,35 ± 0,01
IB (100- $L^*$ )	37,92 ± 0,07 <sup>c</sup>	37,55 ± 0,00 <sup>b</sup>	37,38 ± 0,07 <sup>a</sup>	10,23 ± 0,57

$L^*$  : clarté ou luminosité ;  $a^*$  : indice rouge-vert ;  $b^*$  : indice jaune-bleu ; IB = Indice Brun.

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  entre les trois espèces

Les valeurs de  $L^*$  représentent l'éclat de la farine. Plus la valeur de  $L^*$  est élevée, plus la farine est claire. Comme l'indique le tableau 36, les trois farines de glands sont dans la zone claire, avec des valeurs de luminosité ( $L^*$ ) supérieures à 50 (Pereira *et al.*, 2013). Dans les trois cas, les valeurs de  $a^*$  sont positives, indiquant ainsi la prédominance de la couleur rouge sur le vert. La coordonnée  $b^*$  suppose également que les valeurs positives et relativement élevées indiquent une forte prédominance de la coloration jaune, en défaveur du bleu. Des valeurs élevées de l'indice brun IB ont été également obtenues, ce qui indique une forte coloration brune des farines de gland. Pour tous les paramètres mesurés de la couleur, des différences significatives ont été observées entre les trois espèces de glands retenues.

Par comparaison à la farine de blé tendre (témoin), les résultats montrent que celle-ci est plus claire ( $L^* = 89,77$ ) et moins brune (IB = 10,23) que les farines de gland. De même, les faibles valeurs de  $a^*$  et  $b^*$  de la farine de blé tendre ne reflètent pas son brunissement.

Pasqualone *et al.* (2015) ont montré que les indices de couleur reflètent la teneur en composés bioactifs. Par conséquent, la coloration brune des farines de gland est due à leur richesse en

composés bioactifs tels que les phénols qui sont généralement responsables du brunissement (Moorthy, 2002).

## 1.2. Composition biochimique des farines

Les teneurs moyennes en nutriments majeurs (en % de la masse sèche) des trois farines de glands testées pour l'élaboration du biscuit sont récapitulées dans le tableau 37.

**Tableau 32.** Composition biochimique des farines de gland en % de matière sèche

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
Teneur en eau (%)	8,32 ± 0,54 <sup>a</sup>	7,87 ± 0,05 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,66 <sup>c</sup>
Lipides (%)	7,78 ± 0,075 <sup>c</sup>	8,55 ± 0,07 <sup>b</sup>	8,88 ± 0,003 <sup>a</sup>
Protéines (%)	3,06 ± 0,18 <sup>b</sup>	3,28 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,45 ± 0,45 <sup>a</sup>
Cendres %	1,68 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,00 <sup>c</sup>
Fibers (%)	11,24 ± 1,09 <sup>a</sup>	7,72 ± 2,27 <sup>b</sup>	7,08 ± 0,57 <sup>b</sup>
Glucides totaux %	69,59 ± 1,21 <sup>b</sup>	72,58 ± 2,26 <sup>a</sup>	72,37 ± 0,47 <sup>a</sup>

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  entre les trois espèces

La teneur en eau est un paramètre crucial dans le stockage de farines. En effet, une teneur en eau des farines élevée (supérieure à 12 %) peut entraîner une prolifération microbiennes et une activité enzymatique pouvant détériorer la valeur nutritionnelle et la qualité organoleptique du produit. La teneur en eau des farines de gland étudiées est comprise entre 7,2 et 8,32 %. Cette teneur pourrait permettre ainsi une bonne tenue lors du stockage (Sriroth *et al.*, 2000). Des différences significatives ont été observées entre les trois espèces de glands retenues.

La teneur en lipides des farines de glands varie entre 7,78 et 8,88 %. Elle est légèrement plus élevée dans la farine de *Q. coccifera* que dans les farines de *Q. ilex* et *Q. suber*. Il faut tenir compte du fait que la graisse de gland a un profil d'acide gras nutritionnellement intéressant, comme indiqué précédemment (partie 2, § 7.3). De même, des différences significatives ont été observées entre les trois espèces de glands retenues.

La fraction protéique, dans ses aspects qualitatif et quantitatif, est un élément déterminant dans la qualité biscuitière des farines ainsi que dans la valeur alimentaire du produit fini (biscuit). A la lumière des résultats répertoriés dans le tableau 37, les teneurs en protéines obtenues sont généralement faibles, comprises entre 3,06 et 4,45 %. Plusieurs auteurs notamment Menard *et al.*

(1992) et Charun et Morel (2001) ont montré que dans le cas d'une farine biscuitière le taux des protéines ne doit pas dépasser les 12 %. Comparativement à ces résultats on peut dire que la farine de gland étudiée a une teneur en protéines acceptable et peut être utilisée en biscuiterie. Par contre, cette teneur en protéine reste inférieure au minimum (7 %) fixé par le Codex Alimentarius (1995).

Des différences significatives ont été observées entre *Q. coccifera* et les deux autres espèces de glands retenues qui ont enregistré des teneurs en protéine plus faible.

Le taux de cendres représente les résidus inorganiques restant après l'incinération de la matière organique de la farine. C'est le contenu total en minéraux (Harbers, 1998). Une faible teneur en cendres d'une farine est considérée comme un caractère de pureté (Godon et Willm, 1991 ; Doukani, 2015). D'après les résultats du tableau 37, les farines de gland présentent des taux de cendres compris entre 1,45 et 1,68 %, qui se rangent dans l'intervalle donné par Menard *et al.* (1992) pour une farine biscuitière. Ce taux de cendres des farines de gland revient à la proportion des enveloppes présentes dans le produit, car les glands sont plus vêtus en enveloppes (la matière minérale se concentre beaucoup plus dans les enveloppes) (Doukani, 2015). Des différences significatives ont été observées entre les trois échantillons analysés.

Les farines de gland sont caractérisées par des teneurs appréciables en fibres. Des différences significatives ont été observées entre *Q. ilex* et les deux autres espèces de glands retenues qui ont enregistré des teneurs en fibres plus faibles. Selon la littérature, de nombreux facteurs tels que la variété, le degré de maturité, les conditions de mouture et la quantité des enveloppes existante peuvent influencer la teneur en fibres (Doukani, 2015).

L'allégation nutritionnelle : « *Source de fibres* » peut être attribuée à un produit lorsqu'il contient au moins 3 g de fibres pour 100 g de produit ; et « *Riche en fibres* » lorsque le produit contient au moins 6 g de fibres pour 100 g (Règlement CE n°1924/2006). Les farines de gland ont atteint un niveau de 7 à 11,24 g/100 g de fibres, donc elles peuvent se vanter de l'attribut « *Riche en fibres* ».

Les glucides totaux, composés principalement d'amidon, sont les composants chimiques les plus importants dans les farines de gland (69,59-72,58 g/100g), tandis que les protéines et les cendres sont très peu présents. Cela montre que les farines de gland sont très énergiques.



Les teneurs en lipides, en protéines et en cendres de nos farines sont presque similaires à celles rapportées par Saffarzadeh *et al.* (1999) et de Oliveira *et al.* (2012) ; tandis que les teneurs en glucides totaux sont plus élevées que celles rapportées. La teneur en fibres des farines étudiées est relativement supérieure aux valeurs rapportées par littérature (Saffarzadeh *et al.*, 1999; Shimada, 2001).

## 2. Activité antioxydante des farines de *Quercus*

Les teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/100 g de matière sèche MS), en flavonoïdes (mg CE/100 g MS) ainsi que les résultats de l'activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET/g MS}$ ) évaluée par les tests DPPH et ABTS sont récapitulés dans le tableau 38.

**Tableau 33.** Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/100g), en flavonoïdes (mg CE/100g) et activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET/g}$ ) des huiles de *Quercus*

Paramètres	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. coccifera</i>
CPT	691,03 $\pm$ 5,96 <sup>c</sup>	785,85 $\pm$ 7,61 <sup>b</sup>	1017,39 $\pm$ 22,37 <sup>a</sup>
FT	102,52 $\pm$ 8,33 <sup>b</sup>	63,30 $\pm$ 9,73 <sup>c</sup>	119,40 $\pm$ 6,12 <sup>a</sup>
DPPH	25,53 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	33,06 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	42,56 $\pm$ 2,47 <sup>a</sup>
ABTS	17,20 $\pm$ 1,15 <sup>c</sup>	31,96 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	35,21 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>

CPT : Composés phénoliques totaux; FT: Flavonoïdes totaux. Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  entre les trois espèces et pour le même paramètre.

### 2.1. Composés phénoliques

Le contenu phénolique total (mg GAE/100g MS) est appréciable dans les trois farines de *Quercus* étudiées (Tableau 38). Des différences significatives ont été observées entre les trois espèces de glands retenues. L'extrait de *Q. coccifera* a enregistré la teneur en polyphénols totaux la plus élevée. Tandis que l'extrait de *Q. ilex* a enregistré la teneur en polyphénols totaux la plus faible. De manière générale, les résultats obtenus ont révélé que la farine de gland est une bonne source en composés phénoliques totaux, ce qui est en accord avec les études rapportées par d'autres auteurs (Cantos *et al.*, 2003 ; Tejerina *et al.*, 2011).

Les teneurs en flavonoïdes totaux (mg CE/100 g MS) montrent également des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les trois espèces étudiées. Comme le montre le tableau 38, les teneurs en flavonoïdes varient entre 63,30 et 119,40 mg CE/100 g MS. La teneur en flavonoïdes significativement élevée a été également obtenue chez *Q. coccifera*. De façon comparative, les

valeurs de flavonoïdes totaux obtenues sont considérablement supérieures à celles obtenues par Igueld *et al.* (2015).

## **2.2. Activité antioxydante**

Les résultats obtenus de l'activité antioxydante des farines de gland sont présentés dans le tableau 38. A la lecture de ces résultats, la capacité antioxydante s'est révélée remarquablement élevée pour les trois espèces de *Quercus*, en raison de la teneur élevée en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux.

L'analyse de l'activité antioxydante reflète une variation significative ( $p < 0,05$ ) entre les trois extraits. L'extrait de la farine de *Q. coccifera* a présenté la plus grande capacité de piégeage du radical DPPH<sup>+</sup> (42,56 g TE / g MS) et la plus importante capacité de balayage du radical ABTS<sup>o+</sup> par rapport aux deux autres farines, cela est directement lié à leur teneur significativement importante en composés antioxydants.

Au vu des résultats obtenus (Tableau 38), les farines de gland ont présenté, dans leur globalité, un bon pouvoir antioxydant et peuvent être considérées comme une bonne source en composés fonctionnels en particulier les composés phénoliques qui sont des bons contributeurs à leur résistance à l'oxydation.

## **3. Caractérisation des biscuits formulés**

A l'issue des analyses chimiques effectuées sur les trois farines de *Quercus*, la farine de *Q. coccifera*, ayant la teneur la plus importante en composés phénoliques et en fibres, a été sélectionnée pour l'élaboration de biscuits.

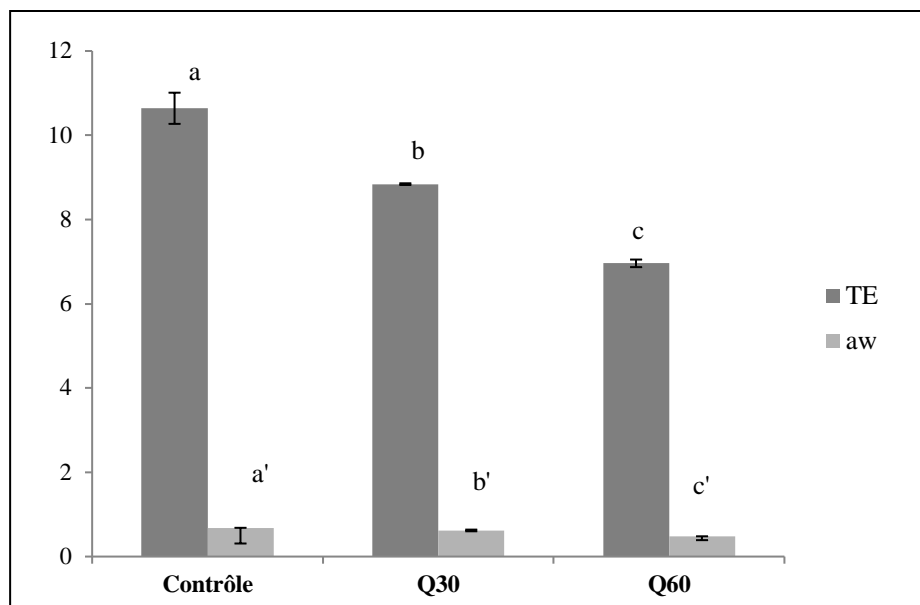
Trois essais d'élaboration de biscuits ont été réalisés par une substitution partielle de la farine de blé tendre par la farine de *Q. coccifera*, selon les formulations indiquées dans le tableau 33, et les produits finis ont été soumis à une série d'analyses à fin de les caractériser.

### **3.1. Caractérisation physique des biscuits formulés**

#### **3.1.1. Teneur en eau et activité de l'eau**

La teneur en eau des biscuits varie entre 6,96 et 10,64 g eau/100g MS avec une valeur moyenne de 8,84 g d'eau/100 g MS (Figure 37). Le biscuit témoin a montré la teneur en eau la plus élevée. Cette différence peut être liée à la nature de la matière première.

La recherche de la teneur en eau a un intérêt commercial afin de limiter la durée de stockage ou la date limite de consommation (Doukani, 2015).



**Figure 30.** Teneur en eau (TE) et activité de l'eau ( $a_w$ ) des différents biscuits formulés

Q30 : biscuit avec 30% de la farine de *Quercus* ; Q60 : biscuit avec 60% de la farine de *Quercus*.  
Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

Bien que les biscuits soient un produit relativement sec, leur activité d'eau est cruciale pour prédire à la fois la stabilité et la sécurité de ce produit en termes de croissance microbienne, réactions enzymatiques, brunissement non-enzymatique et d'oxydation des lipides (Doukani, 2015; Fradinho *et al.*, 2015).

L'activité de l'eau ( $a_w$ ) des biscuits varie de 0,48 à 0,68 (Figure 37). Les valeurs de l'activité de l'eau des biscuits à base de farine de gland sont significativement faibles par rapport à celle du témoin. Ce qui nous laisse supposé que les biscuits à base de farine de gland seraient moins exposés à la contamination d'où la possibilité de les conserver durant une longue durée (Doukani, 2015).

### 3.1.2. Caractéristiques dimensionnelles et texture des biscuits formulés

Les différents paramètres de dimension, de texture et de dureté selon le taux de substitution de la farine de gland sont présentés dans le tableau 39.

Les paramètres dimensionnels et les facteurs d'expansion lors de la cuisson des biscuits (augmentations relatives du diamètre, de l'épaisseur et de la surface, ainsi que le rapport d'étalement) sont rapportés dans tableau 39.

**Tableau 34.** Paramètres dimensionnels et propriétés texturales des différents biscuits formulés

<b>Paramètres</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Q30</b>	<b>Q60</b>
<b>Paramètres dimensionnels</b>			
A-diamètre (%)	2,19 ± 0,07 <sup>c</sup>	7,44 ± 1,65 <sup>b</sup>	14,55 ± 0,75 <sup>a</sup>
A-épaisseur (%)	45,65 ± 0,64 <sup>a</sup>	44,70 ± 2,68 <sup>a</sup>	41,60 ± 1,48 <sup>a</sup>
A-volume (%)	92,30 ± 6,10 <sup>b</sup>	113,20 ± 12,70 <sup>a</sup>	127,60 ± 33,90 <sup>a</sup>
Facteur d'expansion (%)	4,43 ± 0,15 <sup>c</sup>	19,35 ± 4,32 <sup>b</sup>	31,23 ± 2,60 <sup>a</sup>
Rapport d'étalement	3,07 ± 0,35 <sup>b</sup>	4,60 ± 0,11 <sup>a</sup>	5,04 ± 0,29 <sup>a</sup>
<b>Texture</b>			
F <sub>rupture</sub> (N/mm <sup>2</sup> )	6,00 ± 0,59 <sup>a</sup>	3,67 ± 0,44 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,11 <sup>c</sup>

A-diamètre : Augmentation du diamètre après cuisson ; A-épaisseur : Augmentation de l'épaisseur après cuisson ; A-volume : Augmentation du volume ; F<sub>rupture</sub>: friabilité.

L'analyse des résultats montre que le diamètre des biscuits a augmenté significativement avec l'augmentation du taux de la farine de gland incorporée. Le biscuit Q60 a révélé l'évolution du diamètre la plus significative (14,55 %), tandis que le biscuit témoin n'a augmenté qu'avec 2,19 % après cuisson (Figure 38).

Concernant l'épaisseur, nous avons noté l'absence de différence significative entre le témoin et les biscuits formulés (Q30 et Q60), malgré l'enregistrement de faible réduction de cette grandeur au fur et mesure de l'augmentation du taux de la farine de gland incorporée. En effet, la réduction de l'épaisseur des biscuits à base de gland, par rapport au biscuit témoin, est liée probablement à la teneur élevée en fibres alimentaires présentes dans la farine de gland qui réduisent la capacité de rétention des gaz (Pasqualone *et al.*, 2017), ce qui indique que la farine de gland conduise à la production de biscuits moins épais (Figure 38).

L'augmentation de diamètre des biscuits enrichis en farines de gland (Q30 et Q60) a entraîné une augmentation de surfaces (facteur d'expansion) de ces biscuits par rapport au témoin. L'expansion en volume, bien que significativement plus élevée dans les biscuits enrichis en

farines de glands que chez les témoins, est moins influencée par la quantité de farine de glands ajoutée, en raison de son effet réduit sur l'épaisseur.

Le rapport d'étalement (diamètre / épaisseur) est un autre indicateur physique de la qualité des biscuits. Le rapport d'étalement des biscuits à base de farines de gland a été plus élevé que dans celui du biscuit témoin.

Par conséquent, les biscuits enrichis avec la farine de gland ont présenté un bon développement par rapport au biscuit témoin, principalement en raison de l'augmentation importante de diamètre, et cela a été attribué par certains auteurs à une plus grande capacité d'hydratation des farines plus riches en fibres (Fradinho *et al.*, 2015).

Les données obtenues sont conformes à celles d'autres études sur des biscuits enrichis de divers types de fibres (Sudha *et al.*, 2007; Fradinho *et al.*, 2015).

Les changements des caractères physiques des biscuits formulés sont dus au changement de la force biscuitière de la farine. Le faible développement obtenu pour le biscuit témoin est attribuable à la force élevée du gluten, caractéristique du blé (Pasqualone *et al.*, 2015), à la faible quantité en fibres (Pasqualone *et al.*, 2017) ainsi qu'au niveau d'expansion plus faible qui ne permet pas aux biscuits de se dilater correctement (Fradinho *et al.*, 2015). Ces facteurs combinés ont eu un effet défavorable sur le rapport d'étalement des biscuits.



**Figure 31.** Présentation des différents types de biscuits  
Témoin (à gauche), Q30 (au centre) et Q60 (à droite)

La mesure de la friabilité des biscuits a été réalisée au moyen d'un test de flexion en trois points «test d'accrochage» jusqu'à la rupture, simulant la force de rupture exercée lors de la mastication. La force nécessaire pour casser les biscuits ( $F_{\text{rupture}}$ ), étant plus faible pour les biscuits plus

friables, a été significativement plus importante dans les biscuits témoins et diminue progressivement à mesure que le niveau de farine de gland incorporée augmente (Tableau 39).

De façon globale, la dureté des biscuits diminue avec l'augmentation du taux de substitution de la farine de gland, le biscuit à 60 % de farine de gland a été le biscuit le plus friable tandis que le biscuit témoin a été le plus dure. Cela peut être dû à la faible teneur en protéines de la farine de gland par rapport à la farine de blé tendre.

La dureté est la propriété texturale qui attire davantage l'attention dans l'évaluation des produits. Selon Fradinho *et al.* (2015), la dureté des biscuits peut être attribuée à leur teneur en protéines.

En effet, la farine de gland est moins riche en protéines, et sa substitution avec la farine de blé tendre dilue et affaiblit la matrice de gluten, aboutissant ainsi à une diminution de la dureté des biscuits (Fradinho *et al.*, 2015). Dans la même tendance, Fustier *et al.* (2009) ont montré que la fermeté des biscuits augmente avec le contenu en protéines.

### **3.1.3. Couleur des biscuits**

La couleur des biscuits est un attribut de qualité très important qui influence leur acceptation par les consommateurs. Elle est le seul paramètre que le consommateur puisse évaluer lors de la sélection d'un produit sur le marché (Carini *et al.*, 2009).

Les paramètres de couleur (Tableau 40) varient significativement avec le type du biscuit. La valeur  $L^*$  est une mesure de la luminosité de la surface du biscuit. Comme le montre le tableau 41, elle diminue avec l'augmentation des niveaux de substitution. Le biscuit témoin a présenté la plus grande brillance par rapport aux biscuits à base de gland.

La valeur  $b^*$ , qui indique la couleur jaune, a progressivement diminué avec l'augmentation du niveau de substitution. L'ajout de farine de gland a également entraîné une augmentation significative des indices de rouge  $a^*$  et de brun ( $100-L^*$ ).

En comparant la couleur des biscuits (Tableau 40) avec la couleur des farines de départ rapportées dans le tableau 36, on observe une augmentation significative de tous les indices colorimétriques.

**Tableau 35.** Paramètres de couleur des différents biscuits formulés

Paramètres	Contrôle	Q30	Q60
$L^*$	79,24±1,96 <sup>a</sup>	53,02±1,26 <sup>b</sup>	44,11±2,18 <sup>c</sup>
$a^*$	0,17±0,31 <sup>c</sup>	8,32±0,41 <sup>b</sup>	11,04±0,56 <sup>a</sup>
$b^*$	26,23±1,14 <sup>a</sup>	24,87±0,36 <sup>b</sup>	23,66±0,64 <sup>b</sup>
IB (100- $L^*$ )	20,76±1,96 <sup>c</sup>	46,98±1,26 <sup>b</sup>	55,89±2,18 <sup>a</sup>

$L^*$  : clarté ou luminosité ;  $a^*$  : indice rouge-vert ;  $b^*$  : indice jaune-bleu ; IB = Indice Brun.

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  entre les biscuits formulés

La cuisson des biscuits a affecté leur luminosité (valeurs  $L^*$ ) dans les deux niveaux de substitution 30 % et 60 %. Le processus de cuisson n'a pas d'influence sur la brillance des biscuits témoins, mais celle-ci diminue de manière significative dans les biscuits à base de farine de gland et notamment le biscuit Q60. Ceci indique la présence d'une couleur plus brune (100- $L^*$ ) pour les biscuits, à cause de l'effet de la caramélisation et des réactions de Maillard produites au cours de la cuisson (Pereira *et al.*, 2013 ; Pasqualone *et al.*, 2014).

De même, Korus *et al.* (2015) ont également signalé un effet de brunissement important de l'ajout de farine de gland dans du pain sans gluten.

L'augmentation significative de la rougeur (indice  $a^*$ ), observée dans les biscuits à base de gland (Q30 et Q60) par rapport au témoin, est due à la pigmentation rouge résultant des réactions de brunissement et de Maillard (Pereira *et al.*, 2013).

Outre l'influence des réactions de Maillard et de caramélisation qui se produisent pendant le processus de cuisson, la couleur des biscuits a été nettement influencée par les composés phénoliques présents dans la farine de gland. En effet, les produits d'oxydation et de dégradation des polyphénols ont rendu les valeurs  $a^*$  et IB (100-  $L^*$ ) des biscuits à base de gland beaucoup plus élevées que celles du témoin (Pasqualone *et al.*, 2014).

### 3.2. Activité antioxydante des biscuits

Le tableau 41 présente les teneurs moyennes des polyphénols totaux (mg GAE/ 100 g MS) et des flavonoïdes (mg CE/100g) et les résultats de l'activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET/g MS}$ ) des biscuits formulés.

**Tableau 36.** Teneurs moyennes en polyphénols totaux (mg GAE/100g), en flavonoïdes (mg CE/100g) et activité antioxydante ( $\mu\text{mol ET/g}$ ) des biscuits formulés

<b>Paramètres</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Q30</b>	<b>Q60</b>
CPT	28,19±0,76 <sup>c</sup>	142,97±8,8 <sup>b</sup>	291,91±2,5 <sup>a</sup>
FT	1,31±0,83 <sup>c</sup>	9,63±0,63 <sup>b</sup>	27,77±1,41 <sup>a</sup>
DPPH	0,55±0,42 <sup>c</sup>	3,43±0,02 <sup>b</sup>	8,04±0,26 <sup>a</sup>
ABTS	0,23±0,01 <sup>c</sup>	3,17±0,08 <sup>b</sup>	9,15±0,37 <sup>a</sup>

Les différentes lettres en exposant indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  entre les biscuits formulés

La substitution de la farine de blé tendre par la farine de gland a permis d'augmenter de manière significative les teneurs en composés phénoliques (polyphénols et les flavonoïdes totaux) dans les biscuits formulés. Le biscuit Q60 a été significativement plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que le biscuit Q30 et le témoin. En absence de la farine de gland, la présence de composés phénoliques dans le biscuit témoin peut être due à la contribution de l'huile d'olive extra vierge. Cependant, une baisse importante de ces composés a été observée dans les biscuits formulés par rapport à leurs farines. La perte en composés phénoliques dans les biscuits à base de gland formulés est d'environ 47 %. Cette diminution est due aux réactions d'oxydation liées au malaxage et aux dégradations thermiques (la cuisson) (Sadilova et Stintzing, 2007; Pasqualone *et al.*, 2014).

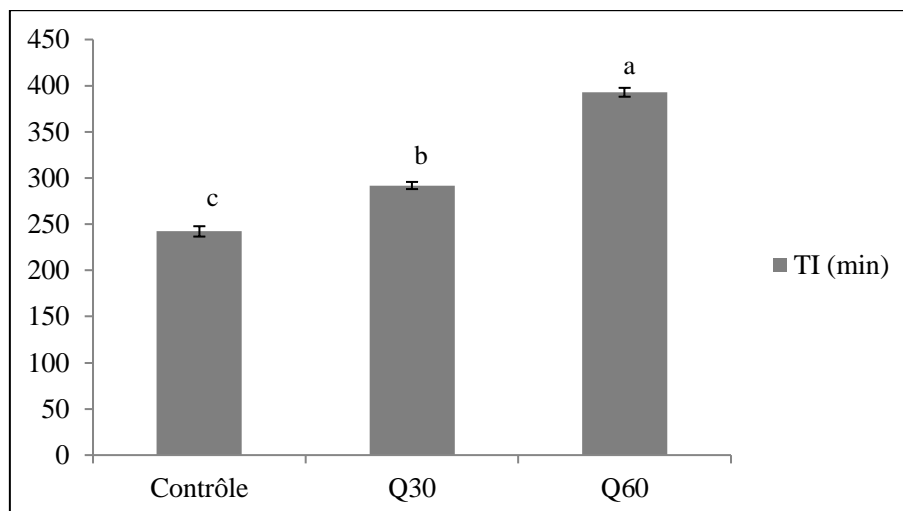
Les quantités appréciables de composés phénoliques extraits de biscuit à base de gland ont eu une influence positive sur l'activité antioxydante des biscuits formulés. Ils ont montré une activité antioxydante significativement supérieure à celle des biscuits témoins, comme en témoignent les tests ABTS et DPPH. L'activité antioxydante observée dans les biscuits témoins est attribuée à la qualité élevée de l'huile d'olive extra vierge utilisée.

Les résultats obtenus ont mis en évidence les effets positifs de l'utilisation de la farine de gland dans l'élaboration de biscuits. L'effet positif s'est manifesté par une activité antioxydante et une teneur en composés phénoliques plus élevée des biscuits à base de gland par rapport aux biscuits témoins.

### **3.3. Stabilité oxydative des biscuits**

Le temps d'induction (IT) obtenus, temps nécessaire pour l'oxydation des biscuits en conditions forcées, est présenté dans la figure 39.





**Figure 32.** Résultats du test Rapidox (IT) des trois types de biscuits

A vu des résultats illustrés dans la figure 39, le temps d'induction varie de 4 h (242,23 min) pour le biscuit témoin à 6,5 h (392,86 min) pour le biscuit *Q60* avec une valeur intermédiaire de 5 h (291,91 min) pour le biscuit *Q30*. La durée d'induction augmente significativement lorsque le taux de substitution de la farine de blé tendre par la farine de gland augmente. Les biscuits à 60 % de farine de gland ont montré la plus longue période d'induction, ce qui montre une grande stabilité à l'oxydation. Des différences réduites mais significatives ont été observées entre les biscuits témoins et *Q30*.

La plus grande stabilité des biscuits *Q60* est probablement due à leur plus grande richesse en composés phénoliques, et elle conduit à une très bonne conservation des ces biscuits.

### 3.4. Profils volatils des biscuits

Les résultats relatifs aux composés volatils déterminés dans les trois types de biscuits par SPME-GC/MS sont présentés dans le tableau 42. Plusieurs composés volatils ont été séparés et identifiés dans les échantillons de biscuits, mais seuls les composés responsables des attributs sensoriels des biscuits ont été retenus.

La composition chimique de la fraction volatile varie considérablement entre les trois types de biscuits. Il ressort clairement des résultats obtenus que l'incorporation de la farine de gland a entraîné des variations significatives du nombre et du contenu de la plupart des substances volatiles identifiées.

**Tableau 37.** Profil volatil des différents types de biscuits formulés

<b>Composés</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Q30</b>	<b>Q60</b>
<b><u>Alcools</u></b>			
Ethanol	n.d.	16,28±0,16 <sup>b</sup>	24,54±3,43 <sup>a</sup>
2-Butanol	n.d.	1,79±0,73 <sup>b</sup>	11,73±0,49 <sup>a</sup>
3-méthyl-1-butanol	n.d.	1,18±0,11 <sup>a</sup>	n.d.
1-Pentanol	n.d.	1,13±0,02 <sup>a</sup>	n.d.
2-Pentanol	n.d.	n.d.	0,96±0,46
2-Heptanol	3,18±0,34 <sup>c</sup>	13,96±0,38 <sup>a</sup>	6,23±0,16 <sup>b</sup>
<b><u>Aldéhydes</u></b>			
2-méthylpropanal	2,00±0,52 <sup>a</sup>	1,93±0,12 <sup>a</sup>	2,08±0,68 <sup>a</sup>
2-méthylbutanal	2,49±0,29 <sup>b</sup>	3,43±0,44 <sup>a</sup>	4,32±0,62 <sup>a</sup>
3- méthylbutanal	4,19±0,69 <sup>b</sup>	5,66±0,47 <sup>a</sup>	7,13±1,06 <sup>a</sup>
Hexanal	6,41±0,54 <sup>a</sup>	6,20±0,53 <sup>a</sup>	4,39±0,32 <sup>b</sup>
<b><u>Cétones</u></b>			
2-Butanone	9,20±0,18 <sup>a</sup>	9,50±0,06 <sup>a</sup>	7,45±2,59 <sup>a</sup>
2-Pentanone	n.d.	5,37±0,4 <sup>a</sup>	5,26±1,04 <sup>a</sup>
<b><u>Acides carboxyliques</u></b>			
Acide pyruvique	n.d.	2,92±0,59 <sup>a</sup>	1,00±0,19 <sup>b</sup>
Acide isobutyrique	n.d.	n.d.	1,44±0,35 <sup>a</sup>
<b><u>Esters</u></b>			
Acétate d'éthyle	1,69±0,03 <sup>b</sup>	5,90±1,00 <sup>a</sup>	4,72±1,44 <sup>a</sup>
Butanoate d'éthyle	1,84±0,25 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.
Propanoate 2-méthylpropyle	n.d.	2,16±0,08 <sup>a</sup>	1,08±0,29 <sup>b</sup>
<b><u>Furanes</u></b>			
2-furancarboxaldéhyde ou furfural	4,56±0,21 <sup>b</sup>	6,37±0,38 <sup>a</sup>	7,48±0,68 <sup>a</sup>
2-furanméthanol	0,97±0,08 <sup>b</sup>	1,76±0,34 <sup>a</sup>	1,83±0,15 <sup>a</sup>
Dihydro-2 (3H) –furanone	n.d.	0,88±0,26	n.d.
<b><u>Pyrazines</u></b>			
2-Méthylpyrazine	n.d.	1,23±0,15 <sup>a</sup>	1,71±0,42 <sup>a</sup>
Pyrazine	2,03±0,06 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.

n.d : non détectable

Les biscuits à base de glands ont présenté des niveaux plus élevés d'alcools fermentatifs et de leurs esters, en particulier d'éthanol et d'acétate d'éthyle, probablement en raison d'une activité de fermentation dans la matière première. Cependant, la quantité d'hexanal, dérivé de l'oxydation des lipides, a été plus faible dans le biscuit Q60 par rapport aux autres types de biscuits, indiquant un niveau d'oxydation lipidique plus faible, ce qui concorde avec des teneurs plus élevées en composés phénoliques.

Les trois aldéhydes de strecker identifiés dans la présente étude sont le 2-méthylbutanal, le 3-méthylbutanal et le 2-méthylpropanal. Ces composés sont significativement plus abondants dans les biscuits à base de gland. Ils peuvent être dérivés des acides aminés : valine, isoleucine, leucine et phénylalanine, respectivement. Ces aldéhydes ont été précédemment identifiés dans d'autres biscuits (Mohsen *et al.*, 2009) et sont responsables de certains arômes. Les alcools et les aldéhydes détectés se caractérisent par des notes odorantes agréables (Rios et Aparicio, 1997; Pasqualone *et al.*, 2015).

Parmi les cétones, le 2-butanone est plus abondant dans les biscuits témoins que dans les biscuits à base de gland. Il provient de la dégradation de triacylglycérols par traitement thermique (Chung *et al.*, 1993; Pasqualone *et al.*, 2015). Ce composé se caractérise par une forte odeur sucrée (Pasqualone *et al.*, 2015).

Concernant les acides carboxyliques, ils ont été détectés en très faibles teneurs. Les acides carboxyliques, provenant d'une oxydation plus poussée des aldéhydes, sont responsables des mauvais goûts, tels que les odeurs de rance, d'aigre et de bois, qui peuvent compromettre l'acceptabilité du produit (Marco *et al.*, 2007; Pasqualone *et al.*, 2015).

Les esters ont été détectés en faibles quantités. L'acétate d'éthyle a été significativement l'ester le plus abondant dans les trois biscuits, alors que l'acide propanoïque, 2-méthylpropylique ester a été présent uniquement dans les biscuits à base de gland. Ces composés, lorsqu'ils sont présents en quantités élevées, peuvent avoir un impact sensoriel élevé.

Les composés furaniques ont été principalement représentés par le furfural qui est significativement plus abondant dans les biscuits à base de gland que dans le témoin. Le furfural est généralement présent dans les biscuits et a fait l'objet de plusieurs études (Mohsen *et al.*, 2009 ; Giarnetti *et al.*, 2015 ; Pasqualone *et al.*, 2014 ; 2015). Trois composés furaniques ont été identifiés dans la présente étude. Les furanes sont des composés dérivés de la réaction de Maillard et principalement associées à une odeur de caramel et de fruité (Mohsen *et al.*, 2009).

De même, les pyrazines, produits par la réaction de Maillard, ont contribué de manière limitée au profil volatil, car ils sont présents à des concentrations relativement faibles dans les trois types de biscuit. Les pyrazines ont été déjà identifiés dans les céréales traitées thermiquement en raison de leurs propriétés d'arôme de noisette grillées (Mohsen *et al.*, 2009).

De nombreuses études ont montré que les aldéhydes, les alcools, les cétones et les pyrazine sont considérés comme les composés les plus puissants pour l'arôme des biscuits (Mohsen *et al.*, 2009; Pasqualone *et al.*, 2014; Pasqualone *et al.*, 2015).

### 3.5. Analyse sensorielle

Une analyse sensorielle descriptive quantitative a été réalisée afin de définir plus en détail le profil sensoriel des biscuits formulés et aussi de mettre en évidence les différences éventuelles avec les biscuits témoins. Les données obtenues sont présentées dans le tableau 43 et la figure 40.

**Tableau 38.** Caractéristiques sensorielles des différents types de biscuits formulés

<b>Descripteurs</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Q30</b>	<b>Q60</b>
Couleur	2,3±0,1 <sup>c</sup>	5,9±0,4 <sup>b</sup>	8,1±0,8 <sup>a</sup>
Friabilité	2,5±0,2 <sup>b</sup>	4,37±1,2 <sup>a</sup>	5,4±1,1 <sup>a</sup>
Odeur du son	0,6±0,4 <sup>c</sup>	3,8±0,1 <sup>b</sup>	4,4±0,2 <sup>a</sup>
Odeur de caramel	0,5±0,3 <sup>c</sup>	2,9±0,8 <sup>b</sup>	5,7±0,8 <sup>a</sup>
Goût sucré	5,1±0,2 <sup>a</sup>	4,2±0,2 <sup>b</sup>	4,6±0,2 <sup>b</sup>
Goût amer	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Sécheresse	4,3±0,4 <sup>a</sup>	4,6±0,4 <sup>a</sup>	4,6±0,2 <sup>a</sup>
Astringence	0,0±0,0 <sup>c</sup>	0,3±0,02 <sup>b</sup>	0,7±0,1 <sup>a</sup>
Granularité	1±0,17 <sup>c</sup>	3,06±0,08 <sup>b</sup>	4,25±0,17 <sup>a</sup>
Odeur anormale	-	-	-
Goût anormal	-	-	-
Ordre de préférence	3	2	1
- non détectable			

Le profil sensoriel des biscuits a montré des différences significatives pour la plus part des descripteurs.

Les membres du panel de dégustation décrivent les biscuits à base de gland et plus particulièrement le biscuit Q60, comme un biscuit ayant une couleur et une odeur plus prononcées, avec un goût moins sucré, friable et d'une bonne acceptabilité globale.

L'analyse sensorielle de la couleur, évaluée par les dégustateurs sur une échelle allant du jaune pâle (score = 0) au brun rougeâtre (score = 9), a été en accord avec les résultats colorimétriques (Tableau 40).

L'odeur du son a été plus perceptible dans les biscuits à base de gland et presque absente dans le biscuit témoin. L'odeur du son est généralement associée à l'odeur caractéristique des produits à base de farine complète ; elle a été donc plus intense dans les biscuits à base de gland car les glands étant transformés en farine complète tandis que la farine de blé tendre utilisée dans l'élaboration des biscuits témoins a été raffinée.

L'odeur de caramel, particulièrement plus intense dans les biscuits Q60 et totalement absente dans les biscuits témoins, est due à la réaction de Maillard au cours de la cuisson.

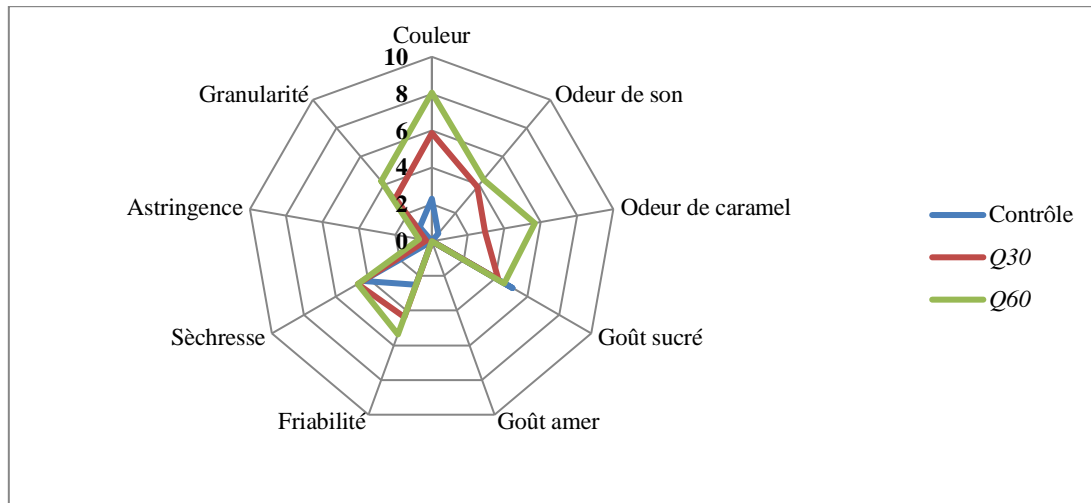
En ce qui concerne la friabilité, la faible valeur observée dans les biscuits témoins est due à la teneur en protéine élevée de la farine de blé ainsi qu'à la quantité limitée de lipides dans la formule des biscuits. Les différences de friabilité détectées par les panélistes ont confirmé les résultats de l'analyse instrumentale de la texture des biscuits (Tableau 40).

Le goût sucré des biscuits a été perçu de manière significativement plus intense dans le biscuit témoin, tandis que l'amertume a été absente dans tous les trois types de biscuits.

La caractéristique sécheresse n'a présenté aucune différence significative entre les trois types de biscuits. Les biscuits à base de glands ont présenté une granulométrie plus élevée que le témoin, c'est-à-dire qu'ils ont été plus friables. Cette friabilité est due à l'huile apportée par les glands, mais les miettes ont été granuleuses et de taille légèrement hétérogène. L'ajout de farine de gland a provoqué l'apparition d'une sensation astringente, bien que cette dernière a été notée très faible.

L'absence d'odeur et de goût anormaux dans les trois types de biscuits est due au niveau de qualité élevée de la fraction lipidique des matières premières.

Les données obtenues montrent que la substitution de la farine de blé tendre par la farine de gland a entraîné une augmentation progressive et significative de l'odeur du son et du caramel et de la couleur, tout en réduisant la perception du goût sucré.



**Figure 33.** Profil sensoriel de trois types de biscuits formulés

Les biscuits ont également fait l'objet d'un test de préférence visant à évaluer l'acceptabilité générale des biscuits à base de gland.

Les biscuits *Q30* ont une appréciation proche comparée à celle du biscuit témoin (fait uniquement à base de blé tendre). Le test de classement a montré que les panélistes ont préféré la formulation à 60 % de substitution de farine de gland (*Q60*).

## Conclusion

De la caractérisation des farines de gland, il ressort les conclusions suivantes :

Les trois farines de *Quercus* utilisées dans cette étude présentent une granulométrie répondant aux exigences de la biscuiterie.

Les coordonnées de la couleur ont montré que les farines de gland sont dans la zone claire ( $L^*$  supérieur à 50). Les valeurs positives et relativement élevées de  $a^*$  (indice rouge-vert) et  $b^*$  (indice jaune-bleu) reflètent un certain niveau de brunissement qui est également confirmé par la valeur élevée de l'indice brun IB ( $100-L^*$ ).

Ce sont des aliments très énergiques, riches en glucides, graisses, fibres, polyphénols totaux, flavonoïdes, et se caractérisent par des teneurs relativement faibles en protéines.

L'évaluation des propriétés antioxydantes révèle que les trois farines sont douées d'une forte activité. La farine de *Q. coccifera* a montré la teneur la plus significative en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant le plus important.

Il ressort de l'appréciation des trois types de biscuits formulés, les conclusions suivantes :

Une activité d'eau significativement faible dans les biscuits à base de gland par rapport au biscuit témoin.

Les paramètres dimensionnels ont montré que les biscuits à base de gland présentent un bon développement par rapport au biscuit témoin, principalement en raison de l'augmentation importante de diamètre. Ces biscuits ont également montré un rapport d'étalement (diamètre / épaisseur) et un facteur d'expansion (différence entre la surface des biscuits avant et après la cuisson) significativement plus élevés.

Pour ce qui est de la texture, la force nécessaire pour casser les biscuits ( $F_{\text{rupture}}$ ) a été plus élevée chez le biscuit témoin.

Les paramètres de couleur  $L^*$  et  $a^*$  et  $b^*$  ont diminué avec l'augmentation des niveaux de substitution de la farine de blé tendre par la farine de gland, ce qui a donné des biscuits plus bruns.

Concernant l'activité antioxydante des biscuits, la substitution de la farine de blé tendre par la farine de gland a permis d'augmenter de manière significative la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes des biscuits. Cette augmentation a eu par conséquent une influence positive sur l'activité antioxydante des biscuits enrichis qui ont montré un bon pouvoir antioxydant par rapport au témoin.

Le temps d'induction (TI), mesuré par le test Rapidoxy, a été significativement plus élevé dans les biscuits à base de gland. Cette mesure indique que le biscuit Q60 est le plus résistant vis-à-vis de l'oxydation forcée.

L'incorporation de la farine de gland a également provoqué des différences significatives au niveau du profil volatil. Ce dernier a montré des niveaux relativement élevés d'alcools fermentatifs et de leurs esters, et des composés liés à la réaction de Maillard tels que les aldéhydes de strecker, les furanes. Des niveaux significativement faibles d'acides carboxyliques, et des pyrazines ont été détectés.

Les différences de couleur et des substances volatiles par rapport au témoin ont été perceptibles également au niveau sensoriel, mais sans apparition de défauts. Parmi les formules étudiées, c'est le biscuit Q60 qui a été le mieux apprécié au niveau de l'odeur et du goût et il a été jugé le plus friable par rapport aux autres biscuits, et d'une bonne acceptabilité global même au niveau de la couleur «brune» qui a été jugée mieux appréciée que celle du biscuit témoin de blé tendre «jaune».

Au regard des résultats enregistrés, on constate que la farine de glands présente un intérêt technologique et nutritionnel important grâce à la quantité importante des fibres et des composés bioactifs qui possèdent. Il est possible de produire des biscuits à base de gland avec de bonnes propriétés technologiques (aspect, couleur et texture) et des qualités organoleptiques et nutritionnelles meilleures que les biscuits à base de farine de blé tendre.



## Références bibliographiques

- AACC (American Association of Cereal Chemists) (2000). Approved methods of analysis (11th ed.). St. Paul, MN, USA: AACC International.
- AACC (1995). Approved methods of analysis. Method 08-03: Total Ash, St. Paul, MN, USA: AACC International.
- Abd-El-Magied M. M. (1991). Effect of dietary fibre of potato peel on the rheological and organoleptic characteristics of biscuits. *Egyptian Journal of Food Science*, 19, 293-300.
- Ajila C.M., Leelavathi K.U.J.S. & Rao U. P. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of cereal science*, 48(2), 319-326.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990). Official methods of analysis (13<sup>th</sup> ed.) Washington, D.C: *Association of Official Analytical Chemists*.
- AOAC (1995). Method 991.43: Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods. Enzymatic-Gravimetric Method.
- Arendt E. K., Renzetti S. & Dal Bello F. (2009). Dough microstructure and textural aspects of gluten-free yeast bread and biscuits. *Gluten-Free Food Science and Technology*; Gallagher E., Ed. Wiley-Blackwell, 107-129.
- Baltsavias A., Jurgens A. & Van Vliet T. (1999). Properties of short-dough biscuits in relation to structure. *Journal of Cereal Science*, 29(3), 245-255.
- Bensel T., Bock J. J., Zumpe L., Mansour S., Blümel N., Seeliger J. & Boeckler A. F. (2018). Effect of Disinfectants on Elastic Modulus, Flexural Strength and Color Stability of Denture Base Resins. *Open Journal of Stomatology*, 8(04), 135.
- Boudreau, A., & Ménard, G. (1992). *Le blé: éléments fondamentaux et transformation*. Ed. Presses Université Laval, Canada. 439 p.
- Brennan C. S. & Samyue E. (2004). Evaluation of starch degradation and textural characteristics of dietary fiber enriched biscuits. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 647-657.
- Broutain C. (2001). Fabriqué des biscuits à base de farine composée (Blé avec mil, maïs, sorgho ou niébé). *PME agroalimentaires, Biscuiteries*. 20 p.
- Cantos E., Espín J.C., López-Bote C., de la Hoz L., Ordóñez J.A. & Tomás-Arberán F.A. (2003). Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus spp.*), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6248-6255.

- Carini E., Curti E., Spotti E. & Vittadini E. (2012). Effect of formulation on physicochemical properties and water status of nutritionally enriched fresh pasta. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1642-1652.
- Charun E. P. J. & Morel M. H. (2001). Quelles caractéristiques pour une farine biscuitière? Influence de la dureté des blés et de la composition biochimique des farines sur leur aptitude biscuitière. *Industries des céréales*, (125), 2-16.
- Chevallier S., Colonna P., Della Valle G. & Lourdin D. (2000). Contribution of major ingredients during baking of biscuit dough systems. *Journal of Cereal Science*, 31(3), 241-252.
- Chung T. Y., Eiserich J. P. & Shibamoto T. (1993). Volatile compounds identified in headspace samples of peanut oil heated under temperatures ranging from 50 to 200. degree. C. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41(9), 1467-1470
- Codex Alimentarius (1995). Céréales, légumes secs, légumineuses, produits dérivés et protéines végétales. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. 2ème édition, FAO/OMS, Vol. 7, Rome.
- Contamine A. S., Abecassis J., Morel M. H., Vergnes B. & Verel A. (1995). Effect of mixing conditions on the quality of dough and biscuits. *Cereal chemistry*, 72(6), 516-522.
- Cosmai L., Summo C., Caponio F., Paradiso V. M. & Gomes T. (2013). Investigation on volatile profile, lipid fraction degradation and antioxidant content of tomato-based pâtés as a function of ingredient formulation. *International Food Research Journal*, 20(6), 3141.
- Cronin K. & Preis C. (2000). A statistical analysis of biscuit physical properties as affected by baking. *Journal of Food Engineering*, 46(4), 217-225.
- De Oliveira M. F., Machado M. G. & d'Abreu M. C. (2012). Acorn chemical composition depending on shedding date and *Quercus* species. In *Options Méditerranéennes A. no. 101. 7th International Symposium on the Mediterranean Pig*, (9), 4-8.
- Difonzo G., Russo A., Trani A., Paradiso V. M., Ranieri M., Pasqualone A., Summo C., Tamma G., Silletti R. & Caponio F. (2017). Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: antioxidant characterization and biological activity. *J Fun Foods*, 31, 63-70
- Doukani K. (2015). Etude comparative entre le couscous industriel et le couscous à base de glands. *Nature & Technology*, (13), 2.
- Eneche E. H. (1999). Biscuit-making potential of millet/pigeon pea flour blends. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54(1), 21-27.
- Feillet P. (2000). Le grain de blé. *Composition et utilisation*. Ed INRA. Paris, 308 p.

- Fellows P. (2000). *Food Processing Technology Principles and Practice*. 2nd Edition. Woodhead Publishing, Cambridge England. 575 p.
- Fradinho P., Nunes M. C. & Raymundo A. (2015). Developing consumer acceptable biscuits enriched with Psyllium fibre. *Journal of food science and technology*, 52(8), 4830-4840.
- Fustier P., Castaigne F., Turgeon S. L. & Biliaderis C. G. (2009). Impact of commercial soft wheat flour streams on dough rheology and quality attributes of cookies. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 228-237.
- Gallagher E. (2008). Formulation and nutritional aspects of gluten-free cereal products and infant foods. In Arendt, E.K., Dal Bello, F. (Eds.), *Gluten-free Cereal Products and Beverages*. Academic Press, Amsterdam; Boston, 321-346.
- Godon B. & Willm C. (1991). *Industries de première transformation des céréales*. apria. Ed. Lavoisier, 679 p.
- Giarnetti M., Paradiso V. M., Caponio F., Summo C. & Pasqualone A. (2015). Fat replacement in shortbread cookies using an emulsion filled gel based on inulin and extra virgin olive oil. *LWT-Food Science and Technology*, 63, 339-345.
- Godon B. & Loisel W. (1997). *Guide pratique d'analyses dans les industries des Céréales*. Lavoisier Tec & Doc. Paris, 840 p.
- Hassan A. A. Rasmy N. M., Foda M. I. & Bahgaat W. K. (2012). Production of functional biscuits for lowering blood lipids. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 7(1), 1-20.
- Harbers L.H. (1998). Ash analysis. In: Gaithersburg, M.A., Nielsen, S.S. (Eds.), *Food Analysis*, 2nd ed. Publishers Inc, Aspen, 141-165.
- Hazelton J. L., DesRochers J. L., Walker C. E. & Wrigley C. (2004). Cookies, Biscuits, and Crackers. Chemistry of Manufacture. *J. Grain Sci.*, 6(1), 307-312.
- Igueld S. B., Abidi H., Trabelsi-Ayadi M. & Chérif J. K. (2015). Study of physicochemicals characteristics and antioxidant capacity of cork oak acorns (*Quercus suber* L.) grown in three regions in Tunisia. *J. Applied Pharmaceut. Sci*, 5, 26-32.
- Kiger J. L., Kiger J. G. (1967). *Techniques modernes de la biscuiterie, pâtisserie-boulangerie industrielles et artisanales et des produits de régime*. Dunod. Tome 1. Paris. 696 p.
- Korus A., Gumul D., Krystyjan M., Juszczak L. & Korus J. (2017). Evaluation of the quality, nutritional value and antioxidant activity of gluten-free biscuits made from corn-acorn flour or corn-hemp flour composites. *European Food Research and Technology*, 243(8), 1429-1438.

- Korus J., Witczak M., Ziobro R. & Juszczak L. (2015). The influence of acorn flour on rheological properties of gluten-free dough and physical characteristics of the bread. *European Food Research and Technology*, 240, 1135-1143.
- Lanza T. (2006). Biscuit making: modern plants, old problems. *Industrie Alimentari (Italy)*., 45, 753-759.
- Ledl F. & Schleider E. (1990). New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem*, 29, 565-594.
- Maache-Rezzoug Z., Bouvier J. M., Allaf K. & Patras C. (1998). Effect of principal ingredients on rheological behaviour of biscuit dough and on quality of biscuits. *Journal of Food Engineering*, 35(1), 23-42.
- Manley D. (1998). *Biscuit, Cookie and Cracker Manufacturing Manuals. Manual 1- Ingredients*. Woodhead Publishing. Cambridge-England, 96 p.
- Manohar R. S. & Rao P. H. (2002). Interrelationship between rheological characteristics of dough and quality of biscuits; use of elastic recovery of dough to predict biscuit quality. *Food Research International*, 35(9), 807-813.
- Marco A., Navarro J. L. & Flores M. (2007). Quantitation of selected odor-active constituents in dry fermented sausages prepared with different curing salts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3058-3065.
- Menard G., Poirier D. & Boudreau A. (1992). Les biscuiteries industrielles In Boudreau A., & Menard G. (1992). *Le blé : éléments Fondamentaux et transformation*. Les presses de l'université Laval. Canada, 287-348. 439 p
- Mohsen S. M., Fadel H. H. M., Bekhit M. A., Edris A. E. & Ahmed M. Y. S. (2009). Effect of substitution of soy protein isolate on aroma volatiles, chemical composition and sensory quality of wheat cookies. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 1705-1712.
- Molavi H., Keramat J. & Raisee B. (2015). Evaluation of the cake quality made from acorn-wheat flour blends as a functional food. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 5(2), 53-60.
- Moorthy S. N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. *Starch-Stärke*, 54(12), 559-592.
- Morales M. T., Rios J. J. & Aparicio R. (1997). Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2666-2673.

- Pasqualone A., Laddomada B., Centomani I., Paradiso V. M., Minervini D., Caponio F. & Summo C. (2017). Bread making aptitude of mixtures of re-milled semolina and selected durum wheat milling by-products. *LWT-Food Science and Technology*, 78, 151-159.
- Pasqualone A., Bianco A. M., Paradiso V. M., Summo C., Gambacorta G., Caponio F. & Blanco A. (2015). Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food Chemistry*, 180, 64-70.
- Pasqualone A., Bianco A. M., Paradiso V. M., Summo C., Gambacorta G. & Caponio F. (2014). Physico-chemical, sensory and volatile profiles of biscuits enriched with grape marc extract. *Food Research International*, 65, 385-393.
- Pereira D., Correia P. M. & Guiné R. P. (2013). Analysis of the physical-chemical and sensorial properties of Maria type cookies. *Acta Chimica Slovaca*, 6(2), 269-280.
- Rakić S., Povreović D. Tešević V., Simić M., Maletić R. (2006). *Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food*. *Journal of Food Engineering*, 74, 416-423.
- Roussel P. (2005). Analyse et amélioration de la qualité boulangère et biscuitière des farines de blé de la récolte française 2005. *Industries des céréales*, (145), 14-18.
- Sadilova E., Carle R. & Stintzing F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular nutrition & food research*, 51(12), 1461-1471.
- Saffarzadeh A., Vincze L. & Csapó J. (1999). Determination of the chemical composition of acorn (*Quercus branti*), *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* seeds as non-conventional feedstuffs. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 3(3), 59-69.
- Scher J., Da Costa J. M. C. & Hardy J. (1998). Influence de la granulométrie sur les propriétés d'écoulement de la farine de blé. In *Deuxième colloque solide divisé*, Lyon, 291-298.
- Shimada T. (2001). Nutrient compositions of acorns and horse chestnuts in relation to seed-hoarding. *Ecological Research*, 16(4), 803-808.
- Singleton V. L. & Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sriroth K., Piyachomkwan K., Wanlapatit S. & Oates C. G. (2000). Cassava starch technology: the Thai experience. *Starch-Stärke*, 52(12), 439-449.
- Squeo G., Silletti R., Summo C., Paradiso V. M., Pasqualone A. & Caponio F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chem.*, 209, 65-71.

- Squeo G., Tamborrino A., Pasqualone A., Leone A., Paradiso V. M., Summo C. & Caponio F. (2017). Assessment of the influence of the decanter set-up during continuous processing of olives at different pigmentation index. *Food Bioprocess Technol.*, 10, 592-602.
- Sudha M. L., Vetrmani R. & Leelavathi K. (2007). Influence of fiber from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and on biscuit quality. *Food chemistry*, 100(4), 1365-1370.
- Švec I., Hrušková M. & Kadlčíková I. (2018). Features of flour composites based on the wheat or wheat-barley flour combined with acorn and chestnut. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 10, 89-97.
- Tejerina D., García-Torres S., de Vaca M. C., Vázquez F. M. & Cava R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: Intra-and inter-annual variations. *Food Chemistry*, 124(3), 997-1004.
- Whiteley P. R. (1971). Classification of biscuit types and methods of production. In *Biscuit Manufacture*, Springer, Boston, MA, 103-123.

## *Conclusion générale*

Nous rappelons que les principaux objectifs de ce travail sont de trouver une voie de valorisation des glands de trois espèces de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. suber* et *Q. coccifera*), par le biais de la caractérisation phytochimique de leurs huiles ou leurs farines.

Dans la première partie, nous nous sommes intéressé à étudier l'huile extraite de gland. Une étude bibliographique réalisée sur ces huiles a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature biochimique d'où nous avons eu beaucoup de difficultés à comparer nos résultats. Dans cette optique, notre étude s'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative, les évaluations du potentiel antioxydant et de la stabilité oxydative, en suivant les marqueurs d'oxydation, de ces huiles d'intérêt.

A l'issu des résultats obtenus dans la première partie, il ressort que les huiles de *Quercus* étudiées se distinguent par une composition chimique spécifique (aides gras, stérols, composés volatils,...). Les composés volatils révélés dans les trois huiles pures et fraîches sont très spécifiques et peuvent être considérés comme des biomarqueurs spécifiques des espèces du genre *Quercus*.

L'évaluation du potentiel antioxydant de ces huiles a montré qu'elles constituent une bonne source d'antioxydants naturels contenant des composés phénoliques, des caroténoïdes et des tocophérols.

Le profil phénolique, révélé pour la première fois, a montré la présence majeure de dérivés de tanins hydrolysables. En raison de leur activité antioxydante, ces composés peuvent contribuer au maintien de la qualité de ces huiles pendant le stockage.

La susceptibilité à l'oxydation (stabilité) des huiles de *Quercus* sur six mois de stockage à température ambiante, a montré que ces huiles présentent une bonne résistance vis-à-vis à l'oxydation.

Dans le cadre de la deuxième partie, un biscuit à base de gland a été élaboré et les avantages et l'acceptabilité de la farine de gland dans un produit de boulangerie en tant que nouvel ingrédient alimentaire ont été examinés.

Sur la base des résultats obtenus dans cette partie, il ressort que la substitution partielle de la farine de blé tendre par la farine de gland s'avère une stratégie très efficace pour augmenter la teneur en fibres et l'activité antioxydante, deux facteurs qui représentent aujourd'hui un objectif primordial dans la production d'aliments.



Dans le même temps, cette substitution a entraînée une amélioration des qualités technologiques, nutritionnelles et organoleptiques des biscuits. La nature et l'amplitude de cette amélioration sont alors fonction du taux de substitution de la farine.

Cette perspective de substitution d'une partie de blé tendre par la farine de gland nous semble intéressante à double titre : d'une part, elle s'intègre dans les politiques de valorisation de la filière de boulangerie en produisant des biscuits de meilleure qualité et elle permet de valoriser les ressources végétales sous utilisées d'autre part.

Au regard des résultats enregistrés dans les deux parties, les conclusions suivantes ont pu être établies :

L'huile de gland étudiée présente une valeur nutritionnelle importante, comparable à celle de l'huile d'olive, puisqu'elle renferme des acides gras essentiels et de nombreuses substances ayant des propriétés antioxydantes.

La farine de gland a conduit à l'élaboration d'un biscuit riche en fibres, en nutriments et en molécules biologiques d'intérêts (composés phénoliques), avec des caractéristiques organoleptique et nutritionnelle meilleures que les biscuits au blé tendre.

Pour les raisons mentionnées ci-dessus, l'huile de gland doit être recommandée pour être classée dans la catégorie des huiles alimentaires, et la farine de gland doit être considérée et acceptée en tant que nouvel ingrédient alimentaire. Par conséquent, l'objectif fixé, à savoir la production d'une huile alimentaire nutritive et l'élaboration d'un biscuit de haute qualité, a été atteint.

Aujourd'hui, il est reconnu que la sécurité alimentaire est liée à la durabilité des aliments. Mettre en lumière l'utilisation de glands à des fins alimentaires pourrait limiter la négligence d'une ressource alimentaire saine et nutritive. Les glands, provenant d'espèces non exigeants, sont des aliments sauvages comestibles, largement sous-utilisés, qui pourraient compléter les plantes cultivées et aider à faire face à la demande croissante de nourriture pour une population mondiale en croissance rapide.

Les différentes conclusions obtenues par cette étude soulèvent de nouvelles perspectives :

- Tester le potentiel technologique de ces huiles en utilisant différents procédés ;
- Etudier la stabilité thermique de l'huile durant les applications thermique (fritures);
- Essayer d'incorporer ces farines dans d'autres produits alimentaires pour les personnes ayant une intolérance au gluten (biscuit diététique);
- Recommander l'inscription de ces deux produits (huile et farine) dans le codex alimentarius, en tant qu'ingrédients alimentaires.

## *Publications*





## Antioxidant activity, tocopherols and polyphenols of acorn oil obtained from *Quercus* species grown in Algeria



Fatima Z. Makhlouf<sup>a</sup>, Giacomo Squeo<sup>b</sup>, Malika Barkat<sup>a</sup>, Antonio Trani<sup>c</sup>, Francesco Caponio<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Bioqual, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

<sup>b</sup> Department of Soil, Plant and Food Sciences, Food Science and Technology Unit, University of Bari Aldo Moro, Via Amendola, 165/A, 70126 Bari, Italy

<sup>c</sup> CIHEAM, International Center for Advanced Mediterranean Agronomic Studies of Bari, Laboratory of Environmental and Agricultural Chemistry, Via Ceglie, 9, 70010, Valenzano, Bari, Italy

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Quercus*  
Vegetable oil  
Phenolic compounds  
LC-MS/MS  
Vitamin E  
Carotenoids  
Antioxidants

### ABSTRACT

Among the unusual vegetable fats, acorn oil has interesting nutritional and functional properties. Few studies are present in literature on acorn oil characterization and antioxidant activity evaluation while no studies are present regarding the analysis of the phenolic profile. The present study aims at investigating the content of hydrophilic and lipophilic phenolic compounds and pigments, as well as antioxidant properties and quality of the oil extracted from three *Quercus* species grown in Algeria. Oil yield, expressed as dry weight, was in the range 7.05–8.40%. Tocopherols contents were remarkable for the three species (539–676 mg kg<sup>-1</sup>), with (β + γ)-tocopherols being the most abundant. Oils had also significant amounts of carotenoids (42–66 mg kg<sup>-1</sup>) and similar polyphenol patterns, but with a wide quantitative variability between species (195–436 mg kg<sup>-1</sup>). Twenty phenolic compounds were detected, 12 of which were tentatively identified. All of them were hydrolysable tannins derivatives (gallotannin or ellagitannin). Oils methanolic extracts had remarkable antioxidant activity; up to 3.34 and 3.79 μmol TE g<sup>-1</sup> oil (DPPH and ABTS test, respectively). *Quercus* oil is a potential source of natural antioxidants, and it could be used as a new functional oil.

### 1. Introduction

Despite the diversity of plant species in the world, very few of them are actually used in human consumption. Besides the usual sources, fruits, leaves or seeds of other plant species show interesting nutritional characteristics but they are not exploited on a large scale, as the case of acorns collected from trees of the *Quercus* genus (Laouar, 2003).

The *Quercus* genus is one of the richest in species. It includes about 500 forest species accompanied by many hybrids, and is well represented in spontaneous state throughout the Mediterranean basin (Bonfils, Horisberger, & Ulber, 2005). Oaks constitute about 40% of the Algerian forests, and represent a forest wealth for the Country (Alatou, 1994). The acorns have been exploited for edible use for many thousands of years in most parts of the world. They were a staple food throughout North America, Asia, the Middle-East, North Africa, and Europe (Bainbridge, 1986; Hoeche, Kelly, & Noci, 2014). In the Mediterranean area, mainly in Italy and Spain, oak acorns, collected for free from spontaneous trees, were used principally by poor people (Pieroni, 1999). Acorn flour was used either directly for making bread or as an ingredient for coffee (Bainbridge, 1986; León-Camacho, Viera-Alcaide,

& Vicario, 2004). However, nowadays acorns have almost disappeared from human consumption.

Acorns are rich in nutritive compounds; they contain approximately 59% starch, 33% fat, of which over 80% is unsaturated, and approximately 8% protein. In addition, acorns contain a considerable amount of mineral salts, such as calcium, magnesium, potassium, and phosphorus (Hoeche et al., 2014).

Acorn oil has been consumed in Algeria for hundreds of years. Its use as cooking oil has been reported also in Morocco, with a flavor similar to olive oil (Bainbridge, 2006). Özcan (2007), studied the fatty acid composition of acorn oil belonging to different species of *Quercus* present in Turkey, showing that acorn oil is a good source of unsaturated fatty acid. These authors reported a high concentration of oleic, linoleic, and palmitic acids in acorn oil with values ranging from 16 to 50%, 25 to 49%, and 14 to 24%, respectively. Moreover, acorn oil contains numerous substances with antioxidant properties, in particular tocopherols, flavonoids and phenolic compounds (Cantos et al., 2003).

Several studies have been carried out on acorn, but only a few of them had the aim to characterize the acorn oil composition and no one is referred to acorn oil from Algeria (Al-Rousan et al., 2013; Charef,

\* Corresponding author at: University of Bari Aldo Moro, Dept. of Soil, Plant and Food Sciences (Di.S.S.P.A.), Italy.

E-mail address: [francesco.caponio@uniba.it](mailto:francesco.caponio@uniba.it) (F. Caponio).

Youski, Saidi, & Stocker, 2008; Özcan, 2007). The studies have shown that acorn and its derived products are nutritional, energetic, and healthy foods, nevertheless it is noteworthy that *Quercus* oil is not still produced on a market scale. Moreover, no studies are present regarding the analysis of phenolic profile in *Quercus* oil.

In this framework, the aim of the present work was to investigate on the quality and the functional components of the oil from three acorn species grown in Algeria: *Quercus ilex* L., *Quercus suber* L., and *Quercus coccifera* L. The phenolic compounds of acorn oil were tentatively identified by mass spectrometry and quantified. Vitamin E, carotenoids and chlorophylls pigments were determined as well and an *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of the methanolic extracts was also carried out.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Raw materials

The research was performed on mature acorn fruits collected from three *Quercus* species: *Quercus ilex* L. (QI), *Quercus suber* L. (QS), and *Quercus coccifera* L. (QC). Acorns were manually collected from a forest located in the East of Algeria during the month of November 2016. Once harvested, acorns were separated from the shell, ground into fine powder and freeze-dried.

### 2.2. Oil extraction

The acorn oil was extracted according to the Soxhlet method using hexane as solvent (NF ISO 8262-3, 2006). The extract was filtered and the hexane removed by evaporation at 50 °C under vacuum. Then, the obtained oils were poured into dark glass bottles, hermetically sealed and stored at –18 °C to avoid glycerides and minor compounds oxidation and/or degradation, until analyses. The amount of oil in the fruits was expressed as percentage on dry-weight. The oil extraction was performed in triplicate for each variety.

### 2.3. Quality indices

Free acidity (g 100 g<sup>-1</sup> oil), peroxide value (meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> oil), ultraviolet absorption indices (K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub>, and ΔK), iodine value (g iodine kg<sup>-1</sup> oil) and refractive index were determined according to the AOCS official methods (AOCS, 1996).

### 2.4. Tocopherols analysis

Tocopherols (α, β + γ, and δ) were determined according to previous papers with slight modifications by means of RP-HPLC-FLD (Gliszczynska-Swiglio & Sikorska, 2004; Tamborrino et al., 2017). The analysis was performed using an UHPLC binary system (Dionex Ultimate 3000 RSLC, Waltham, MA, USA) equipped with a binary pump (HPG 3200RS), auto-sampler (WPS 3000), column compartment (TCC 3000), diode array detector (3000RS), and the Chromeleon software for data acquisition and processing. A Nova-Pack C<sub>18</sub> analytical column (150 × 3 mm i.d.) with a particle size of 3 μm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used. Briefly, 80 mg of oil were dissolved in 1 mL of 2-propanol, vortexed, filtered through 0.45 μm pores filters and then injected into the HPLC system. The mobile phases consist of a mixture of acetonitrile and methanol (1:1, v/v) at a constant flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> in isocratic elution. The injection volume was 20 μL. The FLD (Dionex 3400RS, Waltham, MA, USA) spectrofluorometer was used as detector, set at excitation wavelength of 295 nm and emission at 325 nm, using external standard calibration curves of α-, γ-, and δ-tocopherol (R<sup>2</sup> equal to 99.99, 99.95, and 99.96, respectively). Calibration curves were made in the range from 0.1 to 20 mg L<sup>-1</sup>, with limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 0.17 and 0.55, 0.47 and 1.58, 0.36 and 1.21 mg kg<sup>-1</sup> for alpha, gamma and delta

tocopherol, respectively (Cosmai et al., 2017).

Total tocopherol content was calculated as the sum of the identified and quantified tocopherols and expressed as mg kg<sup>-1</sup>.

### 2.5. Phenolic compounds extraction, identification and quantification

The extraction of phenols was carried out according to the procedure described in Squeo et al. (2016; 2017). To obtain the extract, 1 g of oil was dissolved in 1 mL of hexane and 5 mL of methanol/water (70:30, v/v) with the addition of 250 μL of a gallic acid solution (100 mg L<sup>-1</sup> in methanol/water 70:30, v/v) as internal standard for quantification. The mixture was vortexed for 10 min and centrifuged at 3941 × g for 10 min at 4 °C (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The methanolic phase was recovered, centrifuged again at 8867 × g for 5 min at 4 °C, and finally filtered at 0.45 μm using nylon filters (VWR International, Center Valley, PA, USA). The extracts were used for the next chromatographic determination. LC-PDA-MS analysis was carried out recording the absorbance from 220 to 500 nm and each compound was quantified based on the internal standard peak area on the chromatogram recorded at 280 nm. Due to the semi-quantitative approach, the matrix effect was not taken into account and the results were expressed as gallic acid equivalents (GAE). No other standards were used. An UHPLC Ultimate 3000RS Dionex interfaced by H-ESI II probe with a LTQ Velos pro linear ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used. The UHPLC system was composed by LPG-3400RS quaternary pump, WPS-3000 TRS autosampler, TCC-3000RS column older, PDA 3000RS detector. The analytical separation of phenols was achieved using a Hypersila Q C<sub>18</sub> column 100 mm of length, 2.1 mm internal diameter and 1.9 μm of particle size held at 30 °C and at a constant flow of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. A binary gradient was obtained using 0.1% of formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B), from 10% to 70% of B linear gradient in 30 min. The MS conditions were: capillary temperature 320 °C; source heater temperature 280 °C; nebulizer gas N<sub>2</sub>; sheath gas flow 30 psi; auxiliary gas flow 7 arbitrary units; capillary voltage –2800 V, S-Lens RF Level 60%. Data were acquired in negative ionization mode. Samples were analysed with two methods: a full scan method from 100 to 1000 m/z and a data-dependent experiment to collect MS<sup>2</sup> data. The data-dependent settings were: full scan from 268 to 950 m/z, activation level 500 counts, isolation width 2 Da, default charge state 2, CID energy 35. Tentative identification of compounds was performed using mass spectra (MS<sup>2</sup>) and λ<sub>max</sub> accordingly to Gracia-Villalba, Espin, Tomas-Berberan, and Rocha-Guzman (2017). The total phenolic content (TPC) was considered as the sum of the single phenolic compounds quantified.

### 2.6. Pigments analysis

The chlorophylls fraction was evaluated by measuring the absorbance of each oil sample at 630, 670, and 710 nm according to the AOCS method and expressed as mg of pheophytin per kg of oil (AOCS, 1993). The content of total carotenoids was determined by measuring the absorbance of 0.25 g of oil dissolved in 10 mL of hexane at 449 nm. Quantitative analysis was performed by a calibration curve of β-carotene (R<sup>2</sup> = 0.9987) and the total carotenoid content expressed as mg of β-carotene equivalent per kg of oil.

### 2.7. Antioxidant activity

The antioxidant activity was evaluated on the basis of the scavenging activity of the ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt) compared with a reference antioxidant standard Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) as described in Difonzo et al. (2017) and Caponio et al. (2016). Briefly, 50 μL of each sample were added to 950 μL of ABTS reagent previously prepared. After 8 min, the decrease of absorbance was

measured at 734 nm. Calibration curve of Trolox was used, and the results were expressed in  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalents (TE) per g of oil.

Extracts were analysed also for their capacity to scavenge the DPPH radical (1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl) accordingly to the method proposed by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995), with modification as reported by Difonzo et al. (2017). In cuvettes for spectrophotometry, 50  $\mu\text{L}$  of each sample were added to 950  $\mu\text{L}$  of DPPH solution (0.08 mM in ethanol). After 30 min in the dark, the decrease of absorbance was read at 517 nm. The results were expressed in  $\mu\text{mol}$  TE per g of oil.

## 2.8. Statistical analysis

All analyses were carried out in triplicate and the experimental data were reported as means  $\pm$  standard deviation. Each determination was performed at the same time for the different cultivars. Beside, no validation study was carried out about the methodologies used, as they were referred to previous published and/or validated results. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test were performed on the experimental data using XLSTAT software (Addinsoft SARL, New York, NY, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Oil contents

The crude fat content of acorn fruits ranged from 7.05% for QI to 8.40% for QC, with an intermediate value of 7.83% for QS, which agrees with previous reported values ranging from 6 to 9% (Charef et al., 2008; León-Camacho et al., 2004). These results indicated that the acorn fruit is moderately poor in fat and it cannot be considered as oleaginous seed, which possesses 30–45% oil content (Karleskind, 1992). However, acorn oil might be considered similar to other plant oil sources that are used because of their healthy features, such as wheat germ (8–14% fat content) or amaranth (4.9–8.1% fat level) (Al-Rousan et al., 2013).

### 3.2. Quality indices

The physical and chemical analytical data of acorn oil used in this study are presented in Table 1. Acorn oil has low acidity values, comparable to those observed in other vegetable oils (Karleskind & Wolff, 1992). The peroxide value, which remains on the average below 1.50 meq  $\text{O}_2 \text{ kg}^{-1}$ , indicates a low extent of oxidation, which is confirmed by the low values of  $K_{232}$  and  $K_{270}$ . QC showed higher value for all spectrophotometric parameters compared to the other two species ( $p \leq .05$ ). The relatively high iodine value in the three oil samples is due the high concentration of unsaturated fatty acids of this kind of oil,

**Table 1**  
Physical and chemical characteristics of *Quercus* oils.

Parameters	QI	QS	QC
Free fatty acids (g 100 g <sup>-1</sup> oil)	0.97 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.13 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
PV (meq $\text{O}_2 \text{ kg}^{-1}$ oil)	1.50 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
$K_{232}$	1.55 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.63 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.40 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
$K_{270}$	0.49 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.14 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
$\Delta K$	0.17 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.16 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
IV (g $\text{I}_2 \text{ g}^{-1}$ oil)	103.68 $\pm$ 6.48 <sup>b</sup>	125.28 $\pm$ 7.40 <sup>a</sup>	129.60 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
RI	1.453 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	1.453 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	1.449 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>

QI, *Quercus ilex* L.; QS, *Quercus suber* L.; QC, *Quercus coccifera* L.; PV, peroxide value;  $K_{232}$ , specific extinction at 232 nm;  $K_{270}$ , specific extinction at 270 nm; IV, iodine value; RI, refractive index.

Values are expressed as mean of three replications  $\pm$  SD.

Different letters indicate significant differences at  $p \leq .05$  according to one way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

**Table 2**

Concentration of tocopherols, phenolics and pigments in *Quercus* oils (mg kg<sup>-1</sup> oil).

Tocopherols	QI	QS	QC
$\alpha$ -tocopherol	244.66 $\pm$ 6.51 <sup>a</sup>	126.9 $\pm$ 5.25 <sup>c</sup>	138.09 $\pm$ 4.64 <sup>b</sup>
( $\beta + \gamma$ )-tocopherols	403.59 $\pm$ 5.87 <sup>b</sup>	389.60 $\pm$ 4.42 <sup>c</sup>	422.02 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>
$\delta$ -tocopherol	16.33 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	13.66 $\pm$ 1.61 <sup>c</sup>	19.73 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>
Total tocopherols	664.58 $\pm$ 13.29 <sup>a</sup>	530.16 $\pm$ 11.32 <sup>c</sup>	579.84 $\pm$ 7.41 <sup>b</sup>
TPC <sup>c</sup>	121.32 $\pm$ 10.90 <sup>c</sup>	187.60 $\pm$ 9.14 <sup>b</sup>	299.29 $\pm$ 13.60 <sup>a</sup>
Chlorophylls	1.88 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
Carotenoids	42.29 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup>	66.33 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	43.13 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>

QI, *Quercus ilex* L.; QS, *Quercus suber* L.; QC, *Quercus coccifera* L.

TPC<sup>c</sup>, total phenolic content, sum of those identified and quantified by LC-PDA-MS.

Values are expressed as mean of three replications  $\pm$  SD.

Different letters indicate significant differences at  $p \leq .05$  according to one way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

as already reported (Al-Rousan et al., 2013; Charef et al., 2008). As regards the physical properties, acorn oils showed a refractive index (RI) ranging from 1.449 to 1.453. QI had the significant lowest value respect to QS and QC. These values are similar to those reported by Al-Rousan et al. (2013) for acorn oils from other species and lower than those reported for other vegetable oils such as soybean or olive oils (Gunstone, 2002).

### 3.3. Tocopherols contents

Vitamin E is well recognized to be effective inhibitor of lipid oxidation and, since is only synthesized by plants, it is a very important dietary nutrient for animals (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). The results of tocopherols analysis (Table 2) showed a predominance of  $\beta + \gamma$ -tocopherols, whereas only a small amount of  $\delta$ -tocopherol (ranging from 2.5 to 3.4%) was observed. In general, QS and QC presented a similar tocopherols profile, quite different respect to that of QI. Indeed, in the formers, the sum of  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherols accounted for > 70% of the total tocopherol content. Differently, QI had a significant higher content of  $\alpha$ -tocopherol (> 35% of total tocopherols). QI showed also a significant higher content of total tocopherols, whereas QC showed the highest significant content of  $\beta + \gamma$ -tocopherols. QS had the lowest significant content of both the single tocopherols forms and the total tocopherol content. Despite the highest amount of tocopherols in QI, the antioxidant activity of such oil was lower than that of the other varieties (Table 4). As known, tocopherols react more preferably with lipid peroxy radical than with lipid itself (Choe & Min, 2006). Thus, considering the low amount of peroxides in the oils studied, the contribution of tocopherols to the oil stability could be of minor importance than that observed in other vegetable oils. The concentration of total tocopherols in vegetable oils ranges from 20 to 30 mg kg<sup>-1</sup> in coconut and barley oil to 2390 mg kg<sup>-1</sup> in wheat germ oil (Eitenmiller & Lee, 2004). Considering our results, *Quercus* oils could be considered tocopherol-rich, similarly to palm and sunflower oils (530 and 600 mg kg<sup>-1</sup> of total tocopherols, respectively).

### 3.4. Phenolic compounds content and identification

The TPC (Table 2) showed significant differences among the species ( $p \leq .05$ ) with values significantly higher in QC followed by QS and QI. On the whole, the acorn oils from Algeria seemed to be characterized by a higher TPC than what already reported in acorn oils from other countries of Mediterranean basin (Al-Rousan et al., 2013). It should be noted that, differently from Al-Rousan and co-workers, in our study the phenolic content was calculated as the sum of the identified phenolics by LC-PDA-MS instead of the Folin-Ciocalteu method. Considering that colorimetric methods are not accurate method of analysis, suffering for a lot of interfering reactions (Castro-Alves & Cordenunsi, 2015;

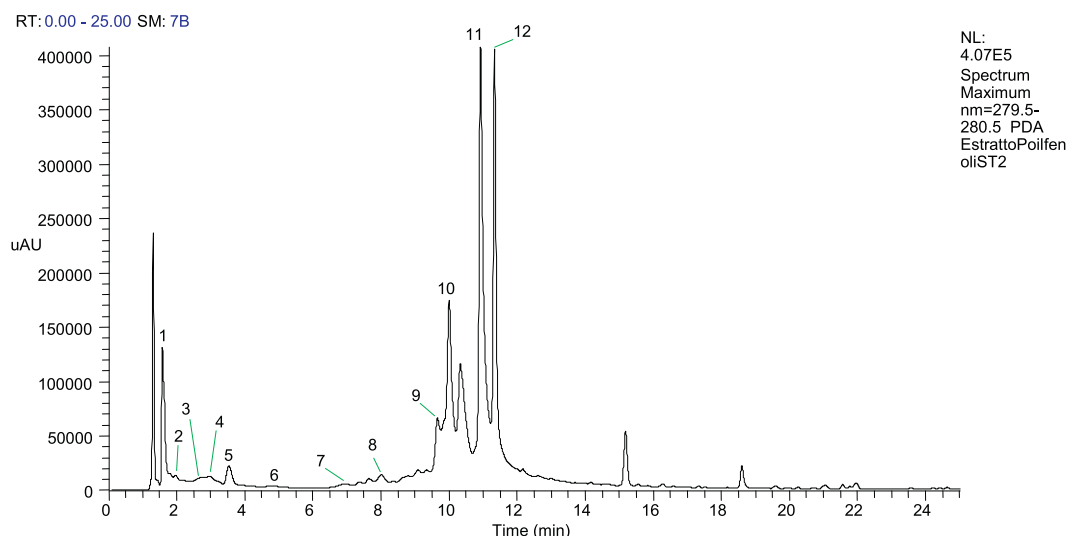


Fig. 1. Example of LC-PDA-MS chromatogram at 280 nm of the methanolic extract of acorn oil. Peaks numbers correspond to those reported in Table 3.

Sánchez-Rangel, Benavides, Heredia, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2013), these results, although arising from a semi-quantitative method, could offer a more accurate understanding about the acorn oil characteristics and they confirm the higher phenolic amount of Algerian acorn oils. Moreover, the phenolic content of such oils was comparable to those of other well-recognized high-quality vegetable oils such as extra-virgin olive oil (EVOO). In particular, QS and QC had values similar to phenols-rich cultivars such as the Italian Coratina cv., which is even characterized by intense bitter and pungent notes (Rotondi, Alfei, Magli, & Pannelli, 2010). On the other hand, QI had a TPC more comparable to “sweet” varieties, which oils are less rich in phenols. However, it must be highlighted that the type of phenols in acorn oils are completely different from that present in EVOO, where the main compounds belong to the class of secoiridoids, typical of the botanical family of *Oleaceae*.

Fig. 1 shown an example of the oil methanolic extract chromatogram while the results of phenolic compounds identification are given in Table 3. The obtained data showed that, apart from the amounts, the phenolic profiles obtained for the three studied oils were quite similar, particularly in the case of QS and QC, which were almost identical. Twenty compounds were detected in the methanolic extract of acorn oils through LC-MS/MS. Twelve of them were tentatively identified using previously published data (Gracia-Villalba et al., 2017). It was found that the most abundant compounds in *Quercus* oil belong to the class of hydrolysable tannins derivatives (gallotannin or ellagitannin) in the form of hexa-hydroxy-diphenyl esters of glucose and galloyl glucose esters (trigalloyl-glucose and pentagalloyl-glucose with  $[M-H]^-$  of 635 and 939, respectively). Five isomeric combinations of galloyl and hexa-hydroxy-diphenyl esters of glucose were detected as digalloyl-hexa-hydroxy-diphenyl-glucose at  $m/z$  785, trigalloyl-hexa-hydroxy-diphenyl-glucose at  $m/z$  937, which were the major components of the phenolic fraction of studied oils. In some cases, a co-elution occurred as in the case of peaks at 9.66 and 10.09 min, which exhibited molecular ions at  $m/z$  787 and  $m/z$  937. Some compounds remained to be identified because they exhibited a fragmentation pattern that did not correspond to any known substance in the literature. It was supposed that the pseudo molecular ion at  $[M-H]^-$  197 (peak no. 8) corresponded to the syringic acid. However, it was impossible to ascertain the identity of syringic acid because it has a very low signal intensity with respect to the noise. In data dependent experiments this prevented to activate the  $MS^2$  and, as a consequence, we did not have its  $MS^2$  spectrum.

### 3.5. Pigments contents

As shown in Table 2, the *Quercus* oil has a low amount of total chlorophylls, whereas the total carotenoids are definitely high. QS had the highest content of both pigments. Overall, the small amount of chlorophyll pigments, together with the great amount of carotenoids, which are well known to be among the most effective inhibitors of the photo-oxidation (acting as light filtering or sensitizer inactivators, as well as  $^1O_2$  quenchers), suggested that the oils from *Quercus* species could be quite stable to oxidation, in particular during light exposition (Choe & Min, 2006; Psomiadou & Tsimidou, 2002).

### 3.6. Antioxidant activity

The antioxidant activity was measured by two tests, the first using the DPPH<sup>+</sup> radical and the second using the ABTS<sup>+</sup> radical and Table 4 gives an overview of the obtained results. Significant differences were detected among species ( $p \leq .05$ ). QC extract exhibited the strongest scavenging capacity, followed by QS and QI, this trend is similar to that already observed for TPC in Table 2. Cantos et al. (2003) have obtained similar results by measuring the antioxidant activity of the phenolic fraction of three *Quercus* varieties by these two methods.

The phenolic identification by LC-MS/MS revealed that the most abundant compounds were hydrolysable tannins derivatives (Table 3), showing their potential as antioxidant in this food matrix.

## 4. Conclusions

The present study demonstrated that the *Quercus* oil from Algeria, never studied before, is a good natural antioxidant source, containing phenolics, carotenoids and tocopherols. The phenolic profile, reported for the first time, revealed the major presence of hydrolysable tannins derivatives. Due to their antioxidant activity, these compounds can contribute to maintaining the quality of this oil during storage. Besides, the peculiar pigments ratio (from around 1:20 to 1:40, chlorophyll to carotenoids) suggested a good resistance of Algerian acorn oils to photo-oxidation.

*Quercus* oil could be proposed as a source of natural antioxidants, and as a functional edible oil. Further investigations on fatty acids, triacylglycerols and volatile compounds composition and oxidative stability of these oils are currently in progress.

**Table 3**  
Identification and quantification (mg GAE kg<sup>-1</sup> oil) of single phenols in *Quercus* oils by LC-PDA-MS.

No.	RT	λ <sub>max</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Identified compounds*	MS/MS	Amount QI	Amount QS	Amount QC
1	1.61	270	483	Digalloyl hexose	313(100), 423(76), 331(62), 271(26)	1.73 ± 0.27	1.26 ± 0.20	1.22 ± 0.14
2	1.86	270	933	Castalagin	631(100), 915(80), 889(35), 871(30)	2.01 ± 0.07	1.45 ± 0.12	1.52 ± 0.02
3	2.51	270	783	Di-HHDP hexoside (Pedunculagin)	301(100), 481(45), 765(35), 275(25)	0.14 ± 0.00	1.22 ± 0.00	1.12 ± 0.06
4	2.97	272	785	Digalloyl-hexahydroxy-diphenoyl- glucose	301(100), 633(46), 615(25), 274(23)	0.26 ± 0.01	3.00 ± 0.20	2.36 ± 0.32
5	3.71	272	935	Galloyl-bisHHDP hexoside (Casuarictin)	633(100), 917(60), 873(30)571(20), 659(20), 301(10)	0.22 ± 0.02	1.93 ± 0.06	2.29 ± 0.24
6	4.76	269	387/785	Digalloyl-hexahydroxydiphenoyl- glucose (785)	387 → 207(100), 163(35), 369(19); 785 → 301(100), 483(64), 633(34), 275(16)	n.d.	1.32 ± 0.05	3.88 ± 0.20
7	7.00	267	635	Trigalloyl-glucose	465(100), 483(30)	1.49 ± 0.02	3.32 ± 0.22	4.87 ± 0.36
8	8.01	263/361	787	Tetragalloyl-pentoside	635(100), 617(30)	1.98 ± 0.09	6.06 ± 0.22	6.55 ± 0.61
9	9.66	278	393/468/ 787/937	Tetragalloyl-pentoside (787), Trigalloyl-hexahydrodiphenoyl-glucose(937)	393 → 317(100), 169(15), 241(5); 468 → 767(100), 392(80), 169(30); 787 → 635(100), 617(30), 465(10); 937 → 767(100), 301(80), 465(50), 785(40), 741(40), 419(20)	n.d.	17.52 ± 0.48	21.26 ± 0.60
10	10.09	280	787/861	Tetragalloyl-pentoside (787), Trigalloyl-hexahydrodiphenoyl-glucose(937)	787 → 617(100), 635(15), 465(10), 573(5); 861 → 785(100), 937(80), 776(40), 765(20), 700(20)	20.83 ± 0.11	28.13 ± 1.58	34.82 ± 1.74
11	11.01	280	937	Trigalloyl-hexahydrodiphenoyl-glucose	769(100), 917(30), 852(30), 861(29), 617(8), 465(8), 301(10)	81.89 ± 10.00	101.47 ± 5.60	129.15 ± 8.10
12	11.41	280	469/939	Pentagalloyl-glucose(939)	469 → 393(100), 769(70), 169(25), 317(10), 617(10); 939 → 769(100), 787(10), 617(10)	10.75 ± 0.24	20.90 ± 0.38	20.22 ± 1.19

GAE, gallic acid equivalents; QI, *Quercus ilex* L.; QS, *Quercus suber* L.; QC, *Quercus coccifera* L.; n.d., not detected; \* tentatively identified using mass spectra (MS<sup>2</sup>) and λ<sub>max</sub> accordingly to Gracia-Villalba et al. (2017).

**Table 4**  
Antioxidant activity of the phenolic fraction (μmol TE g<sup>-1</sup> oil) of *Quercus* oils.

Species	DPPH	ABTS
QI	1.27 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.09 <sup>c</sup>
QS	2.69 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.23 ± 0.17 <sup>b</sup>
QC	3.34 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.79 ± 0.01 <sup>a</sup>

QI, *Quercus ilex* L.; QS, *Quercus suber* L.; QC, *Quercus coccifera* L. Values are expressed as mean of three replications ± SD.

Different letters indicate significant differences at p ≤ .05 according to one way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

**Acknowledgements**

This work has been carried out during the stay of Dr. Fatima Z. Makhoul at the Department of Soil, Plant and Food Sciences of the University of Bari, Italy. The authors acknowledge the University Frères Mentouri Constantine 1 - INATAA, for financial support of the scholarship of Dr. Fatima Z. Makhoul.

**Conflict of interests**

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

**References**

AOCS (1996). *Official methods and recommended practices of the American oil chemists society: Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes*. Illinois: AOCS Press.

AOCS. Method Cc 13i-96 (1993). Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils. In D. Firestone (Ed.). *Official methods and recommended practices of the American oil chemistry society*(4th edn). Washington: AOCS Press.

Alatou, D. (1994). *Croissance rythmique du chêne liège et du chêne zeen*. Constantine, Algeria: Première journée sur les végétaux ligneux.

Al-Rousan, W. M., Ajo, R. Y., Al-Ismail, K. M., Attlee, A., Shaker, R. R., & Osaili, T. M. (2013). Characterization of acorn fruit oils extracted from selected Mediterranean *Quercus* species. *Grasas Aceites*, 64, 554–560.

Bainbridge, D. A. (1986, November). Use of acorns for food in California: Past, present, future. *Proceedings of the symposium on multiple-use management of California's hardwood* (pp. 453–458). California, USA: San Luis Obispo. Available at: [https://www.bepress.com/david\\_a\\_bainbridge/43/](https://www.bepress.com/david_a_bainbridge/43/).

Bainbridge, D. A. (2006). *Acorns as food: History, use, recipes, and bibliography*. Scotts Valley, CA: Sierra Nature Prints.

Bonfils, P., Horisberger, D., & Ulber, M. (2005). Promotion du chêne. In proQuercus (Ed.). *Stratégie de conservation d'un patrimoine naturel et culturel en Suisse* (pp. 102). Berne: Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFEPF).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25–30.

Cantos, E., Espín, J. C., López-Bote, C., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., & Tomás-Arberán, F. A. (2003). Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6248–6255.

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 Chem.* 202, 221–228.

Castro-Alves, V. C., & Cordenunsi, B. R. (2015). Total soluble phenolic compounds quantification is not as simple as it seems. *Food Anal. Methods*, 8, 873–884.

Charef, M., Youssi, M., Saidi, M., & Stocker, P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 921–924.

Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5, 169–186.

Cosmai, L., Caponio, F., Pasqualone, A., Paradiso, V. M., & Summo, C. (2017). Evolution of the oxidative stability, bio-active compounds and color characteristics of non-thermally treated vegetable pâtés during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 97, 4904–4911.

Difonzo, G., Russo, A., Trani, A., Paradiso, V. M., Ranieri, M., Pasqualone, A., ... Caponio, F. (2017). Green extracts from *Coratina* olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. *J. Funct. Foods*, 31, 63–70.

Eitenmiller, R. R., & Lee, J. (2004). *Vitamin E: Food chemistry, composition, and analysis*. New York: CRC Press, Marcel Dekker Inc.

Gliszczynska-Swiglio, A., & Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *J. Chromatogr. A*, 1048, 195–198.

Gracia-Villalba, R., Espin, J. C., Tomas-Berberan, F. A., & Rocha-Guzman, N. E. (2017). Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *J. Food Compos. Anal.* 63, 38–46.



- Gunstone, F. (2002). Vegetable oils in food technology. *Composition, properties and uses*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- Hoeche, U., Kelly, A., & Noci, F. (2014). Acorn: Staple food from the past or novel food for the future? –An investigation into the desirability and acceptability of acorn flour products. *Dublin gastronomy symposium, Dublin, Ireland* (pp. 1–14).
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, *31*, 671–701.
- Karleskind, A. (1992). *Manuel des Corps Gras*. (Tome 1). *Technique et documentation* (pp. 116–226). Paris: Lavoisier.
- Karleskind, A., & Wolff, J. P. (1992). Fats manual. In A. Karleskind (Ed.). *Fats manual* (pp. 1–787). Paris: Lavoisier.
- Laouar, M. (2003). *Les espèces négligées et sous-utilisées en Algérie, in Recueil des Communications Atelier N° 3 «Biodiversité Importante pour l'Agriculture» MATE-GEF/PNUD Projet ALG/97/G31, Alger*. 35–43.
- León-Camacho, M., Viera-Alcaide, I., & Vicario, I. (2004). Acorn (*Quercus* spp.) fruit lipids: saponifiable and unsaponifiable fractions: a detailed study. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *81*, 447–453.
- NF ISO 8262-3 (2006). Détermination de la teneur en matière grasse. *Association Française de Normalisation AFNOR, Paris, France*.
- Özcan, T. (2007). Characterization of Turkish *Quercus L.* taxa based on fatty acid compositions of the acorns. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *84*, 653–662.
- Pieroni, A. (1999). Gathered wild food plants in the upper valley of the Serchio River (Garfagnana), central Italy. *Econ. Bot.* *53*, 327–341.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *J. Agric. Food Chem.* *50*, 716–721.
- Rotondi, A., Alfei, B., Magli, M., & Pannelli, G. (2010). Influence of genetic matrix and crop year on chemical and sensory profiles of Italian monovarietal extra-virgin olive oils. *J. Sci. Food Agric.* *90*, 2641–2648.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods*, *5*, 5990–5999.
- Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso, V. M., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chem.* *209*, 65–71.
- Squeo, G., Tamborrino, A., Pasqualone, A., Leone, A., Paradiso, V. M., Summo, C., & Caponio, F. (2017). Assessment of the influence of the decanter set-up during continuous processing of olives at different pigmentation index. *Food Bioprocess Technol.* *10*, 592–602.
- Tamborrino, A., Squeo, G., Leone, A., Paradiso, V. M., Romaniello, R., Summo, C., ... Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *J. Food Eng.* *205*, 34–46.



Contents lists available at  
 Journal homepage: <https://www.najfnr.org>

## Comparative study of total phenolic content and antioxidant properties of *Quercus* fruit: flour and oil

Fatima Zohra MAKHLOUF <sup>1</sup>, Giacomo SQUEO <sup>2</sup>, **Malika BARKAT** <sup>1\*</sup>, Antonella PASQUALONE <sup>2</sup>,  
 Francesco CAPONIO <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Université Frères Mentouri Constantine 1. MC1. Laboratoire Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Algeria

<sup>2</sup> Department of Soil, Plant and Food Sciences, Food Science and Technology section, University of Bari Aldo Moro, Via Amendola 165/A – 70126, Bari, ITALY

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 05 December 2018

Accepted 15 February 2019

Available online 05 March 2019

#### Keywords:


*Quercus ilex* L.

*Quercus suber* L.

Total phenolic

Total flavonoid

Antioxidant activity


Access this article online	
Quick Response Code: 	Website: <a href="http://www.najfnr.org">www.najfnr.org</a>
 <a href="https://doi.org/10.5281/zenodo.2584087">https://doi.org/10.5281/zenodo.2584087</a>	

### ABSTRACT

**Aim:** The current study was undertaken to determine the total phenolic and flavonoid contents and to assess the antioxidant activity of two different extracts (flour and oil) of two Algerian *Quercus* species, *Quercus ilex* L. and *Quercus suber* L. **Methods and Material:** The oil extraction of the two species was achieved using the Soxhlet method. The obtained extracts were estimated for the chemical and physical constants (acidity, peroxide value, iodine value, and ultraviolet absorption indices). Total phenolic content was measured by spectrophotometry according to the Folin-Ciocalteu procedure and calculated as gallic acid equivalents (GAE). The studied extracts were also submitted to an estimation of their flavonoid contents too, using aluminum chloride methods. Antioxidant ability was assessed by means of two distinct methods (DPPH• and ABTS•+). **Results:** The obtained results revealed that antioxidant properties, total phenolic, and total flavonoid contents differed significantly among selected species and extracts. The flour samples possessed the highest level of total phenolic contents (1101–1464 mg GAE/kg dry weight) and exhibited the highest antioxidant capacities with average values of 52.62–40.78  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  dry weight and 36.19–44.50  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  dry weight for DPPH and ABTS assays, respectively. Acorn oil extracts showed also remarkable antioxidant activity, up to 2.69 and 3.23  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  oil (DPPH and ABTS test, respectively), even though the total phenolic contents were low (195.64–322.06 mg GAE /kg of oil). Total phenolic amounts were positively correlated with the antioxidant properties of *Quercus* flour and oil. **Conclusions:** Our study provides basic information on the presence of bioactive compounds and antioxidant capacity in acorn fruits, in order to consider their extracts as functional food ingredients and potential source of natural antioxidants.

Article edited by Dr. Bachir BENARBA and Dr. Hocine REMINI

\* Corresponding author  Tel: +213 31 600 247

 [barkat.inataa@yahoo.fr](mailto:barkat.inataa@yahoo.fr)

### 1. INTRODUCTION

Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant system [1-3]. The ROS are constituted of free radicals (like OH•, O<sub>2</sub>•-, RO<sub>2</sub>•) and non-radical products such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, RO<sub>2</sub>H [4,5]. While the defense system against free radicals can be divided into two major groups: enzymatic antioxidants' group, including superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione

reductase. The non-enzymatic antioxidants that constitute the second group consist of vitamins E and C, carotenoids, and polyphenols [6,7].

Phenolic compounds are one of the most essential groups, among phytochemicals possessing antioxidant capacity [8-10]. The designation "phenolic compounds" is generic referring to a large number of compounds (more than 8,000) widely dispersed throughout the plant

kingdom [8,10,11]. Phenolics are produced in plants as secondary metabolites. Their antioxidant activity is related to their chemical structure that provide them redox properties. They can play a significant role in neutralizing reactive oxygen species, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides [8]. Owing to their potential health-promoting effects, phenolic compounds have been intensively investigated [12,13]. Indeed, they are involved in the prevention and treatment of several diseases linked to oxidative stress such as cancers, atherosclerosis, diabetes, inflammation, and neurodegenerative diseases [8,11,13,14]. Furthermore, phenolic compounds are utilized in pharmaceutical, cosmetic, and food industry [15,16].

Plants have played a key role in human life for as long as they have existed. A wide variety of secondary metabolites, endowed with potential biological activities, are synthesized from plants. The genus *Quercus* includes more than 500 species growing in temperate ecosystems [17]. Oak acorns, one of the species of *Quercus* genus, are of vital importance for both humans and animals. They have been widely used as food for many thousands of years in many regions worldwide [18]. According to Bainbridge [19] acorns were a staple food throughout Europe, the Mid-East, North Africa, Asia, and North America.

Acorns are nutritional dense functional food with health properties. Some of the health benefits are attributed to the high level of phenolic compounds found in acorns. These phenolic compounds provide acorn fruit with high levels of antioxidants, which could have potential health benefits [18,20].

The aim of the present study was to compare total phenolic and flavonoid contents, as well as the antioxidant activity of both flour and oil extracts of two acorn species grown in Algeria: *Quercus ilex* L. (*Q. ilex* L.) and *Quercus suber* L. (*Q. suber* L.).

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Plant collection

Acorn fruits were directly gathered from two or three individual trees from Oum El Bouaghi region (Sidi Rghis mountain) east of Algeria. *Quercus* species, used in this study, were identified by comparison with those already published in the "Illustrated Guide to Algerian Flora" (N° 978-2-7466-4242-3). Collected seeds (acorns) were sorted and cleared of all impurities, separated from the shell then finely powdered using electric grinder and passed through a 425 µm sieve. The obtained powder was freeze-dried at -50°C and put under pressure of 0.08 mbar for 24 h to obtain a moisture content <1% to undergo extraction.

### 2.2 Oil extraction

Acorn oils were extracted using Soxhlet method. Acorn powder (10 g) was weighed into a cellulose extraction cartridge and the Soxhlet apparatus containing the cartridge was fitted to a distillation flask containing 100 mL n-hexane. After 6 hours of extraction, the extract was filtered and dehydrated with anhydrous sodium sulphate and the solvent was evaporated under vacuum at 50°C. The amount of oil in the fruits was expressed on a dry-weight basis [21].

### 2.3 Physical and chemical constants

AOCS methods [22] were used to determine free acidity, peroxide value, iodine value and ultraviolet absorption indices ( $K_{232}$ ,  $K_{270}$ , and  $\Delta K$ ).

### 2.4 Extraction of phenolic compounds

The prepared samples (oils and flours) were subjected to an extraction of their phenolic compounds. The extraction of phenols from the *Quercus* oils was carried out according to the procedure described in Squeo *et al.* [23, 24]. To obtain the extract, 1 g of oil was dissolved in 1 mL of hexane and 5 mL of methanol/water (70:30 v/v). The mixture was vortexed during 10 min and centrifuging at 3941 g for 10 min at 4 °C (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA). The methanolic phase was recovered, centrifuged again at 8867 g for 5 min at 4°C, and finally filtered through 0.45 mm pores filters. The extracts were analyzed for determination of total phenols and for flavonoid contents. Polyphenol extraction from the *Quercus* flour was performed as reported by Difonzo *et al.* [25] with some modifications. Approximately, 5 g of homogenized sample was added to 50 mL of methanol/water (70:30 v/v). The mixture was subjected for 35 min to ultrasound (CEIA, Vicinaggio, Italy) treatment at room temperature (energy intensity 1.96 kWh L<sup>-1</sup>). The obtained extracts were filtered through Whatman filter paper (GE Healthcare, Milan, Italy), then filtered with nylon filters of 0.45 µm (Sigma Aldrich) and used for chemical characterization. For each species, two different extraction solvents were utilized.

The extracts were analyzed both for determination of total phenols and flavonoid contents.

### 2.5 Extracts characterization

#### *Total phenols*

The total phenolic content was quantified by the Folin-Ciocalteu method using a calibration curve of gallic acid ( $R^2=0.9979$ ), according to Singleton and Rossi [26] with the modifications reported by Caponio *et al.* [27]. Briefly, 100µL of appropriately diluted extract were mixed with 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After 4 min, 800 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

solution 5% (w/v) was added to the mixture and heated in a water bath at 40 °C during 20 min. After being cooled down for 15 min, the absorbance of the solution was measured at 750 nm by an Agilent Cary 60 spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The total phenolic content was expressed as gallic acid mg equivalents  $\text{kg}^{-1}$  of oil and  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  dry matter for the flower.

#### Flavonoids

Total flavonoid content was quantified using a spectrophotometer according to Cosmai *et al.* [28]. Briefly, 500  $\mu\text{L}$  of each extract was mixed with 2 mL of distilled water and 150  $\mu\text{L}$  of  $\text{NaNO}_2$  solution (5 %). After 6 min, 150  $\mu\text{L}$  of a 10% solution of  $\text{AlCl}_3$  was added and allowed to stand further 6 min; thereafter,  $\text{NaOH}$  solution (2 mL, 1 M) was added to the mixture. Then, distilled water was added to bring the final volume to 5 mL. After incubation at room temperature for 15min, the absorbance of the reaction mixture was read at 510 nm. The results were expressed as mg of catechin equivalent per kg of oil  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  dry matter for the flower by means of a catechin standard which was made in the same conditions ( $R^2=0.999$ ).

## 2.6 Antioxidant activity

#### ABTS assay

The antioxidant activity was evaluated on the basis of the scavenging capacity of the ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt) compared with a reference antioxidant standard Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) as described in Difonzo *et al.* [25]. Fifty microliters of each sample were added to 950  $\mu\text{L}$  of ABTS reagent previously prepared. After 8 min, the decrease of absorbance was measured at 734 nm. Calibration curve of Trolox was used, and the results were expressed in  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalents (TE)  $\text{g}^{-1}$  of sample (oil and flour).

#### DPPH assay

Extracts were analyzed for their capacity to scavenge the stable DPPH radical (1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl free radical) as a free radical using the method of Brand-Williams *et al.* [29] following a modification of the procedure described by Difonzo *et al.* [25]. This assay is based on the abilities of the antioxidants present into the extracts to scavenge the radical in comparison with that of the standard antioxidant (Trolox). In cuvettes for spectrophotometry, 50  $\mu\text{L}$  of each sample were added to 950  $\mu\text{L}$  of DPPH solution (0.08 mM in ethanol). After 30 min, in the dark, the decrease of absorbance was read at 517 nm. The results were expressed in  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  of sample.

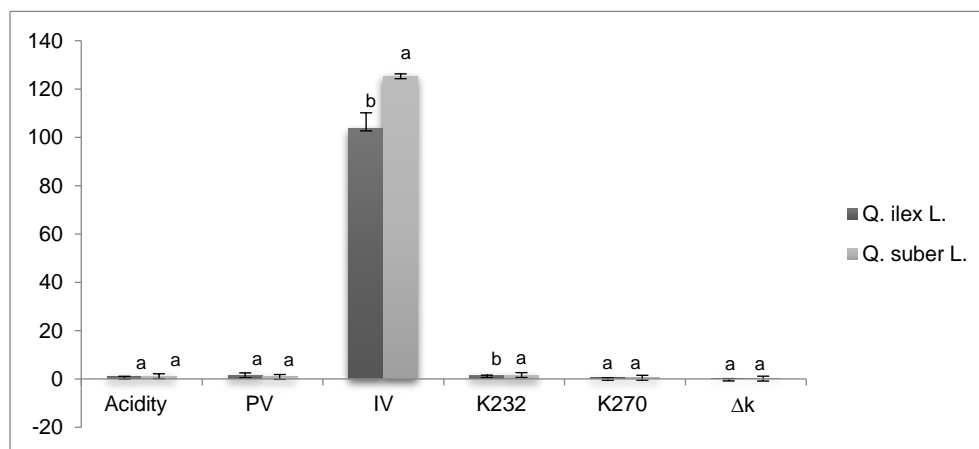
## 2.7 Statistical analysis

All analyses were carried-out in triplicate and the experimental data were reported as means  $\pm$  standard deviation. Analysis of variance (one- way and two-way ANOVA), Tukey's test and correlation analysis were performed on the experimental data using XLSTAT software.

## 3. RESULTS

### 3.1 Oil contents and quality indices

The oil contents of acorn ranged from 7.05 % for *Q. ilex* L. to 7.83 % for *Q. suber* L. species [30]. The physical and chemical constants, estimated in the oil extracted from the two Quercus species, are shown on Figure 1. As revealed, the acidity value was significantly low in the two oils and especially in *Q. ilex* (0.97 g/100g). Acorn oils showed also the lowest peroxide value which remained  $< 1.5 \text{ meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$  oil. *Q. ilex* L. oil showed slightly higher value of PV, while *Q. suber* L. was characterized by the highest acidity values. While, no significant differences were found in ANOVA ( $p < 0.05$ ) between the two species.



**Figure 1:** Physical and chemical characteristics of Quercus fruit oils.

PV, peroxide value;  $K_{232}$ , specific extinction at 232 nm;  $K_{270}$ , specific extinction at 270 nm; IV, iodine value.

Values are expressed as mean of three replications  $\pm$  S.D.

Different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  according to one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test

Similar to PV and acidity values, slight amounts of all spectrophotometric parameters measured ( $K_{232}$ ,  $K_{270}$  and  $\Delta k$ ) were found.

As shown on Figure 1, relatively high iodine value of the two oil samples was observed and *Q. suber* L. had the highest value.

Water furnished an extraction yield of  $14.87 \pm 4.42\%$  which remained weaker than the mixture water/methanol (50:50), methanol and ethanol solvents. Moreover, the evaporation of water took more time and required more energy consumption, which reduces its use. For that reason, some authors advice against using water [15] for phenol extraction, despite its safety and low price.

### 3.2 Phenolic content

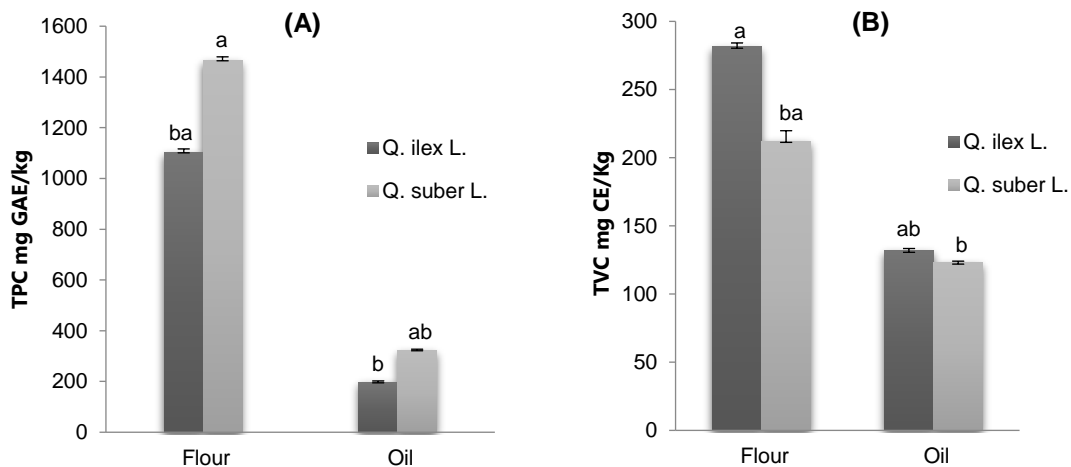
As shown on Figure 2, total phenolic contents (TPC) are given as gallic acid equivalents by reference to standard curve. Total phenolic contents of Quercus fruits showed highly significant differences ( $p \leq 0.05$ ) depending on species and extracts. Quercus flour possessed the highest level of total phenolic contents (1101–1464 mg GAE/kg dry weight), while the lowest content was recorded for the extracts obtained from Quercus oil (195.6–322.06 mg GAE/kg oil). The highest level of TPC was observed in *Q. suber* L. for the two extracts.

### 3.3 Flavonoid content

The results obtained after determining flavonoids, throughout the aluminum chloride method, are illustrated on Figure 2. Flavonoid contents (TFC) showed significant differences too ( $p \leq 0.05$ ) and depend on varieties and extracts. As can be observed on Figure 2, flavonoid contents were ranged between 212.26 and 279.82 mg CE/kg dry weight and 122.99 and 131.6 mg CE/kg of oil for Quercus flour and Quercus oil, respectively. The significant higher amount was obtained in *Q. ilex* L. species for the two different extracts.

### 3.4 Antioxidant capacity

The antioxidant activity of different extracts was assessed using DPPH•+ and ABTS•+ radicals, and the results are summarized on Figure 3. The antioxidant activity's analysis reflects a high significant variation ( $p \leq 0.05$ ) between the two extracts. As presented on Figure 3, flour extract of *Q. ilex* L. species exhibited the strongest scavenging capacity on DPPH (52.62 g TE/g dry weight). ABTS scavenging activity is also one of the most commonly used method to evaluate the antioxidant properties in fruits and plants. This activity varied from 1.27 to 3.23 mg TE/g for acorn oil and from 36.19 to 44.50 mg TE/g for acorn flour.

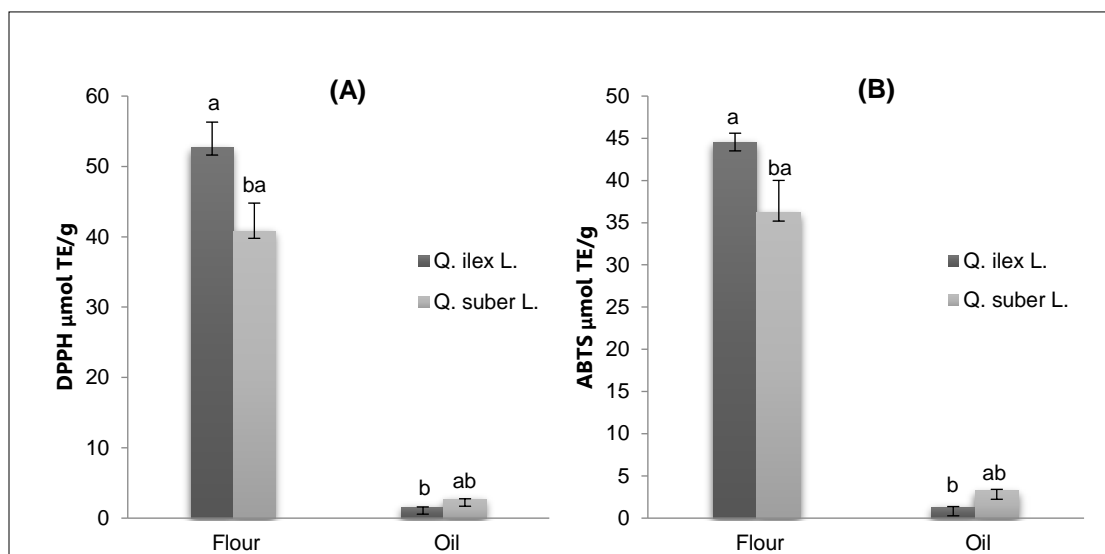


**Figure 2:** Total phenolic content (A) and total flavonoid content (B) of Quercus fruit oil and flour

TPC, total phenolic content; TVC, total flavonoid content

Values are expressed as mean of three replications  $\pm$  S.D.

Different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  according to one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.



**Figure 3:** Antioxidant activity of the phenolic fraction ( $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ ) of Quercus fruit oil and flour: (A), DPPH test; (B), ABTS test. Values are expressed as mean of three replications  $\pm$  S.D. Different letters indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  according to one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test

#### 4. DISCUSSION

The oil contents, obtained from Quercus species, agree with previous findings that reported a range of 6–9% from some acorn species [31,32]. This demonstrated that those contents are low for commercial production as cooking or frying oils and the acorn fruit cannot be considered as oleaginous seed that possess 30–45% of oil [33]. However, there is a possibility of using this kind of oil as a supplement ingredient in products. In addition, acorn oil might be considered similar to other plant oil sources used because of their health benefits or their industrial and pharmaceutical applications [32,34].

Peroxide value, free acidity, and ultraviolet absorption are considered to be fats and oils indicators of quality and stability [35]. The main quality characteristics used were found within the ranges for vegetable oils of good quality [36]. The relatively low acidity values indicate that the Quercus oils contain a slight amount of free fatty acids. The low peroxide value indicates an absence of oxidation, which is confirmed by the low presence of primary ( $K_{232}$ ) and secondary oxidation products ( $K_{270}$ ) [37].

The iodine value is a measure of the total number of double bonds present in fats and oils [37]. It provides an overall status of unsaturation [38]. High iodine-value oil contains a greater number of double bonds than low iodine-value one [39]. Therefore, the relatively high iodine value of the two oil samples may be indicative of the presence of many unsaturated bonds and would certainly contain more unsaturated fatty acids [30].

The amount of phenolic compounds constitutes an important determination since natural phenols improve its resistance to oxidation. These compounds have been correlated with the shelf life of oil, in particular, regarding to its antioxidant activities [40–42].

A comparative study has been carried out between two different extracts (oil and flour) of Quercus fruit. As shown previously, the total phenolic and flavonoid contents were detected at levels significantly higher in the two species of acorn flour. Our results showed higher TPC than that already reported in acorn fruits from other countries of Mediterranean basin [43,44].

On the contrary, the content of phenolic compounds was significantly lower in acorn oil extracts, while the flavonoids did not show any large significant differences. The low amount of phenolic compounds in acorn oil was probably due to the loss of part of these components during oil extraction.

The flavonoids' amount was remarkable in acorn oils and flour respect to other vegetable oils and seeds. For instance, in virgin olive oils, the flavonoid content is generally low, ranging from few  $\text{mg kg}^{-1}$  to around  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  [45–47].

In addition, noticeable differences of total phenolic and flavonoid contents were observed among cultivars *Q. ilex* L. and *Q. suber* L. in both extracts (oil and flour). These minor variations observed might be related to the difference in acorn species, environmental conditions, and oak acorn maturity.

Antioxidant activity analysis reflected as well a wide significant variation between the two Quercus extracts.

Quercus flour extract exhibited the strongest scavenging capacity against DPPH• and ABTS•+ radicals. These findings were directly related to the higher content of Quercus flour in scavenging agents of free radicals acting as antioxidants. Cantos *et al.* [48] have obtained similar results by measuring the antioxidant activity of the phenolic fraction of three Quercus species by these two radicals.

The significant antioxidant activity of Quercus fruit is due to the inductive effect of the natural antioxidants present in the fruit such as phenolic compounds and flavonoids which reduce and discolor free radicals (DPPH•, ABTS•+) because of their ability to yield hydrogen [49,50].

Correlation analysis was used to establish the relationship between antioxidant activity and the different variables measured (Table 1). A strong significant correlation ( $p < 0.001$ ) was observed between scavenger activity on free radicals (DPPH•+, ABTS•+) and total phenolic content. Flavonoid compounds showed in turn a high correlation ( $p < 0.001$ ) between their content and the antioxidant properties.

**Table 1:** Linear correlation between phenolic compounds and antioxidant activities

Variables	Pearson correlation coefficient r	p
TPC <sub>oil</sub> -DPPH	0.983	***
TPC <sub>oil</sub> -ABTS	0.915	***
TPC <sub>flour</sub> -DPPH	0.821	**
TPC <sub>flour</sub> -ABTS	0.756	**
TFC <sub>oil</sub> -DPPH	0.836	***
TFC <sub>oil</sub> -ABTS	0.925	***
TFC <sub>flour</sub> -DPPH	0.746	**
TFC <sub>flour</sub> -ABTS	0.649	**

\*\*  $p < 0.01$ : significant correlation; \*\*\*  $p < 0.001$ : high significant correlation. TPC, total phenolic content; TFC, total flavonoids content.

## 5. CONCLUSION

The present study brings new insight of two Algerian acorn species, particularly their phenolic, flavonoid contents, and their antioxidant activity. Antioxidant properties, total phenolic, and flavonoid contents differed significantly within the two studied extracts. Flour extracts showed strong antioxidant properties and high total phenolic content. Based on the correlation analysis, a positive relationship between antioxidant capacity and total phenolic contents was found, indicating that those phenolic compounds constitute the major contributors to the antioxidant properties of these plants. Our results showed that the Quercus fruit (oil and flour) represents an interesting natural antioxidant source containing various biological active compounds. Therefore, it is suggested that the Quercus fruit could be used as a functional ingredient

in food industry allowing an efficient protection against oxidative deterioration, and as a valuable phytochemical source for preventing human diseases in which free radicals are involved, such as diabetes and cardiovascular diseases.

## 6. REFERENCES

- [1] Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *M/S Revues* (2011) 27;(04):405-12. DOI:10.1051/medsci/2011274017
- [2] Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liege* (2007), 62;(10):628-38.
- [3] Koechlin-Ramonatxo C: Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme* (2006), 20;(4):165-77. DOI: /10.1016/j.nupar.2006.10.178
- [4] Brown GC, Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* (2012), 12;(1):1-4. DOI:10.1016/j.mito.2011.02.001
- [5] Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique* (2003), 270: 91-6.
- [6] Hong Y, Hu HY, Xie X, Li FM. Responses of enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). *J. Plant Physiol.* (2008), 165;(12):1264-73. DOI:10.1016/j.jplph.2007.10.007
- [7] Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* (2001), 7;(2):175-89. DOI:10.1093/humupd/7.2.175
- [8] Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* (2010), 16;(1):251-80. DOI:10.3390/molecules16010251
- [9] Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapiststein HD. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry* (2005), 82;(4):390-93. DOI:10.1094/cc-82-0390
- [10] Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* (2004), 2;(1):3-6. DOI:10.1007/s10298-004-0003-8
- [11] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* (2004), 74;(17):2157-84. DOI:10.1016/j.lfs.2003.09.047

- [12] Pascual-Teresa D, Moreno DA, García-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J. Mol. Sci.* (2010), 11(4):1679-703. [DOI:10.3390/ijms11041679](https://doi.org/10.3390/ijms11041679)
- [13] Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* (2009), 26;(8):1001-1043. [DOI:10.1002/chin.200946244](https://doi.org/10.1002/chin.200946244)
- [14] Shen S, Callaghan D, Juzwik C, Xiong H, Huang P, Zhang W. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* (2010), 114;(6):1590-604. [DOI:10.1111/j.1471-4159.2010.06887.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06887.x)
- [15] Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* (2007), 20;(2):125-32. [DOI:10.1016/j.jfca.2006.04.010](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.010)
- [16] Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, Conte D, Vincieri FF, Galli C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.* (1999), 47;(8):3397-401 (1999), 47(8):3397-3401. [DOI:10.1021/jf9900534](https://doi.org/10.1021/jf9900534)
- [17] Bonfils P, Horisberger D, Ulber M. Promotion du chène. Ed. proQuercus. Stratégie de conservation d'un patrimoine naturel et culturel en Suisse. *Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage* (OFEFP), Berne. (2005). pp 102.
- [18] Hoeche U, Kelly A, Noci F. Acorn: Staple food from the past or novel food for the future? An investigation into the desirability and acceptability of acorn flour products. *Dublin Gastronomy Symposium, Dublin* (2014), pp. 1-14. Available at: <http://arrow.dit.ie/cgi/viewcontent.cgi?article=1035&context=dgs>
- [19] Bainbridge D.A. Acorns as food: History, use, recipes, and bibliography. Scotts Valley, CA: *Sierra Nature Prints* (2006). [Online] Academia.edu. Available at: [http://www.academia.edu/3829415/Acorns as Food Text and Bibliography](http://www.academia.edu/3829415/Acorns_as_Food_Text_and_Bibliography)
- [20] Rakić S, Petrović D, Tešević V, Simić M, Maletić R. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering* (2006) 74;(3):416-23. [DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.03.057](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.057)
- [21] NF ISO 8262-3: Détermination de la teneur en matière grasse. *Association Française de Normalisation AFNOR* (V 04-051-3) Oct. (2006), Paris, France.
- [22] AOCS: Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society: Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes. Illinois: AOCS Press (1996) pp. 152. ISBN: 1893997049.
- [23] Squeo G, Silletti R, Summo C, Paradiso VM, Pasqualone A, Caponio F. Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chem.* (2016), 209:65-71. [DOI:10.1016/j.foodchem.2016.04.028](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.028)
- [24] Squeo G, Tamborrino A, Pasqualone A, Leone A, Paradiso VM, Summo C, Caponio F. Assessment of the influence of the decanter set-up during continuous processing of olives at different pigmentation index. *Food Bioprocess Technol* (2017), 10;(3):592-602. [DOI:10.1007/s11947-016-1842-7](https://doi.org/10.1007/s11947-016-1842-7)
- [25] Difonzo G, Russo A, Trani A, Paradiso VM, Ranieri M, Pasqualone A, Summo C, Tamma G, Silletti R, Caponio F. Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. *Journal of Functional Foods* (2017), 31:63-70. [DOI:10.1016/j.jff.2017.01.039](https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.039)
- [26] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* (1965), 16:144-58.
- [27] Caponio F, Squeo G, Monteleone JI, Paradiso VM, Pasqualone A, Summo C. First and second centrifugation of olive paste: Influence of talc addition on yield, chemical composition and volatile compounds of the oils. *LWT - Food Science and Technology* (2015), 64(1):439-45. [DOI:10.1016/j.lwt.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.007)
- [28] Cosmai L, Summo C, Caponio F, Paradiso VM, Gomes T. Investigation on volatile profile, lipid fraction degradation and antioxidant content of tomato-based pâtés as a function of ingredient formulation. *International Food Research Journal* (2013),20;(6): 3141-48.
- [29] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology* (1995), 28(1):25-30. [DOI:10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- [30] Makhlouf FZ, Squeo G, Barkat M, Trani A, Caponio F. Antioxidant activity, tocopherols and polyphenols of acorn oil obtained from *Quercus* species grown in Algeria. *Food Research International* (2018), 114: 208-13. [DOI:10.1016/j.foodres.2018.08.010](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.010)
- [31] Charef M, Yousfi M, Saidi M, Stocker P. Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), Pistacia lentiscus Seeds Growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2008), 85;(10):921-24. [DOI:10.1007/s11746-008-1283-1](https://doi.org/10.1007/s11746-008-1283-1)
- [32] León-Camacho M, Viera-Alcaide I, Vicario I. Acorn (*Quercus* spp.) fruit lipids: saponifiable and unsaponifiable fractions: a detailed study. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2004), 81;(5):447-53. [DOI:10.1007/s11746-004-0921-8](https://doi.org/10.1007/s11746-004-0921-8)
- [33] Al-Rousan WM, Ajo RY, Al-Ismaïl KM, Attlee A, Shaker RR and Osaili TM. Characterization of acorn fruit oils extracted from selected Mediterranean *Quercus*

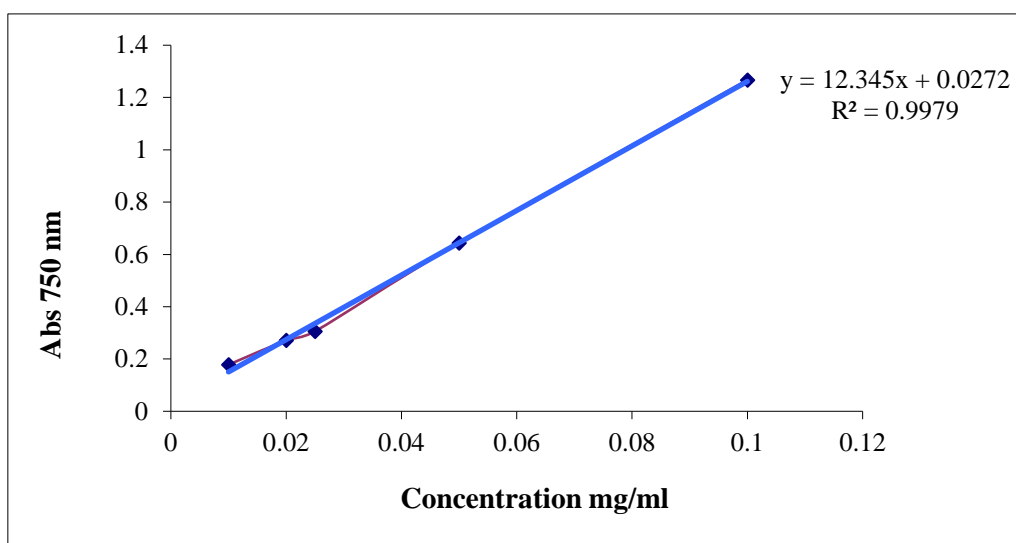


- species. *Grasas y Aceites* (2013), 64(5):554-60. DOI:10.3989/gya.023313
- [34] León-Camacho M, Garcia-Gonzalez DL, Aparicio R. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. *Eur. Food Res. Technol.* (2001), 213;(4-5):349-55. DOI:10.1007/s002170100340
- [35] Tanouti K, Serghini-Caid H, Sindic M, Wathelet JP, Bouseta A, Elamrani A. Volatile compounds, profiles of virgin olive oils produced in the eastern Morocco: oxidative stability and sensory defects. *J. Food Res.* (2012), 1;(4):194-206. DOI:10.5539/jfr.v1n4p194
- [36] Karleskind A, Wolff JP. Oils and Fats manual. In Karleskind A. Oils and Fats manual: A comprehensive treatise. Paris: Lavoisier; 1996: pp 1800.
- [37] Gharby S, Harhar H, Guillaume D, Roudani A, Boulbaroud S, Ibrahim M, Ahmad M, Sultana S, Ben Hadda T, Chafchaoui-Moussaoui I, Charrouf Z. Chemical Investigation of Nigella sativa L. Seed Oil Produced in Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* (2015), 14;(2):172-77. DOI:10.1016/j.jssas.2013.12.001
- [38] Knothe G, Dunn RO. Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2003), 80;(10):1021-26. DOI:10.1007/s11746-003-0814-x
- [39] Zine S, Gharby S, El Hadek M. Physicochemical characterization of opuntia ficus-indica seed oil from Morocco. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* (2013), 10;(1):1-7. DOI:10.13005/bbra/1099
- [40] Caponio F, Gomes T, Pasqualone A. Phenolic compounds in virgin olive oils: Influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *Eur. Food Res. Tech.* (2001), 212;(3): 329-33. DOI:10.1007/s002170000268
- [41] Esti M, Cinquanta L, La Notte E. Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric. Food Chem.* (1998), 46;(1):32-5. DOI:10.1021/jf970391+
- [42] Cinquanta L, Esti M, La Notte E. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1997), 74;(10):1259-64. DOI:10.1007/s11746-997-0054-8
- [43] Tejerina D, García-Torres S, de Vaca M, Vázquez FM, Cava R. Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chem.* (2011), 124;(3): 997-1004. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.07.058
- [44] Rakić S, Povrenović D, Tešević V, Simić M, Maletić R. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering* (2006), 74;(3):416-23. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.03.057
- [45] de Torres A, Espinola F, Moya M, Alcalá S, Vidal AM, Castro E. Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. *LWT* (2018), 90: 22-30. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.12.003
- [46] Squeo G, Tamborrino A, Pasqualone A, Leone A, Paradiso VM, Summo C, Caponio F. Assessment of the influence of the decanter set-up during continuous processing of olives at different pigmentation index. *Food Bioproc. Tech.* (2017), 10;(3):592-602. DOI:10.1007/s11947-016-1842-7
- [47] Tamborrino A, Squeo G, Leone A, Paradiso VM, Romaniello R, Summo C, Pasqualone A, Catalano P, Bianchi B, Caponio F. Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *J. Food Eng.* (2017), 205:34-46. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2017.02.019
- [48] Cantos E, Espín JC, López-Bote C, de la Hoz L, Ordóñez JA, Tomás-Barberán FA. Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *J. Agric. Food Chem.* (2003), 51;(21):6248-55. DOI:10.1021/jf030216v
- [49] Servili M, Esposto S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and Organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* (2009), 17;(2):76-84. DOI:10.1007/s10787-008-8014-y
- [50] Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* (2007), 12;(3):484-96. DOI:10.3390/12030484

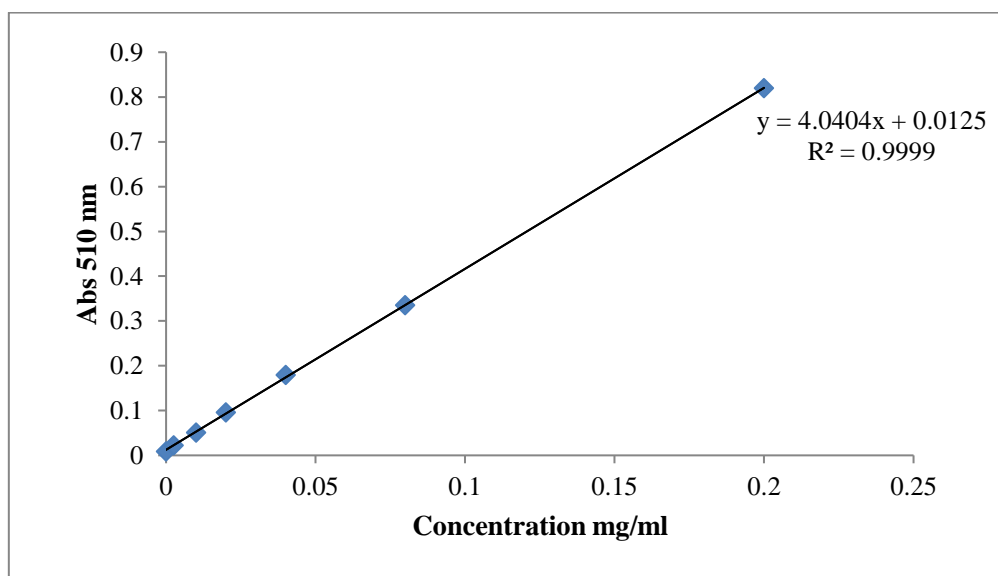
Cite this article as: Makhlouf FZ, Squeo G, Barkat F, Pasqualone A, Caponio F. Comparative study of total phenolic content and antioxidant properties of *Quercus* fruit: flour and oil. *Nor. Afr. J. Food Nutr. Res.* January - June (2019); 03 (05): 148-155. DOI:10.5281/zenodo.2584087

# *Annexes*

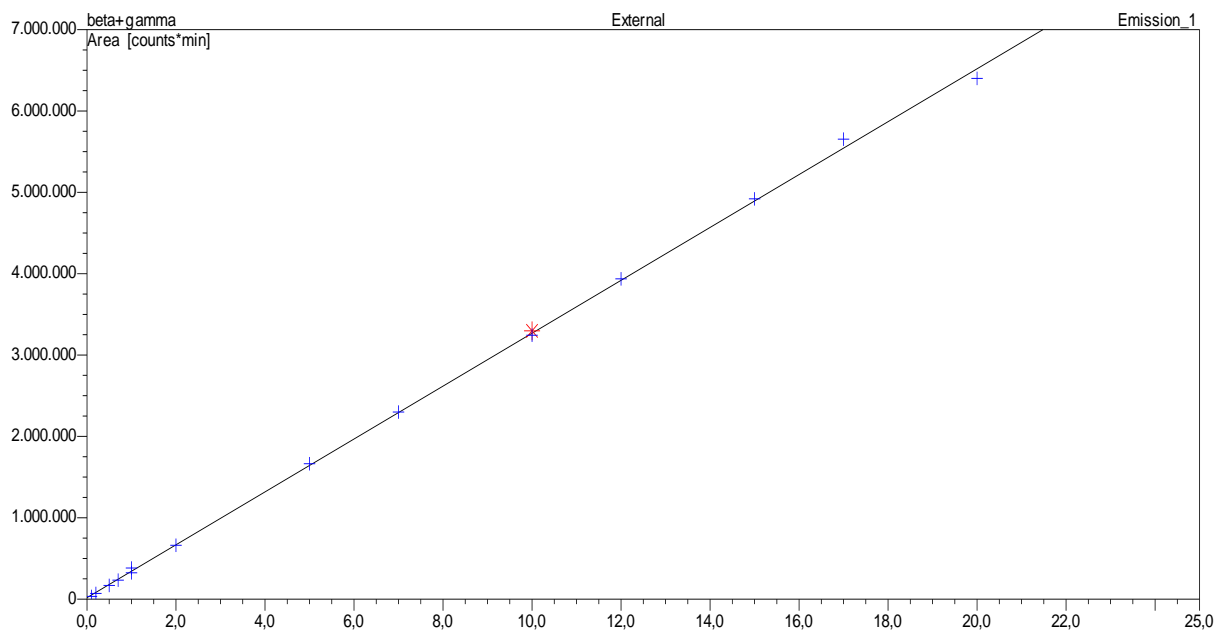
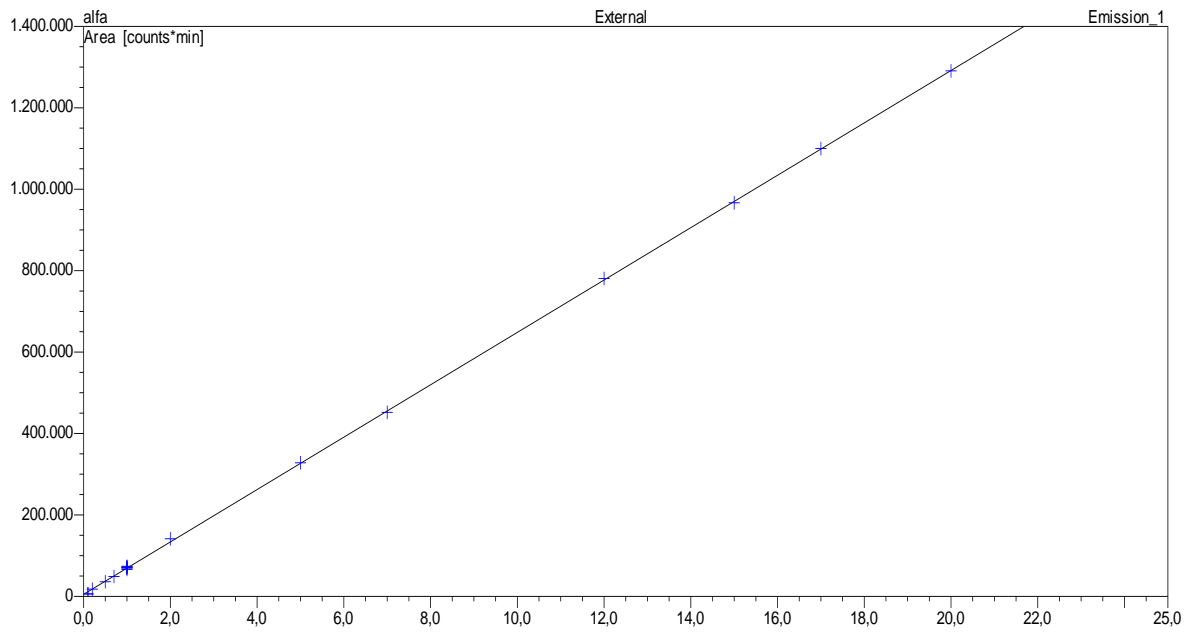
**Annexe 1.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

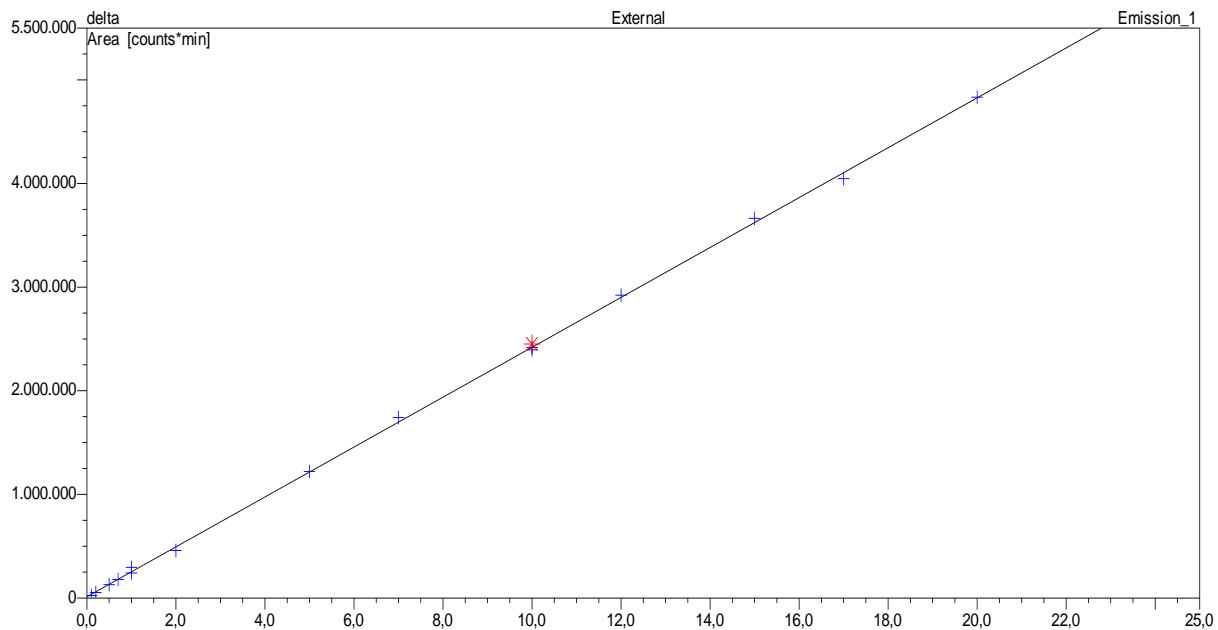


**Annexe 2.** Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes

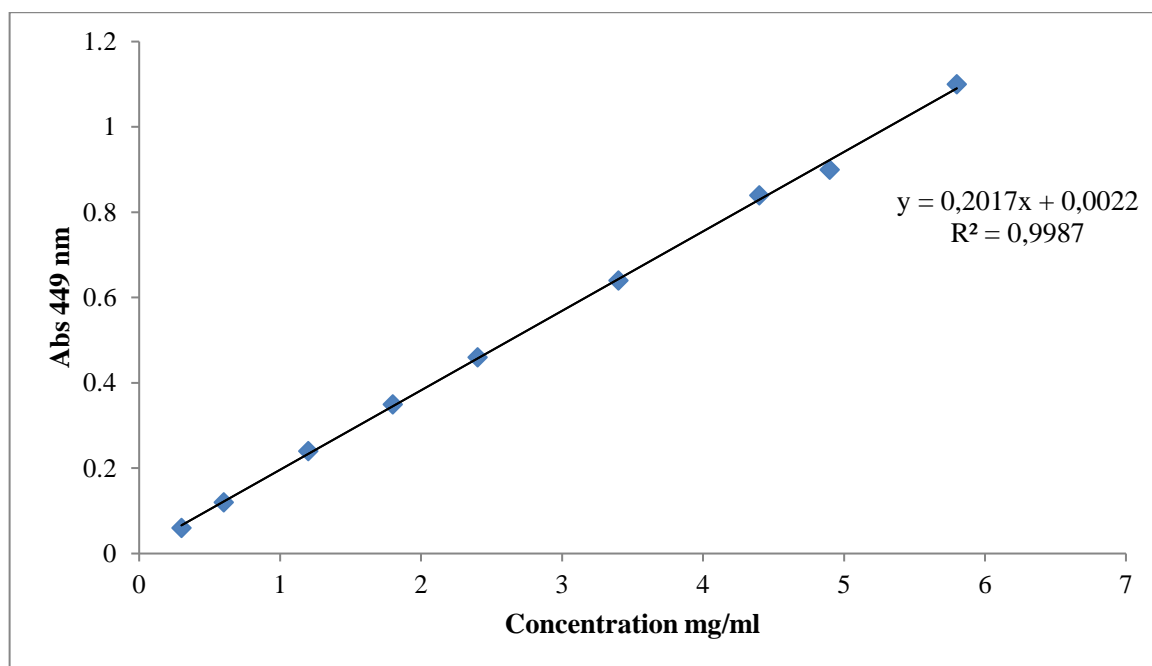


### Annexe 3. Courbe d'étalonnage des tocophérols

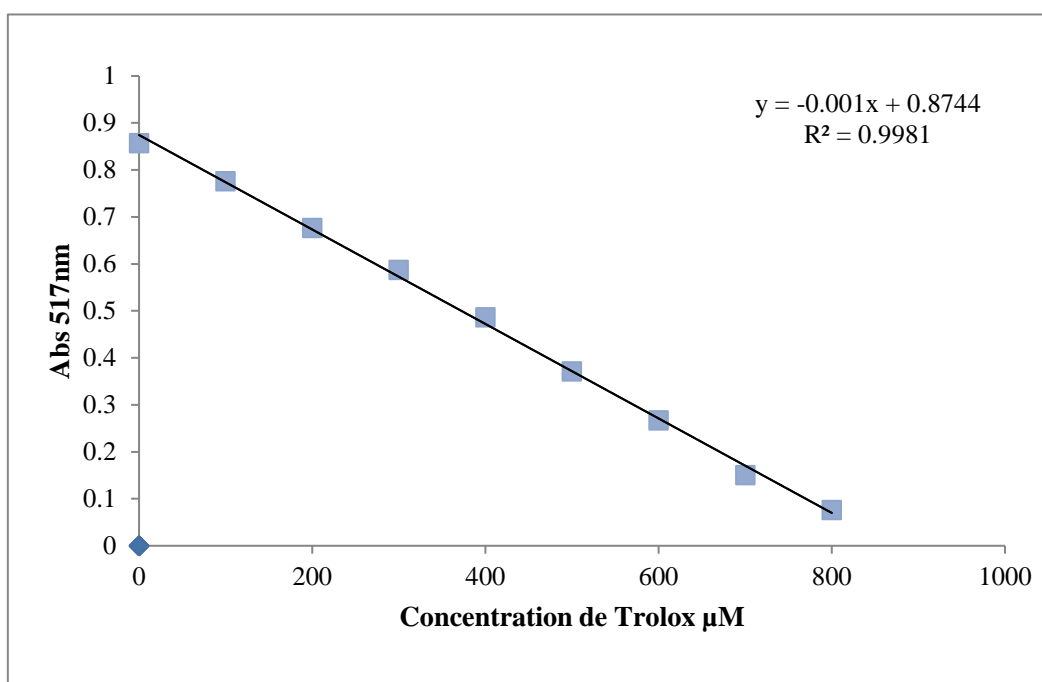




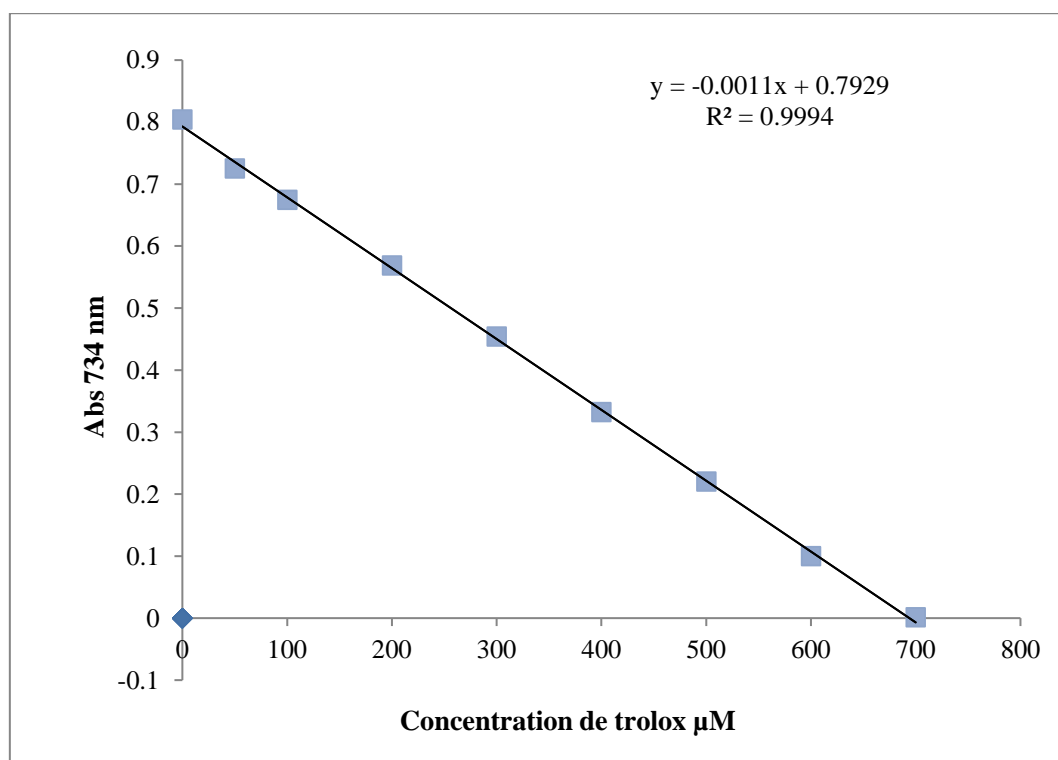
**Annexe 4.** Courbe d'étalonnage du  $\beta$ -carotène



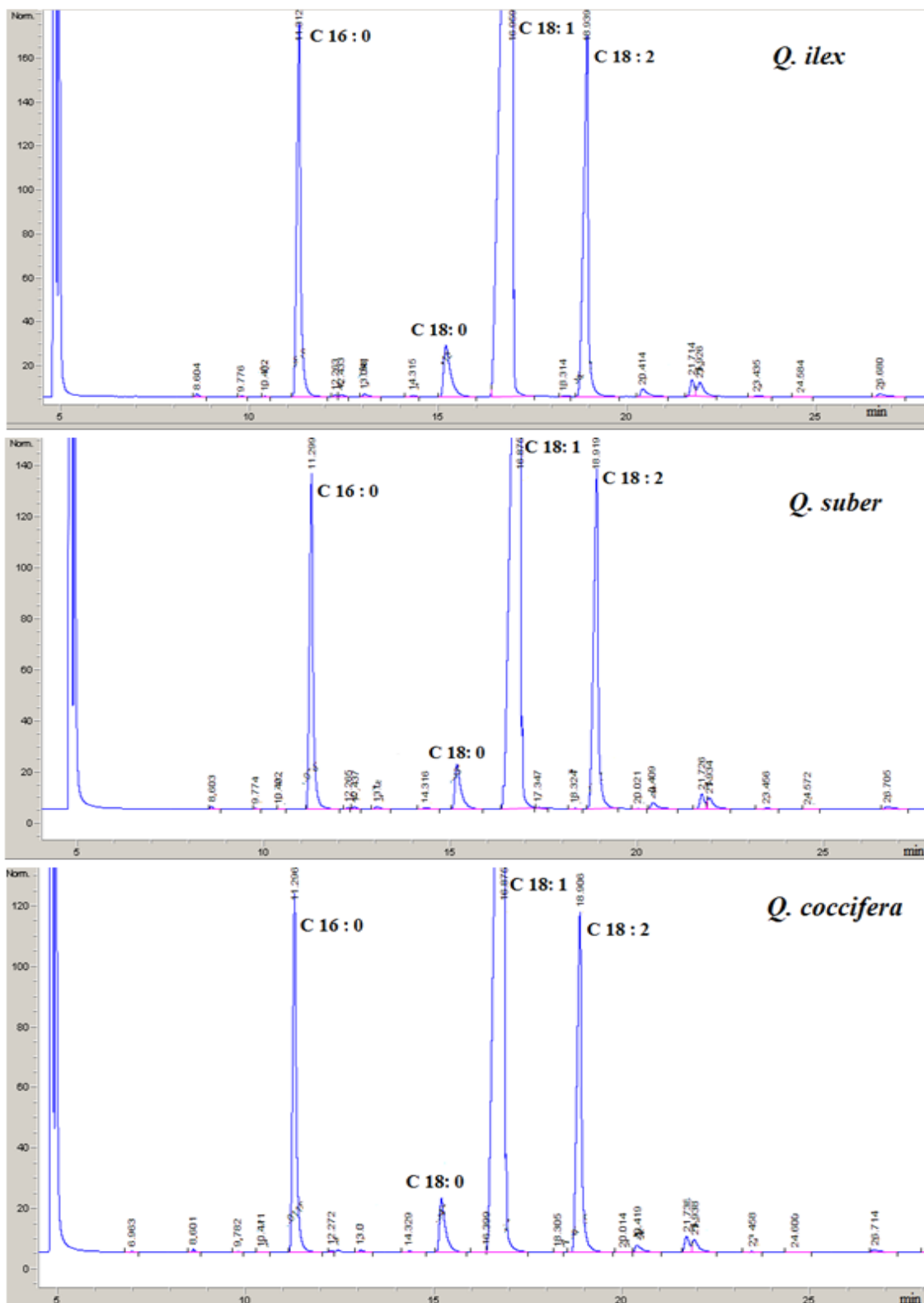
**Annexe 5.** Courbe d'étalonnage de Trolox (test DPPH)



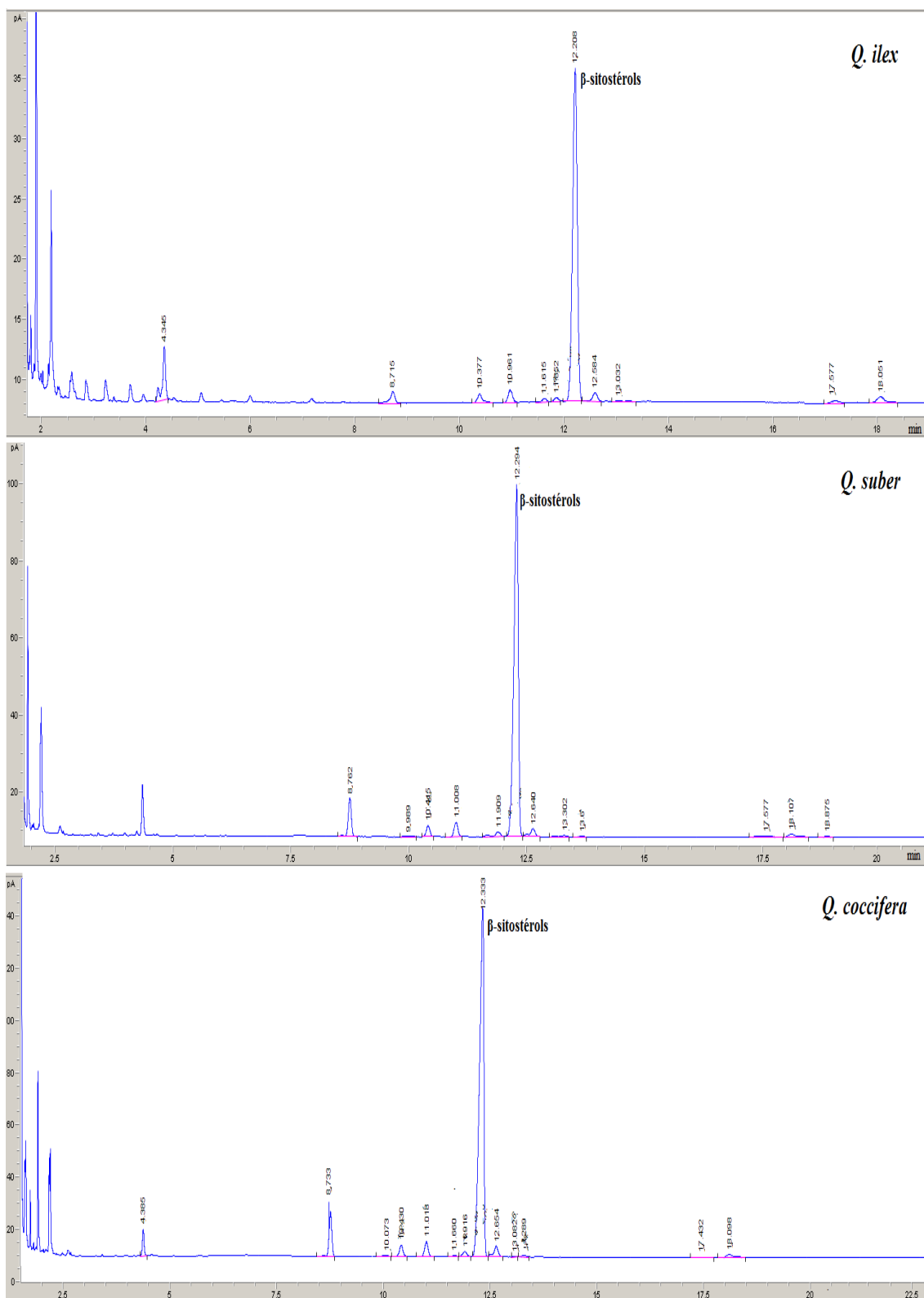
**Annexe 6.** Courbe d'étalonnage de Trolox (test ABTS)



**Annexe 7.** Profils chromatographiques des esters méthyliques d'acides gras des huiles de trois espèces de *Quercus*

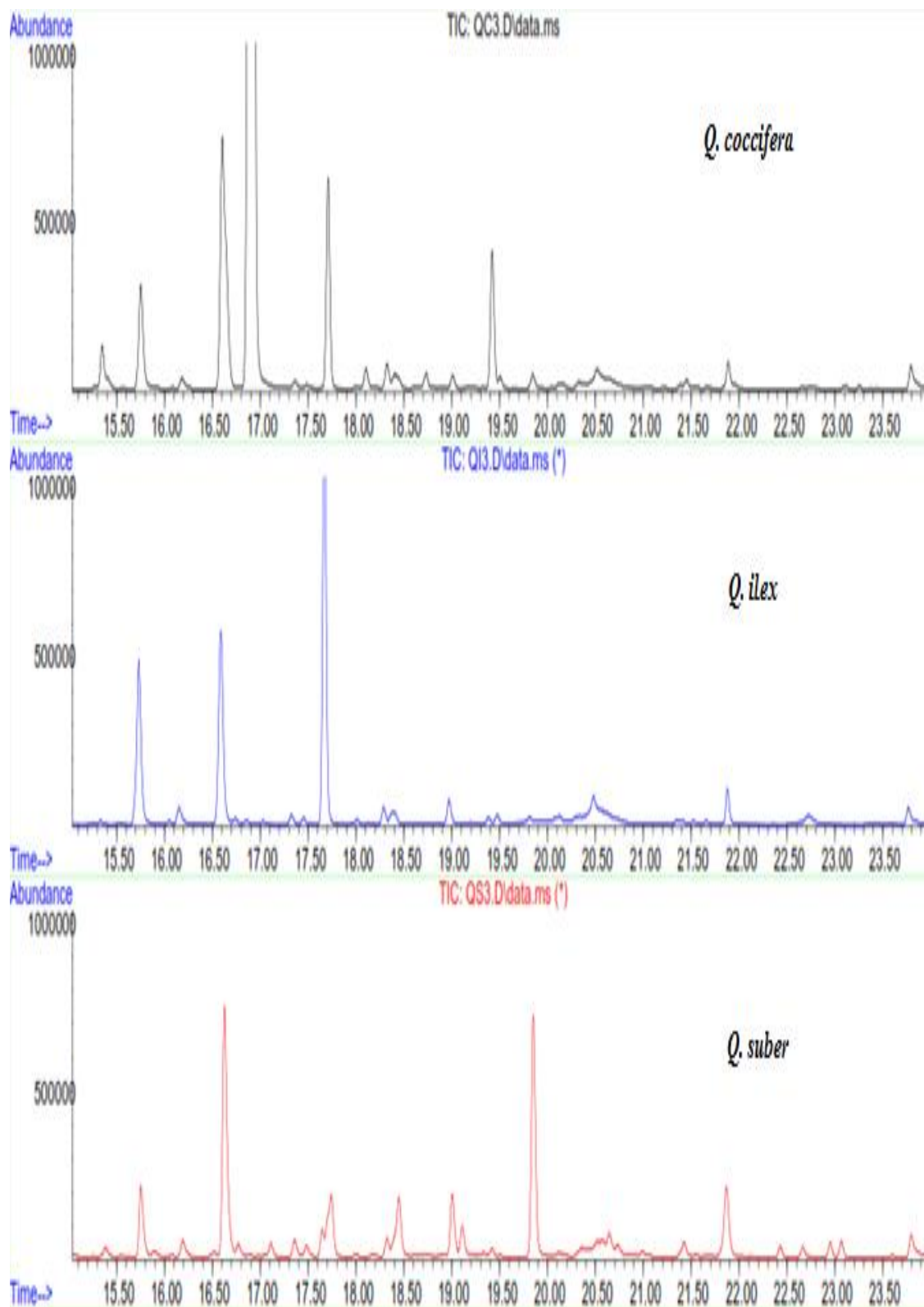


**Annexe 8.** Profils chromatographiques des stérols des huiles de trois espèces de *Quercus*

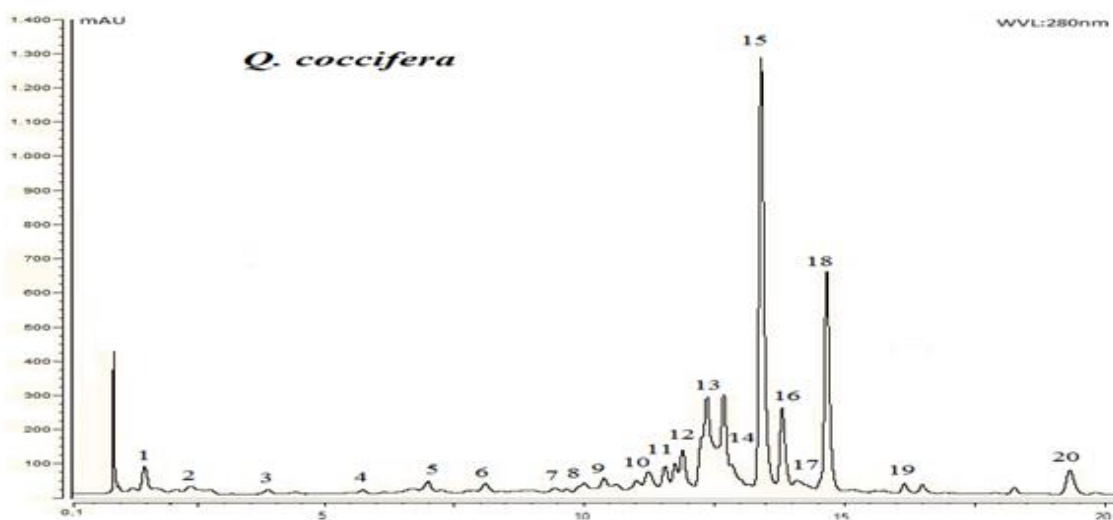
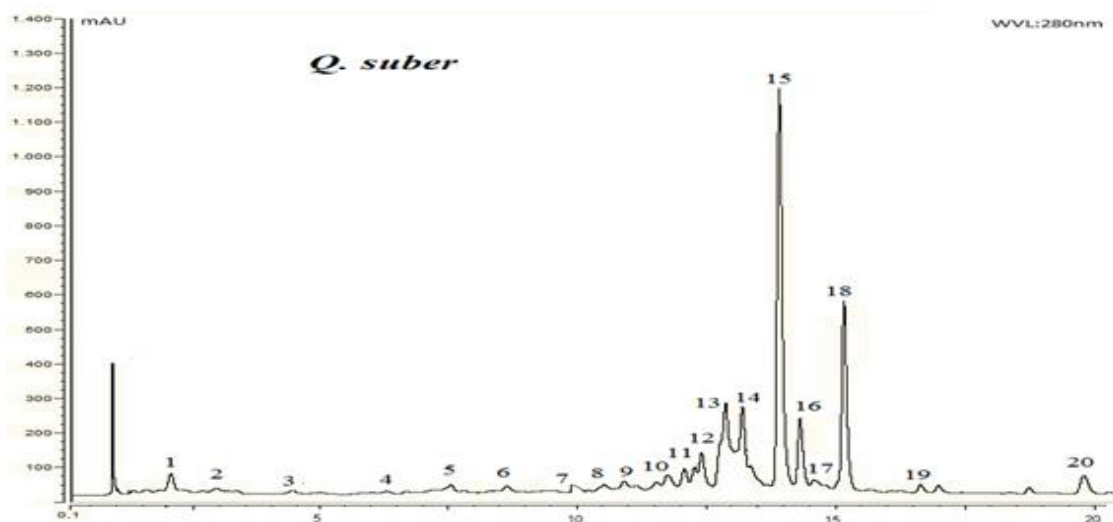
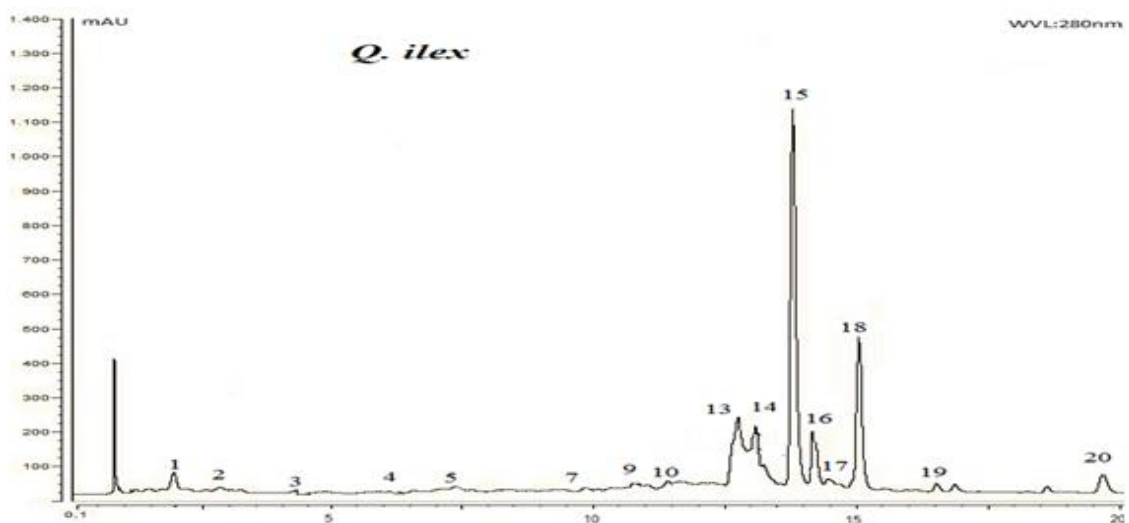




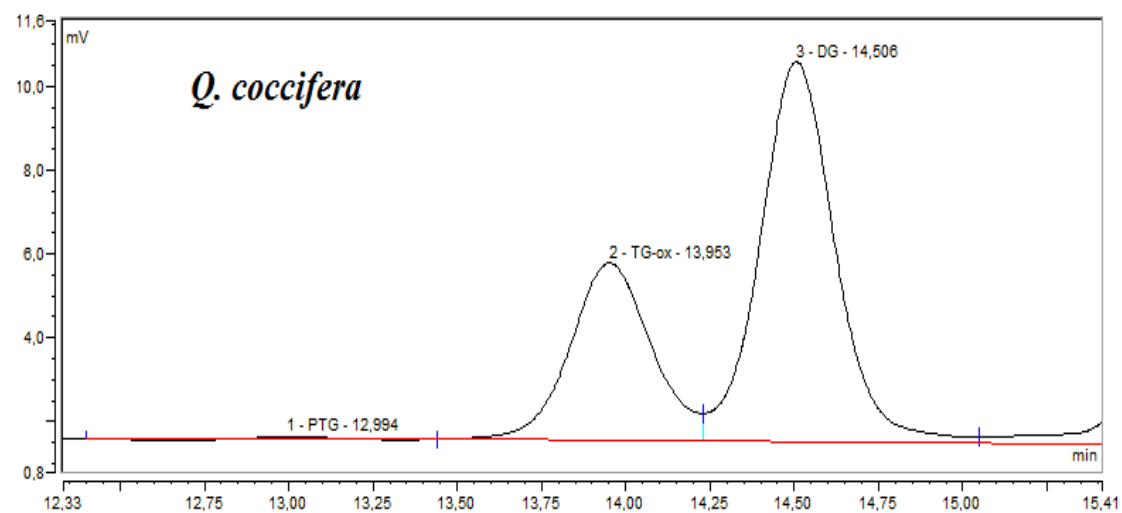
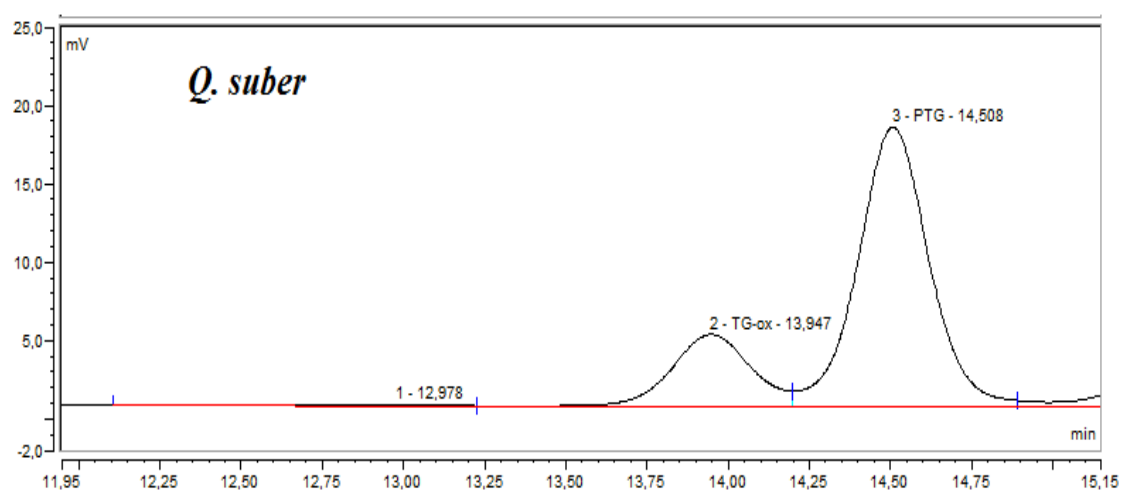
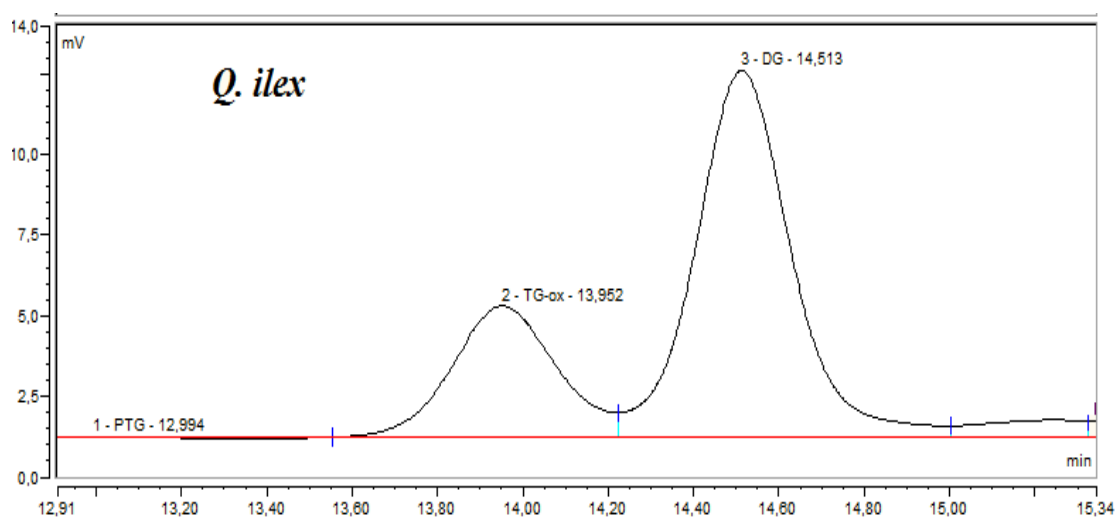
**Annexe 9.** Profils chromatographiques des composés volatils des huiles de trois espèces de *Quercus*



**Annexe 10.** Chromatogrammes HPLC-UV des composés phénoliques des huiles étudiées (les numéros correspondent aux composés sont énumérés dans le tableau 18, partie 2)



## Annexe 11. Chromatogrammes typiques des composés polaires des huiles étudiées



**Annexe 12.** Fiche d'évaluation sensorielle des biscuits formulés

Descripteur	Type du biscuit		
	Contrôle	Q30	Q60
<p><b><u>Caractéristiques visuelles et tactiles</u></b></p> <p>Couleur (0: Jaune ; 9: Brun foncé)</p> <p>Friabilité (0 : Très dur, il casse très difficilement et produit peu de miettes ; 9 : très friable, il se casse facilement et produit beaucoup de miettes)</p>			
<p><b><u>Odeur</u></b></p> <p>Odeur du son (0 : absent ; 9 : très intense)</p> <p>Odeur du caramel (0 : absent ; 9 : très intense)</p>			
<p><b><u>Goût</u></b></p> <p>Goût sucré (0 : absent ; 9 : très intense)</p> <p>Goût amer (0 : absent ; 9 : très intense)</p>			
<p><b><u>Texture perçus lors de la mastication</u></b></p> <p>Sécheresse (0 : humide ; 9 : très sec)</p> <p>Granulosité (0 : Non granuleuse, laissant des miettes de taille fine ; 9 : laissant des miettes de taille différente)</p> <p>Astringence (0 : absent ; 9 : très intense)</p>			
<p>Odeur anormale (0 : absente ; 9 : intense)</p> <p>Goût anormal (0 : absente ; 9 : intense)</p>			
<p><b><u>Ordre de préférence</u></b> (du 1 à 3)</p>			

## Résumé

---

Les glands de chênes (*Quercus*) figurent parmi les ressources végétales sous utilisées dans le domaine agroalimentaire. Il existe peu de données dans la littérature sur le fruit de gland, ce qui constitue un handicap pour la valorisation de ces fruits qui restent malheureusement sous-exploités. Les études réalisées montrent que ce fruit possède des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressantes. Le présent travail vise à étudier la composition biochimique et l'aptitude technologique de deux produits de gland « huile » et « farine » afin de valoriser cette ressource naturelle négligée.

Dans un premier temps, une étude détaillée de la composition et des propriétés physicochimiques des huiles, extraites à partir de trois espèces de fruit de *Quercus* (*Q. ilex*, *Q. coccifera* et *Q. suber*) a été effectuée. Le pouvoir antioxydant et la susceptibilité à l'oxydation des huiles extraites ont été également évalués. Ensuite, une étude de l'aptitude technologique des farines, issues des glands des mêmes espèces, pour l'élaboration d'un biscuit fonctionnel a été menée.

L'étude des caractéristiques physicochimiques nous a permis de déterminer une similitude entre l'huile de gland et l'huile d'olive. L'analyse des huiles par CPG a révélé une prédominance de l'acide gras insaturé (acide oléique), et une composition stérolique particulière, qui diffère de celles de la plupart des huiles conventionnelles comestibles. L'analyse de la fraction volatile des huiles de *Quercus*, rapportée pour la première fois, nous a affirmé que ces huiles se sont avérées contenir des profils en composés volatils spécifiques. L'analyse LC/MS a permis d'identifier vingt composés phénoliques dont les plus abondants sont des dérivés de tanins hydrolysables. Une richesse des huiles étudiées en composés phénoliques, tocophérols et caroténoïdes a été obtenue, ce qui leur confère une forte capacité antioxydante. Celle-ci a été révélée par les deux tests ABTS et DPPH. Le suivi de l'état d'oxydation des huiles de *Quercus* pendant 180 jours de stockage (6 mois) a montré de légères variations des marqueurs d'oxydation mesurés.

Les caractéristiques chimiques de la farine des trois espèces étudiées de *Quercus* ont été comparées. La farine de *Q. coccifera* L., la plus riche en antioxydants, a été utilisée pour la préparation des biscuits à deux niveaux de substitution Q30 et Q60. Les biscuits à base de gland ont montré une teneur significativement plus élevée en composés phénoliques, une activité antioxydante et une stabilité à l'oxydation (TI) supérieures à celles des biscuits témoins. Les biscuits à base de gland ont également montré des propriétés technologiques (volume, friabilité,...) et organoleptiques (odeur, couleur, goût,...) meilleures que les biscuits témoins.

---

**Mots clés :** *Quercus*, huile, farine, composition biochimique, aptitude technologique, biscuit fonctionnel, oxydation, activité antioxydante.