

Filière Technologies du vivant
Orientation Chimie analytique

Diplôme 2009

W. Mathieu Zongo

Hes·SO VALAIS WALLIS

Rte du Rawyl 47 - 1950 Sion 2

*Etude de l'oxydation
des huiles de poisson microencapsulées
par DSC sous pression*

Professeur JACQUES BESSE

Expert JEAN—ANTOINE MEINERS

HES-HEVS (Sion)



EM000006112735

Sion, le 9 octobre 2009

CA / 2009 / 96

SI	TV	EE	IG	EST
X	X			

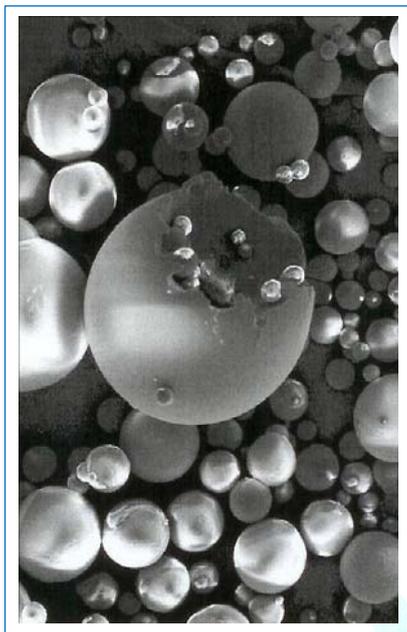
<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2008/09	No TD / Nr. DA ca/2009/96
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input checked="" type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire	Etudiant / Student W. Mathieu Zongo	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire
Professeur / Dozent Jacques Besse	Expert / Experte (données complètes) Jean-Antoine Meiners	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja ¹ <input checked="" type="checkbox"/> non / nein		

Titre / Titel <p style="text-align: center;">Etude de l'oxydation des huiles de poisson microencapsulées par DSC sous pression</p>
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele <p>Les huiles de poisson connaissent de nombreuses utilisations intéressantes en nutrition humaine. Malheureusement, leur goût désagréable et leur grande oxydabilité à l'air en limitent quelque peu leur usage. Pour réduire ces désavantages et améliorer la stabilité au stockage de ces produits, des essais de microencapsulation dans des micro-billes d'alginate ont été réalisés.</p> <p>Le but de ce travail est d'étudier le comportement à l'oxydation, sous différentes conditions de traitement et de stockage (températures, pressions d'oxygène, etc.) des huiles de poisson microencapsulées, principalement par la calorimétrie DSC sous pression. On suivra le processus d'oxydation en parallèle par l'analytique classique (SPME/GC en particulier) et on mettra les résultats de ces deux méthodes de travail en perspective. Au final, on souhaite disposer d'un test accéléré permettant de prédire avec une fiabilité acceptable le comportement au stockage de ces huiles sur le long terme.</p> <p>L'étude et le suivi bibliographiques de l'état de l'art sur le sujet représentent une partie importante du travail.</p>

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Resp. de la filière Leiter des Studieng.:  Etudiant / Student: 	Délais / Termine [pour l'obtention du titre HES] Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 27.04.2009 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 23.10.2009 — 12h00 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 04.09.2009 Défense orale / Mündliche Verfechtung: à convenir / nach Vereinbarung
--	--

¹ Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition.
Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

Etude de l'oxydation des huiles de poisson microencapsulées par DSC sous pression



Diplômant/e Mathieu Zongo

Objectif du projet

Le but de ce travail de diplôme est l'étude de la stabilité des huiles de poisson (microencapsulées ou non) à l'oxydation, sous différentes conditions de traitement (température, pression en oxygène), par trois techniques d'analyse.

Méthodes | Expériences | Résultats

Les méthodes utilisées dans ce travail sont la DSC sous pression, la SPME-GC et l'indice de peroxyde.

Les analyses ont été effectuées dans des conditions de température et de pression différentes et sous atmosphère oxygénée. Des analyses ont été mises en place pour étudier l'efficacité des antioxydants, l'effet de la quantité de DHA sur la stabilité des huiles de poisson microencapsulées.

Les trois méthodes d'analyses ont permis de mettre en évidence les effets de la température, de la pression, de l'oxygène dissous, de la teneur en oméga-3 (DHA) et des antioxydants sur la stabilité à l'oxydation des huiles de poisson.

La corrélation des résultats obtenus par les trois techniques d'analyse permet de mieux comprendre et surtout de mieux suivre la stabilité des huiles de poisson (microencapsulées ou non) à l'oxydation.

Ces techniques d'analyses devraient permettre aux producteurs de ces produits d'être à mesure de prédire dans quelles conditions et sur quelle durée ces huiles peuvent et doivent être stockées pour maintenir leur qualité.

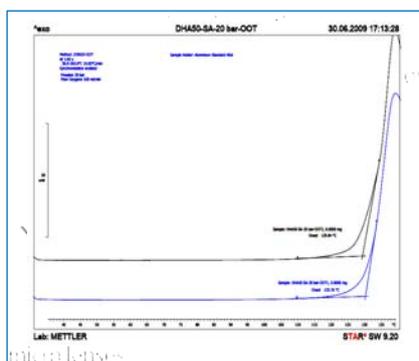
Travail de diplôme
| édition 2009 |

Filière
Science du Vivant

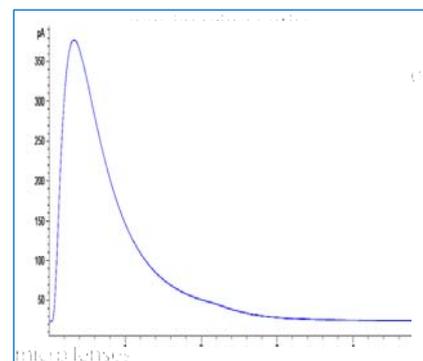
Domaine d'application
Chimie Analytique

Professeur responsable
Jacques Besse
Jacques.besse@hevs.ch

Partenaire
Micro Capsule Concepts s.a
CH 2013 Colombier



DSC – allure d'un thermogramme obtenue avec l'huile DHA 70 –SA (en programmation de température)



SPME-GC : allure d'un chromatogramme exprimant l'aire des volatils totaux en fonction du temps d'incubation (T = 90°C)

*« On ne peut pas croire à la moitié de ce qu'on entend raconter,
on ne peut pas croire à la plupart des choses qu'on lit,
mais on peut croire à tout ce que l'on fait... »*

Ellen MacArthur (2002), *Du vent dans les rêves*, Editions, Paris

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements à tous mes professeurs de la haute école valaisanne, pour m'avoir soutenu et donné un enseignement exemplaire.

Je remercie Mr Jacques Besse, mon responsable de travail de diplôme, pour son ouverture, sa disponibilité et sa rigueur lors de ce travail.

Je remercie Mr Jean-Antoine Meiners, mon mandant, pour le sujet de travail et également pour le travail d'encadrement et de suivi régulier de l'avancement de mon travail de diplôme.

Je remercie Mr Thierry Udrisard, en tant qu'assistant pour ce travail, pour son soutien pratique, son sens de l'organisation et pour les bons moments passés dans son laboratoire de génie chimique.

Je remercie Mr Jean Luc-Luisier

pour son soutien dans le cadre de la mise en place de la méthode SPME en corrélation avec la TV 9000 et le temps d'échanges.

Je remercie Mr Rudolf Rieisen, de Mettler Toledo, pour la mise à disposition de l'appareil HP-DSC, ainsi que pour son appréciation et son apport dans le cadre des analyses DSC.

J'adresse mes très sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique et à Sébastien Hugues pour leur soutien et pour les moments de réflexions scientifiques ou non.

Un très grand merci à ma femme Déborah, à mon fils Léni Wendélassida et à ma mère pour tout ce qu'ils m'apportent et notamment pour leur confiance, leur soutien et leur aide ...

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	1
1.1	OBJECTIFS	1
1.2	LE MANDANT.....	2
1.3	PARTIE THÉORIQUE.....	3
1.3.1	LES ACIDES GRAS.....	3
1.3.1.1	Les acides gras saturés (AGS) :.....	3
1.3.1.2	Les acides gras monoinsaturés (AGM ou MUFA).....	3
1.3.1.3	Les acides gras polyinsaturés (AGPI ou PUFA).....	3
1.3.1.4	L'OXDATION DES ACIDES GRAS.....	4
1.3.1.5	LES MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE L'OXYDATION.....	4
1.3.1.5.1	L'auto-oxydation et les produits formés.....	4
1.3.1.5.2	La photo-oxydation.....	9
1.3.1.5.3	Les voies enzymatiques.....	9
1.3.1.5.4	Les initiateurs de l'oxydation des lipides.....	10
1.3.1.5.5	L'initiation par les formes activées de l'oxygène.....	10
1.3.1.5.6	L'initiation par les métaux.....	10
1.3.1.5.7	Les facteurs environnementaux.....	10
1.3.2	LES ANTIOXYDANTS.....	12
1.3.2.1	Les antioxydants de type I.....	12
1.3.2.2	Les antioxydants de type II.....	13
1.3.2.3	Les antioxydants de type III.....	14
1.3.2.4	Les agents synergiques.....	14
1.3.2.5	Autres types d'antioxydants.....	14
1.3.3	LES EMULSIONS.....	15
1.3.3.1	Les techniques d'émulsion.....	15
1.3.3.1.1	Homogénéisateur à haute pression.....	15
1.3.3.1.2	Homogénéisateur à ultrason.....	15
1.3.3.2	Les émulsifiants.....	15
1.3.4	La technique de microencapsulation.....	16
1.3.4.1	L'alginate.....	16
1.3.4.1.1	Propriété.....	16
1.3.4.1.2	Structure.....	17
1.3.4.1.3	La gélification.....	18
1.3.4.1.4	Le principe de l'encapsulation par l'alginate.....	19
1.3.4.1.5	La méthode par extrusion.....	19

1.3.4.1.6	La méthode par émulsion	19
1.3.5	INDICE DE PEROXYDE	20
1.3.5.1	Principe :	20
1.3.5.2	Expression des résultats	20
1.3.6	LA DSC « Differential Scanning Calorimetry »	21
1.3.6.1	Technique d'échantillonnage	21
1.3.6.2	Étalonnage	22
1.3.7	LA HEADSPACE-SPME « Solid Phase Micro Extraction »	22
1.3.7.1	Définition	22
1.3.7.2	La technique d'agitation	23
1.3.7.3	La technique d'extraction des volatils	23
1.3.7.4	La technique de désorption des volatils	24
1.3.7.5	Les paramètres importants	24
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.1	Matériel	26
2.1.1	Produits	26
2.1.1.1	Les huiles, antioxydants et émulsifiant	26
2.1.1.2	Les produits chimiques	26
2.1.2	Equipement et appareillage	26
2.1.2.1	SPME-GC	26
2.1.2.2	DSC	27
2.1.2.3	EMULSION	27
2.1.2.4	INDICE DE PEROXYDE	27
2.2	Méthodes	27
2.2.1	INDICE DE PEROXYDE	27
2.2.2	DSC	27
2.2.3	SPME	27
3	RÉSULTATS	28
3.1	INDICE DE PEROXYDE	28
3.2	DSC	29
3.2.1	Répétabilité des mesures	29
3.2.2	Oxidation Onset Temperature (OOT)	30
3.2.3	Influence de la pression sur l'OOT	31
3.2.4	Influence de l'antioxydant sur l'OOT	32
3.2.5	Oxidation Induction Time (OIT)	34
3.2.6	Influence de la pression sur l'OIT (Isotherme à 90°C)	35

3.2.7	Influence de la température sur l'OIT	37
3.2.8	Etude comparée des effets des antioxydants sur l'OIT	38
3.2.9	Analyse cinétique des données	40
3.2.10	Effet de l'oxygène dissous	42
3.2.11	Etude de l'influence des méthodes d'émulsification sur la qualité des huiles 43	
3.2.12	Effets des conditions de fabrication des microcapsules sur la stabilité des huiles microencapsulées.....	44
3.2.12.1	Effet de l'atmosphère de séchage.....	44
3.2.12.2	Effet du lavage sur la stabilité des microcapsules	44
3.2.12.3	Effet du dépôt de silice.....	46
3.3	SPME	47
3.3.1	Allure de chromatogramme	47
3.3.2	Choix de la fibre	47
3.3.3	Influence de la température d'incubation.....	48
3.3.4	Optimisation du temps d'extraction	49
3.3.5	Optimisation du temps de désorption	50
3.3.6	Optimisation du temps d'incubation	51
3.3.7	Optimisation de la quantité d'échantillon	52
3.3.8	Répétabilité de la mesure.....	53
3.3.9	Effet de la température sur la stabilité des huiles	54
3.3.10	Effet de la quantité de DHA (50% et 70%)	55
3.3.11	Effet de l'Oxygène dissous sur l'aire du pic.....	56
3.3.12	Effet de l'antioxydant sur la stabilité des huiles.....	57
3.3.12.1	Mélange de tocophérols en fonction de la concentration en DHA.....	57
3.3.12.2	Comparaison des effets de mélange de tocophérols et des extraits de romarin. 58	
3.3.13	Détermination du coefficient de partage (Méthode PRV)	59
4	DISCUSSION.....	61
4.1	Indice de peroxyde	61
4.2	DSC.....	62
4.3	SPME-GC.....	65
4.4	Corrélation des trois techniques d'analyse.....	67
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	68
6	BIBLIOGRAPHIE	69

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse en Composantes Principales
AGM	Acides Gras Monoinsaturés
AGPI	Acide Gras Polyinsaturés
AGS	Acides Gras Saturés
ANOVA	Analyse des Variances
AOA	Activité des AntiOxydants
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BHT	Butyl-hydroxy-toluène
CAR	Carboxene
DHA	Acide Docosahexaenoique
DVB	DivinylBenzene
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EPA	Acide Eicosapentaenoique
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme
GC	Chromatographie Phase Gazeuse
HPDSC	DSC sous haute pression
IP	Indice de peroxyde
MDA	Malonaldehyde
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids
OD	Oxygène Dissous
OIT	Onset Induction Time
OOT	Onset Oxidation Temperature
PDMS	PolyDimethylSiloxane
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
SPME	Micro Extraction en Phase Solide
Sr-TBA	Substance réactives à l'acide thiobarbiturique
Volatils	Composés volatils
VT	Volatils totaux

LISTE DE FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Les deux familles d'AGPI essentiels	4
Figure 2: Représentation simplifiée de la cinétique de formation et de décomposition des hydroperoxydes et de la cinétique de formation des produits secondaires d'oxydation. ..	6
Figure 3 : Cas de la formation des hydroperoxydes isomères à partir d'un acide gras mono-insaturé.....	7
Figure 4: Schéma général de l'autoxydation des lipides et de leurs produits possibles.....	8
Figure 5 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité de la lipoxygénase (German 1985).....	10
Figure 6 : Les différentes structures et noms des tocophérols.....	13
Figure 7 : Structure de l'acide rosmarinique	13
Figure 8: Echelle HLB de l'émulsifiant.....	16
Figure 9 : Mécanisme de détermination de l'IP par iodométrie.....	20
Figure 10 : Equation de calcul de l'IP	20
Figure 11: Principe de la DSC à flux de chaleur	21
Figure 12 : Fibre de SPME pour utilisation manuelle et échantillonnage automatique (adapté de Sigma-Aldrich Co. & Supelco 1999).....	23
Figure 13 : Méthode d'extraction des volatiles.....	24
Figure 14 : Désorption des volatiles dans le GC.....	24
Figure 15 : Evolution l'Indice de peroxyde en fonction du temps de chauffage.....	28
Figure 16: reproductibilité des mesures de l'OIT	29
Figure 17 : Détermination de l'OOT par la méthode des tangentes.....	30
Figure 18 : Effet de la pression sur l'OOT	31
Figure 19: Effet du mélange de tocophérols sur l'OOT.....	32
Figure 20: Effet du mélange de tocophérols sur l'OOT (huile DHA70)	33
Figure 21 : Evaluation de l'OIT.....	34
Figure 22: Effet de la pression sur l'OIT.....	35
Figure 23 Effet de la pression sur l'OIT – Régression logarithmique.....	36
Figure 24: Effet de la température sur l'OIT	37
Figure 25 : Effets comparés des deux antioxydants sur l'OIT	38
Figure 26: Activité comparée des antioxydants sur l'OIT	39
Figure 27: Evaluation de l'énergie d'activation par régression linéaire de $\ln(1/OIT)$ en fonction de $1/T$	41
Figure 28 : Evaluation de l'entropie et de l'enthalpie de réaction par régression linéaire de $\ln(k/T)$ en fonction de $1/T$	41
Figure 29: Aspect des émulsions après 1 semaine de stockage	44
Figure 30: signal obtenu par désorption directe des composés volatils absorbés par la fibre SPME.....	47
Figure 31 : Relation entre le type de fibre SPME et la surface des pics ($pA*s$).....	47
Figure 32 : Effet de la température sur l'aire du pic des volatils totaux.....	48
Figure 33: Effet du temps d'extraction sur l'aire du pic des volatils totaux.....	49
Figure 34: Effet du temps de désorption sur l'aire du pic.....	50
Figure 35: Effet du temps d'incubation sur l'aire du pic.....	51
Figure 36: Effet du volume d'échantillon sur l'aire des pics	52
Figure 37: reproductibilité des mesures	53
Figure 38: Effet de la température sur l'aire du pic.....	54
Figure 39 : Linéarisation de $\ln(\text{aire du pic})$ en fonction de $1/T [K^{-1}]$	54
Figure 40 : Effet de la quantité de DHA sur l'aire des pics	55

Figure 41: Effet de l'oxygène dissous.....	56
Figure 42: Effet du mélange de tocophérols en fonction de la quantité de DHA	57
Figure 43: Etude comparée des effets des antioxydants (Mélange de tocophérols et extraits de romarin).....	58
Figure 44: Evaluation du coefficient de partage de l'huile DHA70% et DHA50% sans antioxydant.....	60
Figure 45 : Relation semi-logarithme entre l'OIT et la température de réaction isotherme.	62
Figure 46: Variation de la constante de vitesse en fonction de la température	64
Figure 47: effet du mélange de tocophérols.....	66
Tableau 1 : type de fibres SPME	25
Tableau 2 : Essais de répétabilité des mesures de l'OIT (Oxidation Induction Time)	29
Tableau 3 : Variation de l'OOT en fonction de la pression en oxygène	31
Tableau 4 : Activité du mélange de tocophérols sur l'OOT.....	33
Tableau 5: résumé des valeurs mesurées	37
Tableau 6: Evaluation de l'activité des antioxydants en mode dynamique de température	39
Tableau 7 : Valeurs de l'énergie d'activation pour les trois types d'huile	40
Tableau 8 : Effet de l'oxygène dissous sur l'OOT (méthode dynamique).....	42
Tableau 9: Effet de l'oxygène dissous sur l'OIT (méthode isotherme à 110°C).....	42
Tableau 10: Echantillons et caractéristiques de la méthode sous pression.....	43
Tableau 11: Echantillons et caractéristiques de la méthode à ultrason	43
Tableau 12 : Comparaison des effets des différentes techniques.....	43
Tableau 13: Effet de l'atmosphère de séchage sur la stabilité des huiles microencapsulées	44
Tableau 14: Effet du lavage sur la stabilité des huiles microencapsulées	45
Tableau 15: Effet du lavage sur la stabilité des huiles microencapsulées (bis).....	46
Tableau 16 : Effet de dépôt de silice sur la stabilité des huiles microencapsulées	46
Tableau 17 : Valeurs statistiques en fonction du temps de désorption	50
Tableau 18 : Valeurs statistiques en fonction du temps d'incubation.....	51
Tableau 19 : Evaluation de la répétabilité des mesures	53
Tableau 20 : Influence de l'oxygène dissout	56
Tableau 21 : Effet du temps d'incubation sur l'IP à 90°C	61
Tableau 22 : Effet de l'antioxydant (mélange de tocophérols) sur l'IP à 90°C.....	61
Tableau 23 : Paramètre d'Arrhenius, enthalpie et entropie d'activation pour l'oxydation des huiles.....	63
Tableau 24: Evaluation de la constante de vitesse.....	63
Tableau 25 : Effet de la température sur les aires de pics	65
Tableau 26 : Effet de DHA sur l'aire du pic	65
Tableau 27 : Effet comparé des extraits de romarin et la mixture de tocophérols.....	66

1 INTRODUCTION

1.1 OBJECTIFS

Le but de ce travail de diplôme est d'étudier la stabilité des huiles de poisson microencapsulées enrichies en oméga-3 ou contenant des antioxydants, sous différentes conditions de traitements et de stockages. Cette stabilité est étudiée en fonction de plusieurs paramètres tels que la température, la pression en oxygène, sous atmosphère d'azote, etc.

Pour mener à bien ces études, trois méthodes analytiques ont été utilisées:

- La DSC sous pression : cette technique permet d'obtenir des informations sur la période d'induction à l'oxydation des huiles de poisson. L'OOT et l'OIT sont deux paramètres qui permettent de caractériser cette stabilité des huiles à l'oxydation.
- La SPME-GC, définie comme étant la micro extraction en phase solide couplée avec la chromatographie en phase gazeuse : elle permet quant à elle de mesurer la quantité de volatils totaux formée lors de l'oxydation des huiles. Le paramètre caractéristique est l'aire des pics formée après exposition des huiles à des conditions drastiques. Cette technique permet la quantification des produits secondaires de l'oxydation des acides gras.
- L'indice de peroxyde(IP), méthode basée sur la méthode 5.2 du MSDA : elle permet de quantifier les hydroperoxydes qui sont des produits primaires de l'oxydation.

La mise en commun de ces trois méthodes devrait permettre de trouver une relation entre la stabilité des huiles et les conditions de travail.

1.2 LE MANDANT



Laboratoire MEINERS Sàrl 2013 Colombier, Switzerland

A truly
independent development laboratory!

30 years of tradition in innovation.

The one stop address for multiple technology development based on:

Sound science to avoid guessing if a micro-encapsulation concept functions in real life as designed.

Practical experience is priceless when it comes to evaluate technology options to solve new challenges. When it comes to understand the real life of scale-up and industrial production few laboratories can claim our standards.

*“Thinking out of the box” was the origin of our unique concept which we call **particle functionalization**, a combination of the best of all technologies.*

There are only a few organizations capable to master flawlessly a multitude of processes. Some are the result of trial and error; and for us this was not different, but we worked longer, harder, faster and smarter to achieve that:

- our enzymes have gone through palletizing process conditions,
- our lacto-bacilli have survived gastric juices,
- our fish oil did not taste bad nor oxidized,
- our essential oils where full of flavor as before,
- our peptides passed the rumen without any harm,
- our iron fortification had no rusty flavor

We have many more examples to demonstrate that Laboratoire Meiners Sàrl is a reliable and cost-efficient partner, capable to make your micro-encapsulation projects to succeed.

Let us take you into the next Kondratieff cycle of micro - and nano technologies

Laboratoire Meiners Sàrl

Postal address: C.P. 206, 2035 Corcelles, Switzerland.

Office and laboratories : Avenue de la Gare 6A, 2013 Colombier, Switzerland

Phone : +41 32 8423383, Fax : +41 32 8423392, email : jam@meiners.ch

1.3 PARTIE THÉORIQUE

1.3.1 LES ACIDES GRAS

Un acide gras est une molécule formée d'une chaîne de carbones liée à des hydrogènes (c'est ce qu'on appelle un hydrocarbure en chimie organique) et terminée par un groupement acide : COOH.

Les acides gras entrent dans la composition des lipides. On distingue 3 classes d'acides gras qui se différencient par leur degré d'insaturation :

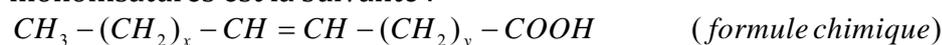
1.3.1.1 Les acides gras saturés (AGS) :

La formule chimique de ces acides gras saturés est la suivante :



1.3.1.2 Les acides gras monoinsaturés (AGM ou MUFA)

Un acide gras est dit mono-insaturé lorsque deux atomes de carbone consécutifs sur la chaîne, sont unis par une double liaison. On peut citer l'exemple de l'acide oléique qui est un acide gras mono-insaturé courant dans notre alimentation. Il tire son nom de l'olive dont l'huile est très riche en acide oléique. La formule chimique des acides gras monoinsaturés est la suivante :



Pour une même formule chimique, il peut donc exister un grand nombre d'isomères, en fonction de la position de la double liaison, mais aussi en fonction de la configuration cis ou trans. Ainsi, lorsque des isomères sont pourvus d'une double liaison dont la position n'est pas identique, ils sont appelés des isomères de structure ou isomères constitutionnels. Lorsque des isomères ont la même structure chimique dans le cas présent, la double liaison en même position mais qu'ils possèdent une configuration spatiale cis/trans différente, ils sont appelés des isomères géométriques (Hart 1987). La présence de multiples doubles liaisons au sein des acides gras polyinsaturés augmente évidemment le nombre d'isomères possibles. A l'état naturel, la majorité des acides gras ont la configuration cis.

1.3.1.3 Les acides gras polyinsaturés (AGPI ou PUFA)

Les acides gras polyinsaturés qui ont un nombre d'atomes de carbone inférieur à 18 sont absents ou présents en quantités extrêmement faibles dans les graisses végétales et animales, mais les acides gras en C14 et en C16 ont été mentionnés dans les huiles d'animaux marins (Dacosta 2004).

Il existe deux familles d'acides gras polyinsaturés essentiels nommées n-3 (ou oméga-3) et n-6 (ou oméga-6). Deux acides gras sont à l'origine de ces familles. L'acide α -linoléique (C18 :3 ω -3) est le précurseur des oméga-3 et l'acide linoléique (C18 :6 ω -6) est le précurseur de la famille des oméga-6 (Figure 1). Ces deux acides gras sont indispensables car ils ne sont pas synthétisables par l'organisme.

Seule l'alimentation peut nous les fournir. Ces dernières années, l'acide α -linoléique ainsi que deux de ces dérivés, l'EPA (Acide Eicosapentaénoïque) et le DHA (Acide Docosahexaénoïque) qui sont deux acides gras polyinsaturés à longue chaîne, ont particulièrement intéressé les nutritionnistes pour leur rôle important vis-à-vis des maladies cardio-vasculaires.

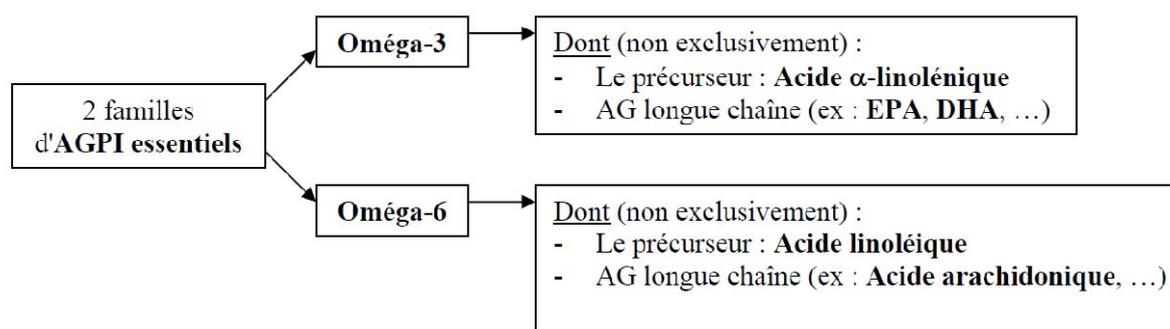


Figure 1 : Les deux familles d'AGPI essentiels

1.3.1.4 L'OXDATION DES ACIDES GRAS

Le rancissement oxydatif est un phénomène purement chimique et spontané dès lors que des acides gras insaturés (comportant au moins une double liaison) sont en présence d'oxygène atmosphérique. Il faut noter qu'à ce stade, la lumière ou la température sont des facteurs accélérateurs mais ne sont pas des éléments nécessaires et suffisants pour déclencher des phénomènes d'oxydation.

Ce phénomène chimique se caractérise également par son caractère évolutif (dû à la succession dans le temps, de différentes réactions chimiques conduisant à plusieurs familles de produits réactionnels intermédiaires et finaux). Il est irréversible et altératif (puisque l'attaque des acides gras par l'oxygène atmosphérique conduit à des dégradations organoleptiques et fonctionnelles qui affectent directement la qualité marchande des corps gras et des produits finis).

Parmi les produits de dégradations, les composés aldéhydiques volatils jouent un rôle clef car ils sont responsables des saveurs de « rance ». Pour cette raison, la réaction d'oxydation est souvent associée à la notion de rancissement chimique aldéhydique (à distinguer du rancissement butyrique ou du rancissement cétonique, qui sont des phénomènes enzymatiques d'hydrolyse).

1.3.1.5 LES MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE L'OXYDATION

L'oxydation des acides gras peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- L'auto-oxydation qui est catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres.
- La photo-oxydation qui est initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs.
- L'oxydation enzymatique initiée quand à elle par la lipoxygénase.

1.3.1.5.1 L'auto-oxydation et les produits formés

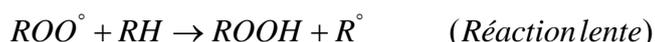
L'oxydation des acides gras est une réaction d'auto-oxydation. Plus précisément, la réaction d'auto-oxydation est une réaction de type radicalaire : rappelons qu'un radical libre est une espèce chimique qui possède un électron non apparié dit « célibataire » ce qui en fait un intermédiaire réactionnel instable, à courte durée de vie, qui se stabilise en arrachant un électron à une autre espèce chimique qui se trouve alors elle-même déstabilisée puisque porteuse d'un électron non apparié. Ceci permet de comprendre le caractère autocatalytique de la réaction d'oxydation dont la cinétique suit une courbe exponentielle croissante, comportant trois phases distinctes :

- UNE PHASE D'INITIATION : cette étape est lente et elle correspond à la formation des radicaux libres. En effet, en présence d'un initiateur (I), les acides gras insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former ces radicaux libres (R°).

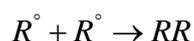


Ce mode d'initiation qui est favorisé par une élévation de la température peut être produit par des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène ou des traces métalliques.

- UNE PHASE DE PROPAGATION : elle est rapide et correspond à la formation des peroxydes à partir des radicaux libres et à l'apparition consécutive des composés secondaires de l'oxydation. Ainsi, les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables (ROO°), qui peuvent réagir avec de nouvelles molécules d'acides gras pour former des hydroperoxydes.



- UNE PHASE DE TERMINAISON : cette phase correspond à la disparition des peroxydes et à l'accumulation des composés secondaires d'oxydation, c'est-à-dire à l'oxydation complète du substrat.



Comme le montre la figure 2, la phase de propagation peut elle-même être découpée en deux étapes séquentielles :

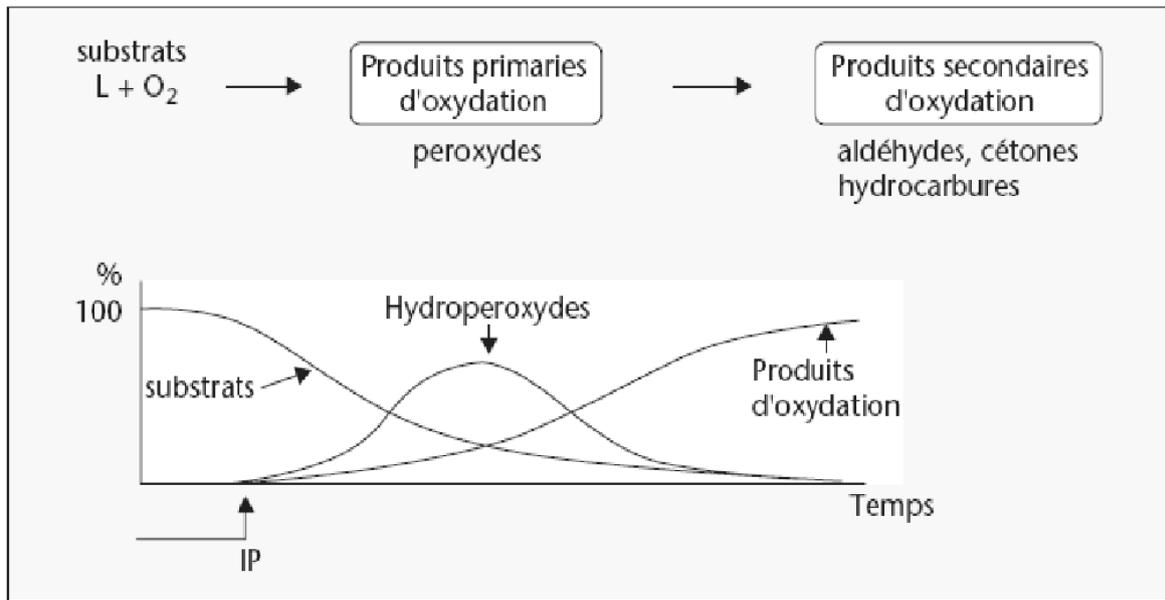


Figure 2: Représentation simplifiée de la cinétique de formation et de décomposition des hydroperoxydes et de la cinétique de formation des produits secondaires d'oxydation.

- La première étape correspond à l'apparition des peroxydes qui sont des composés primaires de l'oxydation à partir des radicaux libres instables. La quantité de peroxydes formés peut être évaluée analytiquement grâce à la détermination de l'indice de peroxyde.
Il faut noter qu'à ce stade dit de peroxydation, la flaveur de rance ne peut pas être perceptible et donc la qualité marchande du produit est non encore altérée.
- La deuxième étape se traduit par l'évolution des hydroperoxydes en composés secondaires d'oxydation par deux voies principales :
 - Une voie dite de scission qui conduit par coupure à la libération de composés volatils (chaînes carbonées courtes et moyennes). Ceux-ci sont notamment aldéhydiques et responsables des flaveurs de rance, caractérisées par un seuil de détection très faible.
 - une voie dite de remaniement, conduisant suite à différents types de pontage intra- ou inter-acides gras ou suite à l'apparition de fonctions oxydées (fonctions cétone, époxy, hydroxy) sur les acides gras et à la formation d'acides gras oxydés, de triglycérides oxydés, de polymères de triglycérides oxydés.

À ce stade dit de rancissement, la flaveur de rance est bien entendu perceptible et peut être accompagnée par d'autres conséquences d'ordre fonctionnel (l'aspect, la couleur et la texture) et d'ordre physiologique (altérations des acides gras essentiels et des vitamines liposolubles).

L'examen de la formation des radicaux et hydroperoxydes d'acides gras en conditions d'auto-oxydation (en présence d'oxygène, en absence de lumière) illustre la complexité de la réaction d'oxydation. Suite à un apport énergétique, l'hydrogène situé en α (position allylique) de chaque côté de la double liaison de l'acide gras subit une coupure homolytique. Cet hydrogène est en effet le plus labile car il subit l'effet électrodonneur de la double liaison voisine.

Il apparaît alors un radical d'acide gras, sur lequel la double liaison peut migrer (isomérisation de position) et/ou s'isomériser (isomérisation géométrique cis/trans) : on parle alors de métamérie. L'oxygène atmosphérique peut alors se fixer sur le radical d'acide gras pour former un radical peroxydique, instable et qui se stabilise sous forme d'un hydroperoxyde d'acide gras grâce à un H arraché en alpha de la double liaison d'un autre acide gras.

Ainsi, la figure 3 illustre le cas d'un acide gras porteur d'une double liaison, à partir duquel se forment quatre hydroperoxydes isomères de position, avec chacun deux isomères géométriques potentiels. Moyennant quoi, le pool d'hydroperoxydes qui se forme dans un produit formulé comportant une ou plusieurs matière(s) grasse(s) comportant chacune plusieurs acides gras, est très complexe, et contribue à la formation d'une grande variété de produits secondaires d'oxydation.

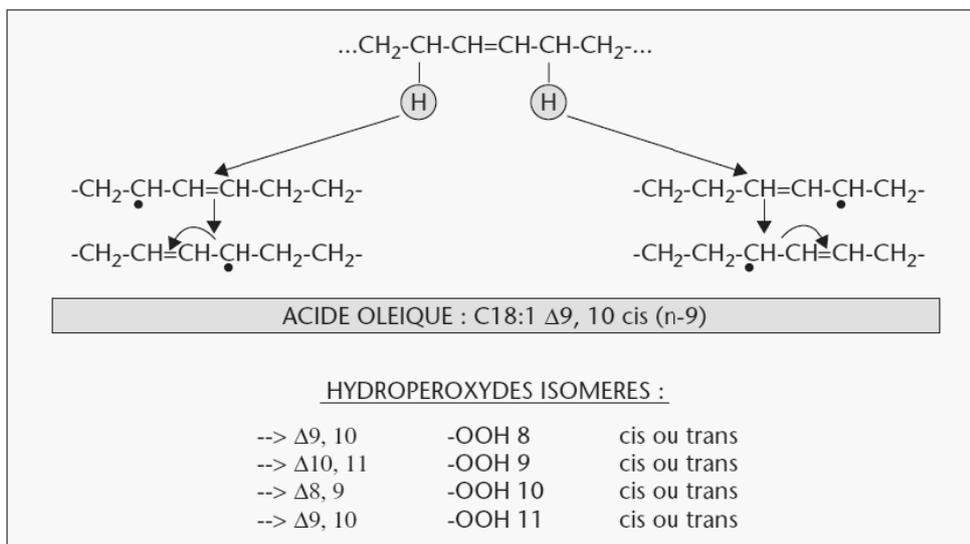


Figure 3 : Cas de la formation des hydroperoxydes isomères à partir d'un acide gras mono-insaturé
La cinétique de cette réaction est influencée par des paramètres qu'il est nécessaire de minimiser :

- Les paramètres exogènes : ils se caractérisent par l'environnement dans lequel se trouve le produit alimentaire. La température et la lumière apportent l'énergie facilitant le passage à l'étape radicalaire. L'aération assure quant à elle le renouvellement du réactif (oxygène) et décale ainsi la réaction vers la formation des produits oxydés (Judde 2004) ;
- Les paramètres endogènes : ils se caractérisent quant à eux par la nature et/ou la qualité du corps gras. On peut citer entre autres le taux d'insaturation, les traces de photosensibilisateurs, l'absence d'antioxydants naturels et qui ont pour conséquences directes l'augmentation du risque oxydatif.

La qualité du corps gras est également garante de la maîtrise du risque oxydatif : ainsi la sélection d'un corps gras dépourvu de peroxydes (indice de peroxyde faible), dépourvu d'acides gras libres (acidité oléique faible), ne comportant pas de traces de métaux pro-oxydants, contribuera à améliorer la stabilité à l'oxydation de l'huile (Judde 2004).

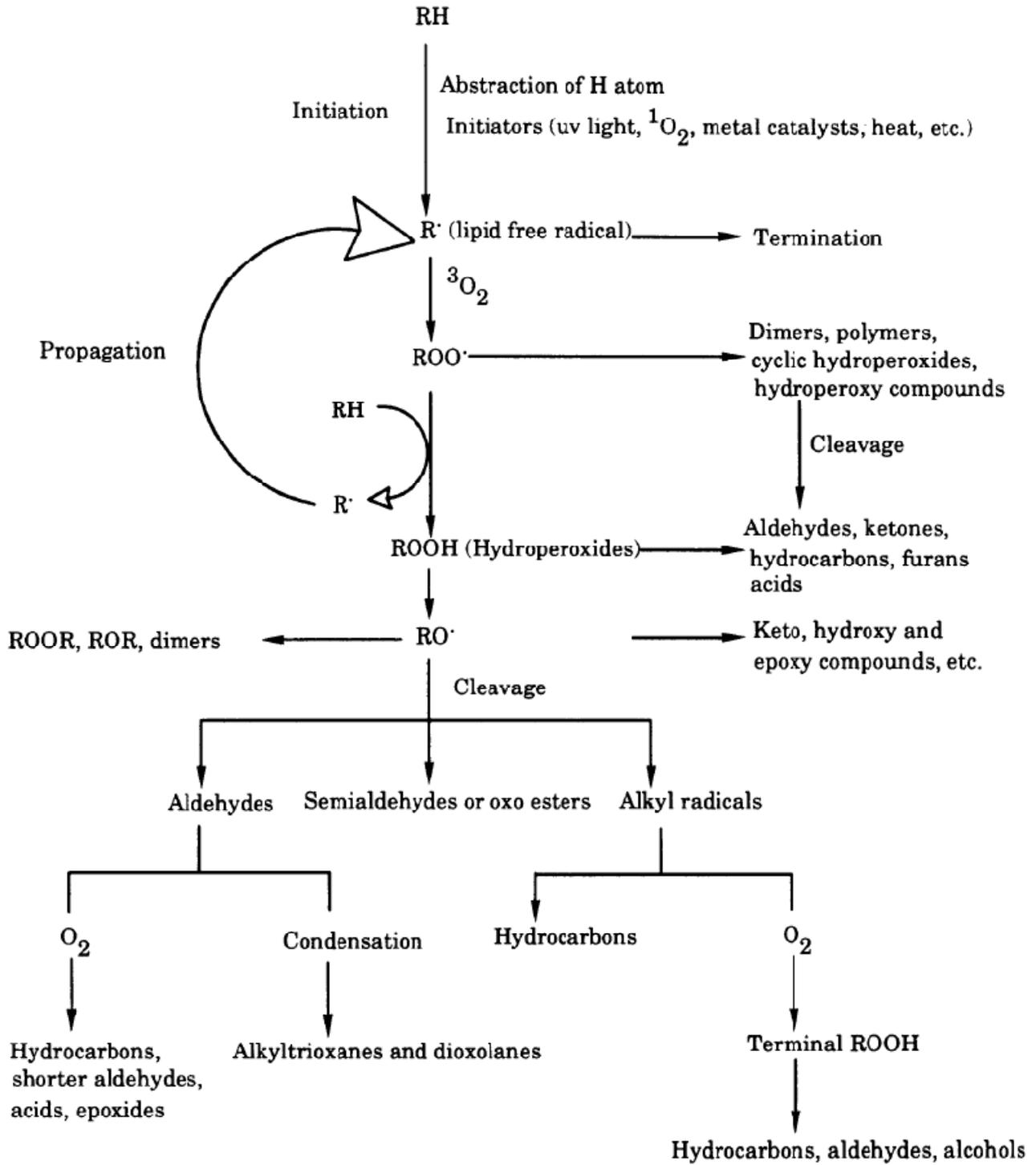


Figure 4: Schéma général de l'autoxydation des lipides et de leurs produits possibles

1.3.1.5.2 La photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines ou la riboflavine. (Hultin 1992)

Les photosensibilisateurs (Sens) absorbent l'énergie lumineuse et passent à un état triplement excité (Sens³) (Hultin 1994). Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des acides gras selon deux types de mécanismes (Frankel 1998) :

- Selon le premier mécanisme, les photosensibilisateurs de type I, tels que la riboflavine agissent comme les radicaux libres initiateurs. Dans leur état triplet, ils arrachent un hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène.



- Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité (sens 3) avec l'oxygène triplet auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet (¹O₂).



L'oxygène singulet ainsi formé est très électrophile et peut directement réagir sur un acide gras insaturé (RH) pour donner un hydroperoxyde ROOH



Les réactions radicalaires en chaîne de l'auto-oxydation interviennent par la suite. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par auto-oxydation (Frankel 1998).

1.3.1.5.3 Les voies enzymatiques

Le phénomène d'oxydation des AGPI, peut être d'origine enzymatique. Dans ce cas, les deux enzymes principalement impliquées dans cette oxydation sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase (Hultin 1994). Le premier enzyme catalyse l'insertion dans ce cas d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé, selon une réaction spécifique et induit la formation d'hydroperoxydes. La lipoxygénase agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases (figure 5). Quant à la cyclooxygénase, elle est une lipoxygénase qui incorpore dans son squelette deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques.

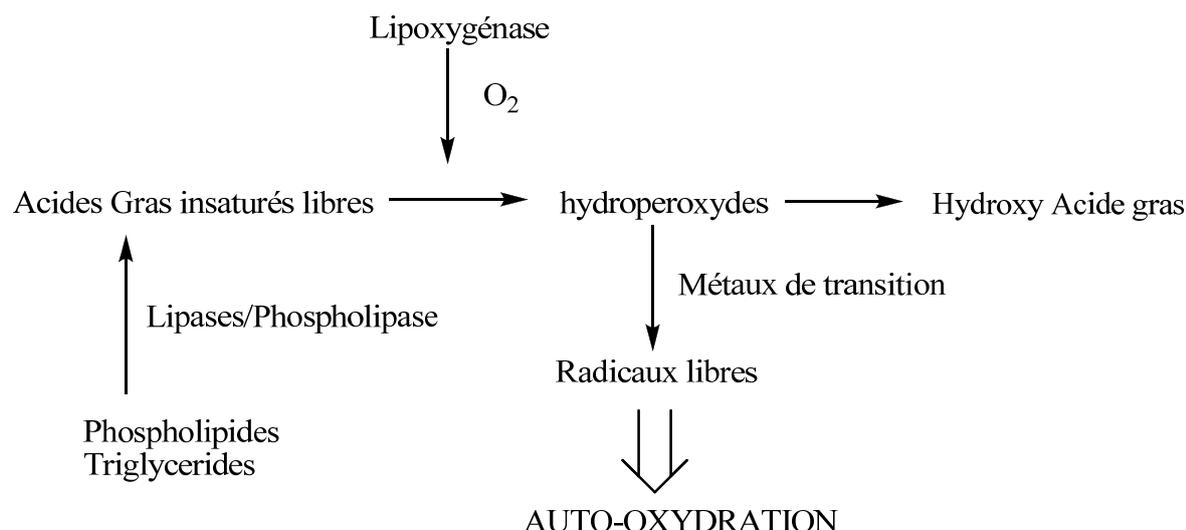


Figure 5 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité de la lipoxygénase (German 1985)

1.3.1.5.4 Les initiateurs de l'oxydation des lipides

Dans les réactions d'oxydation des AGPI, la phase d'initiation peut être déclenchée par plusieurs facteurs. Parmi les initiateurs, on peut citer les formes activées de l'oxygène, les enzymes, les métaux ou la chaleur (Hsieh 1989b; Hultin 1994; Frankel 1998).

1.3.1.5.5 L'initiation par les formes activées de l'oxygène

Dans son état fondamental, la molécule d'oxygène est à l'état triplet. Il ne peut donc pas réagir avec les AGPI car la barrière de spin est trop élevée. La réaction de l'oxygène avec les APGI est rendue possible selon trois mécanismes différents :

- Le premier mécanisme correspond aux voies de l'auto-oxydation qui résulte du départ d'un hydrogène d'une chaîne d'acides gras sous l'effet de différents initiateurs tels que les ions des métaux de transition, les formes activées de l'oxygène comme le radical hydroxyle qui est très réactif. Ce radical peut alors arracher un hydrogène et former un radical alkyle qui va à son tour initier alors la réaction de peroxydation lipidique.
- Le deuxième mécanisme est la formation d'oxygène singulet, qui est capable de réagir directement sur les chaînes des AGPI. Ce mécanisme se produit généralement lors de la photo-oxydation.
- Le troisième mécanisme est lié à l'intervention directe d'enzymes permettant une fixation directe de l'oxygène moléculaire

1.3.1.5.6 L'initiation par les métaux

Les métaux de transition jouent un rôle important dans la génération des radicaux libres de l'oxygène. Ce sont les premiers activateurs des molécules d'oxygène.

Cette initiation de l'oxydation des AGPI peut se faire par transfert d'électron ou par la formation de complexes de transition ou de complexes avec le peroxyde d'hydrogène, qui va catalyser l'auto-oxydation et la décomposition par la réaction redox (Frankel 1998).

1.3.1.5.7 Les facteurs environnementaux

Les principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des AGPI sont : la température, le pH, l'activité de l'eau et la pression partielle en oxygène.

- Une élévation de la température va favoriser l'oxydation des AGPI. L'oxydation est d'autant plus rapide que la température est importante. C'est ainsi que le départ des hydrogènes allyliques et la décomposition des hydroperoxydes en produits secondaires s'accroît. Cependant, la solubilité de l'oxygène diminue avec l'augmentation de la température, ce qui crée un antagonisme entre ces deux paramètres. A basse température, la solubilité de l'oxygène augmente et la température devient alors le facteur limitant de la peroxydation lipidique. Alors qu'une diminution de la température limite la concentration en oxygène et peut devenir un facteur limitant de l'oxydation.
- Le pH influence le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes (Genot 2003). Pour des réactions d'oxydo-réduction faisant intervenir des protons, le potentiel redox décroît linéairement avec le pH. Un pH acide va favoriser la réaction d'oxydation, en particulier lorsque les espèces pro-oxydantes (ions de métaux de transition) ou antioxydantes (tocophérols) qui sont solubles dans la phase aqueuse sont présentes. Ainsi, plus le pH est bas, plus sont, la solubilité et le potentiel redox de ces ions métalliques et leur réactivité vis-à-vis des molécules oxydables sont élevées.
- La concentration d'oxygène (pression partielle en oxygène) dans le produit et dans son espace environnant influence la vitesse de l'oxydation. Elle intervient également dans la nature des produits secondaires formés par la décomposition des hydroperoxydes. Son incidence est alors sur la durée de conservation des huiles et la nature des odeurs perçues quand le produit est oxydé. La relation entre la vitesse d'oxydation et la pression partielle en oxygène dépend de plusieurs facteurs comme la température, la nature des catalyseurs, des antioxydants et de l'activité de l'eau. Selon les équations théoriques, quand la concentration en oxygène est suffisamment importante, la vitesse de l'oxydation est indépendante de cette concentration. Inversement, quand la concentration en oxygène est faible, la vitesse de l'oxydation est indépendante de la concentration en substrat et directement proportionnelle à la concentration en oxygène. Donc, pour des concentrations intermédiaires en oxygène, la vitesse d'oxydation dépend à la fois des concentrations en oxygène et en substrat.

1.3.2 LES ANTIOXYDANTS

Les antioxydants sont des substances qui sont capables de supprimer, de retarder, voire même d'empêcher les processus de l'oxydation des acides gras. De nos jours, les antioxydants naturels sont de plus en plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire au détriment des antioxydants de synthèse. L'utilisation des antioxydants synthétiques est restreinte dans beaucoup de pays à cause de leurs effets indésirables sur la santé (Brannen 1975; Chen 1992; Kahl R. 1993).

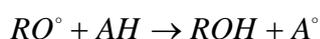
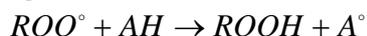
De nombreuses études sont menées sur la recherche de molécules naturelles ayant des propriétés antioxydantes. Les sources d'antioxydants naturels sont nombreuses et bien variées. On a : des extraits d'herbes, de la poudre de miel, des extraits de fruits, de légumes, de thé (Pszczola 2001).

Les antioxydants sont classés en fonction de leurs mécanismes d'action sur la stabilisation de l'oxydation des acides gras.

1.3.2.1 Les antioxydants de type I

L'activité des antioxydants de type I repose sur leur capacité à inactiver les radicaux libres. Ces antioxydants inhibent la propagation des réactions radicalaires par apport d'hydrogènes aux différents radicaux libres présents dans l'huile. L'équation illustre leur mode d'action.

Équation 1 : mécanisme réactionnel des antioxydants de type I



(AH : Antioxydant et A° : Radical de l'antioxydant)

La réaction de propagation s'arrête car les radicaux libres n'ont pas suffisamment d'énergie pour arracher l'hydrogène aux lipides. Les antioxydants, comme les composés phénoliques naturels (les tocophérols) ou de synthèse [comme le butyl-hydroxy-toluène (BHT, E321), le butyl-hydroxy-anisole (BHA, E320) ou le gallate de propyl (E310)] appartiennent à cette classe d'antioxydants (Kortenska 2002).

L' α -tocophérol naturel ou de synthèse est le plus utilisé. Les tocophérols existent naturellement sous la forme de quatre isomères : α , β , γ et δ (E306 à E309). La différence de polarité entre les dérivés tocophérols joue un rôle très important dans leur efficacité. Ainsi le δ -tocophérol est plus polaire que le α -tocophérol et s'accumule le plus rapidement et efficacement à l'interface eau-huile et supprime le développement des hydroperoxydes (Chaiysait 2005). L'efficacité des tocophérols peut être accrue par l'utilisation d'un mélange d'isomères.

Dans le cas des extraits naturels qui sont susceptibles d'être utilisés industriellement, on peut citer les extraits de romarin (*Rosemarinus officinalis L.*) qui possèdent une activité antioxydante, caractérisée par sa capacité à inhiber les radicaux libres (Basaga 1997; Vareltzis 1997). Plusieurs types d'extraits de romarin sont commercialisés et utilisés de nos jours en agro-alimentaire comme antioxydants (Bauman D. 1999). Les molécules des extraits de romarin responsables de cette activité sont principalement les diterpènes phénoliques telles que l'acide carnosique, le carnosol, le rosmanol, l'épirosmanol, l'isorosmanol, le méthyle carnosate (Schwarz K. 1992; Cuvelier 1994) et d'autres acides phénoliques comme l'acide rosmarinique (Frankel E. N. 1996). Le

romarin exerce son travail d'antioxydant à travers une cascade unique de réactions antioxydantes en commençant par l'acide carnosinique qui génère, en autres, le carnosol et le rosmanol. Ces éléments, eux-mêmes des antioxydants, sont oxydés en d'autres éléments qui se réorganisent pour produire plus d'antioxydants capables d'épurer un plus grand nombre de radicaux libres (Cheung S 2007).

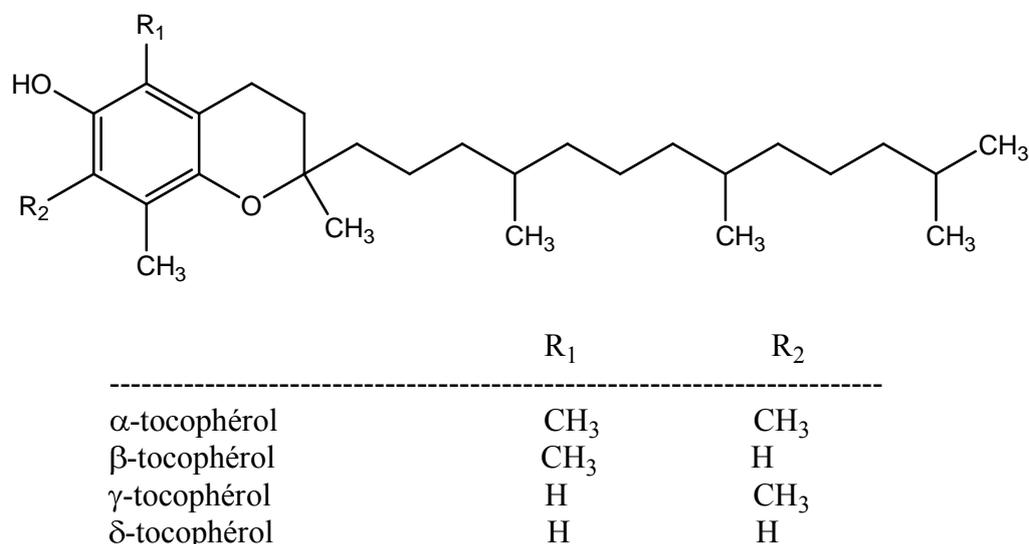
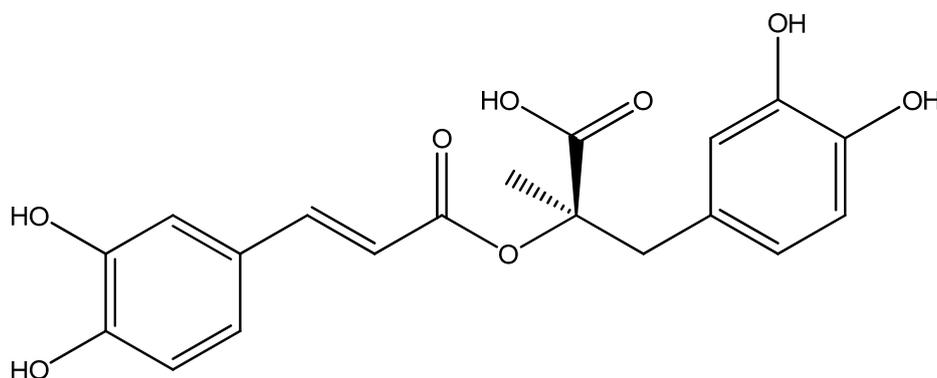


Figure 6 : Les différentes structures et noms des tocophérols



(*R,E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy)-2-methylpropanoic acid
Figure 7 : Structure de l'acide rosmarinique

1.3.2.2 Les antioxydants de type II

Ce type d'antioxydant prévient la formation des radicaux libres et peut donc intervenir selon différents mécanismes possibles. Certains antioxydants chélatent les ions métalliques et réduisent ainsi leur effet pro-oxydant vis-à-vis des ions. C'est le cas des acides phosphorique et citrique. Tout comme les chitosans, qui sont des polymères constitutifs des carapaces de crabes, qui ont montrés une activité antioxydante sur la chair cuite de Hareng (*Clupea Harengus*) conservée pendant 12 jours à 4°C. Cette activité antioxydante est attribuée à la propriété de ces biopolymères à former des complexes avec les métaux de transition (Kamil 2002). L'acide ascorbique possède une activité antioxydante à des teneurs supérieures à 0.5% et un effet pro-oxydant à faible concentration (0.02-0.03%) (Decker 1998).

1.3.2.3 Les antioxydants de type III

Ce type d'antioxydants regroupe les facteurs environnementaux qui ont un effet antioxydant sur les acides gras, en agissant sur le potentiel de réduction du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière. Il faut également noter que l'emballage des produits permet de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière réduisant ainsi le risque d'oxydation de ces derniers. La mise sous vide permet de limiter les réactions d'oxydation et donc de prolonger la durée de vie des produits.

L'emballage des produits peut être réalisé dans des conditions sous atmosphère modifiée (en présence d'azote ou de gaz carbonique), mais cette méthode efficace est très peu utilisée.

1.3.2.4 Les agents synergiques

Les agents synergiques sont des molécules qui ont la capacité d'améliorer l'action de certains antioxydants, ce qui se traduit par un accroissement de la période de protection. On peut citer comme exemples : les acides lactiques, tartriques et orthophosphoriques et leurs sels de sodium, potassium ou de calcium.

On peut également accroître l'efficacité des antioxydants en combinant l'action des antioxydants de types I et II. Leur association permet d'inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des acides gras (Frankel 1998).

1.3.2.5 Autres types d'antioxydants

Comme autres types d'antioxydants, on peut citer le cas de certains composés protéiques. C'est le cas par exemple de la carnosine (Kansci 1997) et des concentrés protéiques obtenus à partir du lait. Ces derniers sont susceptibles de complexer le fer. En plus de cela, ils contiennent des composés polyphénoliques et des flavonoïdes qui présentent des activités antioxydantes.

1.3.3 LES EMULSIONS

Une émulsion est un mélange homogène de deux substances liquides non miscibles. Une des substances est donc dispersée dans la seconde substance sous forme de petites gouttelettes. Le mélange reste stable grâce à un troisième ingrédient appelé émulsifiant.

1.3.3.1 Les techniques d'émulsion

Pour permettre de rendre une émulsion plus stable dans le temps, il est alors nécessaire de réduire le maximum possible la taille des particules de la phase discontinue (Loi de Stokes). Il existe plusieurs types d'appareils capables de réaliser une émulsion, depuis l'agitateur jusqu'à l'homogénéisateur haute pression, en passant par le moulin colloïdal et le turbo émulsionneur.

1.3.3.1.1 Homogénéisateur à haute pression

Il permet d'obtenir des tailles de particules extrêmement petites, puisqu'on arrive à obtenir des tailles de particules inférieures à 500 nm.

Le principe est simple : une pompe à piston plongeur va pousser le fluide à émulsionner au travers d'un orifice réglable, appelé groupe homogénéisant. Plus l'orifice est faible, et plus la pression sera élevée. Au passage de cet obstacle, le fluide subit alors différentes contraintes telles que la turbulence.

1.3.3.1.2 Homogénéisateur à ultrason

Son principe de fonctionnement est basé sur le fait qu'une haute intensité d'ultrason fournit la puissance nécessaire pour disperser une phase liquide (phase dispersé) en petites gouttelettes dans une seconde phase (phase continue). Dans la zone de dispersion, l'implosion des bulles de cavitation provoque des ondes de choc très intense dans le milieu liquide et entraîne la formation de jets liquide à haute vitesse. A niveau de densité d'énergie approprié, l'ultrason permet d'atteindre des tailles de gouttelettes inférieures au micron (micro-émulsions).

1.3.3.2 Les émulsifiants

Les émulsifiants sont souvent appelés émulsionnants. Ce sont des substances qui stabilisent l'émulsion. Ces substances sont des tensioactifs ou des agents de surface. Un émulsifiant est une molécule dite amphiphile parce qu'elle possède une partie hydrophile (qui aime l'eau) et une partie lipophile (=hydrophobe, qui aime l'huile) (Larpent 1965).

Quand on introduit un émulsifiant dans un mélange d'eau et d'huile, il va réorganiser la matière de manière à ce que sa partie hydrophile soit en contact avec l'eau et sa partie lipophile en contact avec l'huile.

En fonction de la nature de l'émulsifiant et des proportions Huile/Eau on obtiendra :

- soit des gouttelettes d'huiles dans l'eau
- soit des gouttelettes d'eau dans l'huile

Selon les deux cas on obtient une émulsion « huile dans eau » H/E ou « eau dans huile » E/H. Le sens de l'émulsion (H/E ou E/H) dépend en premier lieu de l'émulsifiant choisi :

- un émulsifiant très lipophile (= qui se dissout facilement dans l'huile) donnera des émulsions E/H.
- un émulsifiant qui se dissout facilement dans l'eau donnera des émulsions H/E.

Depuis cinquante ans, la méthode HLB (Hydrophilic/Lipophilic Balance) (A. Orechioni ; Griffin 1949; Becher 1984; Davis 1994; Courtney 1997; Parkinson 1997) introduite par Griffin, s'est imposée comme une manière particulièrement rationnelle de formuler des émulsions stables. Cette méthode permet d'éviter une grande partie des essais requis dans une démarche qui serait purement empirique. La méthode HLB est basée sur une classification des tensioactifs par hydrophilie croissante et sur l'utilisation de règles de calculs simples des propriétés de mélanges de tensioactifs. Cette méthode est restée longtemps mal expliquée, mais trouve aujourd'hui une justification satisfaisante grâce aux progrès réalisés dans la compréhension de la physique des émulsions. Ainsi, plus l'émulsifiant est hydrophile, plus l'HLB est élevé.

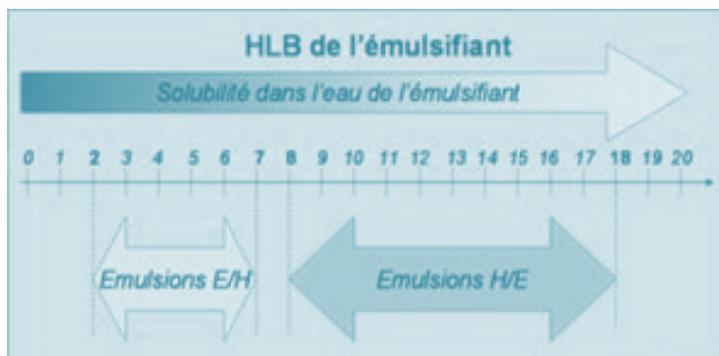


Figure 8: Echelle HLB de l'émulsifiant

Les émulsifiants qui ont un HLB autour de 7-8 (certaines lécithines par exemple) peuvent donner des émulsions H/E et E/H. Dans ce cas, c'est la phase introduite majoritairement qui sera la phase continue.

1.3.4 La technique de microencapsulation

1.3.4.1 L'alginate

L'alginate est un polyélectrolyte, c'est à dire une macromolécule portant des groupements chargés.

Les solutions d'alginate ont les propriétés des macromolécules et celles des molécules ionisées. L'existence des charges sur la chaîne conduit à des interactions intra et intermoléculaires plus fortes que dans le cas de macromolécules non chargées.

L'alginate est obtenue principalement à partir d'algues brunes appartenant à la famille des phéophycées (exemples : *L. hyperborea*, *L. digitata*, *M. pyrifera*, *D. antarctica*).

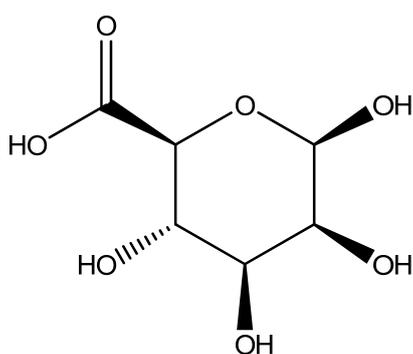
1.3.4.1.1 Propriété

L'alginate de sodium se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre pâle, inodore et insipide, lentement soluble dans l'eau en formant une solution visqueuse et colloïdale, pratiquement insoluble dans l'alcool et dans l'éther.

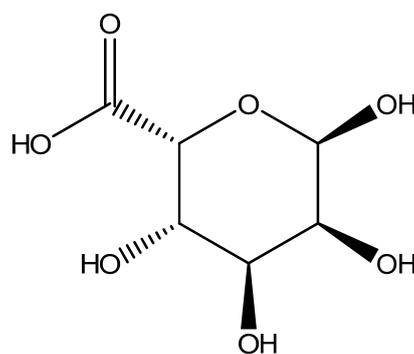
1.3.4.1.2 Structure

L'alginate de sodium est un sel de l'acide alginique. Cet acide alginique est constitué d'un enchaînement linéaire de deux acides hexuroniques liés en α (1 \rightarrow 4) :

- l'acide β -D-mannuronique (M)
- l'acide α -L-guluronique (G)



beta-D-mannuronic acid



alpha-L-guluronic acid

On distingue trois enchaînements différents : M-M-M-, G-G-G- et M-G-M-G-.

Les fractions M-M-M- et G-G-G- sont stéréochimiquement très différentes.

La fraction M-G-M-G- correspond aux zones de fragilité de la molécule, sensibles à l'hydrolyse.

Le rapport M/G dépend de l'espèce de l'algue : ainsi *Macrocystis pyrifera* a une valeur M/G élevée (~ 1.6) alors que *Lamiara hyperborea* a une valeur faible (< 0.5).

Le degré de polymérisation est compris entre 100 et 1000, ce qui correspond à une masse molaire de 20000 à 200000 g mole⁻¹.

1.3.4.1.3 La gélification

L'addition de cations divalents ou trivalents à une solution d'alginate de sodium conduit à une variation des propriétés de cette solution.

L'addition d'ions Ca^{2+} à une solution d'alginate de sodium provoque une augmentation de la viscosité à cause de la formation d'un gel.

Le calcium a la possibilité d'établir des liaisons de coordination avec quatre atomes d'oxygène des chaînes polyguluronates. Le modèle proposé pour expliquer la fixation coopérative du calcium est nommé « boîte à œufs ».

La chaîne d'acides guluroniques présente une structure en « boîtes » qui ont la taille et la forme pour accueillir chacune un atome de Ca^{2+} . La chaîne d'acides mannuroniques a, elle, une structure beaucoup plus linéaire et ne présente pas de telles cavités.

L'apport d'ions Ca^{2+} provoque l'alignement des chaînes d'alginate. Puis un apport plus important provoque un accollement des chaînes en « fermeture éclair ». La structure spatiale globale a un aspect de « boîte à œufs ».

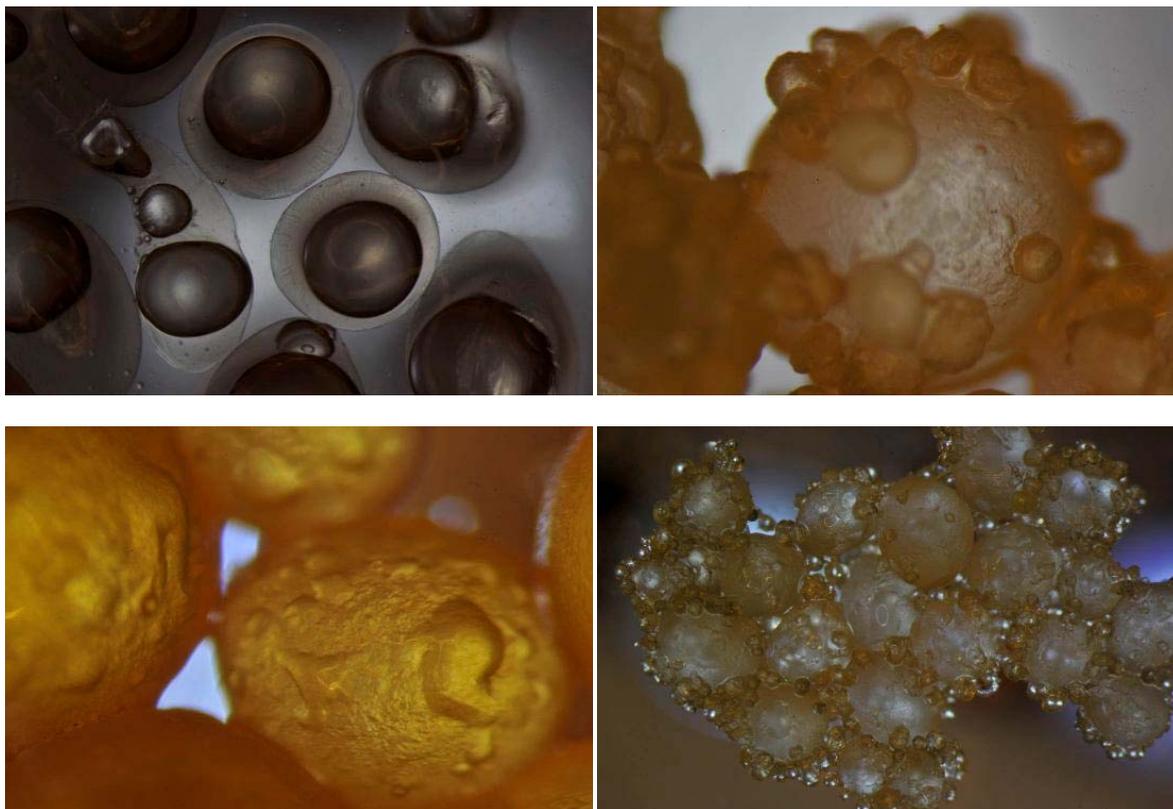
Les jonctions peuvent conduire à une infinité de feuillettes de polyguluronates de calcium.

Les alginate riches en acide guluronique permettent d'obtenir des gels cassants possédant une bonne stabilité à la température, alors que ceux riches en acide mannuronique produisent des gels plus élastiques et plus mous. L'utilisation de l'un ou l'autre dépendra de la finalité de fabrication.

Les gels d'alginate sont thermo-irréversibles c'est à dire qu'ils ne peuvent être fluidifiés que par échanges d'ions.

Le choix du bon sel de calcium est très important. Cela dépendra de l'utilisation que l'on veut en faire, du pourcentage de calcium dans le sel et des législations en vigueur. On sépare habituellement les sels de calcium en trois groupes :

- les sels solubles dans l'eau : un sel tel que le chlorure de calcium est totalement ionisé dans l'eau c'est à dire que l'ensemble des ions Ca^{2+} est disponible pour la réaction. L'emploi de tels sels est souvent réservé à un phénomène de gélification par diffusion.
- les sels moyennement ou faiblement solubles dans l'eau : le sulfate de calcium par exemple. Beaucoup de sels se dissolvent uniquement si la concentration d'un des ions du système est réduite. L'utilisation de tels sels se relève donc utile pour contrôler le taux de gélification.
- les sels insolubles : le dicalcium de phosphate par exemple à $\text{pH}=7$ et 20°C . On pourra mettre en suspension ce sel dans l'alginate à pH neutre puis acidifier le mélange pour provoquer le relargage de calcium et la gélification. On peut ici aussi contrôler le taux de gélification.



Les images ci-dessus montrent l'aspect et la structures des microcapsules formées lors de la microencapsulation des huiles de poisson.

1.3.4.1.4 Le principe de l'encapsulation par l'alginate

Le principe de production de microcapsules d'alginate est la gélification de polymère par extrusion ou émulsion.

Les gels d'alginate se contractent pendant leur formation : il y a perte d'eau et augmentation de la concentration du polymère et du produit encapsulé dans la bille par rapport à la solution de départ.

Ainsi on distingue deux techniques :

- la méthode par extrusion
- la méthode par émulsion

1.3.4.1.5 La méthode par extrusion

La méthode repose sur l'extrusion d'alginate de sodium par une aiguille dans une solution de chlorure de calcium, source d'ions Ca^{++} . Cette solution provoque la gélification de l'alginate et donc la production de billes d'alginate de calcium.

1.3.4.1.6 La méthode par émulsion

Cette méthode repose sur la gélification de l'alginate de sodium au sein d'une émulsion. La solution d'alginate de sodium contenant du calcium lié est émulsionnée dans de l'huile.

Puis le pH est abaissé par ajout d'acide ce qui provoque la libération du calcium en contact avec l'huile et la gélification de l'alginate en périmètre des gouttelettes d'émulsion.

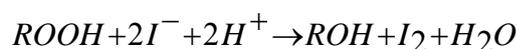
1.3.5 INDICE DE PEROXYDE

L'indice de peroxyde (encore appelé indice de Léa) est recherché pour évaluer l'état de conservation d'une matière grasse au cours du stockage. Comme précisé précédemment, l'auto-oxydation ou rancissement aldéhydique conduit dans un premier temps à la formation de peroxydes (ou hydroperoxydes). C'est ainsi qu'on définit l'indice de peroxyde comme étant le nombre de milliéquivalent d'oxygène par kilogramme de corps gras.

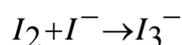
1.3.5.1 Principe :

La première étape de cette oxydation peut être suivie par la recherche et le dosage des peroxydes formés. Ces composés en présence d'iodure de potassium en milieu acide libèrent l'iode qui est ensuite dosé par une solution de thiosulfate de titre connu.

(A) Réaction des ions iodures avec les hydroperoxydes



(B) Formation du complexe entre l'iode et les ions iodures



(C) Réduction des ions iodures libres par le thiosulfate

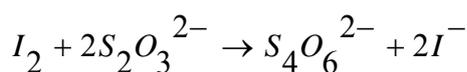


Figure 9 : Mécanisme de détermination de l'IP par iodométrie

1.3.5.2 Expression des résultats

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

$$IP(\text{méq } O_2 / Kg) = \frac{(a-b).t.10}{P}$$

Figure 10 : Equation de calcul de l'IP

Où

a = ml de solution de thiosulfate 0,01 mol/l consommés dans l'essai principal

b = ml de solution de thiosulfate 0,01 mol/l consommés dans l'essai à blanc

t = titre de la solution de thiosulfate

P = prise d'essai, en g.

Puis on exprime en indice de peroxyde (IP), avec 1 décimale.

1.3.6 LA DSC « Differential Scanning Calorimetry »

La DSC est une technique qui permet de mesurer les échanges de chaleur entre un échantillon et une référence en fonction de la température T_p ou du temps. L'équation de base de cette technique est la suivante (Gray 1968):

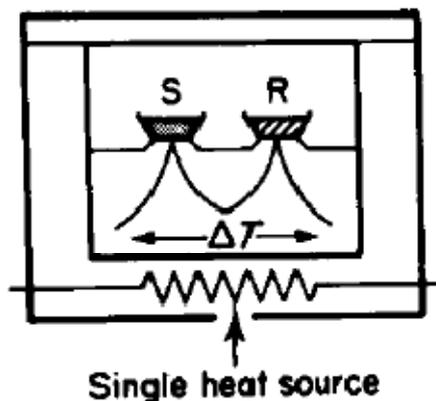


Figure 11: Principe de la DSC à flux de chaleur

Équation 2: Equation généralisée de la DSC

$$\frac{dh}{dt} = \frac{dq}{dt} + (C_e - C_r) \frac{dT_p}{dt} + RC_e \frac{d^2q}{dt^2}$$

Avec:

$\frac{dh}{dt}$: la chaleur libérée ou absorbée par l'échantillon (W)

$\frac{dq}{dt}$: la puissance enregistrée par le calorimètre (W)

C_e : capacité calorifique de l'échantillon (J/K)

C_r : capacité calorifique de la référence (J/K)

T_p : température du bloc thermostatique (K)

t: temps(s)

R: résistance thermique (K/W)

La chaleur dégagée par l'échantillon est donc la somme des trois termes :

Le premier représente la puissance enregistrée par le calorimètre, le deuxième exprime le décalage entre la ligne de base et le niveau zéro du signal : le décalage est dû aux différences de chaleurs spécifiques entre l'échantillon et la référence. Le dernier terme rend compte des phénomènes transitoires liés aux échanges de chaleur entre l'échantillon et le bloc thermostatique. R étant la résistance thermique entre l'échantillon et le four, et RC_e étant la constante de temps de la cellule contenant le produit.

La chaleur libérée ou absorbée par l'échantillon est donc directement reliée à la puissance enregistrée par le calorimètre. Par conséquent, un seul point de calibration permet d'utiliser quantitativement les thermogrammes sur tout le domaine de température accessible par l'appareil. Une mesure de l'air du signal permet de remonter directement à la chaleur totale mise en jeu au cours du phénomène thermique.

L'étude de la fusion d'un corps pur (dont on a connaissance avec précision de l'enthalpie massique de fusion et de la température de fusion selon la norme ASTM E 968 et E 967) (ASTM E968-02 - 2004; ASTM E-967 - 2004), permet de calibrer l'appareil.

Lors de ce travail de diplôme, on a utilisé un appareil de PDSC (Pressure Differential Scanning Calorimeter). Cette méthode est identique à la DSC sauf qu'on travaille sous pression d'oxygène. Elle permet d'évaluer la stabilité oxydative des huiles de poisson en utilisant la variation différentielle entre l'échantillon et la référence en faisant varier la température et la pression en oxygène dans le bloc.

1.3.6.1 Technique d'échantillonnage

La méthode d'encapsulation d'échantillon la plus utilisée est l'utilisation d'une coupelle d'aluminium munie d'un couvercle bombé qui peut être serti. L'allure qualitative du

thermogramme peut être influencée par la configuration de l'échantillon, mais il n'y a pas d'effet sur l'aire du pic (CLaudy 2005).

Pour obtenir un pic étroit et bien résolu, la surface de contact entre l'échantillon et la coupelle doit être maximale.

1.3.6.2 Étalonnage

Avant toute mesure quantitative, le calorimètre doit être étalonné afin d'obtenir une constante d'étalonnage par mJ et de fixer une échelle de température exacte.

Des métaux de grande pureté, dont les enthalpies de fusion sont précises et bien connues, sont souvent employés comme étalons. Le métal le plus couramment utilisé est l'indium (température de fusion : 156.4°C) (Mortimer 1975).

1.3.7 LA HEADSPACE-SPME « Solid Phase Micro Extraction »

1.3.7.1 Définition

La Headspace Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME), peut être traduite comme étant la Micro Extraction en Phase Solide dans l'espace de tête. Cette technique date du début des années 1990. Elle a été développée par Pawliszyn (Pawliszyn 1997), de l'université de Waterloo, en Ontario. Cette technique est de plus en plus populaire dans les laboratoires d'analyses et trouve son application dans tous les champs et domaines de la chimie analytique. Ses principales caractéristiques et ses nombreux avantages résident dans le fait que le coût de sa mise en place est peu élevé, ainsi que dans sa rapidité d'analyse, sa reproductibilité et sa fiabilité.

En effet, l'échantillon à analyser est détruit ou non suivant le but recherché et ne nécessite que de très faibles volumes d'échantillonnage, cela en comparaison à d'autres techniques d'extraction plus anciennes. La SPME peut être considérée comme une combinaison de méthodes d'extraction passives et actives. C'est une méthode qui ne nécessite pas de solvant, et qui s'avère donc être très intéressante du point de vue environnemental.

Dans ce travail de diplôme, nous avons trouvé très important et pertinent de pouvoir adapter cette méthode pour l'étude de la stabilité des huiles de poisson en se basant sur les volatiles globaux issus de l'oxydation des ces huiles, dans le but de faire un parallèle entre les résultats obtenus et ceux de la DSC.

La figure 7 représente les deux modèles de fibres SPME existantes, à savoir : le modèle à ressort utilisé pour des injections manuelles dans la GC et le modèle employé pour des injections automatisées avec le CombiPal.

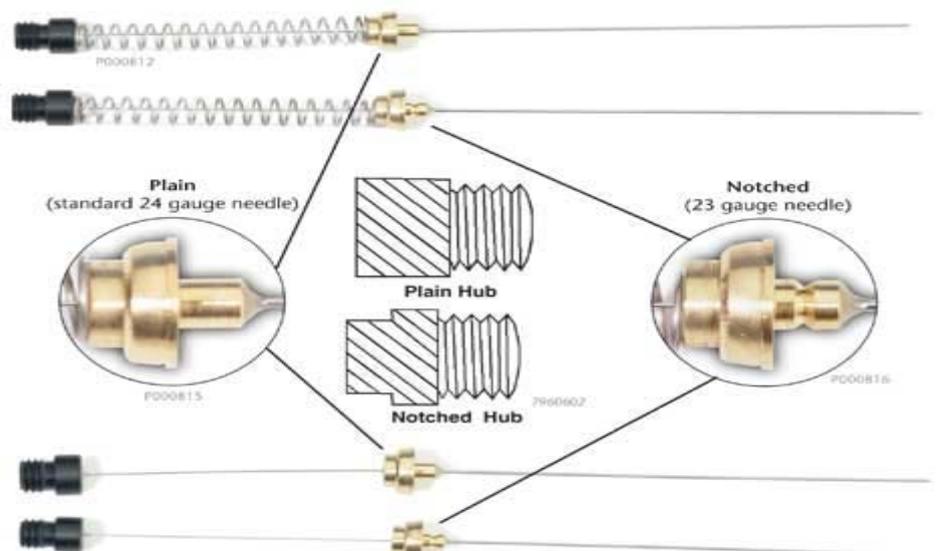


Figure 12 : Fibre de SPME pour utilisation manuelle et échantillonnage automatique (adapté de Sigma-Aldrich Co. & Supelco 1999)

1.3.7.2 La technique d'agitation

Dans les expérimentations manuelles de SPME, on utilise généralement la technique d'agitation magnétique. Ainsi, il faut faire en sorte que la vitesse de rotation reste constante et que la température de chauffage ne change pas au cours du temps (Pawliszyn 1999).

1.3.7.3 La technique d'extraction des volatils

La sélection du mode d'extraction des volatils est basée sur la composition de la matrice de l'échantillon utilisé. Pour l'analyse des volatils, le mode espace de tête « Head space » doit être mis en œuvre car le temps d'équilibrage est plus court (Pawliszyn 1999).

Lors de ce travail, la méthode utilisée pour l'élaboration des analyses est basée sur le mode « Head space ». Dans ce cas précis, seule la phase gazeuse est extraite afin d'être analysée par SPME-GC. Cette méthode est basée sur une technique de détection directe des volatils totaux, qui sont les produits d'oxydation des matrices utilisées (huiles de poissons).

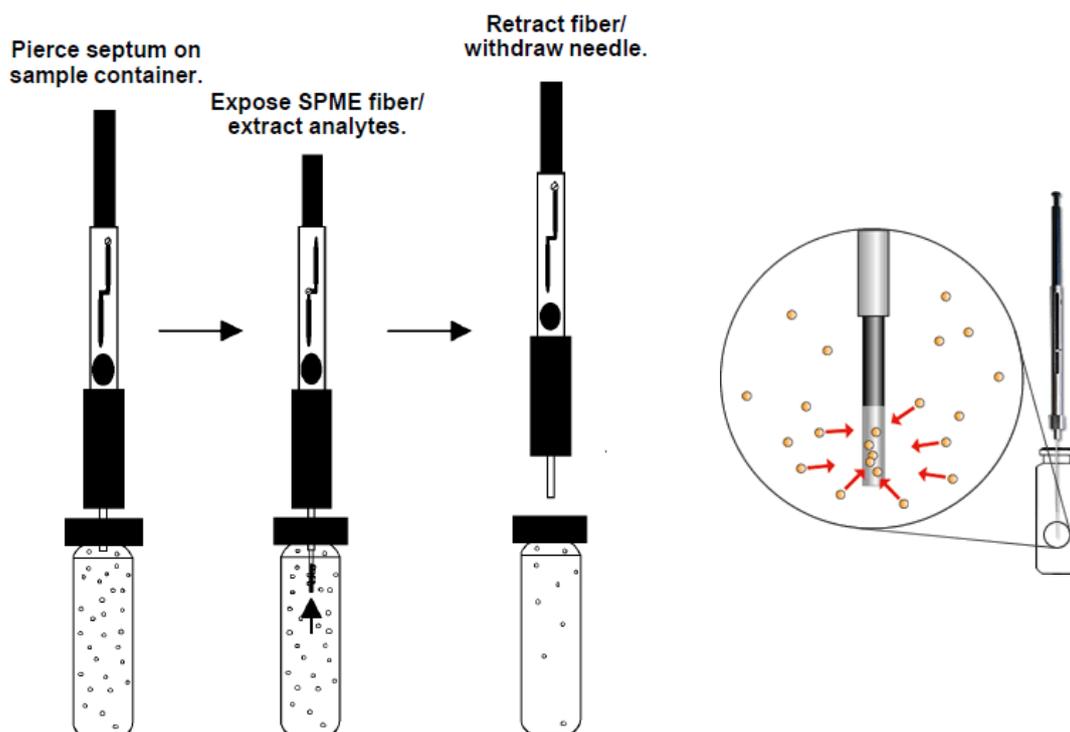


Figure 13 : Méthode d'extraction des volatiles

1.3.7.4 La technique de désorption des volatils

L'aiguille est transférée à la fenêtre d'injection sur le chromatographe à gaz et passée à travers le septa, après quoi la fibre est éjectée. La température élevée dans la fenêtre d'injection (typiquement 250°C) fait que les volatils captés sur la fibre sont désorbés si rapidement que l'on obtient un chromatogramme qui ressemble à une chromatographie en phase gazeuse normale excepté que dans le cas de ce travail, on obtient un seul pic caractérisant les volatils totaux.

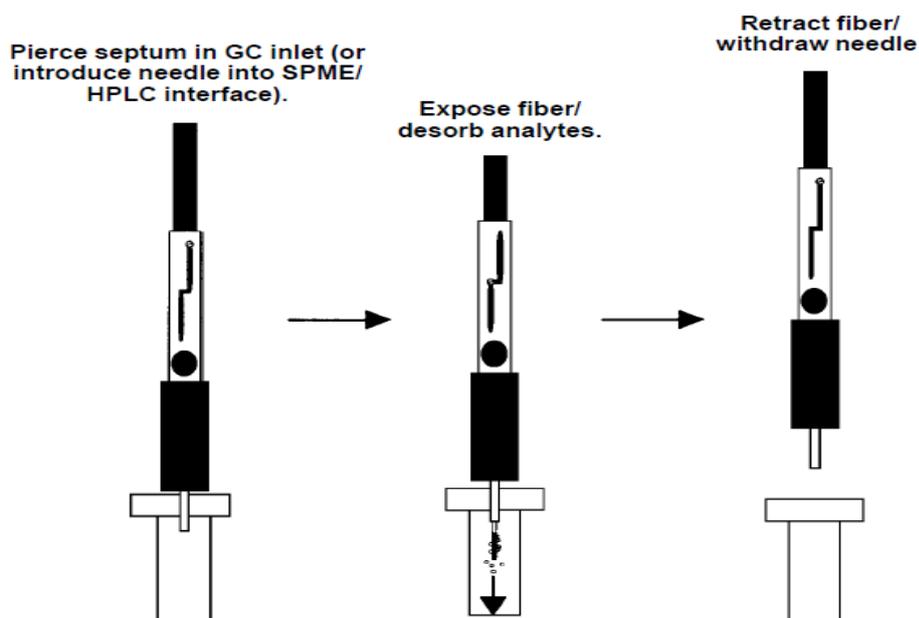


Figure 14 : Désorption des volatiles dans le GC

1.3.7.5 Les paramètres importants

L'efficacité de la technique SPME dépend principalement de la quantité d'analytes qu'il est possible de concentrer sur la fibre. La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre dépend de la maîtrise de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont :

- La température
- Le pH
- La force ionique
- L'agitation
- La nature de la phase polymérique appliquée sur la fibre.

Il existe plusieurs types de fibre en fonction de la nature de la phase polymérique. Chaque phase présente une spécificité pour une classe de composés donnés. Le tableau n°1 regroupe les fibres SPME les plus couramment utilisées et distribuées par SUPELCO.

Tableau 1 : type de fibres SPME

Types de fibre	Classe de composés	Couleur
100 µm PDMS	Volatils et semi volatils	Rouge
65 µm carbowax-DVB	Composés polaires, acides volatils	Orange
65 µm PDMS-DVB	Volatils et semi volatils	Bleue
75 µm Carboxen-PDMS	Gaz, composés volatils	Noire
50-30µm DVB-Carboxen-PDMS	Gaz, composés volatils et semi volatils	Grise

(PDMS : Polydiméthylsiloxane ; DVB : Divinylbenzène)

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

2.1.1 Produits

2.1.1.1 Les huiles, antioxydants et émulsifiant

- Incroomega DHA 500TG SR, SF05245 – Batch 0000339954
- Incroomega DHA 500TG SR, SF05245 – Batch 0000313596
- Omevital 10/50 TG Ultra – Batch 82271909
- Algatrium DHA 70% Enzymatic - Batch 0100 Nr20/2009
- Algatrium DHA 70% Enzymatic - Batch 2-7991 Nr15/2009
- Huile Croda - SF05245
- Tocopherols mixed : Covi-ox T-90 U45L08FM01
- Rosmarin Antioxydants Extrakt (ökol) Typ-Nr. 027.010
- Emulsifiant : Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR), E476
- Huile DHA70 barbotage à l'azote
- Huile DHA70 ultrason et barbotage à l'azote
- Huile microencapsulées DHA70 lavées avec silice
- Huile microencapsulées DHA70 lavées sans silice
- Huile microencapsulées DHA70 non lavées avec silice
- Huile microencapsulées DHA70 non lavées sans silice
- Alginate liquide 2%
- Alginate poudre

2.1.1.2 Les produits chimiques

- Acide Acétique Glacial – Corrosif – Pancreac 131008.1212
- Chloroforme (99.8%) – Nocif – Fluka 25690
- Dichlorométhane - Nocif – Sigma Aldrich 34856
- Iodure de potassium (>99%) AT – Fluka 60405
- Amidon – riedel-deHaën 33615
- Thiosulfate de sodium (0.1 mol/l) – Fluka 35245
- Solution Iode – Merck HC774995 (25.11.2008)

2.1.2 Equipement et appareillage

2.1.2.1 SPME-GC

- Agilent Technologies 6890N CA560 Network GC System
- CTC Analytics CombiPal 122370
- Software : ChemStation Rev B-03-01-SRI (317)
- Septum: Thermogreen LB-2, Lot 790-072-3, conditione/ready to use
- Micropipette: Eppendorf ref.336517 - 1000µl
- Septum P/N: 20030504-SPME 20 mm magnetic crimp-cap with Septa Silicone/PTFE for SPME
- Vials 22ml
- Capillaire: TSP-075375-D-10 S/N DWH05A – 10 m fused silica Tubing -75 µ ID x 375 µm OD – Desactivated with (DPTMDS)

- Support Vials: Wheaton 868805
- Seringues: 2ml – LUER lot E87100-3
- Aiguilles seringues : Terumo 0.9 x 55 mm LUER

2.1.2.2 DSC

- Mettler TOLEDO HP DSC 827e
- ME-27331 AL-CRUCIBLES 40µl with PIN
- Balance : Mettler TG50
- FOTWARE : STARe Software version 9.20

2.1.2.3 EMULSION

- Sous Pression
 - Homogénéisateur Lap-APB
- UltraSon
 - Vibracell 750 W

2.1.2.4 INDICE DE PEROXYDE

- Verrerie de laboratoire standard

2.2 Méthodes

2.2.1 INDICE DE PEROXYDE

Voir Annexe I

2.2.2 DSC

Voir Annexe II

2.2.3 SPME

Voir Annexe III

3 RÉSULTATS

3.1 INDICE DE PEROXYDE

Les indices de peroxydes des trois huiles de poisson utilisées dans cette expérience sont de l'ordre de 0.48 [mécq O₂/kg] pour la DHA 50% avec antioxydant, 0.50 [mécq O₂/kg] pour la DHA 70% avec antioxydant et 0.58 [mécq O₂/kg] pour la DHA 70% sans antioxydant. Il n'existe pas une différence significative entre ces trois valeurs.

Après avoir soumis les trois huiles à la même température de 90°C pendant des temps différents d'exposition, on constate une variation de l'indice de peroxyde en fonction du temps de chauffage.

La figure 15 montre que la teneur en DHA dans l'huile joue un rôle marqué sur la production de produit primaire de l'oxydation. Par exemple après 120 minutes de chauffage, l'indice de peroxyde est de 1.87 [mécq O₂/kg] pour la DHA 50% avec antioxydant et 2.58 [mécq O₂/kg] pour la DHA 70% avec antioxydant.

On peut également constater que l'antioxydant joue un rôle dans la formation des peroxydes en fonction du temps de chauffage. Cette influence est bien visible entre les deux huiles à DHA 70%. Ainsi celle avec antioxydant présente un indice de peroxyde de 2.58 [mécq O₂/kg] et celle sans antioxydant de 3.15 [mécq O₂/kg]. Cette différence est significative, et permet de tirer une conclusion sur la qualité des huiles utilisées.

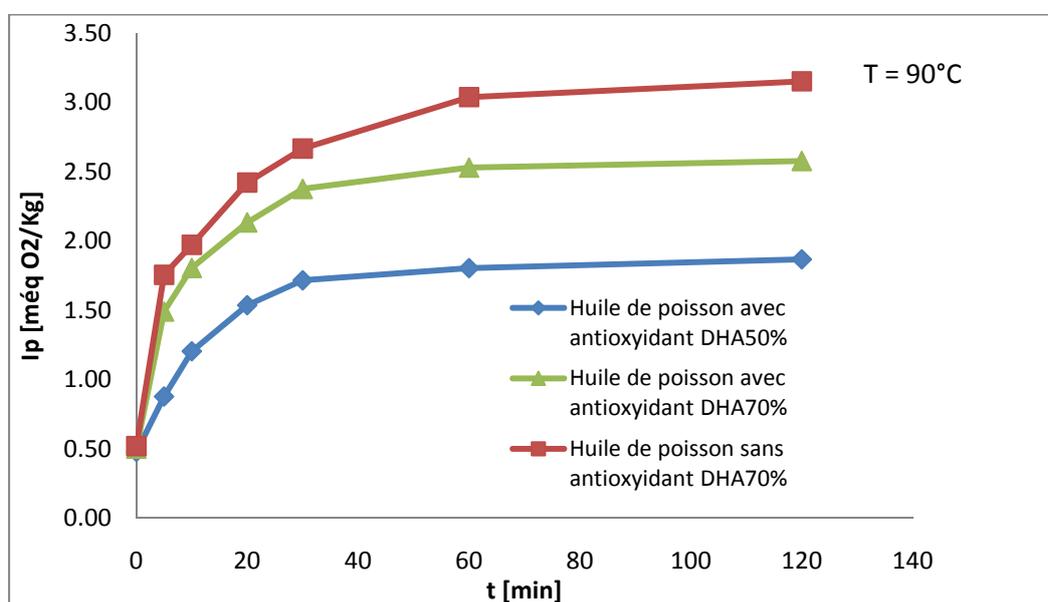


Figure 15 : Evolution l'Indice de peroxyde en fonction du temps de chauffage

3.2 DSC

3.2.1 Répétabilité des mesures

Pour évaluer la répétabilité des mesures de l'appareil, 6 mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions d'analyse (cf. tableau 2). Pour cela on a utilisé l'huile DHA50-AA. L'analyse statistique des résultats obtenus donne un coefficient de variation de 4.27%. Au vu des temps d'analyse, cette valeur est acceptable. On a une moyenne de 3.71 min avec un maximum de 3.88 min et un minimum de 3.52 min.

Tableau 2 : Essais de répétabilité des mesures de l'OIT (Oxidation Induction Time)

	Masse [mg]	T [K]	OIT [min]
Essai 1	4.908	373.15	3.88
Essai 2	4.826		3.86
Essai 3	4.845		3.78
Essai 4	4.892		3.52
Essai 5	4.857		3.53
Essai 6	4.840		3.69
		Moyenne	3.71
		Ecart-type	0.158
		CV [%]	4.27

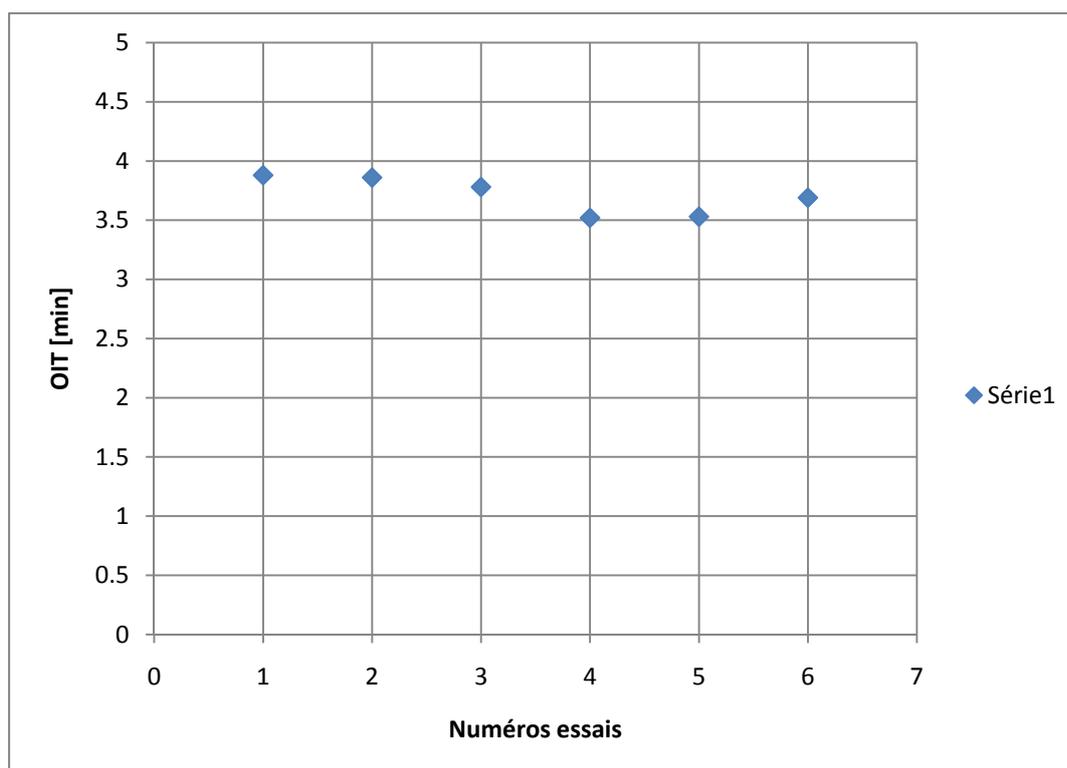


Figure 16: reproductibilité des mesures de l'OIT

3.2.2 Oxidation Onset Temperature (OOT)

L'OOT se définit comme étant la température initiale de l'oxydation. Sur le thermogramme, cette température est obtenue par une extrapolation entre la ligne de base et la tangente à la courbe d'oxydation. C'est une mesure relative du degré de stabilité à l'oxydation de la matière grasse évaluée à un taux de chauffage donné et de l'environnement oxydant (par exemple en présence d'oxygène). Donc, plus la valeur de l'OOT est élevée et plus la matière est stable.

L'OOT est présentée dans la Figure 17. Les valeurs de l'OOT peuvent être utilisées à des fins comparatives et ne sont pas une mesure absolue. La présence ou l'efficacité des antioxydants peut également influencer l'OOT.

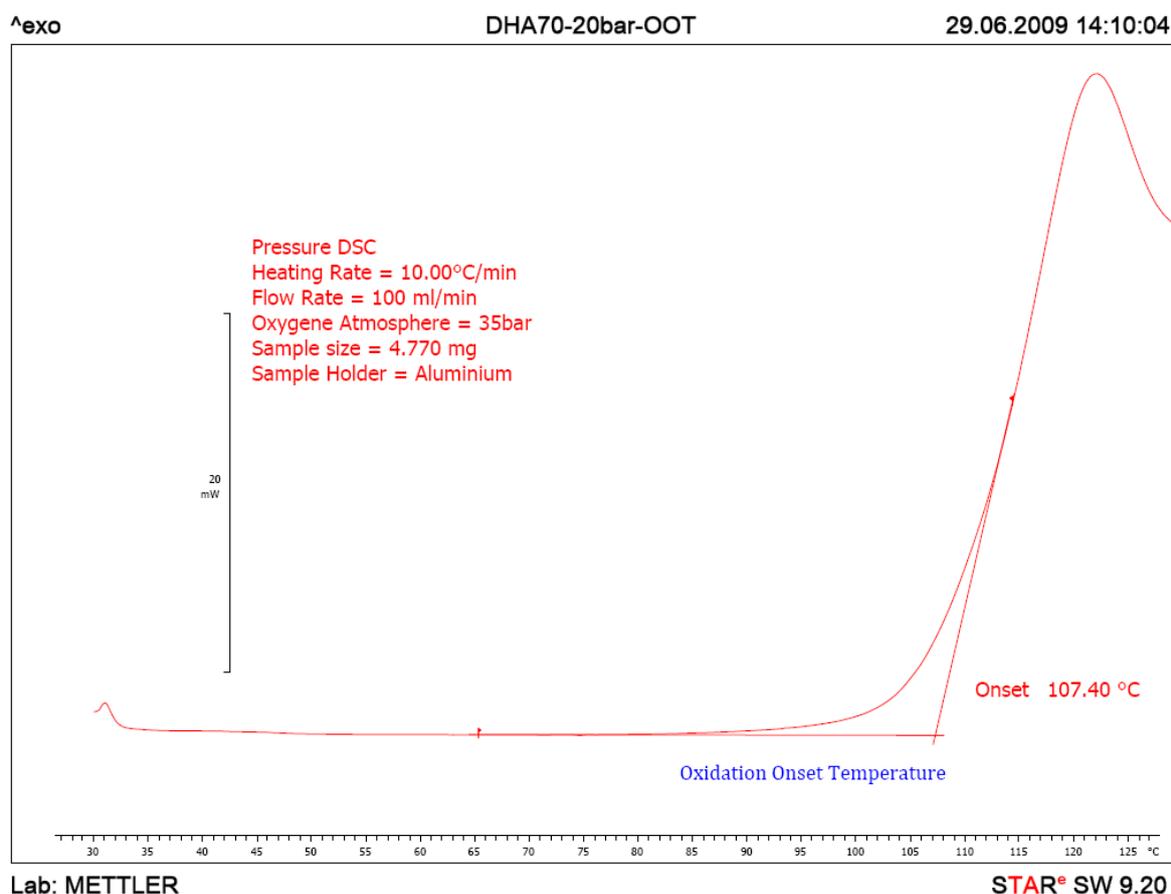


Figure 17 : Détermination de l'OOT par la méthode des tangentes

Pour la suite des mesures de l'OOT, on utilisera la méthode dynamique (Annexe II – Méthode dynamique). L'échantillon est porté à une température de 30°C à 260°C, avec une vitesse de montée en température de 10 °C/min et sous 35 bar d'oxygène, pendant 23 minutes.

3.2.3 Influence de la pression sur l'OOT

Pour étudier l'influence de la pression sur l'OOT, on a effectué des analyses en faisant varier la pression de 10 à 40 bar, sur l'huile DHA50-SA.

On constate que non seulement l'OOT est fonction de la pression en oxygène, mais cette dépendance est linéaire. La régression $OOT = f(P)$ donne une droite avec un coefficient de variation de 0.998. Plus la pression augmente et plus la température d'oxydation des huiles diminue. Entre 10 et 40 bar, on a une variation d'environ 10°C (cf. tableau 3).

La pression est donc un paramètre très important pour le stockage des matières grasses en présence d'oxygène atmosphérique.

Tableau 3 : Variation de l'OOT en fonction de la pression en oxygène

Pression en O ₂ [bar]	OOT [°C]	Variation [°C]
40	124.0	9.3
35	126.0	7.3
20	130.3	3.0
15	131.7	1.6
10	133.3	0.0

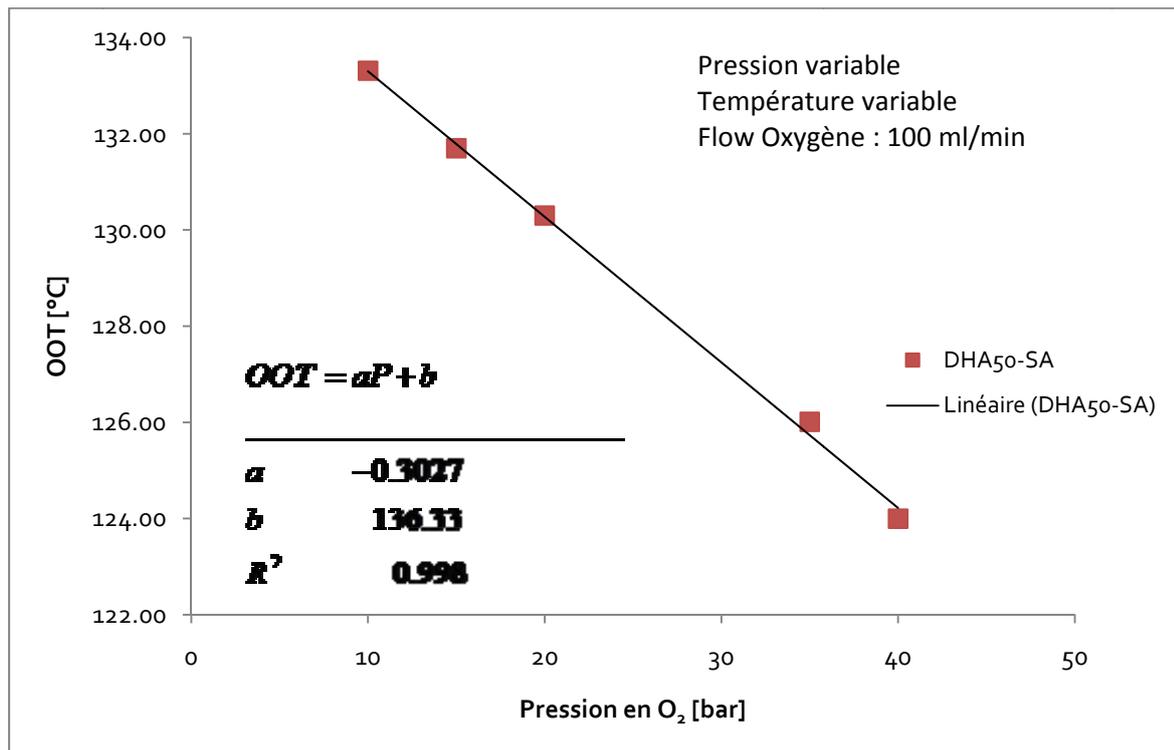


Figure 18 : Effet de la pression sur l'OOT

3.2.4 Influence de l'antioxydant sur l'OOT

La teneur en antioxydant a une activité variable sur l'OOT. L'effet est très marqué à faible teneur d'antioxydant. Une addition de 1000 ppm accroît l'OOT de 4%. Puis cette température d'oxydation reste constante entre 2000 et 4000 ppm, avec une activité de l'ordre de 8% par rapport à l'huile pure.

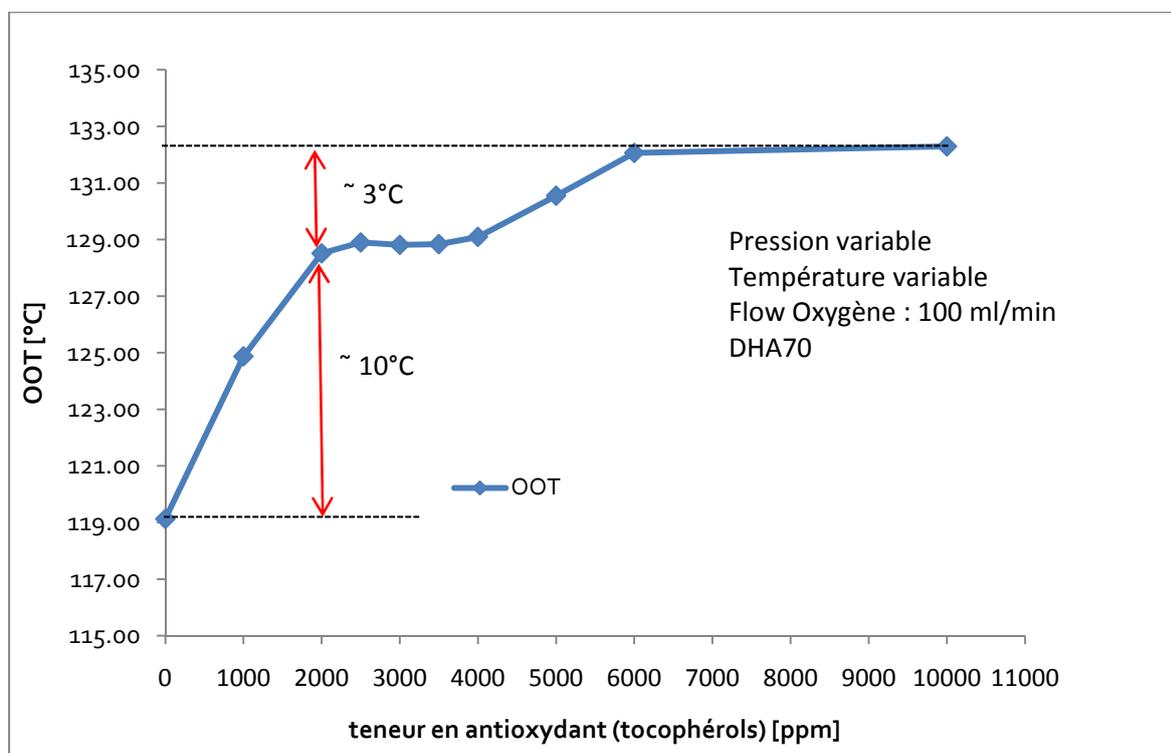


Figure 19: Effet du mélange de tocophérols sur l'OOT

Le tableau N°4 et la figure 19, permettent de mettre en évidence un plateau entre 2000 et 4000 ppm. Au-delà de 6000 ppm l'activité est d'environ 11%. Donc on peut conclure que dans cette plage de concentration en antioxydant dans l'huile de poisson étudiée, on ne constate pas une activité pro-oxydante de l'antioxydant. La raison est que l'activité du mélange des antioxydants (α , β , γ , δ)-tocophérols est beaucoup plus importante que pris individuellement et permet également d'éviter leur effet pro-oxydant.

L'évaluation de l'activité de l'antioxydant est basée sur l'application de la formule suivante :

$$AOA[\%] = \left(\frac{OOT - OOT_0}{OOT_0} \right) * 100$$

Avec:

OOT = la température d'oxydation à une concentration donnée en antioxydant

OOT₀ = la température d'oxydation à une concentration de 0 ppm

Les résultats sont résumés dans le tableau N°4.

Tableau 4 : Activité du mélange de tocophérols sur l'OOT

teneur (ppm)	OOT [°C]	AOA [%]
0	119.1	0
1000	124.9	4.82
2000	128.5	7.88
2500	129.0	8.20
3000	129.0	8.13
3500	129.0	8.15
4000	129.1	8.37
5000	130.6	9.59
6000	132.1	10.86
10000	132.3	11.05

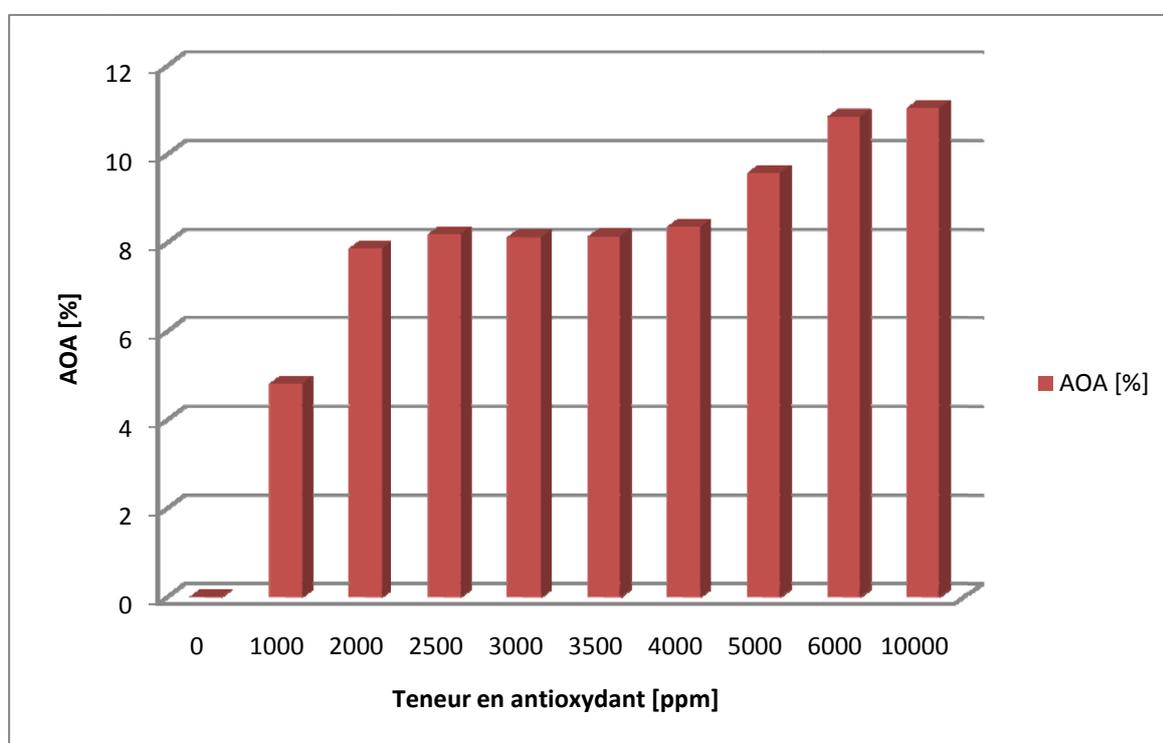


Figure 20: Effet du mélange de tocophérols sur l'OOT (huile DHA70)

3.2.5 Oxidation Induction Time (OIT)

Le temps d'induction à l'oxydation est une mesure relative du degré de stabilité à l'oxydation de la matière grasse, évaluée à une température constante (isotherme. Les valeurs de l'OIT ainsi obtenues peuvent être comparées à celle d'une huile de référence (cas d'ajouts d'antioxydants) pour obtenir des informations relatives à la stabilité à l'oxydation de ces matières grasses.

Principe de mesure :

Comme la mesure de l'OIT, cette valeur est obtenue par extrapolation entre la ligne de base et la tangente à la courbe d'oxydation. Les mesures sont faites à température constante. On peut ainsi jouer sur les paramètres tels que la pression en oxygène ou encore sur le flux d'oxygène

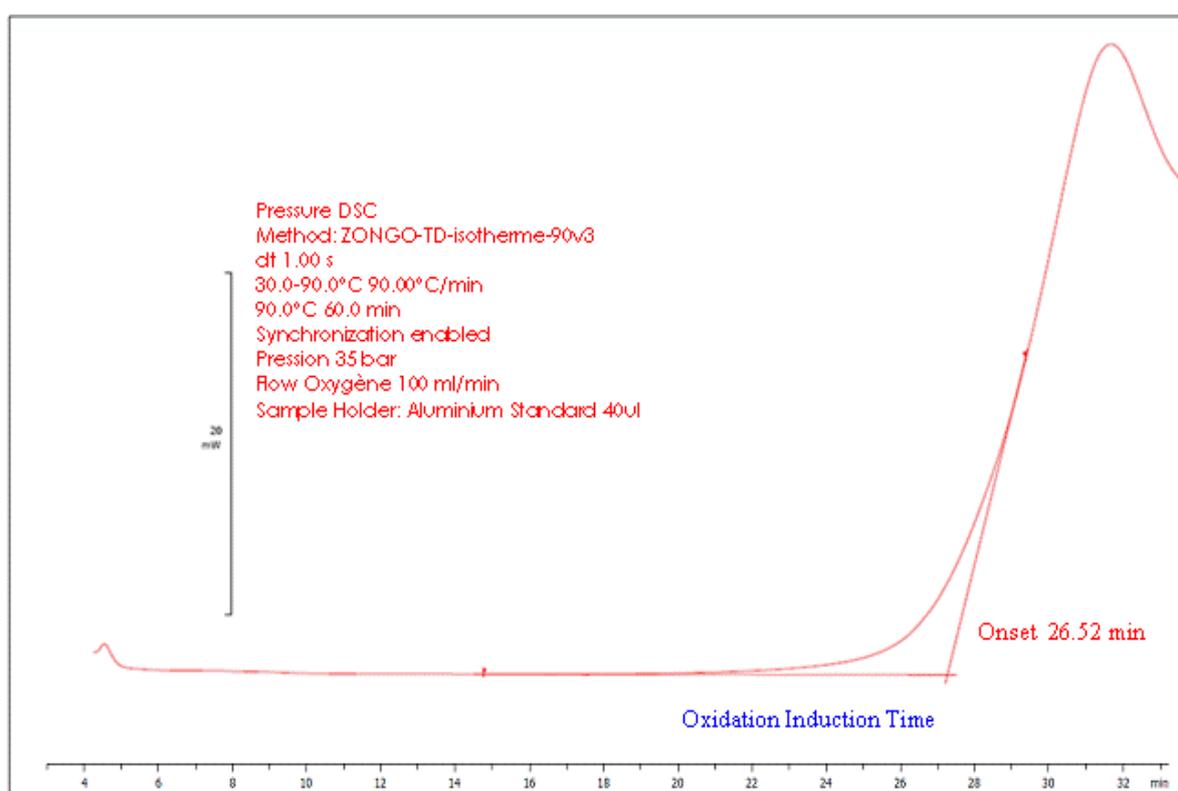


Figure 21 : Evaluation de l'OIT

Le début de la mesure se fait à partir du moment où la température de mesure (90°C) est atteinte.

3.2.6 Influence de la pression sur l'OIT (Isotherme à 90°C)

Tout comme l'OOT, la pression a une influence sur l'OIT. Les analyses ont été effectuées à 90°C (isotherme), avec un flux en oxygène de 100 ml/min et une pression de 10 à 40 bar montre (cf. figure 22) que plus la pression en oxygène augmente plus le temps d'induction à l'oxydation diminue. Dans cette plage de pression la relation entre l'OIT et la pression n'est pas linéaire.

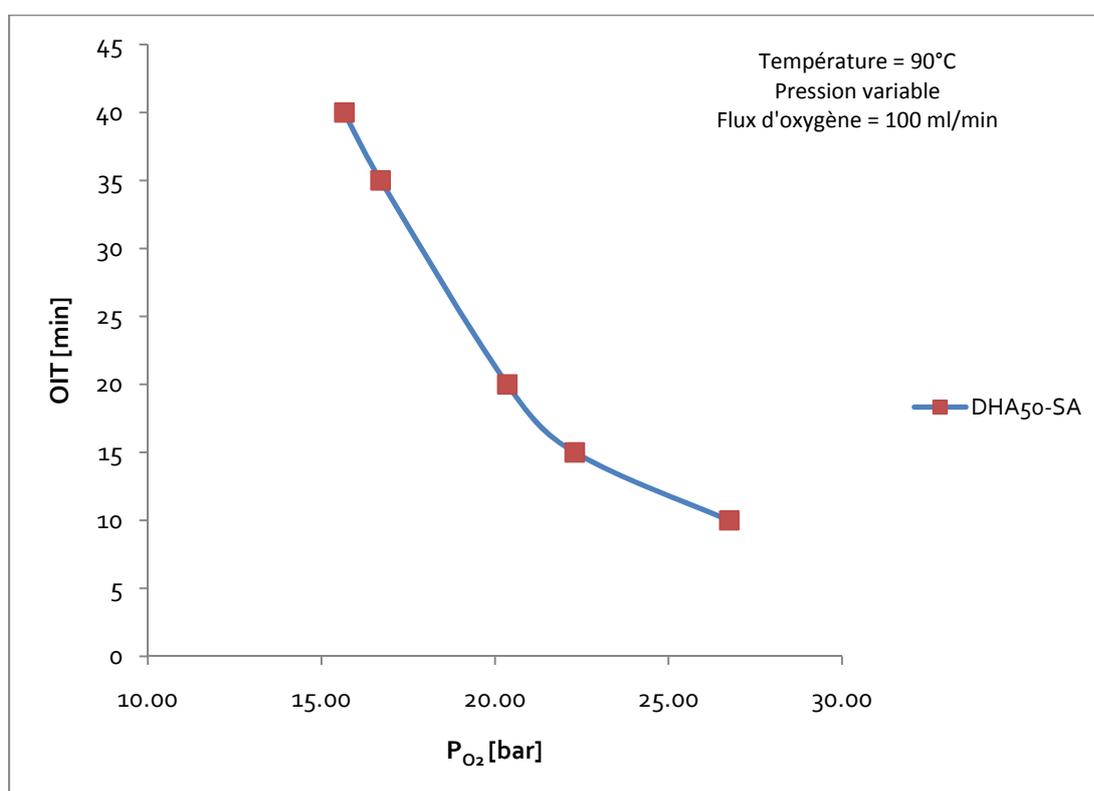


Figure 22: Effet de la pression sur l'OIT

Afin d'analyser la relation entre l'OIT et la pression d'oxygène, nous avons représenté les valeurs dans un système de coordonnées logarithmiques (ln-ln) (voir figure 23).

Dans ce système de coordonnées, on remarque une bonne linéarité entre les points obtenus. On peut donc décrire la relation entre l'OIT et la pression (P_{O_2}) par une loi exponentielle.

$$OIT = A * (P_{O_2})^{-q}$$

Donc

$$\ln(OIT) = \ln(A) - q * \ln(P_{O_2})$$

Le facteur A est une mesure de la vitesse de la réaction d'oxydation et l'exposant q est la pente de la droite. La valeur de q obtenue pour cette huile de poisson est de 0.38.

En principe, la pente doit se trouver entre 0 et 1. Pour q égal à 1, l'OIT est inversement proportionnel à la pression d'oxygène. Son évolution en fonction de la pression dépend uniquement de la concentration en oxygène dans l'échantillon. Pour une valeur de q égale à 0, la concentration en oxygène ne joue aucun rôle. Dans ce cas l'oxydation ne nécessiterait pratiquement pas d'oxygène externe (Schawe 2007). Une telle huile contiendrait déjà de nombreux radicaux libres.

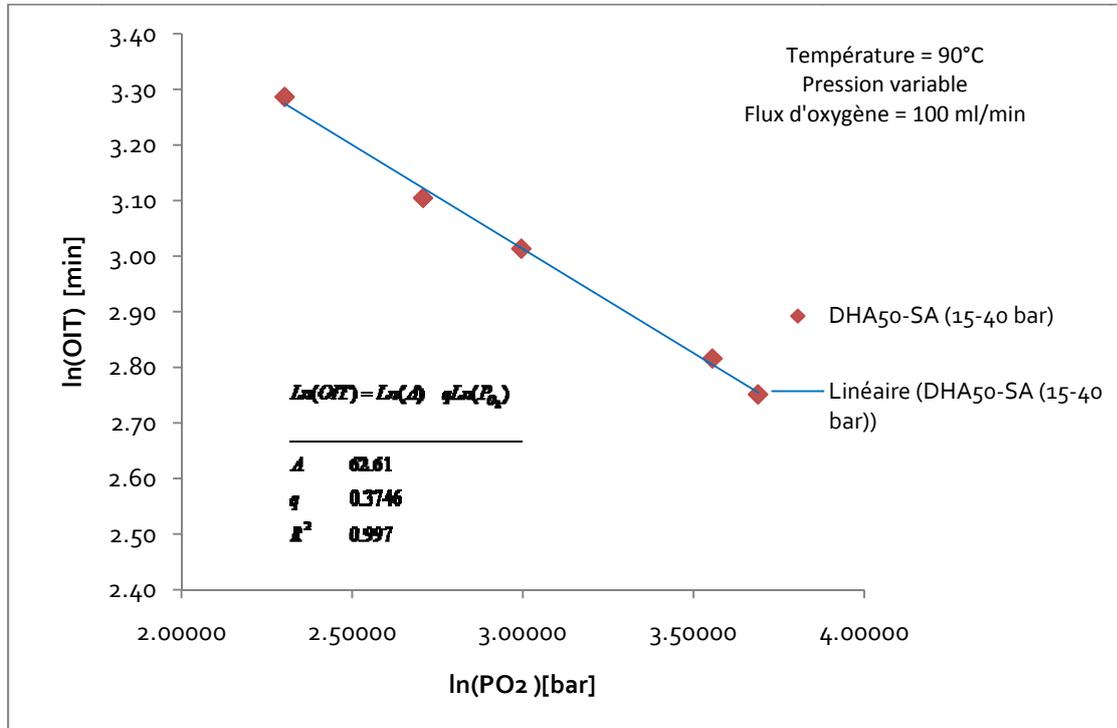


Figure 23 Effet de la pression sur l'OIT – Régression logarithmique

3.2.7 Influence de la température sur l'OIT

La température a une influence capitale sur l'OIT des différentes huiles étudiées. Une augmentation de la température d'isotherme induit un abaissement du temps d'induction oxydative (OIT). Cette augmentation de température a une influence sur la stabilité des huiles de poisson étudiées (cf. figure 24).

Une augmentation de température de 30 °C, induit une diminution de la température d'induction à l'oxydation d'environ 30 min pour l'huile DHA70-AA et de 25 min pour l'huile DHA 50-AA. Cette différence est imputée à la différence en teneur en DHA.

On peut ainsi dire que la teneur en DHA dans l'huile de poisson influence négativement la stabilité de l'huile à l'oxydation.

L'utilisation d'antioxydant dans l'huile de poisson augmente la résistance de l'huile à l'oxydation. En effet entre les huiles DHA70-SA et DHA70-AA on constate une différence entre les OIT. Ainsi pour les isothermes étudiées on constate une différence d'environ 5 min entre les temps d'induction à l'oxydation.

Tableau 5: résumé des valeurs mesurées

T [K]	OIT [min]		
	DHA70-SA	DHA70-AA	DHA50-AA
343.15	72.15	-	-
353.15	37.30	34.42	28.45
363.15	17.72	14.48	13.96
373.15	8.39	8.15	6.75
383.15	-	4.09	3.48

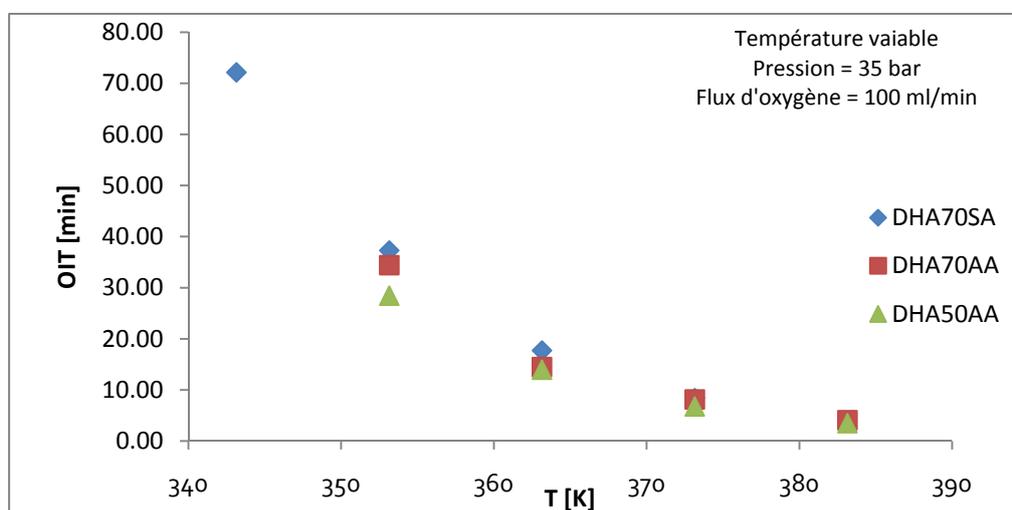


Figure 24: Effet de la température sur l'OIT

Il existe une relation linéaire entre le logarithme de l'OIT et l'inverse de la température en Kelvin. Cette relation sera débattue dans la partie 3.2.9 dans le cadre de l'analyse cinétique de l'oxydation des huiles de poisson.

3.2.8 Etude comparée des effets des antioxydants sur l'OIT

Les activités des antioxydants ne dépendent pas seulement de leur réactivité avec les peroxydes et autres radicaux libres et de leur concentration dans l'huile, mais aussi de certains facteurs tels que la température, la lumière, le type de matrice (substance), l'état physique du système et la pression en oxygène (Réblová 2006).

On constate une augmentation rapide de l'OIT entre 0 et 1000 ppm pour le mélange de tocophérols. Et puis il y a un plateau entre 1000 et 4000 ppm. Et ensuite l'OIT repart à la hausse. Quant aux extraits de romarin, on n'observe pas de réelle variation de l'OIT en fonction de la quantité d'antioxydant (cf. figure 25).

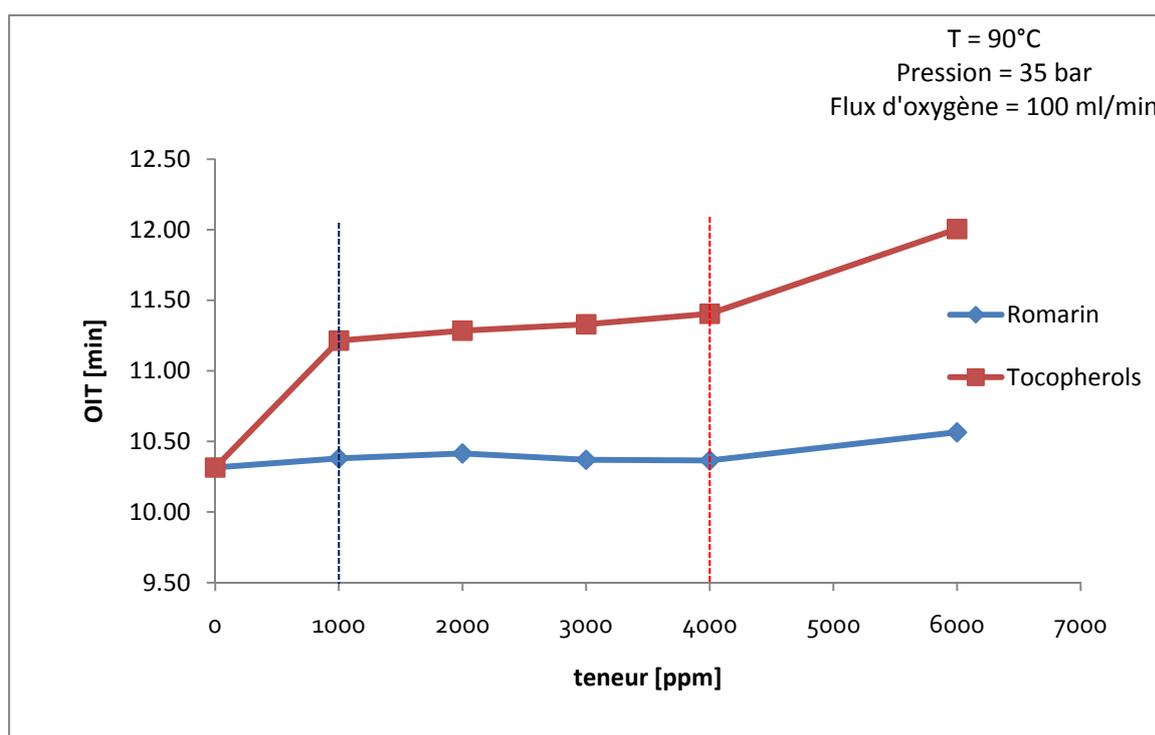


Figure 25 : Effets comparés des deux antioxydants sur l'OIT

L'activité de l'antioxydant (AOA) peut être déterminée par la formule suivante :

$$AOA[\%] = 100 \left(\frac{OIT_A - OIT_0}{OIT_0} \right)$$

Avec :

AOA : Activity of Antioxidant

OIT_A : Onset Induction Time de l'huile avec antioxydant

OIT_0 : Onset Induction Time de l'huile sans antioxydant

Une étude comparée entre les effets des deux antioxydants (mélange de tocophérols et des extraits de romarin) permet de conclure que le mélange de tocophérols est beaucoup plus efficace. Ainsi l'activité du mélange de tocophérols augmente légèrement en fonction de sa teneur dans l'huile, alors celle des extraits de romarin reste presque constante.

Tableau 6 : Evaluation de l'activité des antioxydants en mode dynamique de température

teneur (ppm)	Mélange tocophérols		Extrait de romarin	
	OIT [min]	AOA [%]	OIT [min]	AOA [%]
0	10.3	-	10.3	-
1000	11.2	8.7	10.4	0.6
2000	11.3	9.4	10.4	1.0
3000	11.3	9.8	10.4	0.5
4000	11.4	10.6	10.4	0.5
6000	12.0	16.4	10.6	2.4

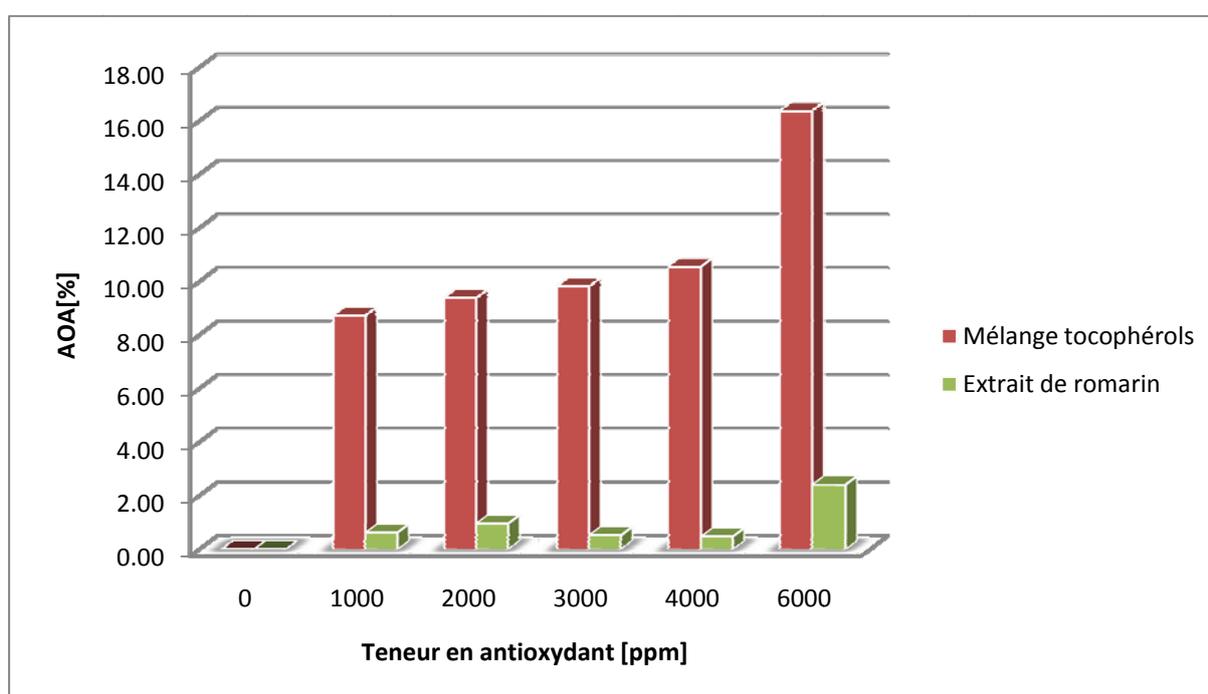


Figure 26: Activité comparée des antioxydants sur l'OIT

3.2.9 Analyse cinétique des données

L'analyse cinétique est basée sur l'adaptation des méthodes d'analyses sur l'oxydation des acides gras, de (Hill 1980; Labuza 1980; Labuza 1982; Arabshabi 1985; Cohen 1985; Haralampu 1985; Van Boekel 1996). Dans l'étude des effets de la température sur la vitesse de réaction par l'équation d'Arrhenius.

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \rightarrow \ln\left(\frac{1}{OIT[min]}\right) = f\left(\frac{1}{T[K]}\right)$$

Avec :

k = Constante de vitesse ou bien la réciproque de l'OIT en min⁻¹

A = Facteur de fréquence

E_a = Energie d'activation [kJmol⁻¹]

R = Constante des gaz parfait : 8.314510 JK⁻¹mol⁻¹

T = Température absolue en Kelvin [K], c'est-à-dire l'OIT + 273.15

L'énergie d'activation et le facteur de fréquence sont déterminés par la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression ln(k) = f(1/T).

La détermination de l'enthalpie de la réaction ΔH[#] et ΔS[#] de l'activation sont déterminées par la régression ln(k/T) vs 1/T par l'équation dérivée de la théorie du complexe activé (Equation d'Eyring):

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\#}{R}\right) - \frac{\left(\frac{\Delta H^\#}{R}\right)}{T}$$

Avec :

k_B = 1.380658 x 10⁻²³ JK⁻¹ La constante de Boltzmann.

H = 6.6260755 x 10⁻³⁴ Js la constante de Planck

Les graphiques obtenus pour les différentes expériences sont illustrés dans les figures 27 et 28, et les différents paramètres évalués par les méthodes d'Arrhenius et du complexe activés sont résumés dans le tableau N°7.

Tableau 7 : Valeurs de l'énergie d'activation pour les trois types d'huile

	Ea [kJ/mol]	A [h⁻¹]	ΔH[#] [kJ/mol]	ΔS[#] [J/K mol]
DHA70-SA	76.56	5.97E+09	73.59	-67.60
DHA70-AA	78.47	1.23E+10	75.42	-62.52
DHA50-AA	79.12	1.76E+10	76.07	-58.87

En guise de conclusion, on peut dire que la réaction d'oxydation a un caractère auto catalytique et suit un mécanisme de décomposition de type Arrhenius.

Les réactions d'oxydation sont assimilables à une cinétique apparente d'ordre 2, car ΔS[#] est comprise entre -40 et -70 (J/K*^{mol}).

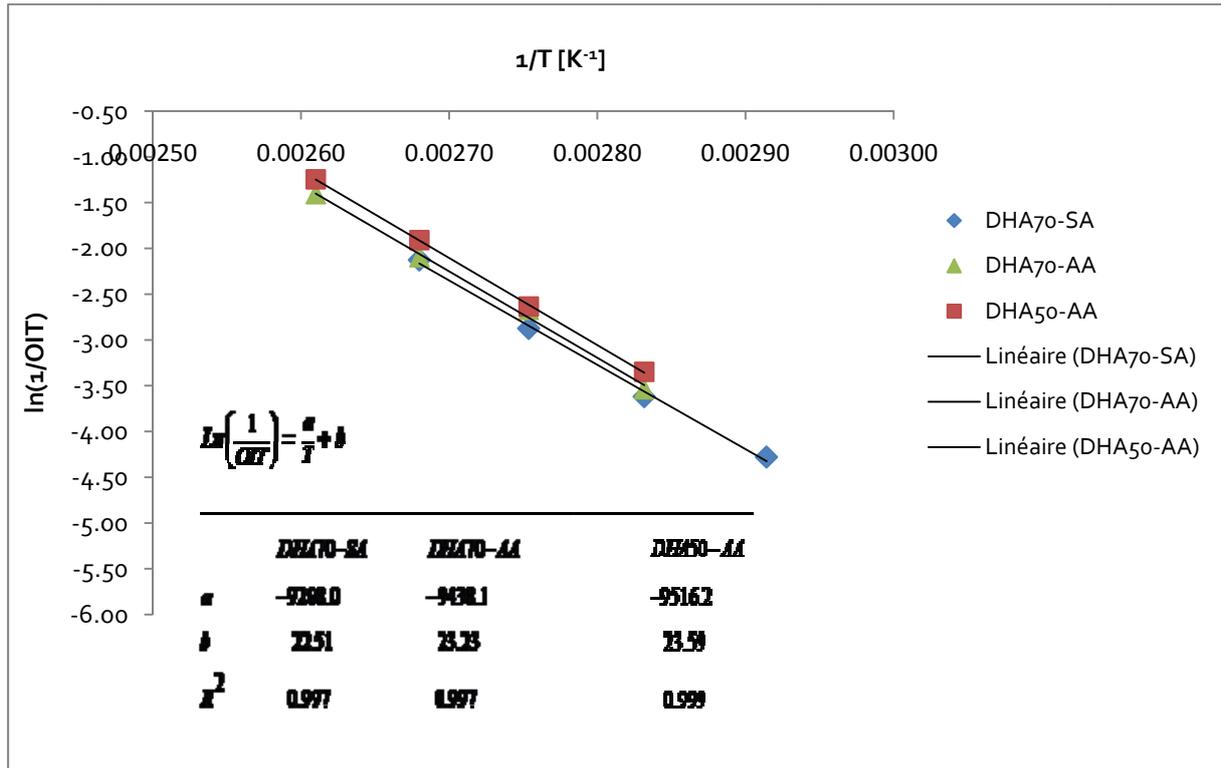


Figure 27: Evaluation de l'énergie d'activation par régression linéaire de $\ln(1/OIT)$ en fonction de $1/T$

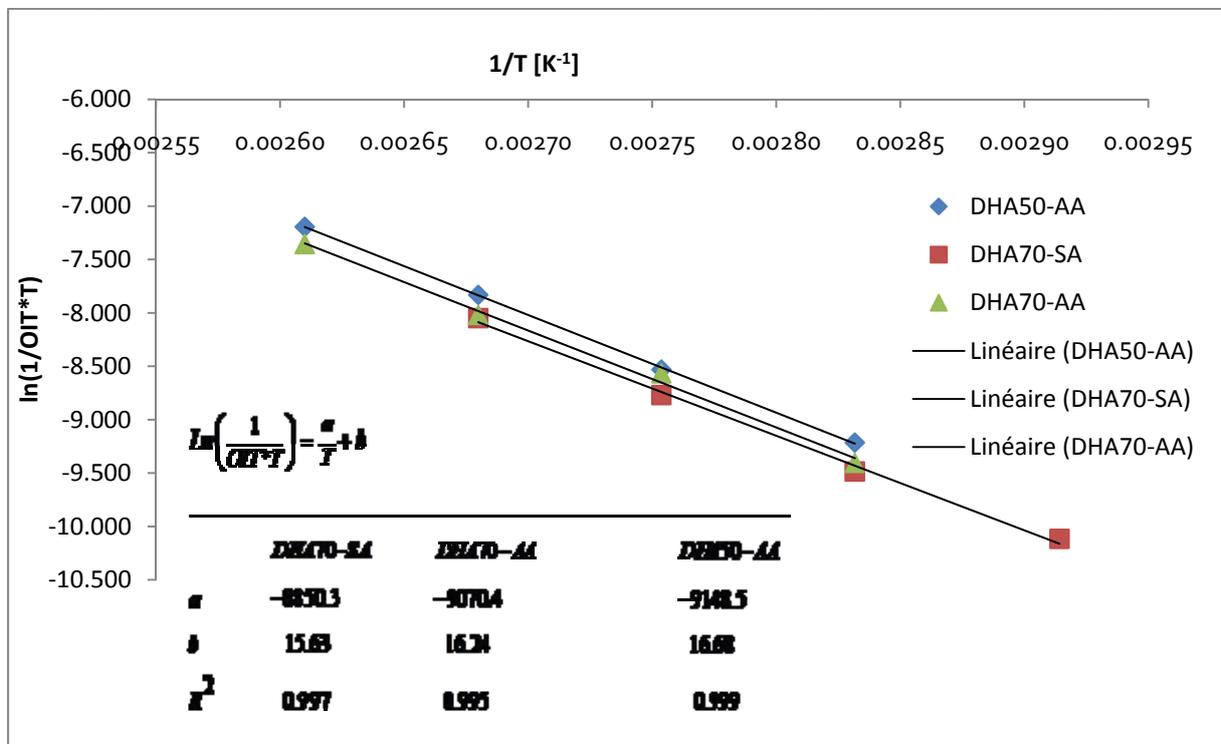


Figure 28 : Evaluation de l'entropie et de l'enthalpie de réaction par régression linéaire de $\ln(k/T)$ en fonction de $1/T$

3.2.10 Effet de l'oxygène dissous

De nombreux produits, en particulier dans le domaine agroalimentaire, subissent une étape de dégazage sous vide. Cette étape a pour objectif principal de retirer du milieu l'oxygène dissous présent. L'absence d'oxygène dissous permet d'éviter l'oxydation des composés sensibles de type vitamine ou autres. En cas de présence d'oxygène, l'oxydation peut être rapide dans les étapes de traitement où le produit est chauffé, en particulier dans une éventuelle étape d'émulsification des huiles de poisson.

Le gaz de remplacement doit être un gaz inerte (argon, hélium, azote), préférentiellement l'azote. La substitution de l'oxygène par un gaz de remplacement permet d'éliminer l'oxygène à un taux suffisamment important pour éviter une oxydation du produit dans la chaîne de traitement ou dans le temps.

Sous milieu fermé hermétiquement et sans apport extérieur en oxygène, l'oxydation est déclenchée par l'oxygène dissous (OD) dans l'huile de poisson. Pour étudier l'effet de l'oxygène dissous sur la stabilité des huiles, trois types d'huiles ont été.

On constate bien que l'oxygène dissous joue un rôle important sur la stabilité à l'oxydation des huiles microencapsulées. Comme le montre le tableau ci-dessous, on a une différence de température à l'oxydation de 10°C entre l'échantillon (1) et l'échantillon (2). Par contre l'utilisation de l'ultrason n'a aucun effet sur la stabilité à l'oxydation en comparaison avec l'OOT des échantillons 2 et 3.

Tableau 8 : Effet de l'oxygène dissous sur l'OOT (méthode dynamique)

Echantillons	OOT [°C]	Variation [°C]
Fish Oil 70 % DHA Standard *	122	-
Fish Oil 70 % DHA Barbotage à l'azote**	132	10
Fish Oil 70 % DHA Ultrason et barbotage à l'azote ***	133	11

* échantillon 1 - ** échantillon 2 - *** échantillon 3

On retrouve une influence similaire de l'oxygène dissous sur l'OIT lors des analyses effectuées à 110°C, sous pression atmosphérique (cf. tableau 9)

Tableau 9: Effet de l'oxygène dissous sur l'OIT (méthode isotherme à 110°C)

Echantillons	OIT [min]	Variation [min]
Fish Oil 70 % DHA Standard *	9.04	-
Fish Oil 70 % DHA Barbotage à l'azote**	10.5	1.5
Fish Oil 70 % DHA Ultrason et barbotage à l'azote ***	10.65	1.6

3.2.11 Etude de l'influence des méthodes d'émulsification sur la qualité des huiles

Deux techniques d'émulsions ont été utilisées afin de déterminer l'impact de chacune d'elle sur la qualité et la stabilité des émulsions ainsi formées (cf. tableaux 10 et 11). On constate que les émulsions préparées avec la technique à ultrason sortent à une température de 4°C (échantillons A et B), alors que dans celle préparées sous pression, les produits de sortie sont chauds (échantillons 1, 2,3 et 4). L'analyse par HPDSC donne les résultats suivants :

Tableau 10: Echantillons et caractéristiques de la méthode sous pression

Echantillons	temps [s]	Pression [bar]	Remarques
1	20	250	Tous les échantillons étaient chauds à la sortie
2	60		
3	120		
4	1 passage	400	

Tableau 11: Echantillons et caractéristiques de la méthode à ultrason

Echantillons	Temps [s]	Pulse [%]	Remarques
A	60	63	Tous les échantillons étaient à température ambiante de 4°C
B	120	63	

Tableau 12 : Comparaison des effets des différentes techniques

	Echantillon A	Echantillon 2	Echantillon B	Echantillon 3
Temps [s]	60		120	
OOT _{moyen} [°C]	129.5	125.8	129.3	125.6
OIT _{moyen} [min]	9.95	9.61	9.92	9.60

On constate que la méthode d'émulsion à Ultrason provoque moins de dégâts que celle sous haute pression. Pour une bonne émulsion, il faut que les gouttelettes soient de même taille. Et la viscosité de l'huile joue également un grand rôle.

Après une journée de stockage on constate l'apparition de deux phases. Une phase huileuse en haut (couleur jaunâtre) et une autre phase plus blanchâtre. Entre la méthode à haute pression et celle à ultrason, on peut également constater une différence de volume au niveau de la phase huileuse. La méthode à haute pression présente moins de surnageant que celle à ultrason.

En fonction de la pression appliquée lors de la formation de l'émulsion, on constate également que le volume de surnageant augmente en fonction de la pression et du temps de traitement.

Donc la méthode à ultrason est la méthode de choix pour effectuer l'émulsification des huiles de poisson.

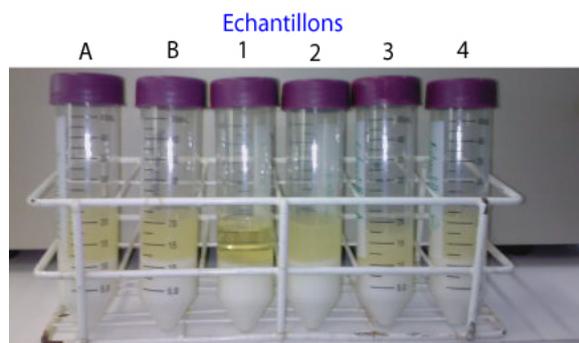


Figure 29: Aspect des émulsions après 1 semaine de stockage

3.2.12 Effets des conditions de fabrication des microcapsules sur la stabilité des huiles microencapsulées.

3.2.12.1 Effet de l'atmosphère de séchage

Les deux atmosphères de séchage utilisées sont :

- Sous vide
- Barbotage à l'azote à 37°C

On constate que le milieu azoté à 37°C est moins sûr pour la stabilité de l'huile. Ainsi la variation de l'OOT entre les deux traitements est de l'ordre de 15 °C. Donc le milieu sous vide est le mieux adapté pour le séchage des microcapsules.

Tableau 13: Effet de l'atmosphère de séchage sur la stabilité des huiles microencapsulées

		Echantillon	OOT [°C]	Variation [°C]
		Incromega 50% DHA	132	-
Séchage sous vide	Microencapsulées	Sans silice	113	19
		Avec silice	116	16
Séchage sous azote à 37°C	lavées	Sans silice	97	35
		Avec silice	101	31

3.2.12.2 Effet du lavage sur la stabilité des microcapsules

Pour étudier l'influence du lavage sur la stabilité des huiles microencapsulées, des échantillons ont subi respectivement des lavages sous vide et sous atmosphère azoté afin de ressortir son influence sur l'OOT. Les microcapsules lavées sont plus petites que celles non lavées. Le lavage se fait dans un bain de solution de calcium.

Tableau 14: Effet du lavage sur la stabilité des huiles microencapsulées

		Echantillon	OOT [min]	Variation [°C]
		Incromega 50% DHA	132	-
Séchage sous vide	Microencapsulées lavées	Sans silice	113	19
	Microencapsulées non lavées	Sans silice	113	19

Tableau 15: Effet du lavage sur la stabilité des huiles microencapsulées (bis)

		Echantillon	OOT [°C]	Variation [°C]
		Incromega 50% DHA	132	
Séchage sous azote à 37°C	Microencapsulées lavées	Sans silice	97	35
	Microencapsulées non lavées	Sans silice	101	31

On constate qu'en milieu sous vide, le lavage n'a pas d'incidence sur la stabilité des huiles microencapsulées, par contre en milieu azoté on remarque que le lavage abaisse la stabilité des huiles microencapsulées.

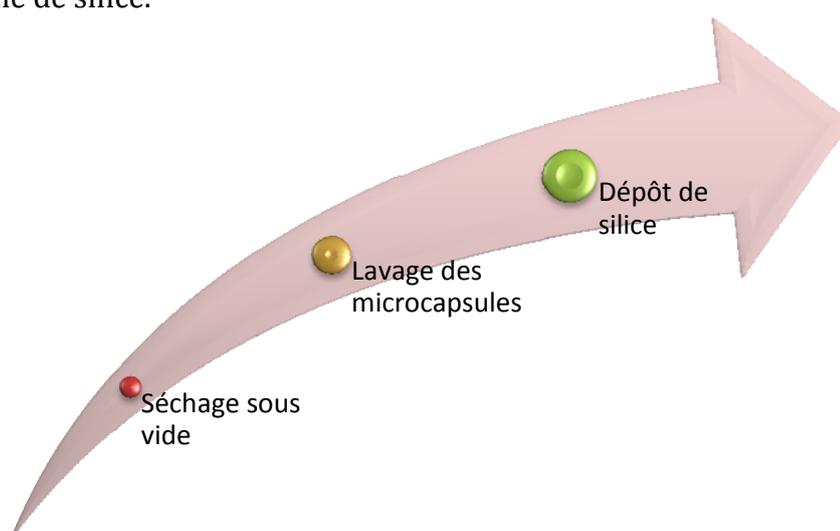
3.2.12.3 Effet du dépôt de silice

Le dépôt de silice lors de la microencapsulation permet d'éviter que les microcapsules se collent entre elles. Comme le montre le tableau ci-dessous, le dépôt de silice sur les huiles microencapsulées permet d'augmenter la stabilité de l'huile à l'oxydation.

Tableau 16 : Effet de dépôt de silice sur la stabilité des huiles microencapsulées

		Echantillon	OOT [min]	Variation [°C]
		Incromega 50% DHA	132	-
Séchage sous vide	Microencapsulées non lavées	Sans silice	113	19
		Avec silice	116	16

En résumé, pour avoir des huiles microencapsulées plus stables à l'oxydation, il faut sécher les microcapsules sous vide, puis les laver et ensuite les recouvrir avec une couche fine de silice.



3.3 SPME

3.3.1 Allure de chromatogramme

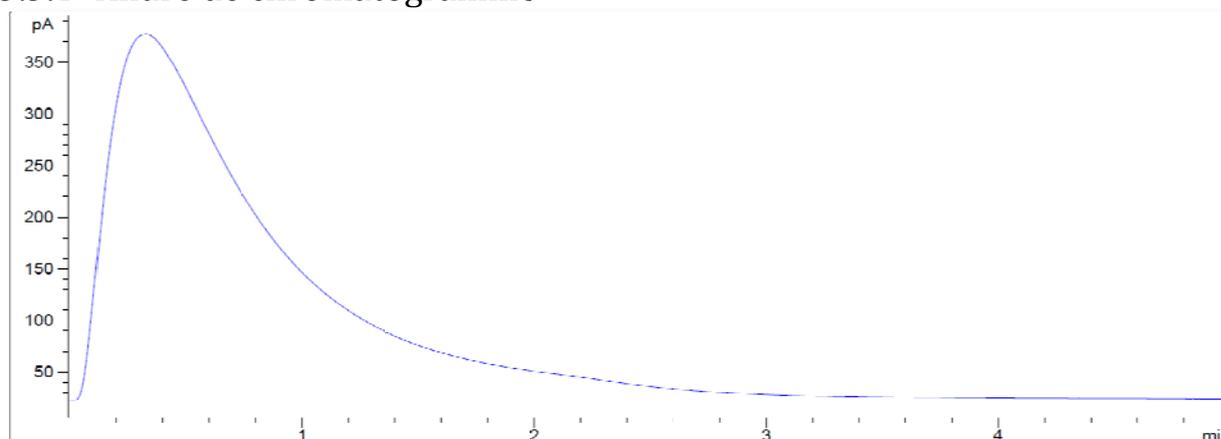


Figure 30: signal obtenu par désorption directe des composés volatils absorbés par la fibre SPME

3.3.2 Choix de la fibre

La première partie du travail consiste à choisir la fibre la mieux adaptée pour l'extraction des volatils totaux. Pour cela, cinq types de fibres ont été utilisés : PDMS-100, la PDMS-7, la PDMS-DVB-65, la PDMS-CAR-75 et la PDMS-CAR-DVB-50/30. Les mesures ont été effectuées en utilisant la méthode FIBRE-SELECTION.M.

On obtient les résultats suivants :

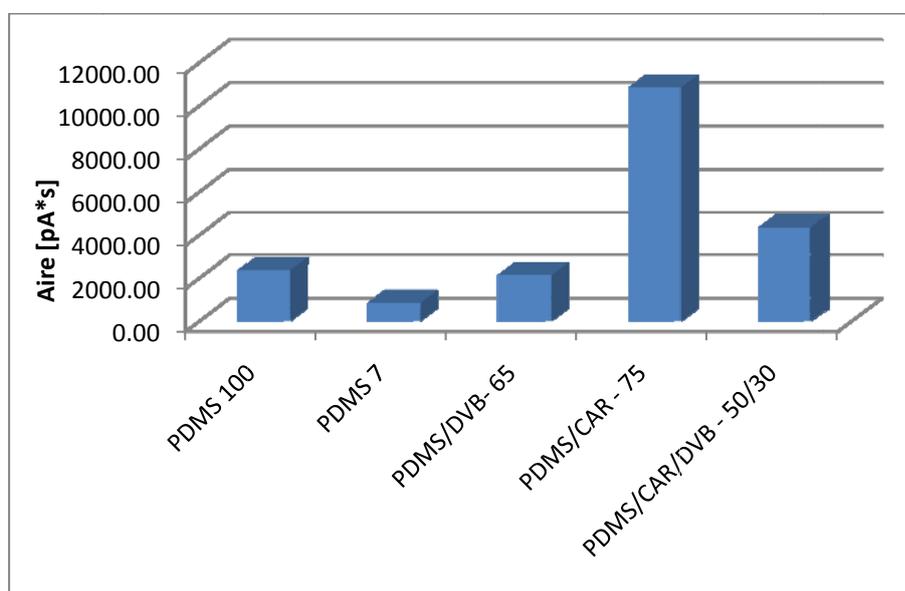


Figure 31 : Relation entre le type de fibre SPME et la surface des pics (pA*s)

La fibre *PDMS-CAR-75* présente une aire plus importante par rapport aux autres types de fibres utilisés. Elle est moins sélective pour la capture des volatils globaux. Ce qui est en conformité avec les travaux de (Duflos G. 2005). Donc pour la suite du travail, cette fibre sera utilisée pour toutes les analyses d'optimisation et de caractérisation de la stabilité des huiles de poisson.

3.3.3 Influence de la température d'incubation

Pour étudier l'effet de la température d'incubation, on a utilisé quatre températures différentes 50, 70, 90 et 100 °C, cela dans le but de corrélérer les résultats avec ceux obtenus par la méthode DSC. On constate que plus la température de chauffage augmente et plus l'aire du pic augmente. Ce qui implique que la température est un paramètre important dans la formation des volatils issus de l'oxydation des huiles de poisson. Pour la suite du travail, on travaillera à *température de 90 °C*. Ceci dans l'objectif de corrélérer les résultats obtenus avec ceux de la DSC (isotherme de 90°C).

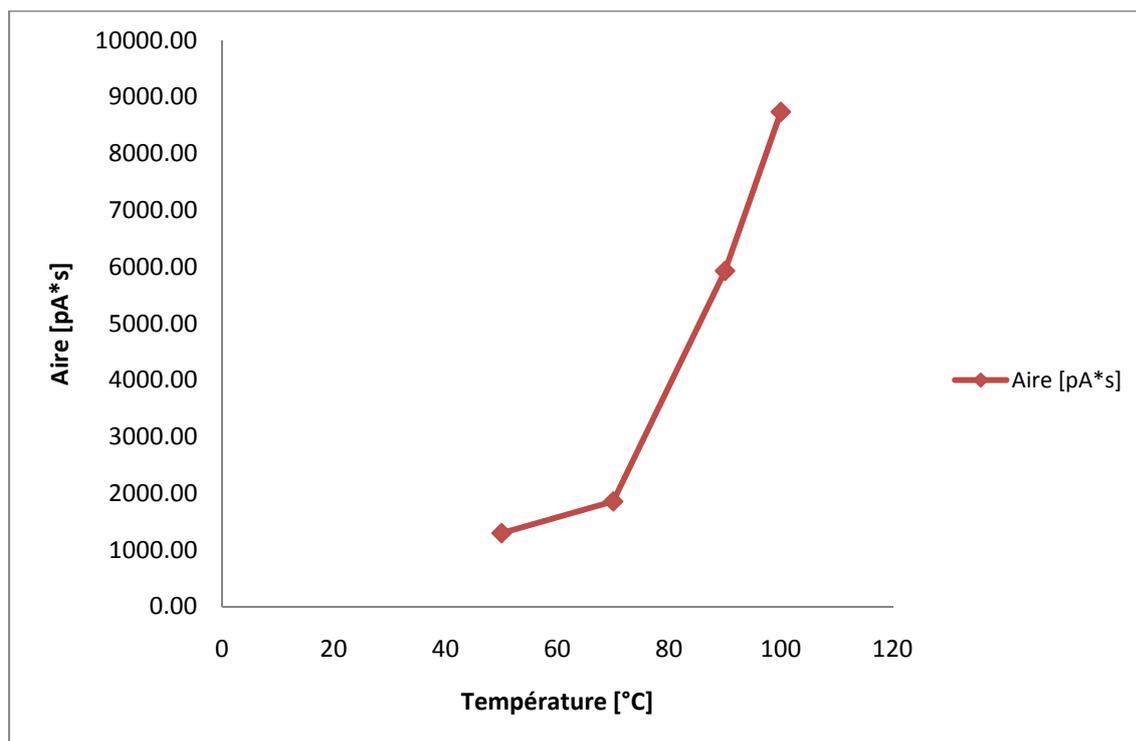


Figure 32 : Effet de la température sur l'aire du pic des volatils totaux

3.3.4 Optimisation du temps d'extraction

Le temps d'extraction est un paramètre très important dans l'évaluation des volatils totaux. Il correspond au temps requis pour qu'un équilibre s'établisse entre la phase d'échantillonnage et la fibre utilisée.

On constate qu'à partir de 10 minutes d'extraction, la grande majorité des volatils a été absorbés et la reproductibilité des mesures est très satisfaisante avec un coefficient de variation de 1.22 %. Etant donné qu'une analyse rapide est recherchée dans ce travail, on choisira un temps d'extraction court et qui donne un résultat satisfaisant.

Pour la suite du travail, on utilisera un *temps d'extraction de 15 minutes* pour s'assurer de saturer au maximum possible la fibre.

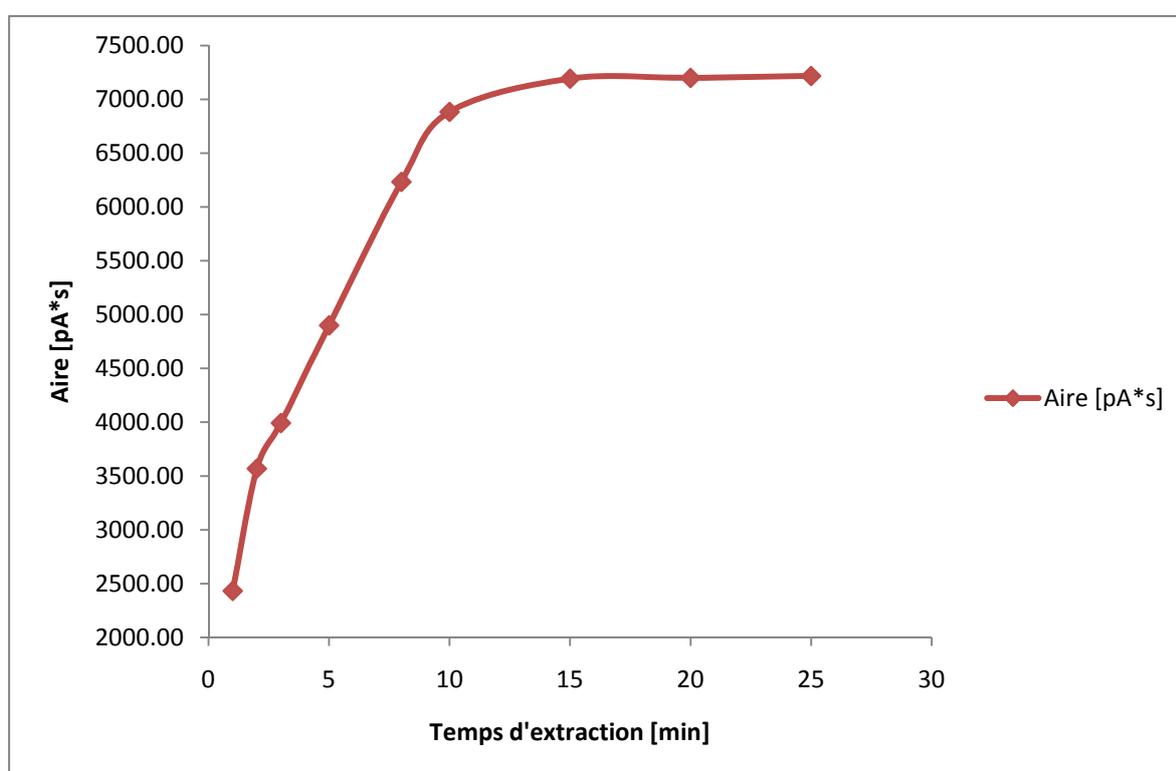


Figure 33: Effet du temps d'extraction sur l'aire du pic des volatils totaux

3.3.5 Optimisation du temps de désorption

Le temps de désorption représente le temps pendant lequel, les volatils totaux prélevés par absorption sur la fibre sont relargués dans l'injecteur à température constante de 250°C. Après 1 minute, 98% de la totalité des volatils a été désorbée. Ce qui se traduit par une faible variation des aires de pics.

Ainsi pour la suite du travail, on choisira 2 minutes pour la désorption optimale des volatils.

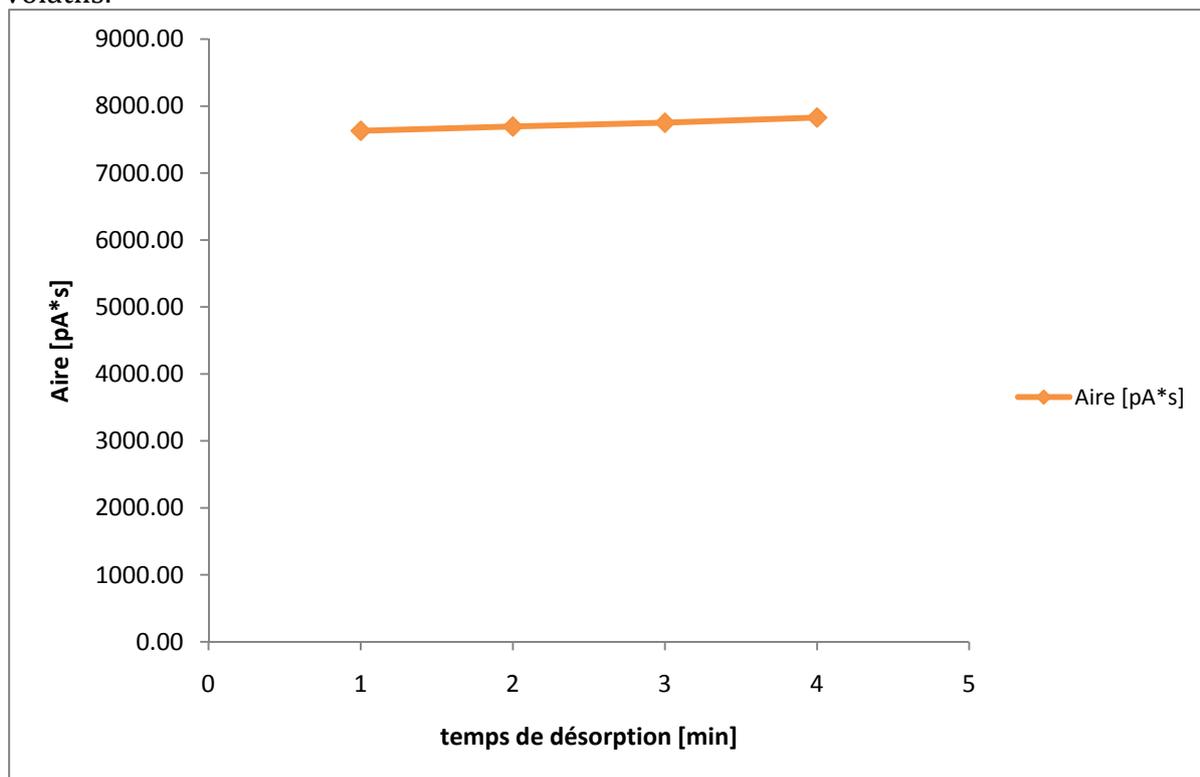


Figure 34: Effet du temps de désorption sur l'aire du pic

En supposant que la totalité des volatils a été désorbée en un temps de 4 minutes, on peut résumer les résultats sur le tableau ci-dessous.

Tableau 17 : Valeurs statistiques en fonction du temps de désorption

Temps désorption [min]	Aire _{Moyen} [pA*s]	% désorbés	Ecart-type	CV [%]
1	7631.3	97.5	38.56	0.51
2	7694.7	98.3	10.91	0.14
3	7751.2	99.0	21.47	0.28
4	7828.2	100.0	3.32	0.04

3.3.6 Optimisation du temps d'incubation

Le temps d'incubation joue un rôle majeur dans la production de volatils dans l'espace tête. En effet c'est le temps durant lequel a eu lieu l'oxydation de l'huile sous l'effet de la chaleur. Plus ce temps est important et plus une grande partie de AGPI sera oxydée, ce qui a pour effet d'augmenter la quantité de volatils formés. Dans cette expérience on a utilisé l'huile DHA 50-SA.

On constate qu'après 30 minutes d'incubation, la variation des aires de pics devient négligeable. Entre 30 minutes et 90 minutes d'incubation, le rapport des aires est de 1.04. Un *temps d'incubation de 30 minutes* est donc suffisant pour l'oxydation de l'huile.

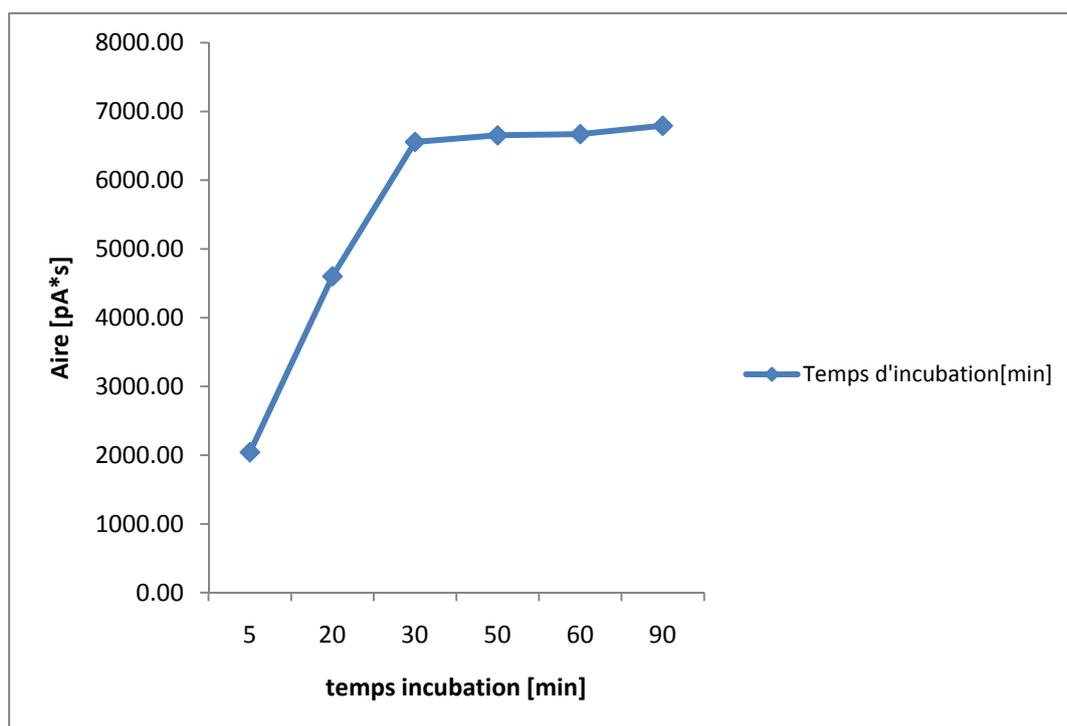


Figure 35: Effet du temps d'incubation sur l'aire du pic

Tableau 18 : Valeurs statistiques en fonction du temps d'incubation

Temps d'incubation [min]	Aire Moyenne [pA*s]	Ecart-type	CV [%]
5	2041.8	95.6	4.68
20	4601.8	73.5	1.60
30	6557.9	20.1	0.31
50	6653.6	7.2	0.11
60	6670.6	13.3	0.20
90	6792.6	165.7	2.44

3.3.7 Optimisation de la quantité d'échantillon

La quantité de volatils formés est fonction du volume d'échantillon du volume de l'espace de tête. Pour ces analyses, des volumes de 1, 2, 3 et 5 ml d'huile ont été introduits dans les vials (22ml).

Pour l'huile DHA 70% - sans antioxydant, on constate que plus le volume de l'échantillon augmente plus l'aire du pic augmente, ce qui implique que la quantité de volatils totaux formés augmente avec le volume d'échantillon employé.

Par contre avec l'huile DHA 50% - sans antioxydant, c'est le phénomène contraire qui se produit. L'aire des pics décroît en fonction de l'augmentation de volume d'échantillon. En partant du principe que les vials sont de même volume et que l'espace de tête dans les deux cas est identique, on peut alors dire que la concentration en DHA joue un rôle dans ce phénomène. Et par conséquent on fait appel au coefficient de partage des deux huiles avec l'espace de tête et de la fibre.

Les études comparatives menées par (Ágnes Keszler 1999) sur des aldéhydes aliphatiques produits lors de l'oxydation des huiles de tournesol raffinées, ont montré que plus le volume d'échantillon augmente, plus la masse de volatils absorbés est importante. Ce qui signifie que les volatils formés sont plus importants.

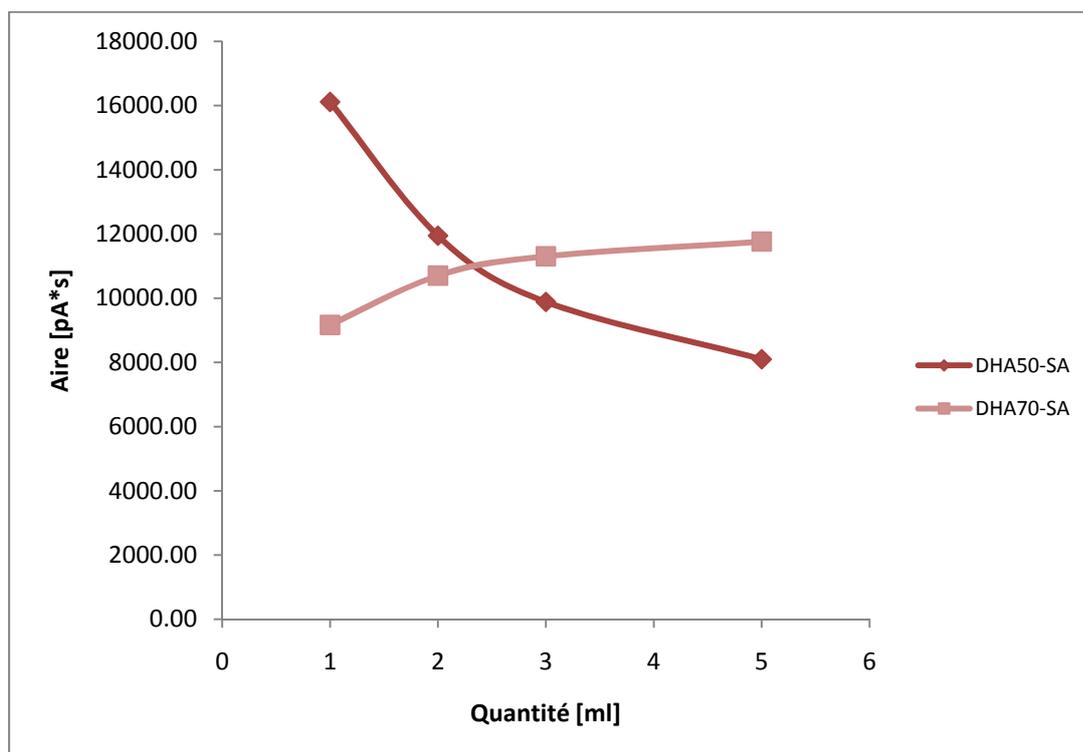


Figure 36: Effet du volume d'échantillon sur l'aire des pics

3.3.8 Répétabilité de la mesure

Dans un vial de 22 ml, on a placé un volume de 1 ml d'huile de poisson. Après stabilisation de l'espace de tête durant une demi-heure, une fibre SPME (PDMS-CAR 75 μm , Supelco Co.) est immergée dans cet espace de tête, à travers un septum pour une durée de 15 minutes. La SPME est ensuite désorbée dans un injecteur à septum maintenu à 250°C durant toute la mesure.

Un courant d'hélium entraîne les substances volatils à travers un tube capillaire désactivé (longueur 1 m, diamètre interne 75 μm , TSP-075375-D-10, pression de l'hélium : 150kPa). La température de l'injecteur de l'injecteur est maintenue à 250°C. Le détecteur utilisé est un détecteur à ionisation de flamme (FID).

La température de travail est maintenue à 300°C. Le signal, mesuré comme étant la surface du pic au moyen du programme ChemStation (Rev B-03-01-SRI), est très reproductible (cf. tableau 19). On obtient un écart-type de 101.74 et un coefficient de variation de 1.10%.

La figure N°37 représente la surface des signaux (Aire) en fonction des numéros d'essais (1 à 6). Elle illustre très bien la reproductibilité de la mesure.

Tableau 19 : Evaluation de la répétabilité des mesures

N° Essai	Aire [pA*s]
1	9466.07
2	9248.67
3	9246.36
4	9297.59
5	9197.02
6	9190.50
Moyenne	9274.37
Ecart-type	101.74
CV [%]	1.10

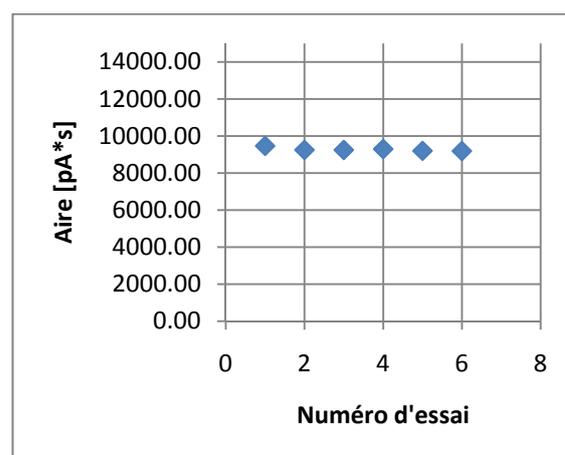


Figure 37: reproductibilité des mesures

Résumé des conditions SPME

- Fibre : PDMS-CAR
- Température : 90°C
- Temps d'extraction : 15 min
- Temps de désorption : 2 min
- Temps d'incubation : 30 minutes
- Volume d'échantillon : 1 ml

3.3.9 Effet de la température sur la stabilité des huiles

Pour étudier l'influence de la température sur la quantité de volatils totaux formés, on a fait varier la température de 50°C à 110°C. On constate que plus la température augmente plus l'aire du pic augmente aussi. Cela indique que la température est un paramètre très important dans l'étude de la stabilité des huiles.

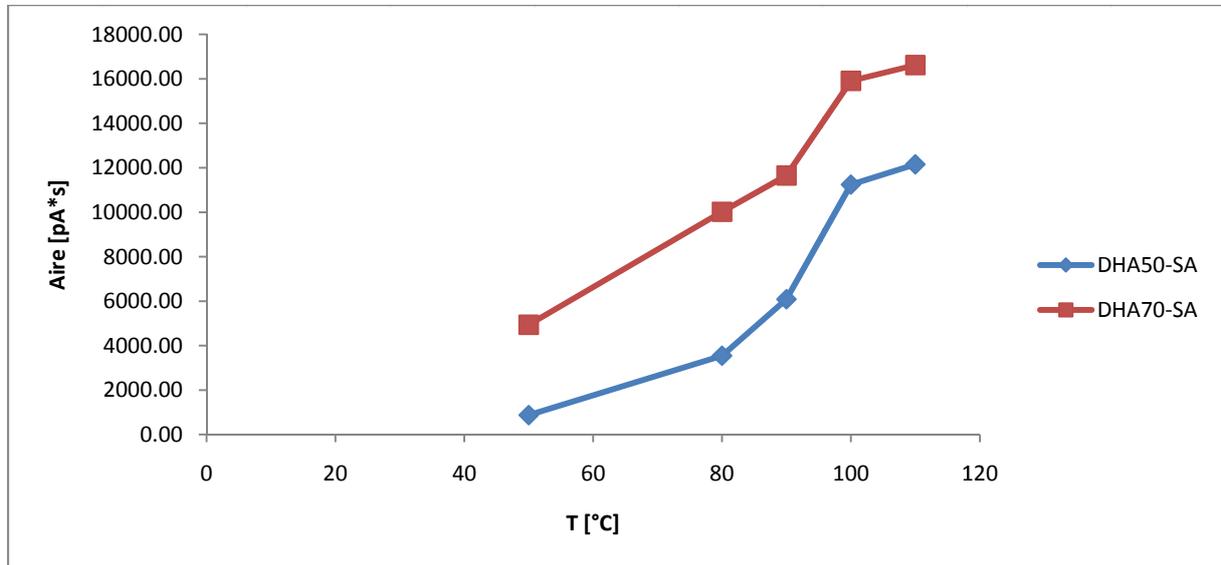


Figure 38: Effet de la température sur l'aire du pic

Une linéarisation du logarithme des aires $\ln(A)$ en fonction de l'inverse de température ($1/T$ [K^{-1}]), permet de constater une linéarité en fonction de $1/T$. Comme dans le cas de la DSC isotherme, on peut également évaluer l'énergie d'activation de l'auto-oxydation en appliquant la formule d'Arrhenius. On obtient alors 22.67 KJ/mol pour l'huile DHA 70% SA et 49.82KJ/mol pour l'huile DHA 50% SA.

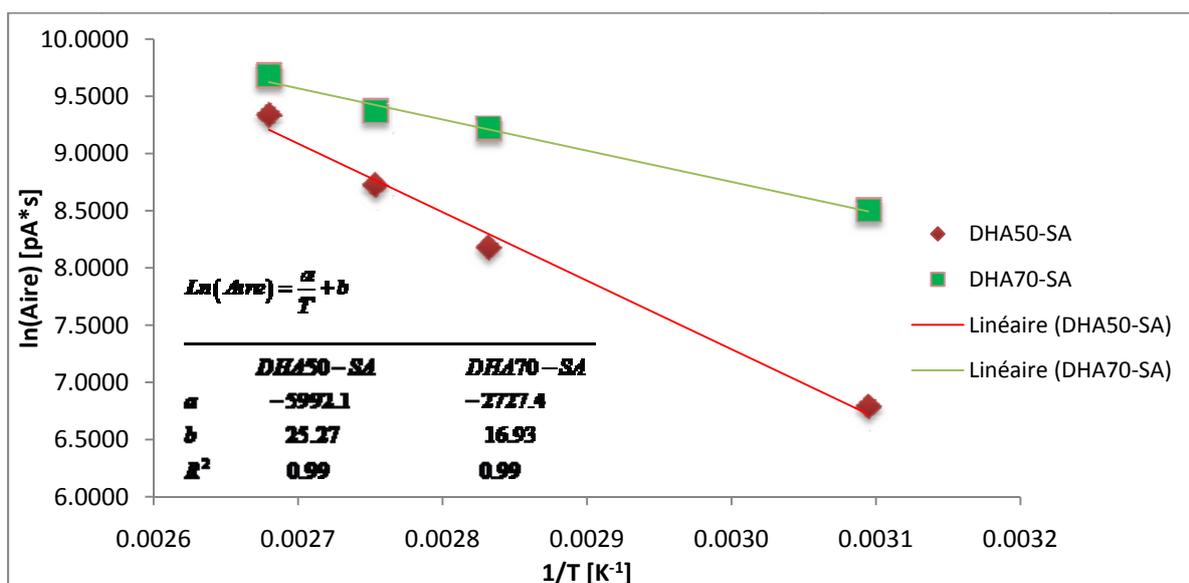


Figure 39 : Linéarisation de $\ln(\text{aire du pic})$ en fonction de $1/T$ [K^{-1}]

3.3.10 Effet de la quantité de DHA (50% et 70%)

Une étude comparée de la quantité en acide docosahexanoïque a été mise en place dans le but de comparer l'effet de la teneur en acide gras polyinsaturés sur la quantité de volatils totaux formés. Le rapport entre les deux aires est de 3.7. On peut donc conclure que la quantité de DHA joue alors un rôle très important sur la stabilité des huiles de poisson. Une petite teneur en DHA garantit une meilleure stabilité.

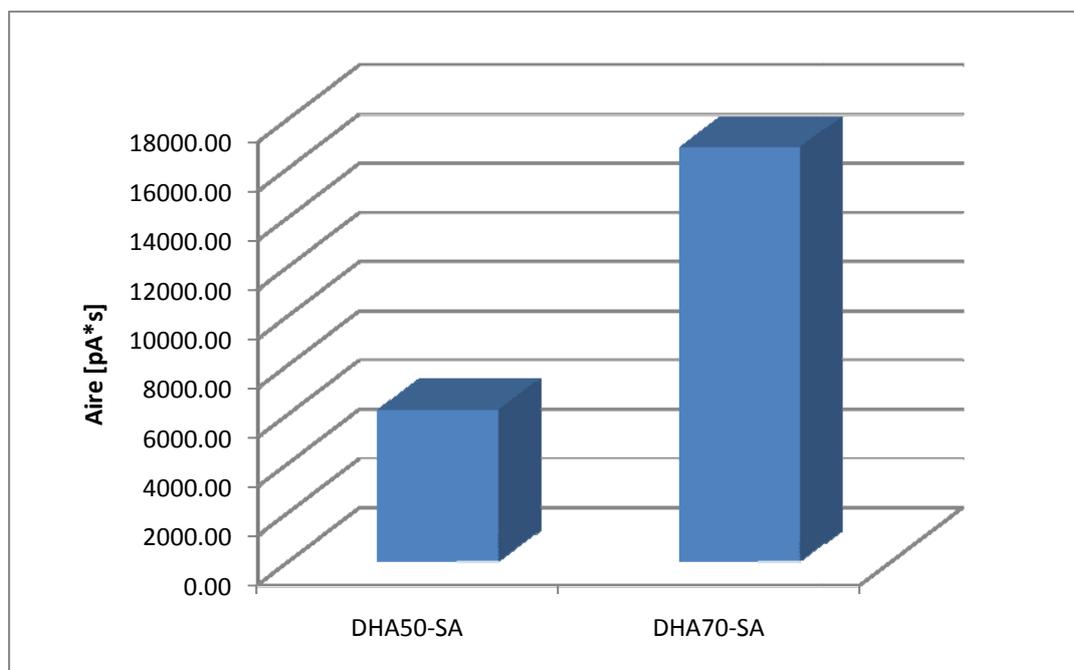


Figure 40 : Effet de la quantité de DHA sur l'aire des pics

3.3.11 Effet de l'Oxygène dissous sur l'aire du pic

Afin d'étudier l'effet de l'oxygène dissous sur l'aire du pic, des échantillons d'huiles ont été placés dans des vials avec barbotage en azote afin d'éliminer le maximum d'oxygène dans le vial. L'auto-oxydation des huiles sera influencée par la température qui est constante (90°C) pour les deux échantillons, et de la quantité d'oxygène dissous.

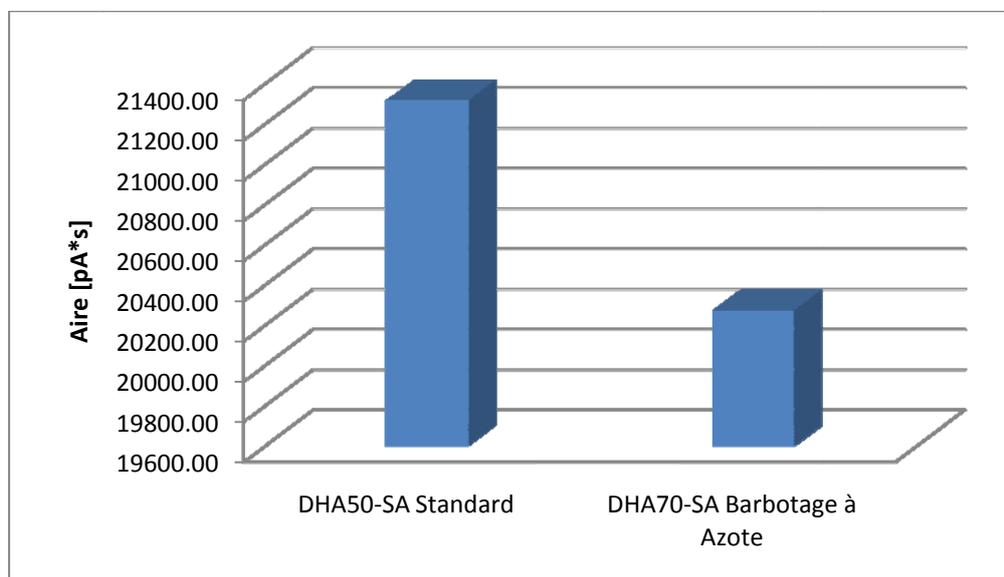


Figure 41: Effet de l'oxygène dissous

On constate que l'oxygène dissous joue un grand rôle sur la stabilité à l'oxydation des huiles de poisson. En effet l'huile standard contenant plus d'oxygène dissous présente une aire plus importante. Ce qui implique qu'il y'a plus de volatils formés avec l'huile standard.

Tableau 20 : Influence de l'oxygène dissout

	Atmosphère	Aire [pA*s]
DHA50-SA Standard	Azote	21317.2
DHA70-SA Barbotée Azote	Azote	20273.4

3.3.12 Effet de l'antioxydant sur la stabilité des huiles

3.3.12.1 Mélange de tocophérols en fonction de la concentration en DHA

Pour évaluer l'effet de l'antioxydant sur la stabilité des huiles de poisson, on a utilisé deux types d'huile avec des teneurs en DHA de 50 et 70%.

On constate qu'en fonction de la teneur de DHA, l'efficacité antioxydative varie. Ainsi entre 0 et 1000 ppm d'antioxydant, on a une augmentation considérable de la stabilité des huiles, ce qui se caractérise par un abaissement des aires de pics et donc de la quantité de volatils formés. Cette stabilité demeure stable entre 1000 et 4000 ppm.

En fonction de la teneur en DHA, on peut conclure que l'AOA est plus importante avec une huile de 50% en DAH.

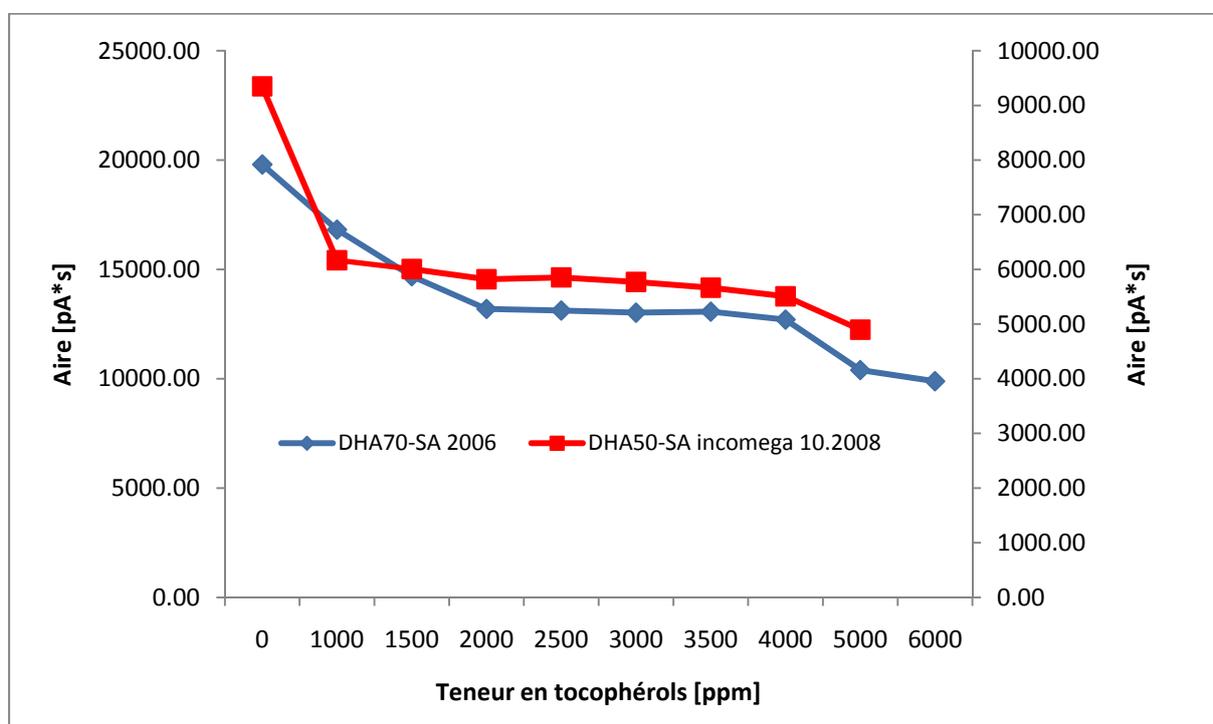


Figure 42: Effet du mélange de tocophérols en fonction de la quantité de DHA

3.3.12.2 Comparaison des effets de mélange de tocophérols et des extraits de romarin.
Une étude comparée des activités du mélange de tocophérols et d'extraits de romarin permet de conclure que dans ces conditions de travail, les extraits de romarin ont un effet antioxydant beaucoup plus important que le mélange de tocophérols. Ce qui est en contradiction avec les résultats de la HPDSC.

La différence principale entre ces méthodes de mesure est la pression en oxygène appliquée lors des mesures. Ce qui laisse penser que la quantité d'oxygène du milieu réactionnel joue un rôle important sur l'activité des deux antioxydants utilisés. Moins il y a d'oxygène, plus l'effet antioxydatif des extraits de romarin est important et inversement plus l'effet antioxydatif du mélange de tocophérols diminue.

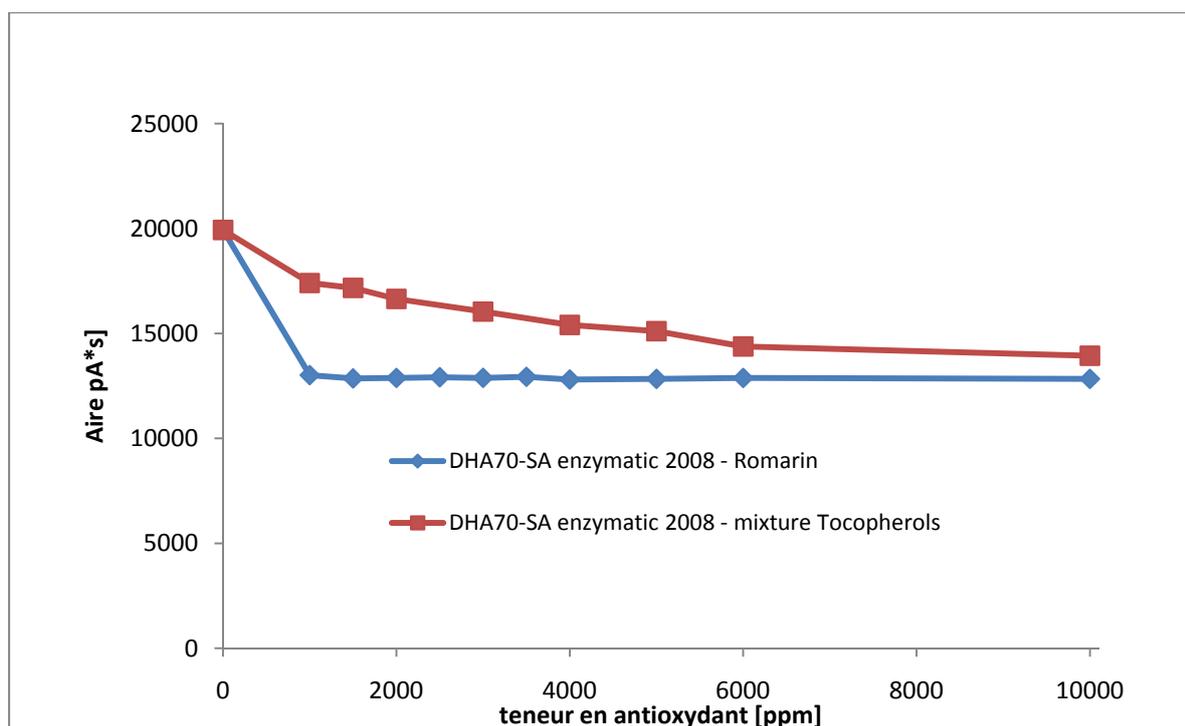


Figure 43: Etude comparée des effets des antioxydants (Mélange de tocophérols et extraits de romarin)

On peut alors conclure que les extraits de romarins sont plus efficaces à basse teneur en oxygène dans le milieu réactionnel.

3.3.13 Détermination du coefficient de partage (Méthode PRV)

Cette méthode a été initialement proposée par (Ettre 1993) ; elle permet de déterminer la constante de Henry. Le principe de cette méthode consiste à mesurer la quantité de matière dans plusieurs flacons contenant des volumes différents du même échantillon.

Chaque flacon de volume V_v est rempli d'un volume $V_{éch}$ de l'échantillon, de concentration initiale en composés volatiles de $C_{éch}^0$. Et on suppose que le flacon ne contient pas de composés volatiles initialement. Lorsque l'équilibre thermodynamique entre les phases est atteint, les composés volatiles sont alors répartis entre l'échantillon liquide ($C_{éch} \cdot V_{éch}$) et la phase gazeuse ($C_g \cdot V_g$). Ainsi le bilan de matière est vérifié par la relation suivante :

$$C_{éch}^0 \cdot V_m = C_{éch} \cdot V_{éch} + C_g \cdot V_g \quad \text{Eq. 1}$$

La mesure effectuée au GC-FID donne une surface de pic A issue de l'analyse de l'espace de tête. Cette aire est proportionnelle à la concentration de volatiles dans la phase gazeuse C_g à un facteur F près, qui correspond au facteur de réponse du détecteur. Dans ce cas F est propre à chaque molécule avec :

$$A = F \cdot C_g \quad \text{Eq. 2}$$

Considérons β comme étant le rapport entre le volume de gaz et celui de l'échantillon dans le flacon. Alors en divisant les membres du bilan de matière (éq.1) par la concentration des volatiles dans la phase gazeuse C_g et en utilisant la variable β , on obtient alors une relation entre l'aire du pic et le coefficient de partage gaz/échantillon qui est la suivante :

$$A = \frac{F \cdot C_{éch}^0}{K_{g-éch}^{-1} \cdot \beta} \quad \text{Eq. 3}$$

Ainsi, on effectue des mesures pour lesquelles, le rapport de volumes de phases β change. Afin de déterminer le coefficient de partage, (Ettre 1993) écrivent l'équation 3 sous la forme suivante :

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{F \cdot C_{éch}^0} \cdot \beta + \frac{K_{g-éch}}{F \cdot C_{éch}^0} \quad \text{Eq. 4}$$

Dans cette équation, F, $C_{éch}^0$, $K_{g-éch}$ sont supposés constants. Les seules valeurs variables sont alors l'aire du pic A et le rapport de volumes β .

Par une régression linéaire on peut déduire la valeur de $K_{g-éch}$ en traçant $1/A$ en fonction de β .

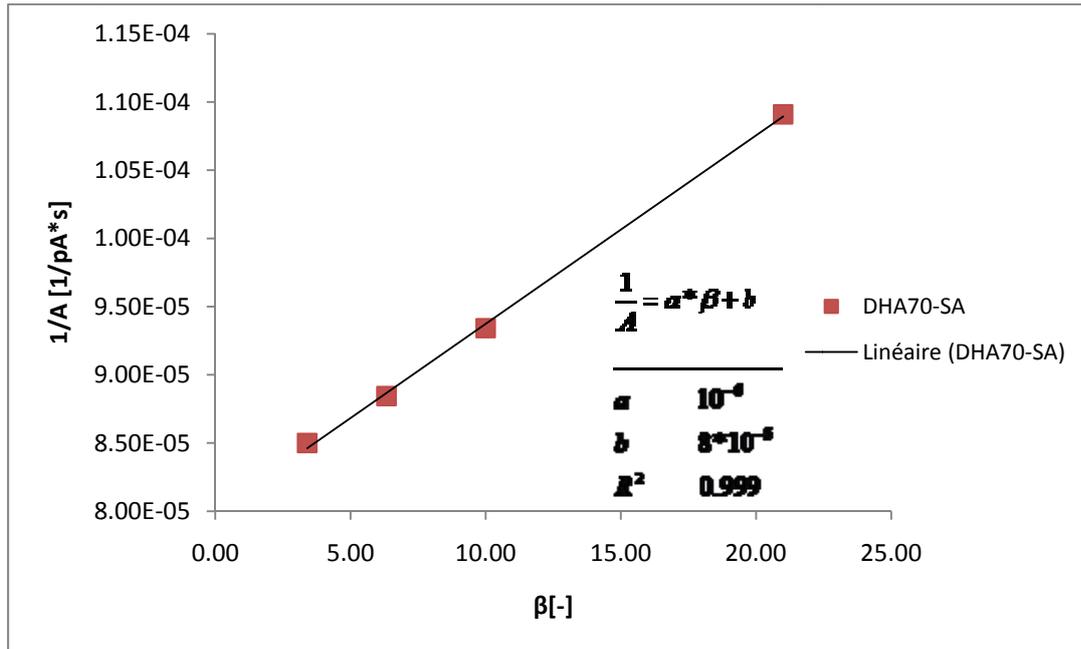


Figure 44: Evaluation du coefficient de partage de l'huile DHA70% et DHA50% sans antioxydant.

Donc la résolution de cette équation passe classiquement par une régression linéaire. Toutefois il faut noter que ce type de résolution comporte des erreurs sur l'estimation du coefficient de partage. Mais l'avantage de cette méthode réside sans doute dans la détermination du coefficient de partage sans passer par la connaissance du coefficient d'activité maximale γ^{∞}_i ou de la pression de vapeur saturante du composé pur, ni d'un étalonnage. Les limites de cette méthode de détermination sont sans doute liées à la précision de l'appareillage de mesures, et la difficulté à mettre en œuvre l'expérience, car il faut déposer avec précision de petits volumes d'échantillon (soit entre 50 et 2000 μ l).

Pour cette huile utilisée, on obtient un coefficient de partage de 80. Cette valeur est supérieure à 1. Ce qui implique que les volatils se situent majoritairement dans la phase gazeuse.

4 DISCUSSION

4.1 Indice de peroxyde

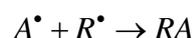
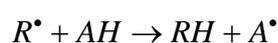
L'indice de peroxyde permet d'évaluer la quantité d'hydroperoxyde formée pendant un temps donné. Ainsi que la phase d'initiation de l'oxydation des AGPI. Exprimé en milli équivalent d'oxygène par Kg d'huile, il permet de suivre l'état d'avancement de la production de composant primaires de l'oxydation. En effet plus l'indice de peroxyde est élevé, plus l'huile est sensible à l'oxydation.

La température et le temps d'incubation ont un effet néfaste sur la stabilité à l'oxydation des huiles de poisson. En effet comme le montre le tableau 21, plus le temps d'incubation est long, plus l'IP augmente.

Tableau 21 : Effet du temps d'incubation sur l'IP à 90°C

temps d'incubation à 90°C [min]	DHA70-AA	DHA50-AA	IP [még O2/Kg]
0	0.5	0.48	
5	1.49	0.88	
10	1.81	1.20	
20	2.13	1.54	
30	2.38	1.72	
60	2.53	1.80	
120	2.58	1.87	

Les antioxydants ont un effet protecteur sur la stabilité à l'oxydation des huiles de poisson, et cela suivant deux voies possibles : par interruption du mécanisme de formation des radicaux libres (cf. figure 2), ou préférentiellement en oxydant en lieu et place des AGPI (réaction avec les radicaux libres).



Cet effet se voit aisément dans le tableau 22.

Tableau 22 : Effet de l'antioxydant (mélange de tocophérols) sur l'IP à 90°C

temps d'incubation [min]	DHA70-SA	DHA70-AA	IP [még O2/Kg]
0	0.52	0.5	
5	1.76	1.49	
10	1.97	1.81	
20	2.42	2.13	
30	2.67	2.38	
60	3.04	2.53	
120	3.15	2.58	

4.2 DSC

La méthode de détermination de la stabilité des huiles de poisson est basée sur la mesure de l'OIT (qui peut être interprété comme étant le temps d'induction à l'oxydation) en fonction de la température. Ce qui implique d'effectuer des séries d'analyses à plusieurs températures différentes.

Le logarithme de l'OIT en fonction de la température montre une relation linéaire entre les paramètres (les coefficients de corrélation sont tous >0.99). Ce qui signifie que nous sommes en présence d'une réaction d'auto-oxydation (Kamal-Eldin 2006). On peut ainsi, dans les mêmes conditions de travail, prédire avec précision le temps d'oxydation en fonction de la température. Ainsi pour des huiles de poisson fraîchement produites, on peut rapidement obtenir des informations sur leur stabilité en effectuant des mesures pour des températures données et faire une corrélation entre l'OIT et les températures de travail.

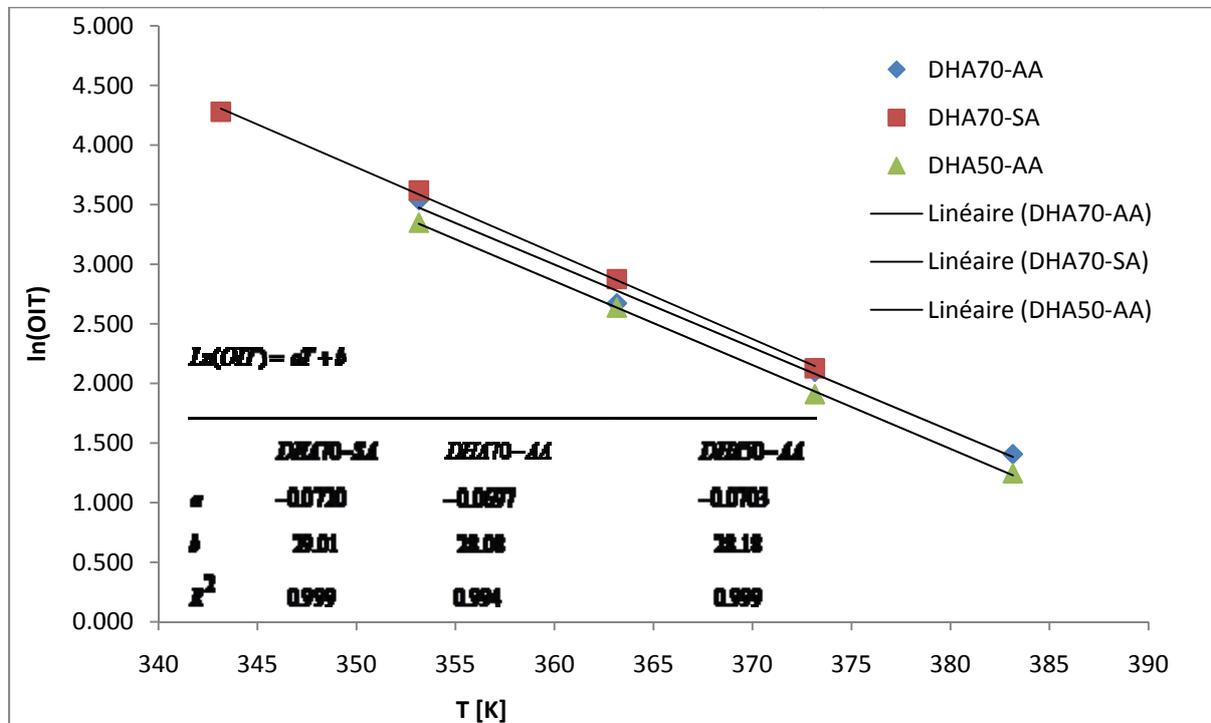


Figure 45 : Relation semi-logarithme entre l'OIT et la température de réaction isotherme.

Si le milieu réactionnel contient de l'oxygène en excès comme dans le cas de la HPDSC, la réaction d'auto-oxydation peut être considérée comme une réaction de cinétique apparente d'ordre 2. Ainsi la cinétique peut alors être expliquée par le facteur pré-exponentiel (A) et l'énergie d'activation (E_a) en se basant sur le modèle d'Arrhenius (Litwinienko 2005).

L'énergie d'activation de l'oxydation est influencée par le degré d'insaturation des AGPI contenu dans l'huile de poisson (A. Adhvaryu 2000). Plus il y a d'AGPI, et plus l'énergie d'activation est élevée. Cette énergie d'activation se trouve également influencée par la teneur en antioxydant. Les antioxydants comme le mélange de tocophérols augmentent l'énergie d'activation et retarde l'oxydation de ces huiles (Kamal-Eldin 2006).

Les valeurs négatives des entropies d'activation $\Delta S^\#$ que les complexes activés sont stériquement plus encombrés lorsque la teneur en DHA de l'huile est plus forte. Ainsi, plus l'entropie d'activation est négative, plus le déclenchement de la réaction d'oxydation est rapide (cf. tableau 23).

La teneur en DHA a pour conséquence d'augmenter la valeur absolue de l'entropie, ce qui implique une réactivité plus accrue en présence d'oxygène et de la température. Par contre l'utilisation d'un antioxydant comme le tocophérol à des proportions recommandées (2000-4000ppm), diminue la valeur de l'entropie et donc de ralentir la vitesse de réaction de l'oxydation de ces aliments.

Tableau 23 : Paramètre d'Arrhenius, enthalpie et entropie d'activation pour l'oxydation des huiles

Paramètres	DHA70-SA	DHA70-AA	DHA50-AA
$\ln(k) = a(1/T) + b$			
a	-9208	-9438.1	9516.2
b	22.51	23.231	23.59
R²	0.997	0.997	0.999
A [h⁻¹] x 10¹⁰	0.5	1.23	1.76
E_a [kJ/mol]	76.6	78.5	79.1
$\ln(k/T) = a(1/T) + b$			
A	-8850.3	-9070.4	9148.5
B	15.63	16.24	16.68
R²	0.997	0.995	0.999
$\Delta H^\#$ [kJ/mol]	73.6	75.4	76.1
$\Delta S^\#$ [J/mol K]	-67.6	-62.5	-58.9

Comme le montre le tableau 24, la constante de vitesse de réaction augmente en fonction de la température. On constate également qu'une augmentation de la quantité de DHA, induit une également une hausse de la constante de vitesse et donc accélère la réaction d'auto-oxydation des huiles de poissons. L'antioxydant diminue la valeur de k et donc ralenti la réaction.

Tableau 24: Evaluation de la constante de vitesse

T [°C]	k [min ⁻¹]		
	DHA70-SA	DHA70-AA	DHA50-AA
70	0.014	0.013	0.012
80	0.030	0.028	0.026
90	0.063	0.058	0.054
100	0.127	0.115	0.109
110	0.246	0.218	0.213

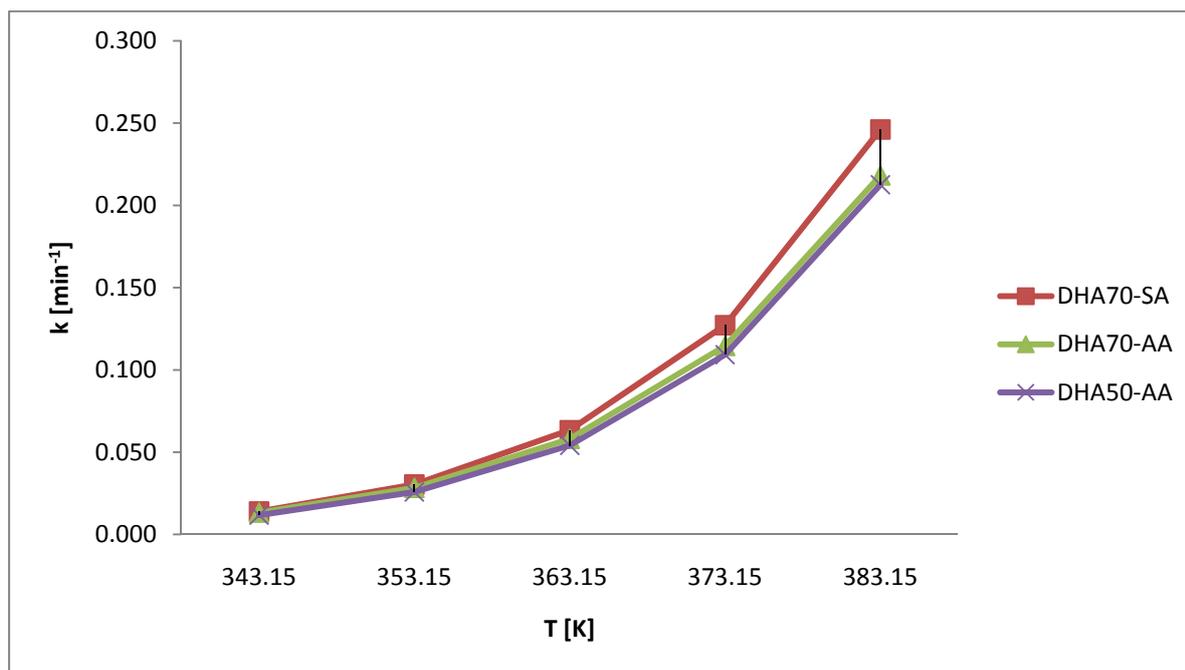


Figure 46: Variation de la constante de vitesse en fonction de la température

Ainsi, on peut conclure que les paramètres tels que la température, la pression en oxygène dans les milieux réactionnels sont très défavorables au stockage des huiles de poisson. Par conséquent la DSC est une méthode qui peut être facilement utilisée pour prévoir la stabilité des huiles de poisson. Cette technique accélérée donne de bons résultats.

L'influence de la pression sur l'OIT suit une loi exponentielle. L'exposant q dépend fortement des processus de diffusion de l'oxygène et de la formation des radicaux libres. Les matériaux avec un faible exposant ont une tendance à l'oxydation plus importante que ceux avec un exposant plus grand (Schawe 2007).

L'oxygène pénètre dans l'échantillon par diffusion. Ce processus dépend de la différence de concentration, de l'air et de la qualité de surface de l'échantillon d'une part et de la constante de diffusion qui est elle-même fonction de la température d'autre part (Loi de Fick).

L'évolution de l'OIT en fonction de la pression fournit des informations supplémentaires pour l'évaluation de la stabilité, de l'endommagement et de la tendance inhérente à l'oxydation des huiles de poisson.

La méthode d'émulsification à ultrason est la mieux adaptée pour les huiles de poisson. En effet celle sous pression diminue la stabilité à l'oxydation en abaissant l'OOT et l'OIT.

En ce qui concerne l'optimisation de la technique d'encapsulation des huiles de poisson, la meilleure méthode est la suivante :

- Séchage sous vide (sans apport d'azote lors du stripage de l'oxygène)
- Lavage des microcapsules ou non (Cette opération n'a pas d'incidence sur la stabilité des huiles microencapsulées).

- Recouvrement des microcapsules avec une couche de silice.

4.3 SPME-GC

La SPME-GC est une méthode bien adaptée pour l'étude de la formation des volatils totaux. En effet, elle permet d'avoir une bonne appréciation de la quantité de volatils formés après l'oxydation des huiles de poisson. Ces quantités de volatils formés sont directement fonction de l'aire des pics respectifs.

La méthode permet de bien mettre en évidence que la température est un paramètre très important dans l'étude de la stabilité des huiles de poisson par la SPME. En effet, on constate qu'une augmentation de la température a pour conséquence d'augmenter la quantité de volatils totaux formés. Comme le montre le tableau 25, une augmentation de 60°C entraîne une augmentation de 7% de l'aire du pic de l'huile DHA50-SA et de 30% pour la DHA70-SA.

Tableau 25 : Effet de la température sur les aires de pics

Température [°C]	Aire [pA*s]	
	DSHA50-SA	DHA70-SA
50	877	4939
80	3548	10019
90	6090	11653
100	11243	15911
110	12153	16621

Dans le commerce, la tendance est de mettre à disposition de la clientèle des huiles de plus en plus enrichies en oméga-3. Or la quantité en oméga-3 a une influence négative sur la stabilité à l'oxydation des huiles de poisson. En effet une variation de 20% en DHA entraîne une augmentation d'environ 37% sur la quantité de volatils totaux formés pour des huiles traitées pendant 30 minutes à 90°C (cf. tableau 26).

Tableau 26 : Effet de DHA sur l'aire du pic

	Aire moyen [pA*s]	Ecart-type	CV [%]	Rapport [%]
DHA50-SA	6161.71	28.81	0.47	37
DHA70-SA	16836.28	4.67	0.03	

Pour contrer cette perte de stabilité, l'industrie agro-alimentaire ajoute des antioxydants dans les huiles riches en AGPI. Ainsi une étude portant sur deux antioxydants (mélange de tocophérols et extraits de romarin) a permis de mettre en évidence leur effet sur la stabilité des huiles de poisson enrichies en oméga-3.

En fonction de la quantité de DHA et en fonction de la quantité de tocophérols, on peut constater que plus la quantité de DHA est faible, plus l'activité de l'antioxydant est importante.

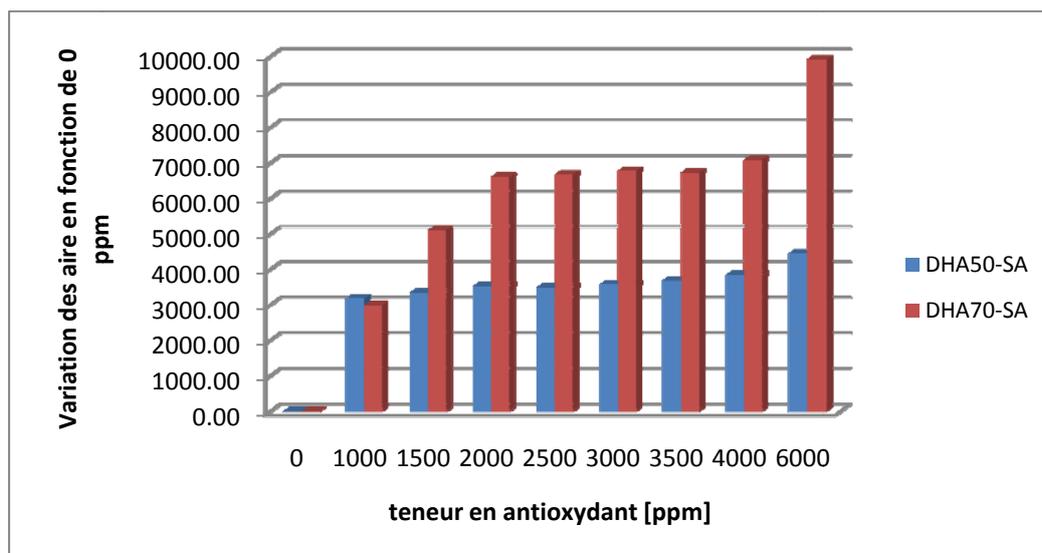


Figure 47: effet du mélange de tocophérols

Comme le montre le résumé du tableau 27, le mélange de tocophérols s'avère être plus efficace dans ces conditions d'analyse.

Tableau 27 : Effet comparé des extraits de romarin et la mixture de tocophérols

Quantité [ppm]	Aire [pA*s]		
	Mixture Tocophérols	Romarin	Variation
0	19932	19932	0
1000	17403	13013	4390
1500	17169	12855	4313
2000	16644	12882	3762
3000	16042	12885	3158
4000	15406	12803	2603
5000	15108	12833	2274
6000	14379	12878	1501
10000	13939	12836	1103

4.4 Corrélation des trois techniques d'analyse

La corrélation des résultats obtenus pour les trois méthodes d'analyse permettent de cerner les problèmes liés à la stabilité des huiles de poissons et des huiles microencapsulées.

L'indice de peroxyde nous donne des informations sur l'état d'avancement de la formation des produits primaire de l'oxydation. Il permet de caractériser l'huile avant oxydation.

La DSC permet d'obtenir deux paramètres importants : l'OIT et l'OOT. Ces valeurs donnent des informations capitales sur le temps d'induction à l'oxydation et la température à partir de laquelle l'oxydation des huiles commence. Elle permet de prédire la stabilité à moyen terme d'huile dans des conditions données par extrapolation.

A partir du moment où l'oxydation est amorcée la SPME-GC permet d'évaluer la quantité de produits secondaires formés par la mesure des volatils totaux.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La mise en regard des résultats obtenus par les trois techniques d'analyse permet de mieux comprendre et surtout de mieux suivre la stabilité des huiles de poisson (microencapsulées ou non) à l'oxydation.

Ces techniques devraient permettre aux producteurs de ces produits de prédire dans quelles conditions et sur quelle durée ces huiles peuvent et doivent être stockées pour maintenir leur qualité.

Dans le but d'approfondir l'étude sur la stabilité des huiles de poisson (des produits volatils formés), certaines méthodes peuvent être mises en place pour déterminer leur degré d'oxydation et quantifier les volatils formés par ciblage de certains aldéhydes.

Pour étudier les produits primaires de l'oxydation, on pourrait envisager deux méthodes complémentaires qui sont :

✦ la mesure des diènes conjugués

Le principe de cette méthode est basé sur le fait que l'oxydation des AGPI s'accompagne d'un déplacement des doubles liaisons qui passent de la position malonique à la position conjuguée. Ce déplacement des DL peut être suivi par la spectrométrie à ultra violet. Les diènes conjugués absorbent à 232-233 nm et les triènes conjugués à 268 nm. Cette méthode est rapide, mais peu spécifique.

✦ le dosage des hydroperoxydes par la méthode au xylénol orange

Ce dosage colorimétrique a pour objectif de quantifier les hydroperoxydes (ROOH) présents au sein des échantillons.

En ce qui concerne les produits secondaires de l'oxydation, on pourrait également envisager d'utiliser une des trois méthodes analytiques suivantes :

✦ le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA)

Les produits secondaires des acides gras les plus couramment dosés sont les aldéhydes. Le TBA réagit avec le malonaldéhyde (MDA) pour former un complexe de couleur rose et/ou jaune possédant un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 532 nm. Il réagit également avec d'autres aldéhydes résultant de l'oxydation des AGPI à longue chaîne. La concentration en substances réactives au TBA (sr-TBA), exprimée en équivalent MDA, est alors évaluée par la lecture de l'absorbance au spectromètre visible des sr-TBA extraites des échantillons par l'acide trichloracétique.

✦ l'indice de p-anisidine

La détermination de l'indice de p-anisidine permettrait d'évaluer la nature et la quantité des acides gras oxydés par formation d'un complexe avec les aldéhydes (α et β)-insaturés. Et comme l'indice de peroxyde permet de déterminer la quantité de liaisons éthyléniques oxydées en peroxydes, la corrélation de ces deux indices permettrait de mieux évaluer le vieillissement par oxydation des huiles de poisson (rancissement).

✦ le dosage des composés volatils formés lors de l'oxydation

On pourrait également envisager une étude avancée sur l'identification et la quantification ciblée de certains produits de l'oxydation. On pourrait dans ce cas envisager de suivre la teneur en malonaldéhyde ou hexenal formé, en utilisant la méthode SPME –GC couplé avec spectrométrie de masse (MS).

Enfin, on pourrait également mettre en place une méthode d'évaluation sensorielle.

Cette méthode devrait permettre de détecter et d'identifier les odeurs résultant des dégradations lipidiques difficilement mesurables par des méthodes chimiques.

6 BIBLIOGRAPHIE

A. Adhvaryu, S. Z. E., Z. S. Liu, J. M. Perez (2000). "Oxidation kinetic studies of oils derived from unmodified and genetically modified vegetal using pressurized differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectrometry." *thermochim Acta* **364**: 87-97.

A. Orechioni, F. P. e. M. S. "Notions de HLB et HLB critique. Galenica 5, Les systèmes dispersés, vol.1 : Agents de surface et émulsions." *Puisieux F. et Seiller M. éd., Tech. & Doc. Lavoisier*: 153-194.

Ágnes Keszler, K. H. (1999). "Influence of extraction parameters and medium on efficiency of solid-phase microextraction sampling in analysis of aliphatic aldehydes." *Elsevier* **845**: 337-347.

Arabshabi, A. a. D. B. L. (1985). "Consideration in Calculating Kinetics Parameters to the Prediction From Experimental Data." *J.Food Process* **7**: 239-251.

ASTM, A. B. o. S. (E968-02 - 2004). E968-02 : Standard Practice for Heat Flow Calibration of Differential Scanning Calorimeters, ASTM Standards: 5.

ASTM, A. B. o. S. (E-967 - 2004). E-967 Practice for Temperature Calibration of Differential Scanning Calorimeters and differential Thermal Analyzers, ASTM Standards: 8.

Basaga, H., Tekkaya, C. and Acikel, F. (1997). "Antioxidative and Free Radical Scavenging Properties of Rosemary Extract." *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **30**: 105-108.

Bauman D., H. M., Rizner Hraz A., & Knez Z., (1999). "Supercritical fluid extraction of rosemary and sage antioxidants." *Acta Alimentaria* **28**(15-28).

Becher, P. (1984). "HLB : a survey (HLB : tour d'horizon). Surfactants Solution." *Éd. : Mittal K.L. et Lindman B. Plenum Press* **3**([Proc. Int. Symp.] 4th): 1925-45.

Branen, A. L. (1975). "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy-anisole and butylated hydroxytoluene." *Journal of American Oil Chemist' Society*, **52**: 59-63.

Chaiysait, W., McClements, D.J., & Decker, E. (2005). "The relationship between the physicochemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil-water emulsion." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 4982-4988.

Chen, Q., Shi, H., & Ho, C. T. (1992). "Effects of natural and synthetic antioxidants on changes in refined, bleached, and soybean lipoxygenase activity." *Journal of American Oil Chemist' Society* **69**: 999-1002.

Cheung S, T. J. (2007). "Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*." *Oncol Rep* **6**: 1525-1531.

CLaudy, P. (2005). Analyse calorimétrique différentielle - Théorie et application de la D.S.C. Lavoisier.

Cohen, E., and Sagui (1985). "Statistical Evaluation of Arrhenius Model and its Applicability in Prediction of Food Quality Losses." J. Food Process **9**: 273-290.

Courtney, D. L. (1997). "Emulsifier selection / HLB (Sélection des émulsifiants / HLB)." Surfactant Sci. Ser. **68**: 127-138.

Cuvelier, M. E., Berset, C., & Richard H. (1994). "Antioxidant constituents in sage." Journal of Agricultural and Food Chemistry **43**: 665-669.

Dacosta, y. (2004). Les acides gras oméga-3. Synthèse des connaissances actuelles. Paris: 313.

davis, H. T. (1994). "Factors determining emulsion type : hydrophile-lipophile balance and beyond (Facteurs déterminants le type des émulsions : la balance hydrophile-lipophile et au-delà)." Colloids Surf. A **91**: 9-24.

Decker, E. A. a. X., Z. (1998). "Minimizing rancidity in muscle food." Food Technology **52**: 54-61.

Duflos G., M. F., Coin V. M., Malle P. (2005). J. Chromatogra. Sci **43**: 304.

Ettre, L. S., C. Welter and B. Kolb (1993). "Determination of Gas-Liquid Partition-Coefficients by Automatic Equilibrium Headspace - Gas-Chromatography Utilizing the Phase Ratio Variation Method " Chromatographia **35 (1-2)**: 73-84

Frankel E. N., H. S. W., Aeschbach R., & Prior E. (1996). "Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents, carsonic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(131-135).

Frankel, E. N. (1998). "Lipid oxidation." The Oily Press Dundee, Scotland **10**.

Genot, C., Meynier, A., Riaublanc, A. and Chobert, J.M. (2003). "Protein Alterations Due to Lipid Oxidation in Multiphase Systems In." AOACS Press Champaign, (Lipid oxidation pathways. Kamal-Eldin A. (Ed.): 265-292.

German, J. B. a. K., J.E. (1985). "Lipid oxidation in fish tissue. enzymatic initiation via lipoxygenase." Journal of Agricultural and Food Chemistry **33**: 680-683.

Gray, A. P. (1968). "A sample generalized theory for the analysis of dynamic thermal measurements." Analytical Calorimetry **1**((Edité par R.J. Poter, J.F. Johnson). Plenum Press, New York): 209.

Griffin, W. C. (1949). "Classification of surface active agents by HLB (Classification des agents tensioactifs par leur valeur HLB)." J. Soc. Cosmet. Chem **1**: 311-26.

Haralampu, S. G., I. Saguy, and M. Karel (1985). "estimation of Arrhenius Model Parameters Using Three Least Squares Methods

" J. Food Process **9**: 129-143.

Hart, H. (1987). Alkanes and cycloalkanes ; conformational and geometric isomerism. Organic chemistry: a short course. Boston, Houghton Mifflin Company: 40-66.

Hill, C. G. J. a. G.-B. (1980). "Kinetic Data : Generation, interpretation, and Use." Food Technology **34(2)**: 56-66.

Hsieh, R. J. a. K., J.E. (1989b). "Lipoxygenase Generation of Specific Volatile Flavor Carbonyl Compounds in Fish Tissues." Journal of Agricultural and Food Chemistry **37**: 279-286.

Hultin, H. O. (1992). Lipid Oxidation in Fish Muscle. In *Advances in seafood biochemistry: Composition and quality*. Technomic Publishing Compagny Inc, Lancaster. G. J. M. Flick, R.E. (Eds.): 99-122.

Hultin, H. O. (1994). Oxidation of lipids in seafoods. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. F. B. Shahidi, J.R. (Eds) New York, Blackie Academic & Professional,: 49-74.

Judde, A. (2004). "Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications?" OCL **11**: 413-418.

Kahl R., K. H. (1993). "Antioxidantien BHA and BHT im Vergleich mit dem natürlichen Antioxidans Vitamin E." Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung **196**: 329-338.

Kamal-Eldin, A. (2006). "Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidation of vegetal oils." Eur. J Lipid Sci Technol **58**: 1051-1061.

Kamil, J. Y. V. A., Jeon, Y.-J. and Shahidi, F. (2002). "Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*)." Food Chemistry **79**: 69-77.

Kansci, G., Genot, C., Meynier, A. and Gandemer, G. (1997). "The antioxidant activity of carnosine and its consequences on the volatile profiles of liposomes during iron/ascorbate induced phospholipid oxidation." Food Chemistry **60**: 165-175.

Kortenska, V. D., Yanishlieva, N.V., Kasaikina, O.T., Totzeva, I.R., Boneva, M.I. and Russina, I.F. (2002). "Phenol antioxydant efficiency in various lipid substrates containing hydroxy compounds." European Journal of Lipid Sciences and Technology **104**: 513-519.

Labuza, T. P. (1980). "Enthalpy/Entropy Compensation in Food Reaction." Ibid **34(2)**: 67-77.

Labuza, T. P. a. D. R. (1982). "Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in food." Ibid **36(10)**: 66-74.

- Larpent, C. (1965). "Tensioactifs. Techniques de l'Ingénieur, Traité Constantes physico-chimiques." article K 342.
- Litwinienko, G. (2005). "Analysis of lipid oxidation by differential scanning calorimetry." Champaign III.: JAOCS Presse(In : Kamal-Elding A, Pokorny J, editors): 152-193.
- Mortimer, J. L. N. e. C. T. (1975). La calorimétrie Différentielle à balayage, Butterworths
- Parkinson, A. J. O. L. e. J. K. (1997). "Applying the three dimensional HLB system (Application du système HLB – 3D)." Cosmet. Toiletries n°112-11: 59-65.
- Pawliszyn, J. (1997). "Solid Phase Microextraction (SPME)." The Chemical Educator 2(4): 1-7.
- Pawliszyn, J. (1999). "Application of solid phase microextraction." The royal society of chemistry: 1-36.
- Pszczola, D. E. (2001). "Antioxidants : from preserving food quality to quality of life." Food Technology 55: 51-59.
- Réblová, Z. (2006). "The effect of temperature on antioxidant activity of tocopherols." Eur. J. Lipid Sci. Technol. 108: 858-863.
- Schawe, D. J. (2007). "Détermination de la stabilité à l'oxydation en fonction de la pression." UserCom Mettler Toledo 2: 18-21.
- Schwarz K., T. W. (1992). "Antioxidative constituents of rosmarinus officinalis and salvia officinalis." Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung 195: 95-98.
- Van Boekel, M. A. J. S. (1996). "Statistical Aspects of kinetic Modeling for Food Science Problems." J.Food Sci 61: 477-485.
- Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E. and Vasiliadou, S. (1997). "Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage." Z Lebensm Unters Forsch A 205: 93-96.

ANNEXES

Zongo Mathieu

2009

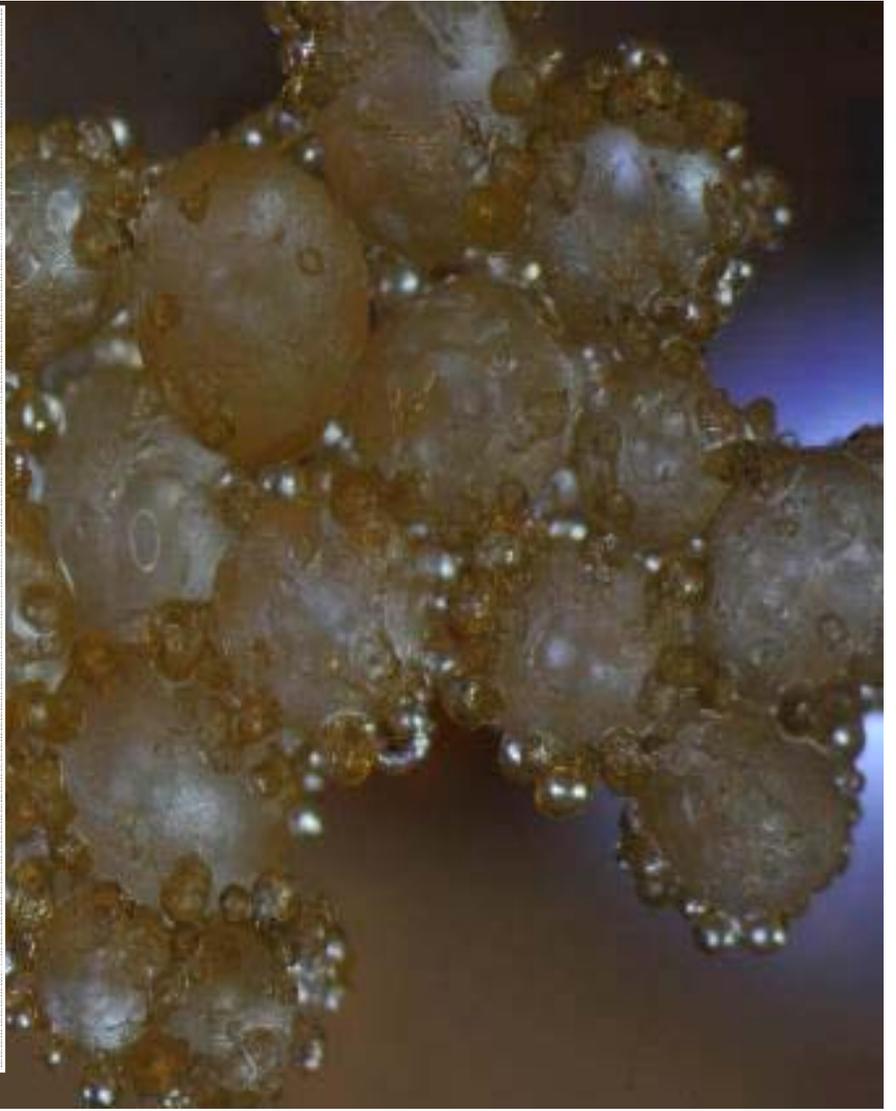


Table des matières

1	ANNEXE I (Indice de peroxyde)	4
2	ANNEXE II (Méthodes DSC)	6
2.1	CALIBRATION	6
2.2	MÉTHODE DYNAMIQUE	8
2.3	ISOTHERME 50°	9
2.4	ISOTHERME 70°C	10
2.5	ISOTHERME 90°C	12
2.6	ISOTHERME 100°C	13
2.7	ISOTHERME 110°C	14
2.8	ISOTHERME 120°C	15
3	ANNEXE II (Méthodes pour la SPME-GC)	16
3.1	METHODE CTCPAL	16
3.2	METHODE GC-FID	17
4	ANNEXES- RESULTATS	18
4.1	INDICE DE PEROXYDE	18
4.1.1	Indice de peroxyde à température ambiante	18
4.1.2	Evolution de l'indice de peroxyde en fonction du temps de chauffage.....	19
4.1.3	Variation de l'IP en fonction du temps de chauffage (suite).....	20
4.2	DSC	21
4.2.1	Répétabilité des mesures	21
4.2.2	Influence de la pression sur l'OIT	22
4.2.3	Influence de la pression sur l'OOT.....	23
4.2.4	Analyse cinétique I	24
4.2.5	Analyse cinétique II	25
4.2.6	Résumé des OOT des huiles étudiées	26
4.2.7	Effet de la teneur en antioxydant sur l'OOT.....	27
4.2.8	Effet de la teneur en antioxydant sur l'OOT (Graphique)	28
4.2.9	Effets comparés du mélange de tocophérols et des extraits de romarin	29
4.2.10	Activité des antioxydants sur l'OIT (DHA 50-SA et DHA70-SA)	30
4.2.11	Comparaison des activités antioxydatives des extraits de romarin et du mélange de tocophérols	31
4.2.12	OOT & OIT des huiles émulsionnées	32

4.2.13	Appareillages et propriétés des émulsions	33
4.2.14	Effet de l'oxygène dissous sur la stabilité des huiles de poisson	34
4.2.15	Influence de : l'atmosphère de séchage – la présence de silice ou non – du lavage ou non	35
4.3	ANNEXES SPME-GC.....	36
4.3.1	Choix de la fibre adaptée à l'absorption des volatils totaux	36
4.3.2	Optimisation de la température d'incubation	37
4.3.3	Optimisation du temps d'extraction des volatils totaux	38
4.3.4	Optimisation du temps de désorption des volatils totaux.....	39
4.3.5	Optimisation du temps d'incubation.....	40
4.3.6	Influence de la quantité d'échantillon sur les volatils totaux	41
4.3.7	Répétabilité des mesures	42
4.3.8	Influence de la quantité de tocophérols sur la volatilité totale	43
4.3.9	Influence de la quantité de romarin sur la volatilité totale	44
4.3.10	Influence de la température sur la volatilité totale	45
4.3.11	Influence de la quantité de DHA sur la volatilité totale	46
4.3.12	Influence de la technique d'émulsification sur la stabilité des huiles.....	47
4.3.13	Teste de la fibre PDMS-CAR (avant utilisation)	48
4.3.13.1	Produits :	48
4.3.13.2	Matériel :	48
4.3.13.3	Procédure	48
4.3.13.4	Nettoyage de la fibre	48
4.3.13.5	Mesures	48
4.3.14	Effet de l'Oxygène dissous.....	50
4.3.15	Evaluation des coefficients de partage (méthode PRV).....	51

1 ANNEXE I (Indice de peroxyde)

Cette méthode est une adaptation de la méthode 5.2 du MSDA (manuel Suisse des Denrées Alimentaire).

A. NETTOYAGE DE LA VAISSELLE

Il faut tremper la vaisselle dans une solution de RBS (détergent) 2% chaude durant 30 minutes. Puis il faut absolument les rincer abondamment à l'eau distillée chaude (pour enlever toutes traces de métaux ou de graisses), et les sécher à l'abri de toute poussière.

B. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

a. Solution saturée d'iodure de potassium

Dissoudre 14 g d'iodure de potassium dans 10 ml d'eau distillée fraîchement bouillie. Et puis conserver la solution dans une bouteille à verre brun

b. Solution de thiosulfate de sodium

Préparer une solution de thiosulfate de sodium de 0.01 M à partir d'une solution mère de 0.1 M (soit une dilution 10 X). Cette solution doit être préparée chaque jour.

c. Solution d'amidon

Pour la solution d'amidon, il faut peser 1 g d'amidon dans 100 ml d'eau milliQ

d. Le mélange d'acide acétique – chloroforme*

Pour la préparation du mélange aide acétique – chloroforme, il faut mélanger 300 ml d'acide acétique avec 200 ml de chloroforme (mélange volume-volume de 3 :2).

e. Solution bleutée

Dans une fiole jaugée de 500 ml, ajouté 400 ml d'eau milliQ et ensuite 10 ml d'amidon. Dans une burette automatique (ou non), remplir avec la solution d'iode (0.01M), et puis avec des volumes de 20 ml par ajout, amener la solution à une coloration bleutée.

C. TITRATIONS

• ESSAIS A BLANC

- Dans un ballon à fond plat de 50 ml ajouter 10 ml du mélange acide acétique – chloroforme.
- Ajouter 0.2 ml de solution saturée d'iodure de potassium et puis mélanger brièvement.
- Laisser reposer la solution pendant une minute à l'obscurité
- Puis titrer la solution avec une solution de thiosulfate de sodium 0.01M.

• ESSAIS

- Dans un ballon à fond plat de 50 ml, peser 1.0 g d'huile de poisson
- Ajouter 10 ml du mélange acétique – chloroforme et mélanger brièvement afin de solubiliser l'huile.
- Ajouter 0.2 ml de solution d'iodure de potassium saturée et mélanger brièvement.
- Laisser reposer la solution pendant 1 minute à l'obscurité.
- Ajouter 20 ml de la solution d'amidon bleutée.

- Titrer la solution avec la solution de thiosulfate de sodium 0.01 M jusqu'à la disparition de la coloration bleue.
- Agiter le ballon afin de faire passer l'iode solubilisé de la couche de chloroforme à la phase aqueuse et poursuivre la titration jusqu'à ce que le milieu réactionnel devienne incolore.

D. CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

$$IP[méq O_2 / Kg huile] = \frac{(a-b) * t}{P} * 10$$

Avec :

a [ml] = volume de thiosulfate 0.01M consommé dans l'essai principal

b [ml] = volume de thiosulfate 0.01 M consommé dans l'essai à blanc

t [mol/l] = titre de la solution de thiosulfate

P [g] = prise d'essai de l'huile de poisson

IL FAUT EXPRIMER L'INDICE DE PEROXYDE AVEC 1 DÉCIMAL

(*) – Le trichloroéthane a été remplacé par le chloroforme

2 ANNEXE II (Méthodes DSC)

2.1 CALIBRATION

Check DSC ^endo In 25.08.2009 13:15

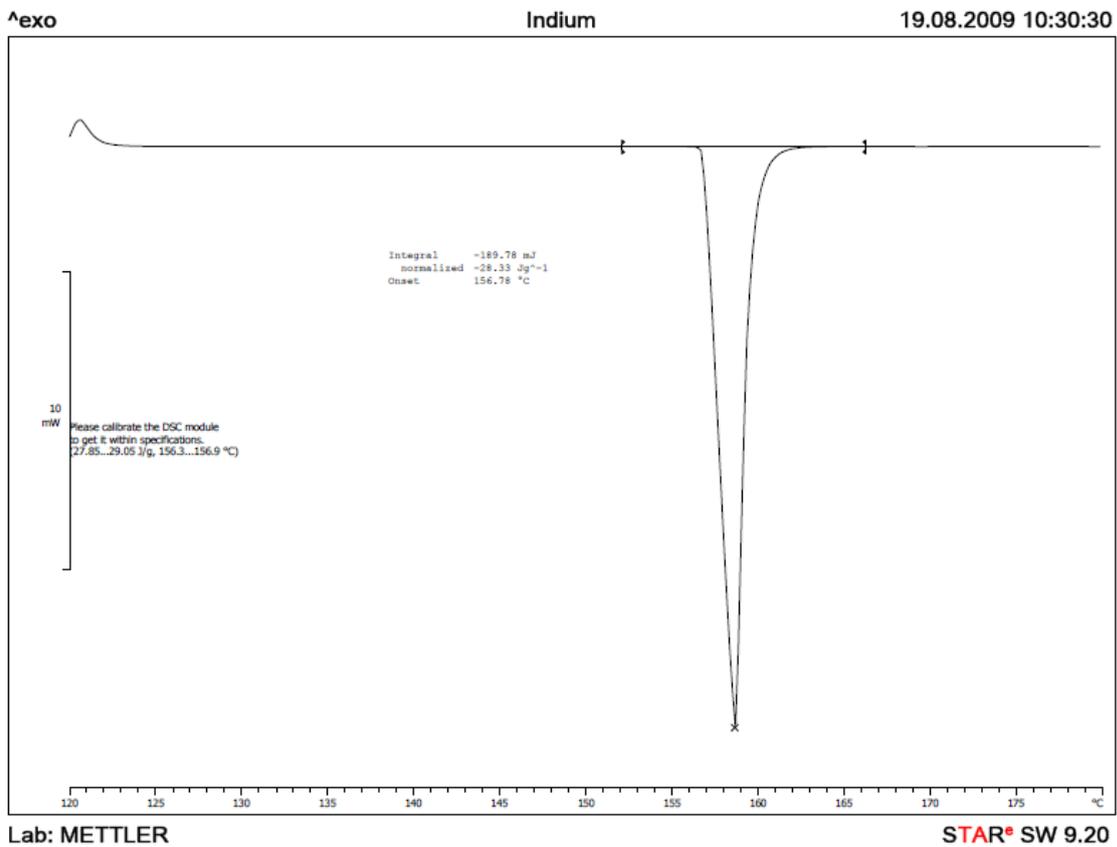
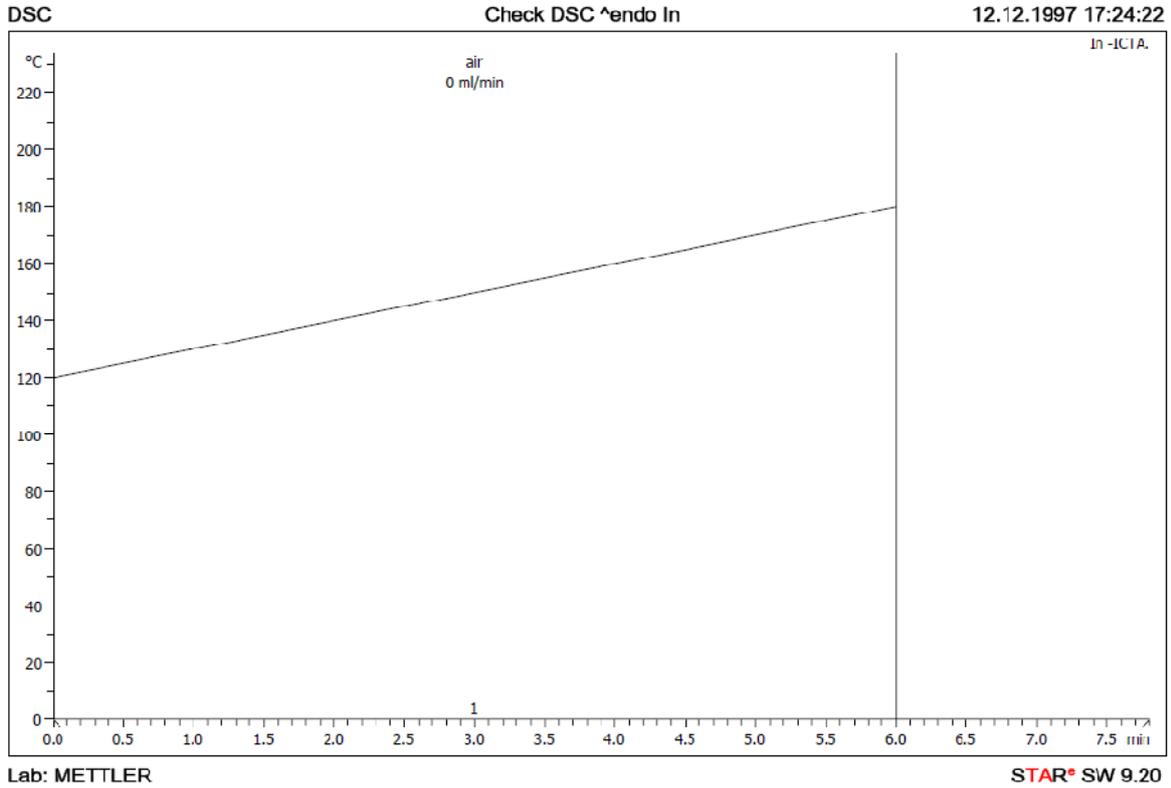
Method : Check DSC ^endo In , 12.12.1997 17:24:22
 Created by : METTLER
 Method Groups
 ve´rifications
 Sample Holder : Aluminium Standard 40ul
 TA Technique : DSC
 Start Temperature: 120 °C
 End Temperature : 180 °C
 Sample
 Preparation
 Use a piece of indium of 4 to 8 mg mass.
 Press it flat and place it in an Al pan.
 Measure its weight with a micro balance.

 Range of Weight: 4 - 1000 mg
 Sampling Interval: 1 s
 Insert Temperature
 Automatic
 Remove Temperature
 Automatic
 No Hold

Segment 1
 Start temp : 120 °C
 End temp : 180 °C
 Heating rate : 10 °C/ min
 Gas : air, 0 ml/min

EvalMacro In -ICTA.
 Temperature based
 Integral
 auto limit from 150 to 170 °C
 Result mode: sample temperature
 Validation
 normalized : between 27.85 and 29.05
 Onset : between 156.3 and 156.9

Text
 OK Text
 The DSC module is within specifications!
 (27.85...29.05 J/g, 156.3...156.9 °C)
 KO Text
 Please calibrate the DSC module
 to get it within specifications.
 (27.85...29.05 J/g, 156.3...156.9 °C)
 Synchronization enabled



2.2 MÉTHODE DYNAMIQUE

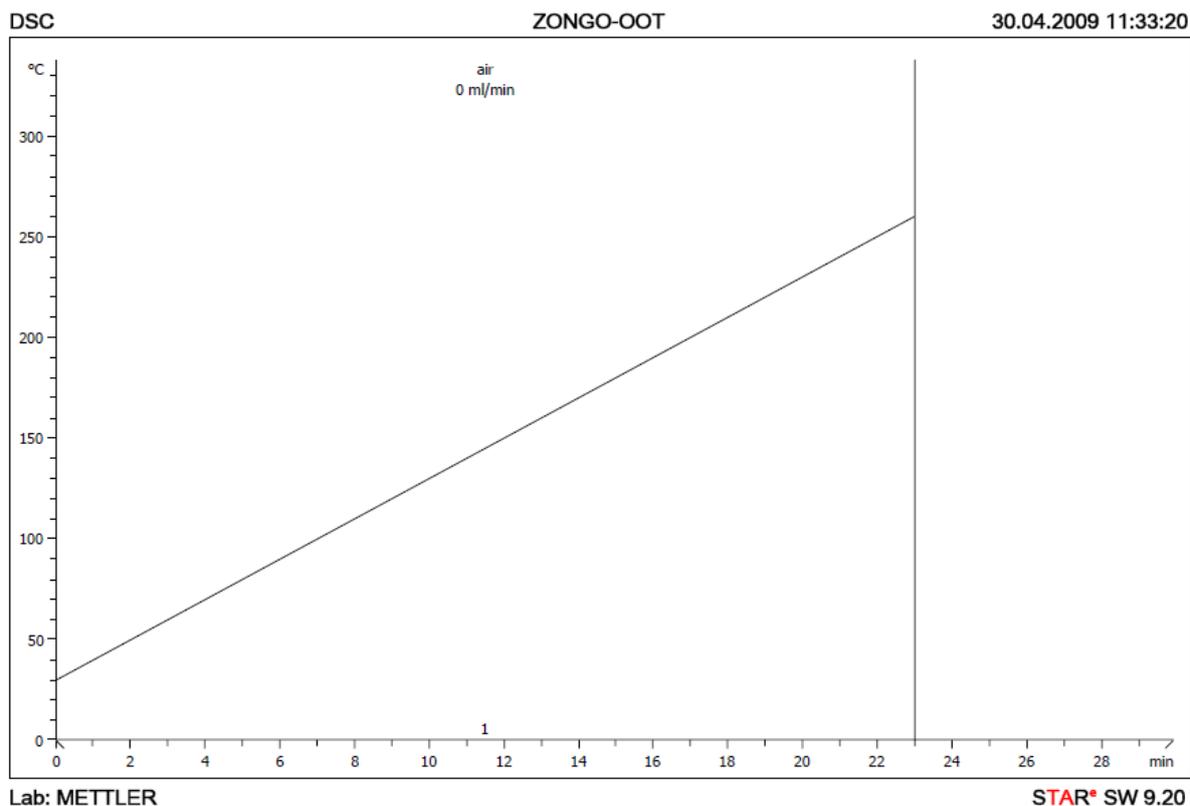
ZONGO-OOT

25.08.2009 13:13

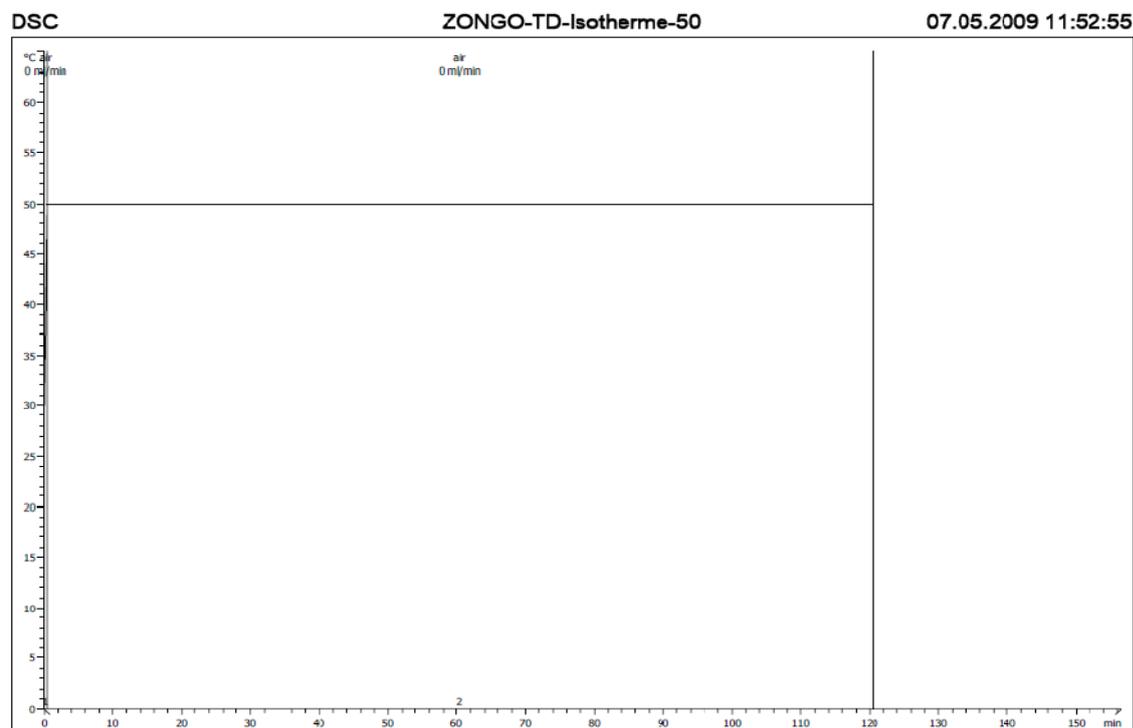
Method : ZONGO-COT, 30.04.2009 11:33:20
Created by : METTLER
Sample Holder : Aluminium Standard 40ul
TA Technique : DSC
Start Temperature: 30 °C
End Temperature : 260 °C
Sample
Range of Weight: 0 - 1000 mg
Sampling Interval: 1 s
Insert Temperature
Automatic
Remove Temperature
Automatic
No Hold

Segment 1
Start temp : 30 °C
End temp : 260 °C
Heating rate : 10 °C/ min
Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled



2.3 ISOTHERME 50°



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

ZONGO-TD-Isotherme-50

16.10.2009 10:22

Method : ZONGO-TD-Isotherme-50, 07.05.2009 11:52:55

Created by : METTLER

Sample Holder : Aluminium Standard 40ul

TA Technique : DSC

Start Temperature: 30 °C

End Temperature : 50 °C

Sample

Range of Weight: 0 - 1000 mg

Sampling Interval: 1 s

Insert Temperature

Automatic

Remove Temperature

Automatic

No Hold

Segment 1

Start temp : 30 °C

End temp : 50 °C

Heating rate : 50 °C/ min

Gas : air, 0 ml/min

Segment 2

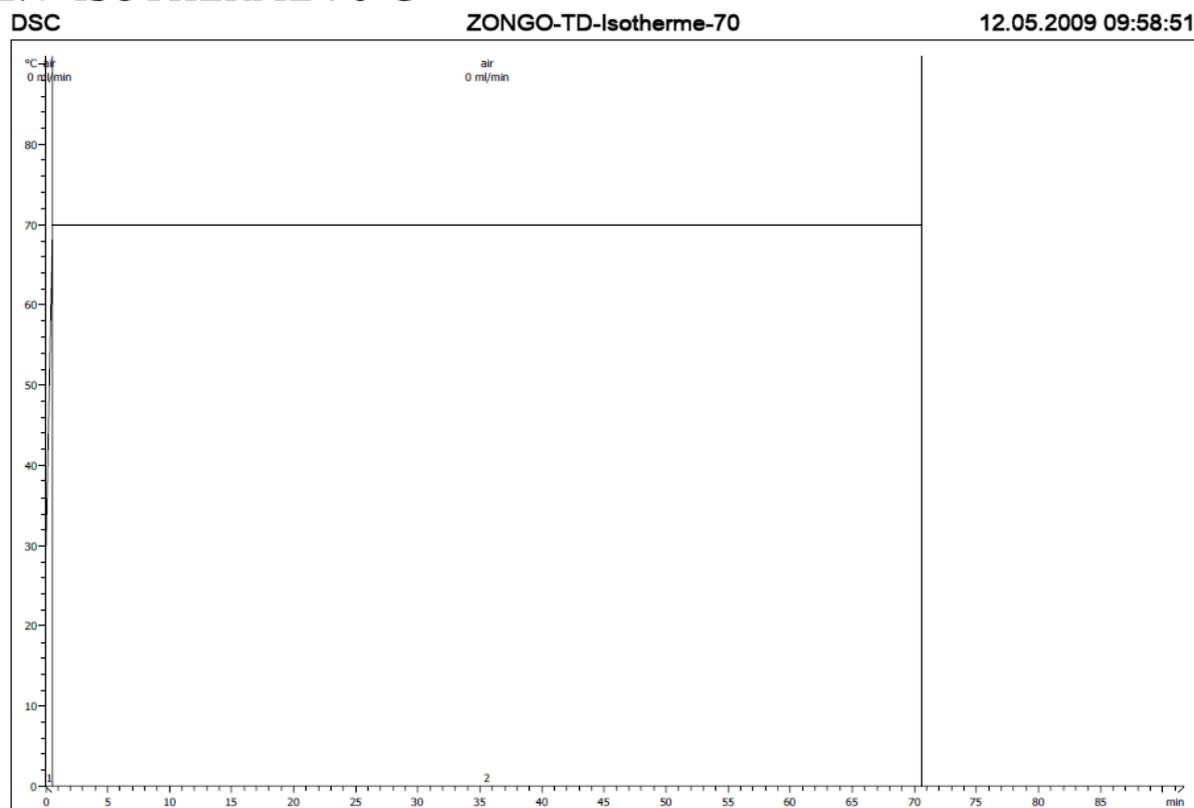
Temperature : 50 °C

Duration : 120 min

Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled

2.4 ISOTHERME 70°C



Lab: METTLER

STAR[®] SW 9.20

ZONGO-TD-Isotherme-70

16.10.2009 10:23

Method : ZONGO-TD-Isotherme-70, 12.05.2009 09:58:51

Created by : METTLER

Sample Holder : Aluminium Standard 40ul

TA Technique : DSC

Start Temperature: 30 °C

End Temperature : 70 °C

Sample

Range of Weight: 0 - 1000 mg

Sampling Interval: 1 s

Insert Temperature

Automatic

Remove Temperature

Automatic

No Hold

Segment 1

Start temp : 30 °C

End temp : 70 °C

Heating rate : 70.0117 °C/ min

Gas : air, 0 ml/min

Segment 2

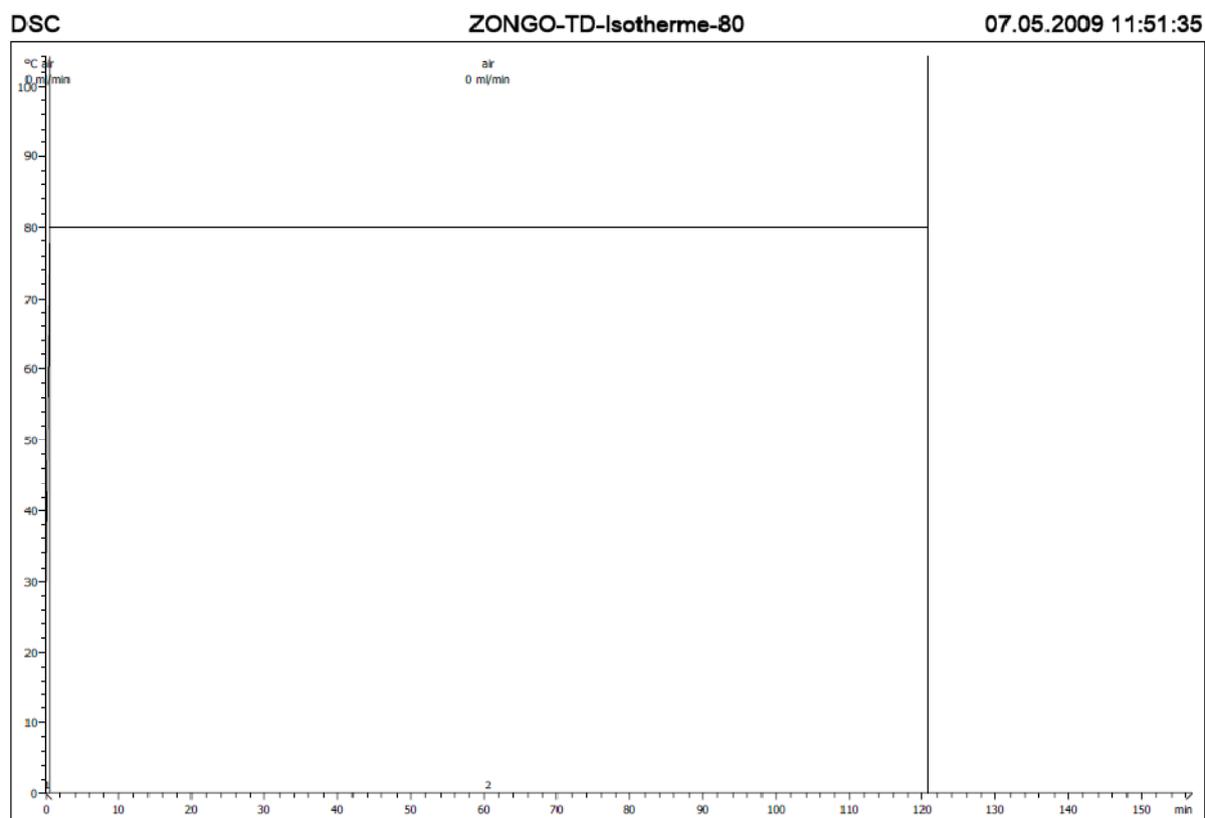
Temperature : 70 °C

Duration : 70 min

Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled

ISOTHERME 80°C



Lab: METTLER

STAR® SW 9.20

ZONGO-TD-Isotherme-80

16.10.2009 10:23

Method : ZONGO-TD-Isotherme-80, 07.05.2009 11:51:35

Created by : METTLER

Sample Holder : Aluminium Standard 40ul

TA Technique : DSC

Start Temperature: 30 °C

End Temperature : 80 °C

Sample

Range of Weight: 0 - 1000 mg

Sampling Interval: 1 s

Insert Temperature

Automatic

Remove Temperature

Automatic

No Hold

Segment 1

Start temp : 30 °C

End temp : 80 °C

Heating rate : 80 °C/ min

Gas : air, 0 ml/min

Segment 2

Temperature : 80 °C

Duration : 120 min

Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled

2.5 ISOTHERME 90°C

ZONGO-TD-isotherme-90

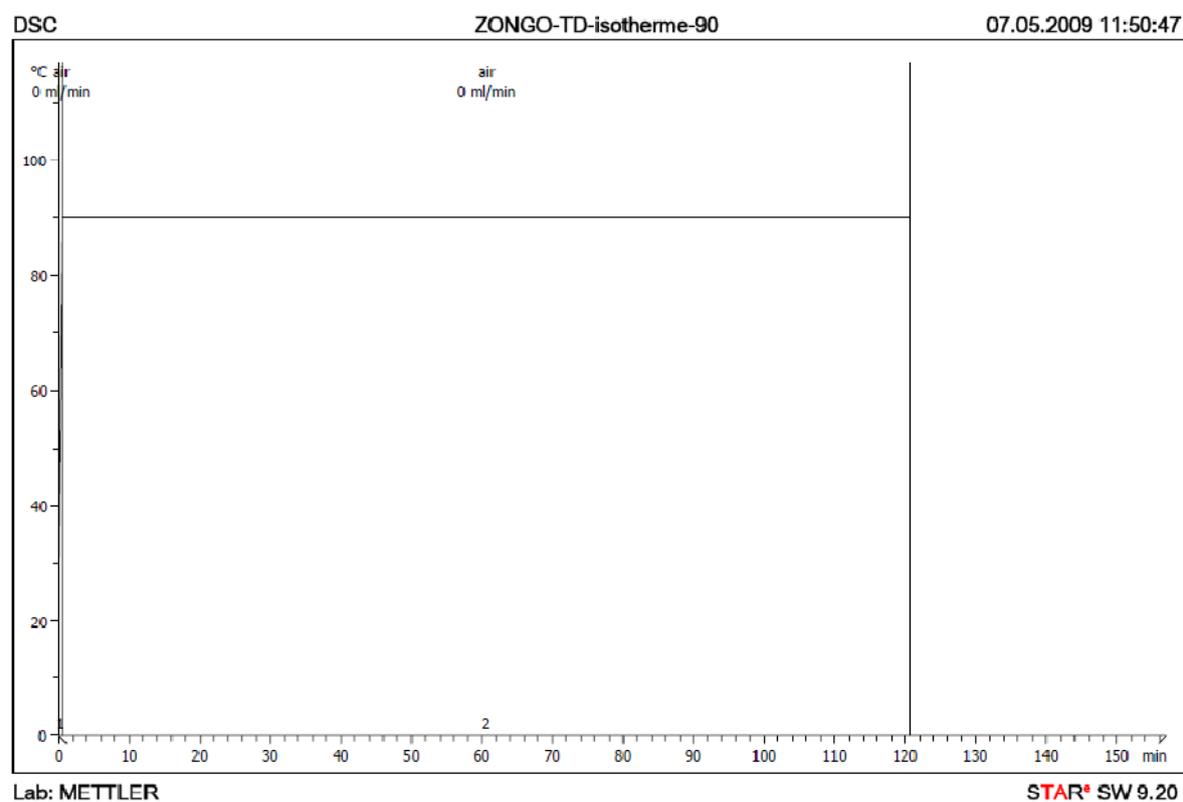
25.08.2009 13:13

Method : ZONGO-TD-isotherme-90, 07.05.2009 11:50:47
Created by : METTLER
Sample Holder : Aluminium Standard 40ul
TA Technique : DSC
Start Temperature: 30 °C
End Temperature : 90 °C
Sample
Range of Weight: 0 - 1000 mg
Sampling Interval: 1 s
Insert Temperature
Automatic
Remove Temperature
Automatic
No Hold

Segment 1
Start temp : 30 °C
End temp : 90 °C
Heating rate : 90 °C/ min
Gas : air, 0 ml/min

Segment 2
Temperature : 90 °C
Duration : 120 min
Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled



2.6 ISOTHERME 100°C

ZONGO-TD-Isotherme-100

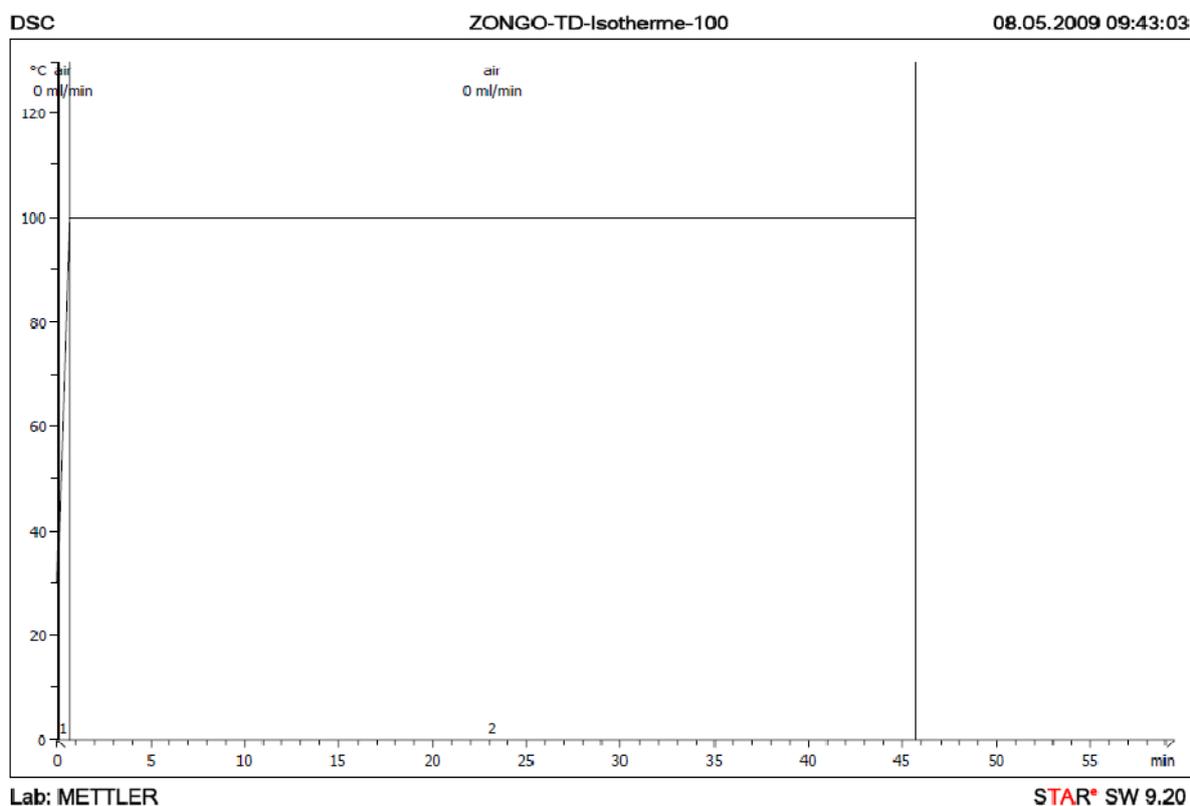
25.08.2009 13:14

Method : ZONGO-TD-Isotherme-100, 08.05.2009 09:43:03
Created by : METTLER
Sample Holder : Aluminium Standard 40ul
TA Technique : DSC
Start Temperature: 30 °C
End Temperature : 100 °C
Sample
Range of Weight: 0 - 1000 mg
Sampling Interval: 1 s
Insert Temperature
Automatic
Remove Temperature
Automatic
No Hold

Segment 1
Start temp : 30 °C
End temp : 100 °C
Heating rate : 100 °C/ min
Gas : air, 0 ml/min

Segment 2
Temperature : 100 °C
Duration : 45 min
Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled



2.7 ISOTHERME 110°C

ZONGO-TD-Isotherme-110-v2

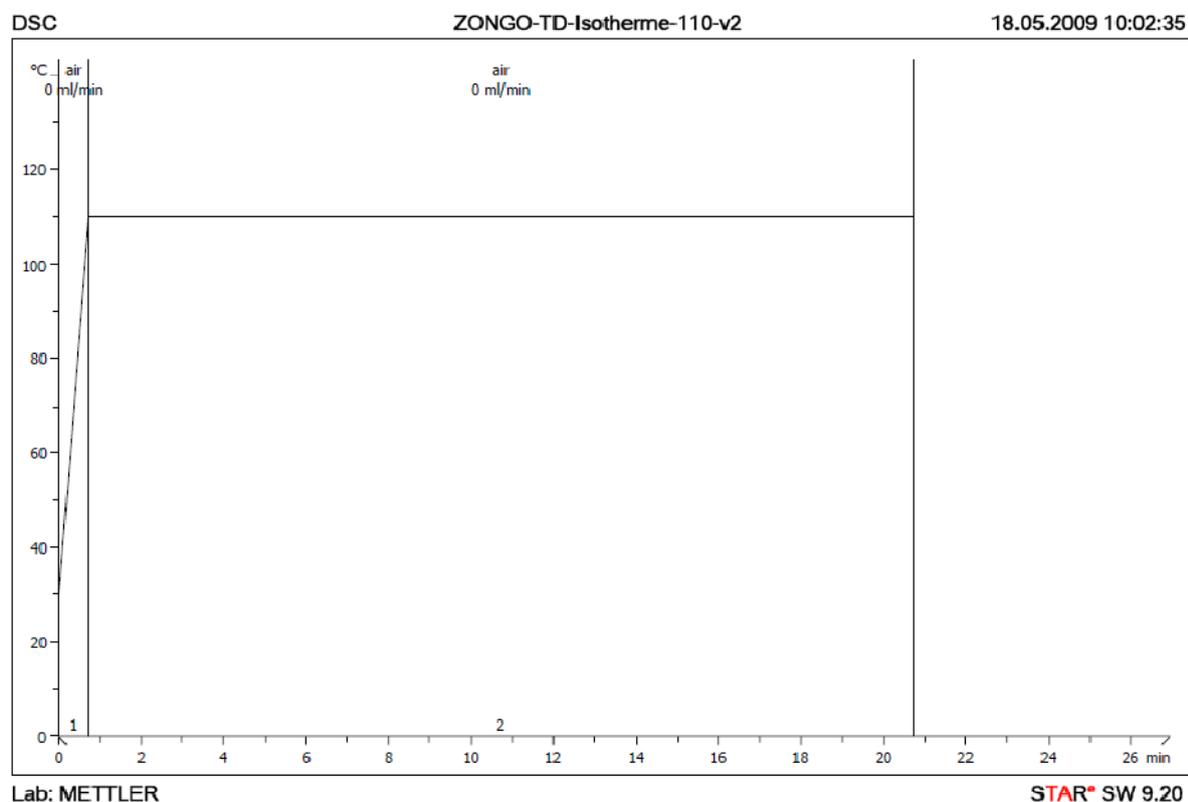
25.08.2009 13:17

Method : ZONGO-TD-Isotherme-110-v2, 18.05.2009 10:02:35
 Created by : METTLER
 Sample Holder : Aluminium Standard 40ul
 TA Technique : DSC
 Start Temperature: 30 °C
 End Temperature : 110 °C
 Sample
 Range of Weight: 0 - 1000 mg
 Sampling Interval: 1 s
 Insert Temperature
 Automatic
 Remove Temperature
 Automatic
 No Hold

Segment 1
 Start temp : 30 °C
 End temp : 110 °C
 Heating rate : 109.991 °C/ min
 Gas : air, 0 ml/min

Segment 2
 Temperature : 110 °C
 Duration : 20 min
 Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled



2.8 ISOTHERME 120°C

ZONGO-TD-Isotherme-120

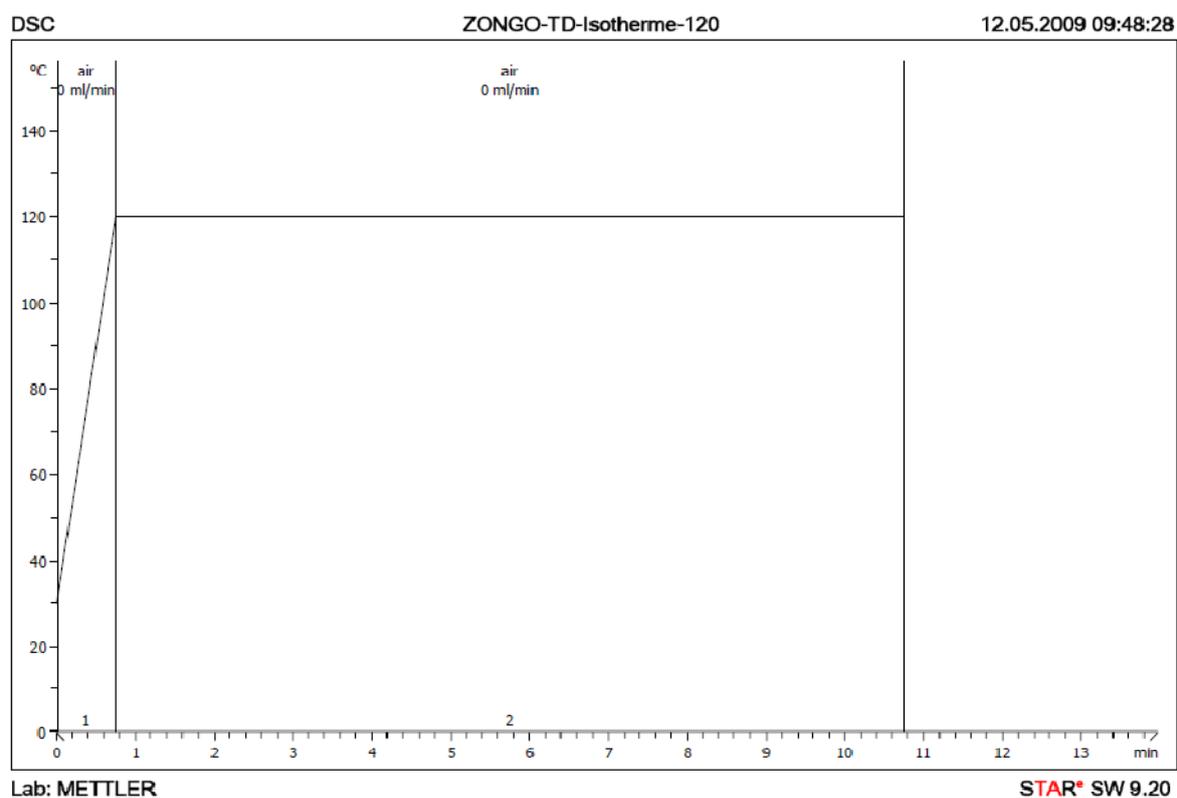
25.08.2009 13:16

Method : ZONGO-TD-Isotherme-120, 12.05.2009 09:48:28
 Created by : METTLER
 Sample Holder : Aluminium Standard 40ul
 TA Technique : DSC
 Start Temperature: 30 °C
 End Temperature : 120 °C
 Sample
 Range of Weight: 0 - 1000 mg
 Sampling Interval: 1 s
 Insert Temperature
 Automatic
 Remove Temperature
 Automatic
 No Hold

Segment 1
 Start temp : 30 °C
 End temp : 120 °C
 Heating rate : 120 °C/ min
 Gas : air, 0 ml/min

Segment 2
 Temperature : 120 °C
 Duration : 10 min
 Gas : air, 0 ml/min

Synchronization enabled



3 ANNEXE II (Méthodes pour la SPME-GC)

Cette méthode a été optimisée pour l'analyse des volatiles totaux de l'oxydation des huiles de poisson.

3.1 METHODE CTCPAL

Cycle File : SPME-Agi-Htd-FibCond

DETAIL DU CYCLE :

- Pre Incubation Time (s) : 1800
- Incubation Temp. (°C): 90
- Pre Inc Agitator Speed (rpm): 500
- Agitator On Time (s): 5
- Agitator Off Time (s): 2
- Vial Penetration in mm (μl): 22
- Extraction Time (s): 900
- Desorb to : GC Inj1
- Injection Penetration in mm (μl): 54
- Desorption Time (s): 120
- PostCondTime (s) : 300
- GC Runtime (s): 600

3.2 METHODE GC-FID

- Oven
 - Initial temp: 250 °C
 - Initial time 5.00 min
- Front inlet (Split/Splitless)
 - Mode: Splitless
 - Initial temp: 290°C
 - Pressure 150 kPa
 - Purge flow: 1.2 ml/min
 - Purge time: 5.00 min
 - Total flow 3.9 ml/min
 - Gas saver: Off
 - Gas type: Helium
- COLUMN
 - Capillary column
 - Model Number: BGB TPS-07573-D capillaire desactivé avec DPTMDS
 - Max temperature: 300 °C
 - Nominal length: 1 m
 - Nominal diameter: 75.00 µm
 - Mode: Constant flow
 - Initial flow: 0.2 ml/min
 - Normal initial temperature : 150 kPa
 - Average velocity : 87 cm/sec
 - Inlet: Front inlet
 - Outlet: front Detector
 - Outlet pressure: ambient
- FRONT DETECTOR (FID)
 - Temperature: 300°C
 - Hydrogen flow: 40.0 ml/min
 - Air flow: 400.0 ml/min
 - Mode: Constant Makeup flow
 - Makeup flow: 45.0 ml/min
 - Makeup Gas Type: Helium
 - Flame : On
 - Electrometer : On
 - Lit offset : 2.0

4 ANNEXES- RESULTATS

4.1 INDICE DE PEROXYDE

4.1.1 Indice de peroxyde à température ambiante

	volume (Thiosulfate de sodium 0.01M) [ml]	Volume moyen [ml]
Blanc	0.40	0.43
	0.50	
	0.40	

	masse [g]	volume (Thiosulfate de sodium 0.01M) [ml]	IP[méq O ₂ /Kg]	Ip(Moyen) [méq O ₂ /Kg]
Huile de poisson DHA 50% sans antioxydant	1.01	5.57	0.5	0.51
	1.02	5.50	0.5	
	1.02	5.55	0.5	
Huile de poisson DHA 70% sans antioxydant	1.04	5.80	0.5	0.52
	1.05	5.90	0.5	
	1.06	6.00	0.5	
Huile de poisson DHA 70% avec antioxydant	0.99	5.20	0.5	0.47
	1.01	5.40	0.5	
	0.99	5.00	0.5	

4.1.2 Evolution de l'indice de peroxyde en fonction du temps de chauffage

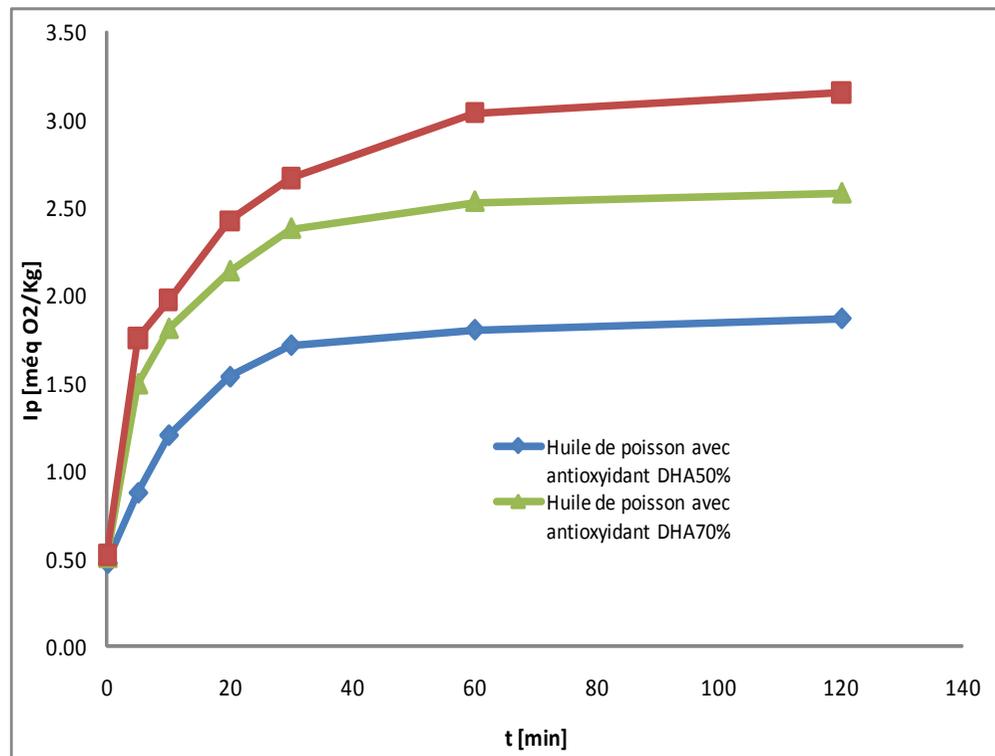
Test à blanc		
	volume (Thiosulfate de sodium 0.01M) [ml]	Volume moyen [ml]
Blanc	0.4	0.43
	0.5	
	0.4	

Huile de poisson avec antioxydant DHA50%				
temps d'incubation [min]	masse huile [g]	volume (Thiosulfate de sodium 0.01 et 0.1M) [ml]	IP[méq O ₂ /Kg]	Ip(Moyen) [méq O ₂ /Kg]
0	0.99	5.20	0.5	0.48
	1.01	5.40	0.5	
	0.99	5.00	0.5	
5	1.03	9.30	0.9	0.88
	1.07	9.60	0.9	
	0.99	9.50	0.9	
10	1.04	12.50	1.2	1.20
	1.02	12.80	1.2	
	0.98	12.60	1.2	
20	1.06	16.40	1.5	1.54
	1.01	16.90	1.6	
	1.09	16.50	1.5	
30	1.01	18.30	1.8	1.72
	1.07	18.40	1.7	
	1.05	18.30	1.7	
60	1.04	19.60	1.8	1.80
	1.08	19.90	1.8	
	1.09	19.70	1.8	
120	1.08	20.00	1.8	1.87
	1.03	20.20	1.9	
	1.06	20.30	1.9	

Huile de poisson sans antioxydant DHA70%				
temps d'incubation [min]	masse huile [g]	volume (Thiosulfate de sodium 0.01 et 0.1M) [ml]	IP[méq O ₂ /Kg]	Ip(Moyen) [méq O ₂ /Kg]
0	1.04	5.80	0.5	0.52
	1.05	5.90	0.5	
	1.06	6.00	0.5	
5	1.01	17.30	1.7	1.76
	0.90	17.90	1.9	
	1.03	17.50	1.7	
10	0.99	20.70	2.0	1.97
	1.00	20.50	2.0	
	1.06	20.20	1.9	
20	0.90	24.60	2.7	2.42
	1.03	24.90	2.4	
	1.10	24.70	2.2	
30	1.03	27.90	2.7	2.67
	1.09	28.10	2.5	
	1.00	28.40	2.8	
60	0.98	31.50	3.2	3.04
	1.05	31.30	2.9	
	1.03	31.40	3.0	
120	1.02	33.00	3.2	3.15
	1.03	34.00	3.3	
	1.05	32.00	3.0	

4.1.3 Variation de l'IP en fonction du temps de chauffage (suite)

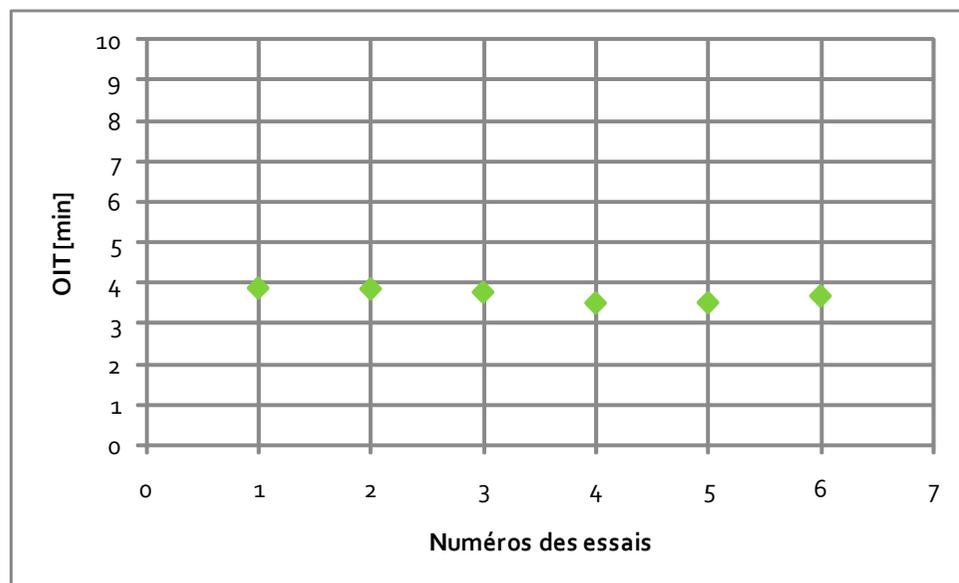
Huile de poisson avec antioxydant DHA70%				
temps d'incubation [min]	masse huile [g]	volume (Thiosulfate de sodium 0.01 et 0.1M) [ml]	IP[méq O ₂ /Kg]	Ip(Moyen) [méq O ₂ /Kg]
0	1.01	5.57	0.5	0.50
	1.02	5.50	0.5	
	1.02	5.55	0.5	
5	0.98	15.40	1.5	1.49
	1.05	15.60	1.4	
	1.03	15.90	1.5	
10	1.01	18.50	1.8	1.81
	1.02	18.90	1.8	
	1.02	19.00	1.8	
20	1.01	22.30	2.2	2.13
	1.02	22.20	2.1	
	1.02	21.90	2.1	
30	1.09	25.80	2.3	2.38
	1.06	25.60	2.4	
	1.02	25.20	2.4	
60	1.10	27.60	2.5	2.53
	1.05	27.50	2.6	
	1.08	27.90	2.5	
120	1.04	27.50	2.6	2.58
	1.10	28.60	2.6	
	1.08	28.20	2.6	



4.2 DSC

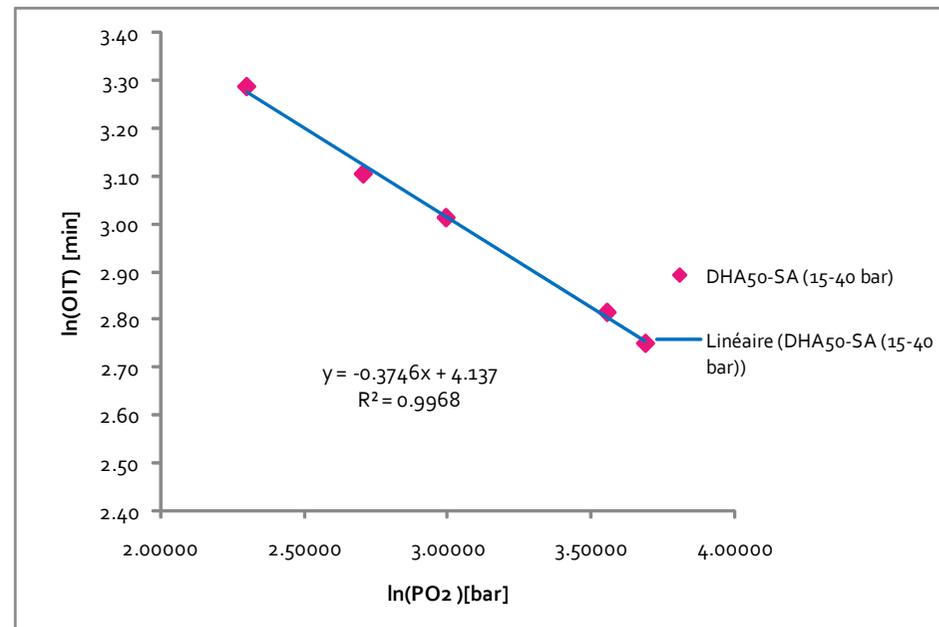
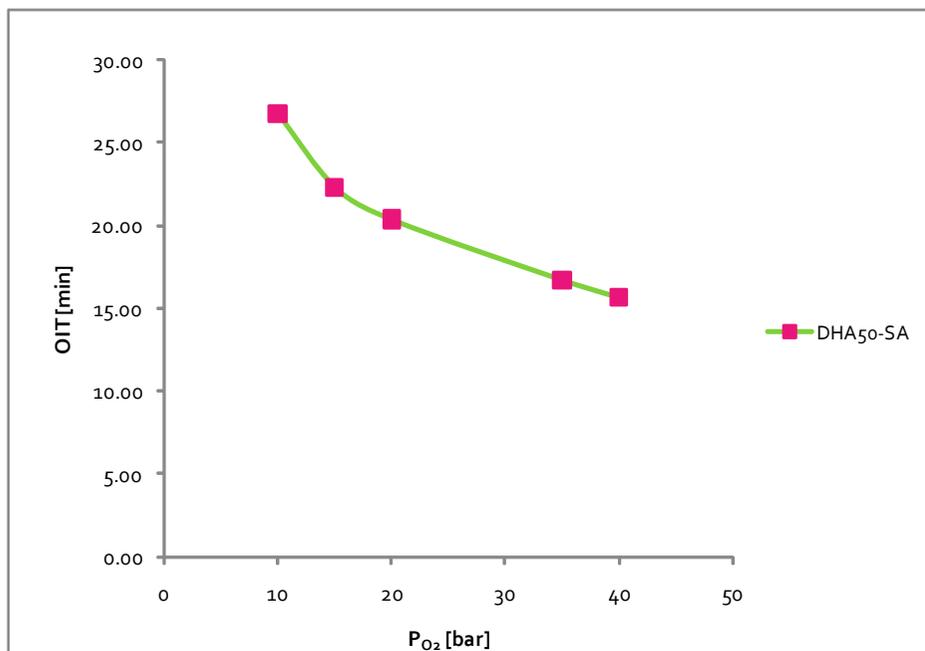
4.2.1 Répétabilité des mesures

Essais	Masse [mg]	T[K]	t [min]
1	4.908	373.15	3.88
2	4.826		3.86
3	4.845		3.78
4	4.892		3.52
5	4.857		3.53
6	4.840		3.69
Moyenne			3.710
Ecart-type			0.158
CV [%]			4.27



4.2.2 Influence de la pression sur l'OIT

Huile DHA50-SA (BATCH 0000339954)						
T = 90°C - Isotherme						
Flux d'oxygène = 100 ml/min						
	masse [mg]	P _{O2} [bar]	OIT [min]	OIT moyen [min]	ln(OIT)	ln(P _{O2})
Essai 1	4.703	40	15.46	15.66	2.75	3.68888
Essai 2	4.998		15.86			
Essai 1	4.738	35	16.69	16.71	2.82	3.55535
Essai 2	4.936		16.72			
Essai 1	4.67	20	20.37	20.36	3.01	2.99573
Essai 2	4.68		20.34			
Essai 1	4.897	15	21.74	22.30	3.10	2.70805
Essai 2	4.714		22.86			
Essai 1	4.769	10	26.3	26.75	3.29	2.30259
Essai 2	4.892		27.2			



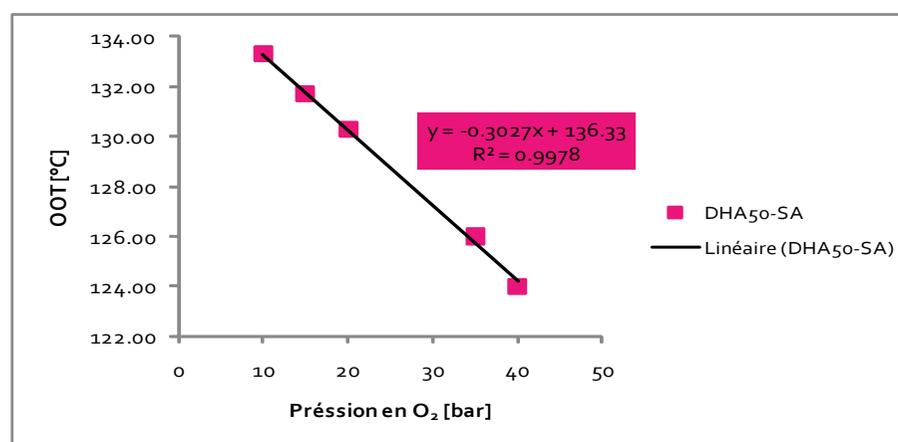
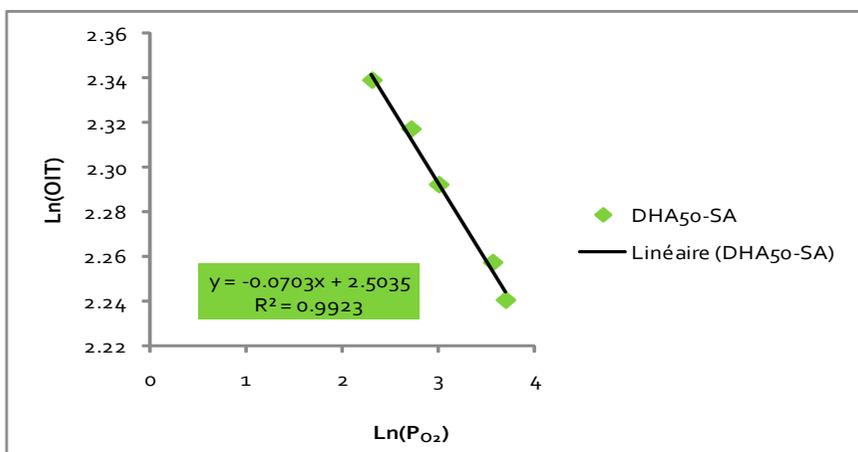
4.2.3 Influence de la pression sur l'OOT

Influence de la pression en oxygène sur l'OOT (Dynamique) DHA50-SA
Huile DHA50-SA (BATCH 0000339954)
Flux d'oxygene 100 ml/min

Essai	Masse [mg]	Pression en O ₂ [bar]	OOT [°C]	OOT moyen [°C]	OIT [min]	OIT moyen [min]
Essai 1	4.748	40	123.45	124.00	9.33	9.40
Essai 2	4.642		124.54		9.46	
Essai 1	4.750	35	126.31	126.01	9.52	9.56
Essai 2	5.005		125.71		9.59	
Essai 1	4.949	20	129.84	130.3	9.85	9.90
Essai 2	4.706		130.76		9.94	
Essai 1	4.756	15	131.62	131.7	10.15	10.15
Essai 2	4.985		131.78		10.14	
Essai 1	4.731	10	133.90	133.31	10.34	10.37
Essai 2	4.955		132.72		10.40	

Pression en O ₂ [bar]	OOT [°C]	Variation
40	124.00	9.315
35	126.01	7.3
20	130.3	3.01
15	131.7	1.61
10	133.31	0

DHA50-SA					
P _{O2} [bar]	OOT [°C]	ln(p)	1/T [K]	OIT [min]	Ln(OIT)
40	124	3.68887945	0.00251794	9.40	2.24
35	126.01	3.55534806	0.002505261	9.56	2.26
20	130.3	2.99573227	0.002478622	9.90	2.29
15	131.7	2.7080502	0.002470051	10.15	2.32
10	133.31	2.30258509	0.002460267	10.37	2.34



4.2.4 Analyse cinétique I

Huile de poisson sans antioxidant DHA 70%

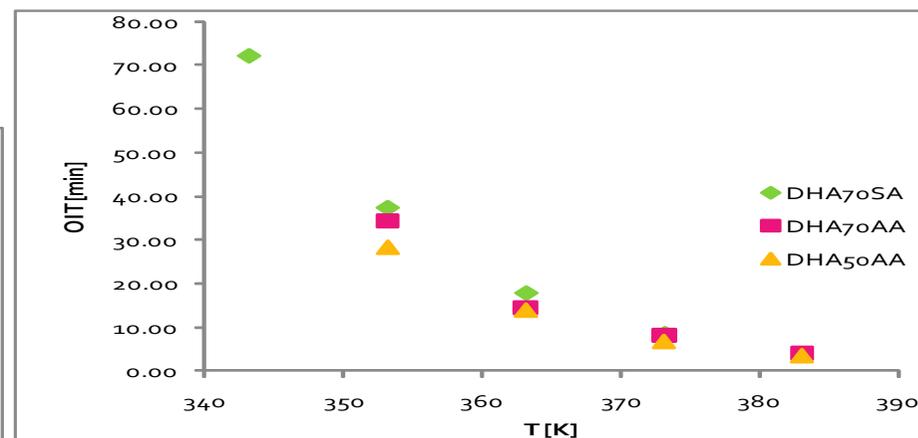
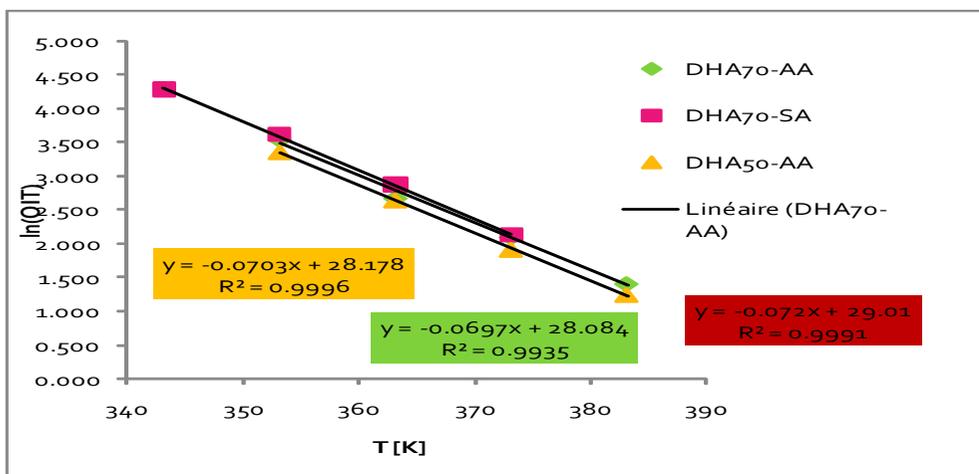
	T[K]	t [min]	t _{moyen} [min]	k	ln(t)	ln(1/t)	1/T	T[°C]	ln(k/T)
Essai 1	343.15	72	72.15	0.014	4.279	-4.28	0.00291	70	-10.117
Essai 2		72.3							
Essai 1	353.15	37.20	37.30	0.027	3.619	-3.62	0.00283	80	-9.486
Essai 2		37.40							
Essai 1	363.15	17.55	17.72	0.056	2.875	-2.87	0.00275	90	-8.770
Essai 2		17.89							
Essai 1	373.15	8.45	8.39	0.119	2.127	-2.13	0.00268	100	-8.049
Essai 2		8.33							

Parametres	DHA70-SA	DHA70-AA	DHA50-AA
$\ln(k) = a(1/T) + b$			
a	-9208	-9438.1	9516.2
b	22.51	23.231	23.59
R ²	0.997	0.997	0.999
A [h ⁻¹] x 10 ¹⁰	0.5	1.23	1.76
Ea	76.56	78.47	79.12

	Ea [KJ/mol]	A	ΔH [#] [kJ/mol]	ΔS [#] [J/K mol]
DHA70-SA	76.56	5.97E+09	73.59	-67.60
DHA70-AA	78.47	1.23E+10	75.42	-62.52
DHA50-AA	79.12	1.76E+10	76.07	-58.87

kB	1.38E-23	J/K
h	6.62608E-34	Js
ln(kB/h)	23.76	

$\ln(k/T) = a(1/T) + b$			
a	-8850.3	-9070.4	9148.5
b	15.63	16.24	16.68
R ²	0.997	0.995	0.999
ΔH [#] [KJ/mol]	73.59	75.42	76.07
ΔS [#] [J/mol K]	-67.60	-62.52	-58.87



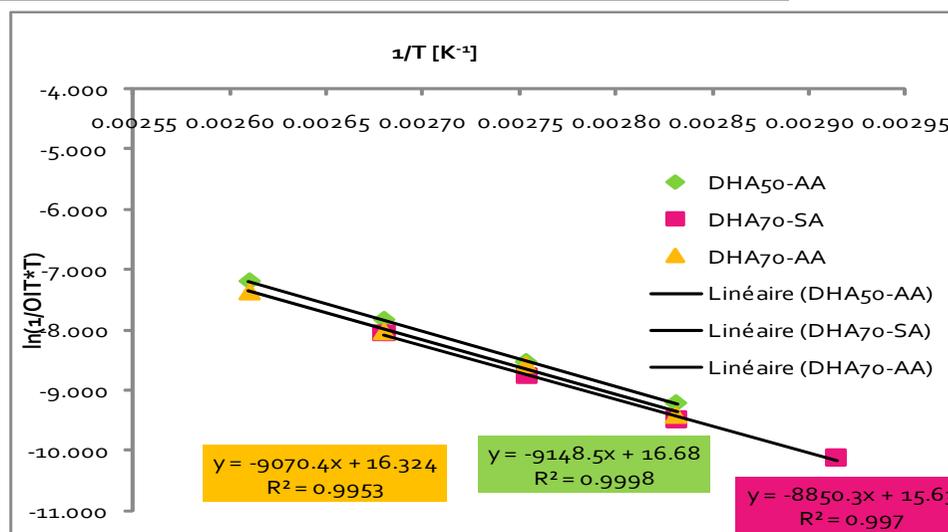
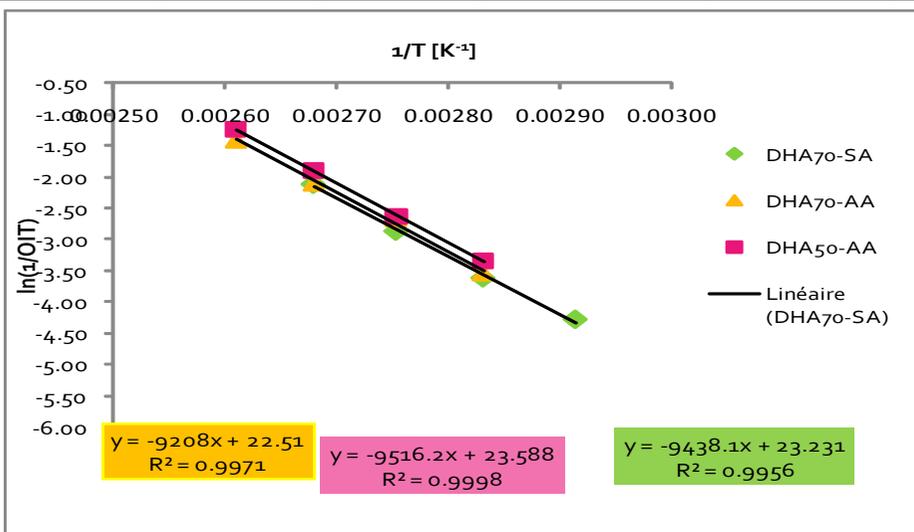
4.2.5 Analyse cinétique II

Huile de poisson avec antioxidant DHA 70%

	T[K]	t [min]	t _{moyen} [min]	k	ln(t)	ln(1/t)	1/T	T[°C]	ln(k/T)
Essai 1	353.15	34.2	34.42	0.029	3.538	-3.54	0.00283	80	-9.405
Essai 2		34.63							
Essai 1	363.15	14.95	14.48	0.069	2.672	-2.67	0.00275	90	-8.567
Essai 2		14.00							
Essai 1	373.15	8.24	8.15	0.123	2.097	-2.10	0.00268	100	-8.019
Essai 2		8.05							
Essai 1	383.15	4.2	4.09	0.245	1.407	-1.41	0.00261	110	-7.356
Essai 2		3.97							

Huile de poisson avec antioxidant DHA 50%

	T[K]	t [min]	t _{moyen} [min]	k	ln(t)	ln(1/t)	1/T	T[°C]	ln(k/T)
Essai 1	353.15	28.45	28.45	0.035	3.348	-3.35	0.00283	80	-9.215
Essai 2		28.44							
Essai 1	363.15	13.18	13.96	0.072	2.636	-2.64	0.00275	90	-8.531
Essai 2		14.73							
Essai 1	373.15	6.54	6.75	0.148	1.910	-1.91	0.00268	100	-7.832
Essai 2		6.96							
Essai 1	383.15	3.57	3.48	0.288	1.246	-1.25	0.00261	110	-7.194
Essai 2		3.38							



4.2.6 Résumé des OOT des huiles étudiées

	Onset Oxydation Temperature - OOT [°C]				
	Essai 1	Essai 2	moyenne	Ecart-Type	RSD [%]
Huile de poisson DHA 70% Sans Antioxydant	121.47	122.21	122	0.52	0.43
Huile de poisson DHA 70% Avec Antioxydant	133.94	134.93	134	0.70	0.52
Huile de poisson DHA 50% Sans Antioxydant	125.57	125.22	125	0.25	0.20
Incromega DHA 500TG SR, SF05245 Batch 0000339954	126.31	125.71	126	0.42	0.34
Algatrium DHA 70 050429-FO	117.15	116.78	116.965	0.26	0.22
Omevital 10/50 TG Ultra 978657 Batch - 82271909	137.69	137.51	137.6	0.13	0.09

4.2.7 Effet de la teneur en antioxydant sur l'OOT

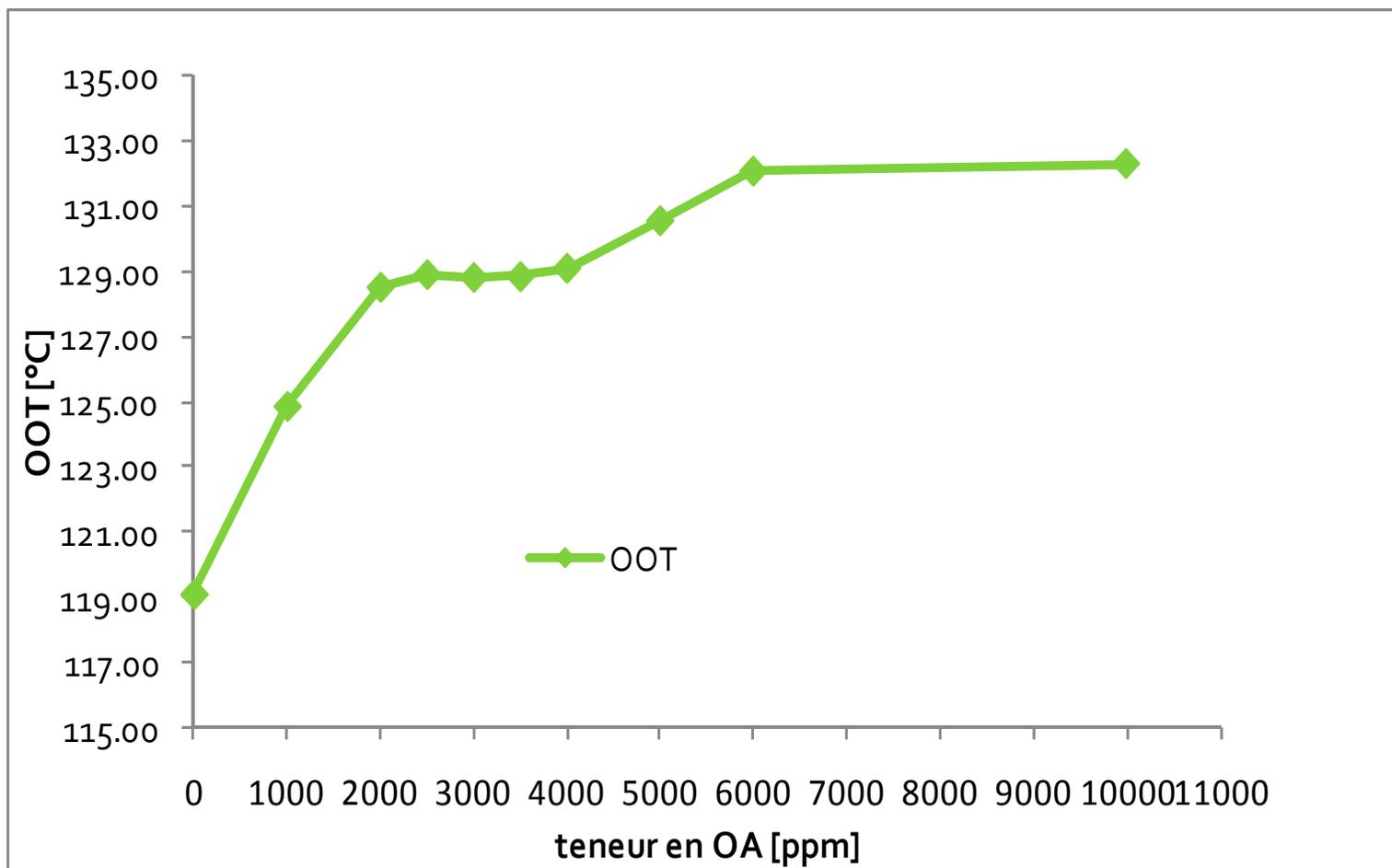
Analyse des OOT en fonction du pourcentage d'antioxydant MCC micro capsule concepts - 11.05.09 (vielle huile)							
teneur (ppm)	masse [mg]	Essais	OOT [°C]	OOT moyen [°C]	OIT [min]	OIT moyen [min]	variation de température (DHA70-SA et DHA70-AA)
0	4.820	Essai 1	118.60	119.13	8.83	8.89	0.00
	4.953	Essai 2	119.65		8.94		
1000	4.779	Essai 1	125.26	124.87	9.48	9.45	5.75
	4.746	Essai 2	124.48		9.41		
2000	4.763	Essai 1	128.14	128.51	9.79	9.82	9.38
	4.863	Essai 2	128.88		9.85		
2500	4.800	Essai 1	128.87	128.90	9.84	9.85	9.77
	4.616	Essai 2	128.92		9.85		
3000	4.817	Essai 1	129.10	128.81	9.86	9.84	9.69
	4.973	Essai 2	128.52		9.81		
3500	4.754	Essai 1	129.38	128.84	9.91	9.92	9.71
	4.882	Essai 2	128.29		9.92		
4000	4.809	Essai 1	129.72	129.09	9.95	9.89	9.97
	4.791	Essai 2	128.46		9.83		
5000	4.732	Essai 1	130.24	130.55	10.06	10.06	11.42
	4.826	Essai 2	130.85		10.06		
6000	4.708	Essai 1	132.72	132.06	10.12	10.18	12.94
	4.787	Essai 2	131.40		10.24		
10000	4.830	Essai 1	132.09	132.29	10.15	10.18	13.17
	4.971	Essai 2	132.49		10.21		
DHA70-SA	4.82	Essai 1	118.6	119.125			
	4.953	Essai 2	119.65				
TOCOPHEROLS	5.354	Essai 1	240.52	240.755			
	5.466	Essai 2	240.99				

Sous-dosage

Dosage acceptable sur le marché

Surdosage --> Effet de pro-oxydant

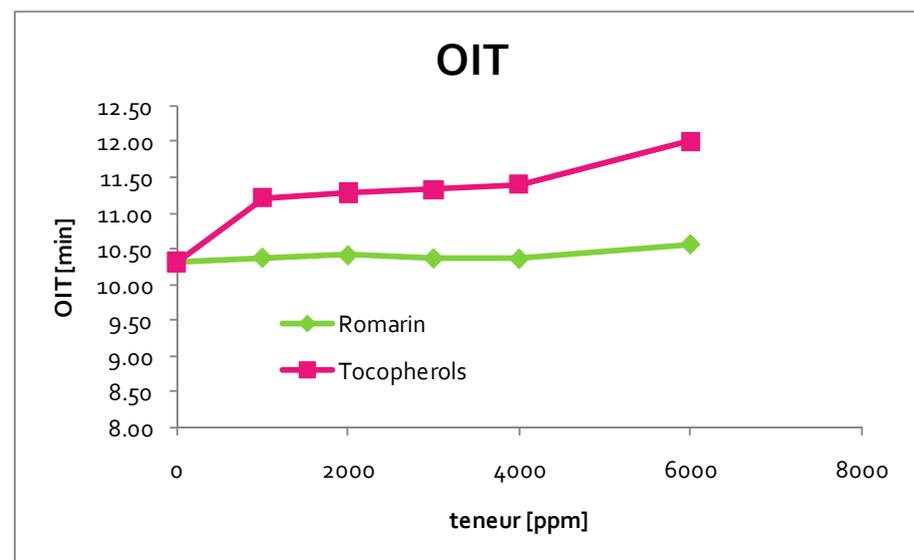
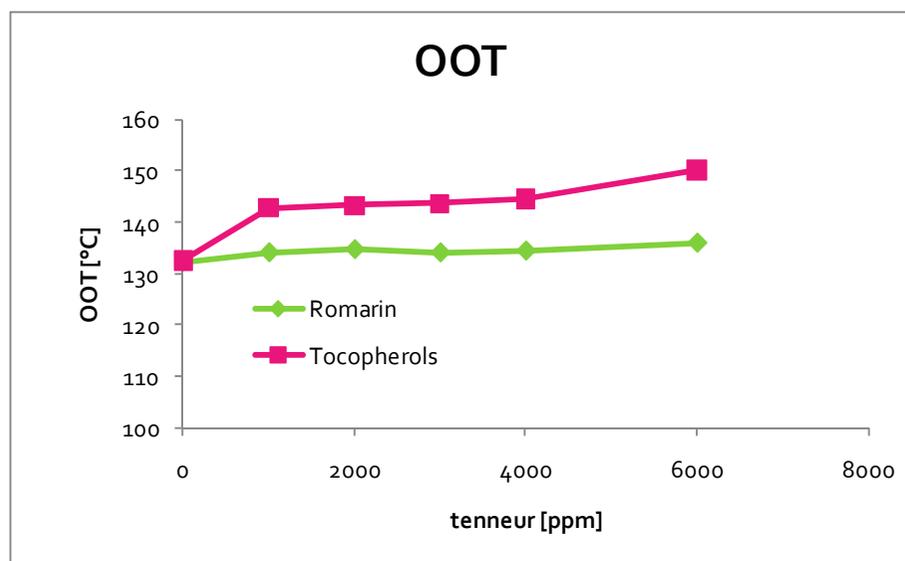
4.2.8 Effet de la teneur en antioxydant sur l'OOT (Graphique)



4.2.9 Effets comparés du mélange de tocophérols et des extraits de romarin

Tocopherols						
tenneur (ppm)	masse [mg]	Essais	OOT [°C]	OOT moyen [°C]	OIT [min]	OIT moyen [min]
0	4.772	Essai 1	132.32	132.48	10.37	10.32
	4.976	Essai 2	132.48		10.26	
1000	4.893	Essai 1	142.69	142.79	11.21	11.22
	4.855	Essai 2	142.89		11.22	
2000	4.885	Essai 1	143.23	143.20	11.29	11.29
	4.873	Essai 2	143.17		11.28	
3000	4.808	Essai 1	143.81	143.68	11.34	11.33
	4.825	Essai 2	143.54		11.32	
4000	4.752	Essai 1	145.10	144.57	11.45	11.41
	4.816	Essai 2	144.03		11.36	
6000	4.853	Essai 1	149.64	150.07	11.89	12.01
	4.876	Essai 2	150.49		12.12	

Romarin						
tenneur (ppm)	masse [mg]	Essais	OOT [°C]	OOT moyen [°C]	OIT [min]	OIT moyen [min]
0	4.772	Essai 1	132.32	132.40	10.37	10.32
	4.976	Essai 2	132.48		10.26	
1000	4.560	Essai 1	134.02	134.12	10.37	10.38
	4.847	Essai 2	134.21		10.39	
2000	4.689	Essai 1	134.62	134.49	10.43	10.42
	4.933	Essai 2	134.35		10.40	
3000	4.901	Essai 1	134.01	134.15	10.36	10.37
	4.878	Essai 2	134.29		10.38	
4000	4.835	Essai 1	134.35	134.32	10.37	10.37
	4.913	Essai 2	134.29		10.36	
6000	4.793	Essai 1	135.87	136.07	10.54	10.57
	4.774	Essai 2	136.27		10.59	



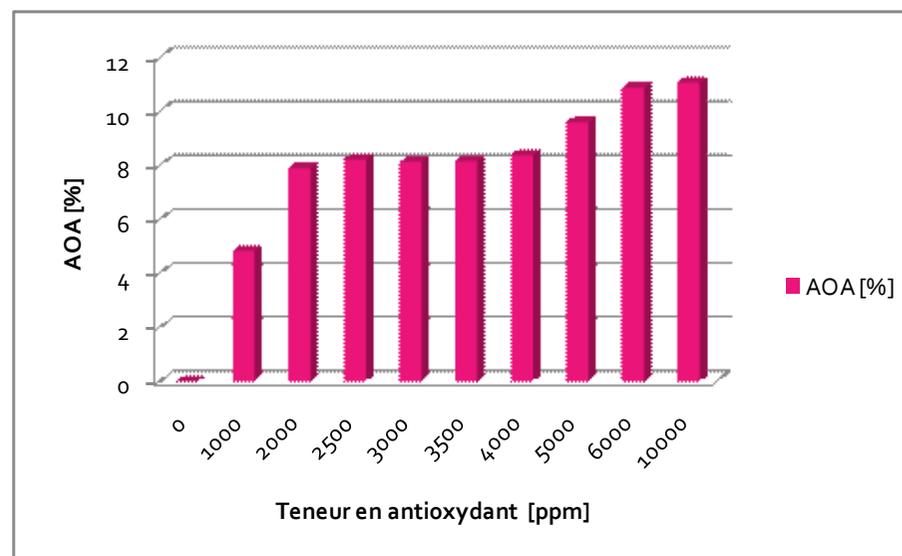
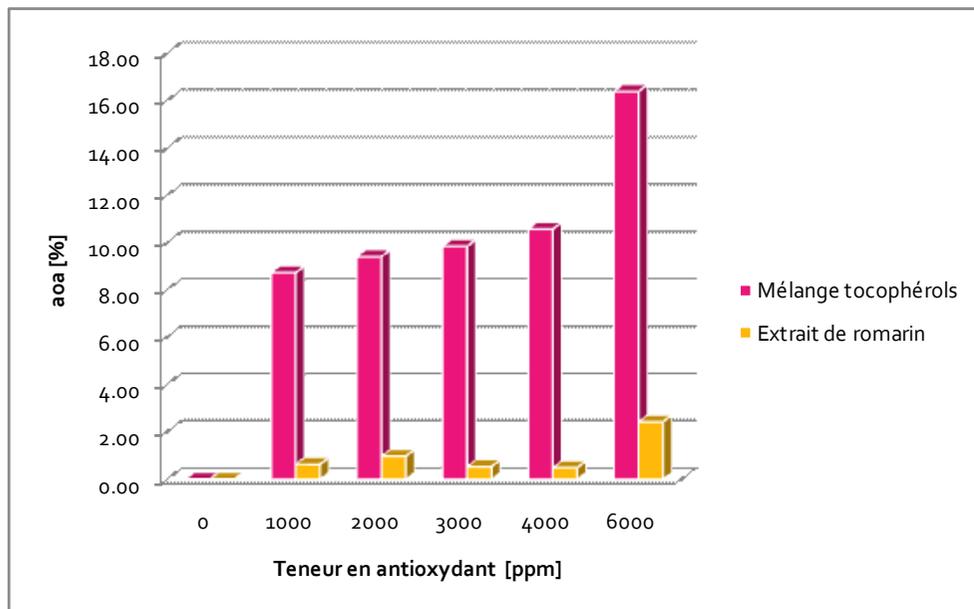
4.2.10 Activité des antioxydants sur l'OIT (DHA 50-SA et DHA70-SA)

ACTIVITE DES ANTIOXYDANTS Sur l'OIT (DHA 50-SA)

	Mélange tocophérols		Extrait de romarin	
tenneur (ppm)	OIT moyen [min]	AOA [%]	OIT moyen [min]	AOA [%]
0	10.32	0.00	10.32	0.00
1000	11.22	8.73	10.38	0.63
2000	11.29	9.40	10.42	0.97
3000	11.33	9.84	10.37	0.53
4000	11.41	10.57	10.37	0.48
6000	12.01	16.38	10.57	2.42

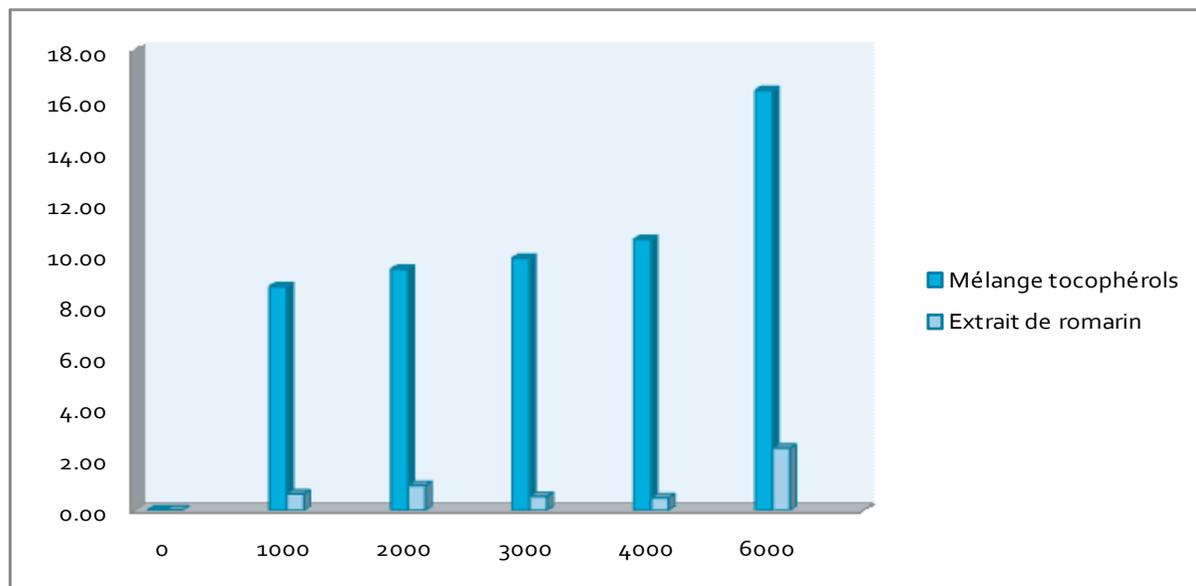
Activité de l'antioxydant sur l'OIT (DHA70-SA)

tenneur (ppm)	OIT moyen [°C]	AOA [%]
0	119.125	0
1000	124.87	4.82
2000	128.51	7.88
2500	128.895	8.20
3000	128.81	8.13
3500	128.835	8.15
4000	129.09	8.37
5000	130.545	9.59
6000	132.06	10.86
10000	132.29	11.05



4.2.11 Comparaison des activités antioxydatives des extraits de romarin et du mélange de tocophérols

teneur (ppm)	Mélange tocophérols		Extrait de romarin	
	OIT moyen [min]	AOA [%]	T moyen [mi]	AOA [%]
0	10.32	0.00	10.32	0.00
1000	11.22	8.73	10.38	0.63
2000	11.29	9.40	10.42	0.97
3000	11.33	9.84	10.37	0.53
4000	11.41	10.57	10.37	0.48
6000	12.01	16.38	10.57	2.42



4.2.12 OOT & OIT des huiles émulsionnées

OOT & OIT programmation de température - Huiles émulsionnées

Préparation pour l'émulsion: 701.8 g (Huile Croda - SF05245) + 350.9 g (H₂O distillée) + 6 g (Emulsifiant - PGPR) soit (2/3 + 1/3+ 0.5%) --- Pour l'émulsion sous pression

Et 100.28 g (Huile Croda - SF05245) + 50.13 g (H₂O distillée) + 0.86 g (Emulsifiant - PGPR) --- Pour l'émulsion Ultrason

Emulsion sous pression			
Echantillons	temps [s]	Pression [bar]	Rémarques
1	20	250	Tous les échantillons étaient chauds à la sortie
2	60		
3	120		
4	1 passage	400	

Emulsion sous ultrason			
Echantillons	Temps [s]	Pulse [%]	Rémarques
A	60	63	Tous les échantillons étaient à température ambiante. 4°C
B	120	63	

	masse [mg]	OOT [°C]	OOTmoyen [°C]	OIT [min]	OITmoyen [min]
1	4.838	134.38	134.32	10.39	10.40
	4.872	134.26		10.41	
2	4.782	126.00	125.88	9.60	9.61
	4.878	125.88		9.61	
3	4.840	125.39	125.635	9.55	9.60
	4.859	125.88		9.60	
4	4.871	123.50	123.71	9.37	9.39
	4.821	123.92		9.41	

	masse [mg]	OOT [°C]	OOTmoyen [°C]	OIT [min]	OITmoyen [min]
A	4.992	129.18	129.505	9.92	9.955
	4.842	129.83		9.99	
B	4.974	129.92	129.305	9.96	9.915
	4.830	128.69		9.87	

Huile DHA 50% -SA non emulsifiée - INCROMEGA DHA 500TG SR					
	masse [mg]	OOT [°C]	OOT moyen [°C]	OIT [min]	OITmoyen [min]
Essai 1	4.890	134.12	134.645	10.34	10.40
Essai 2	4.710	135.17		10.46	

	Echantillon A	Echantillon 2	Echantillon B	Echantillon 3
Temps [s]	60		120	
OOTmoyen [°C]	129.505	125.88	129.305	125.635
OITmoyen [min]	9.955	9.605	9.915	9.6

On constate que la méthode d'émulsion à Ultrason provoque moins de dégats que celle sous haute pression. Pour une bonne émulsion, il faut que les gouttellettes soient de même taille. Et la viscosité de l'huile joue également un grand rôle.

4.2.13 Appareillages et propriétés des émulsions

Matériel:

de l'eau distillée

Huile Croda - SF05245

L'émulsifiant est le Polyglycérol Polyricinoleate (PGPR), E476

Appareil:

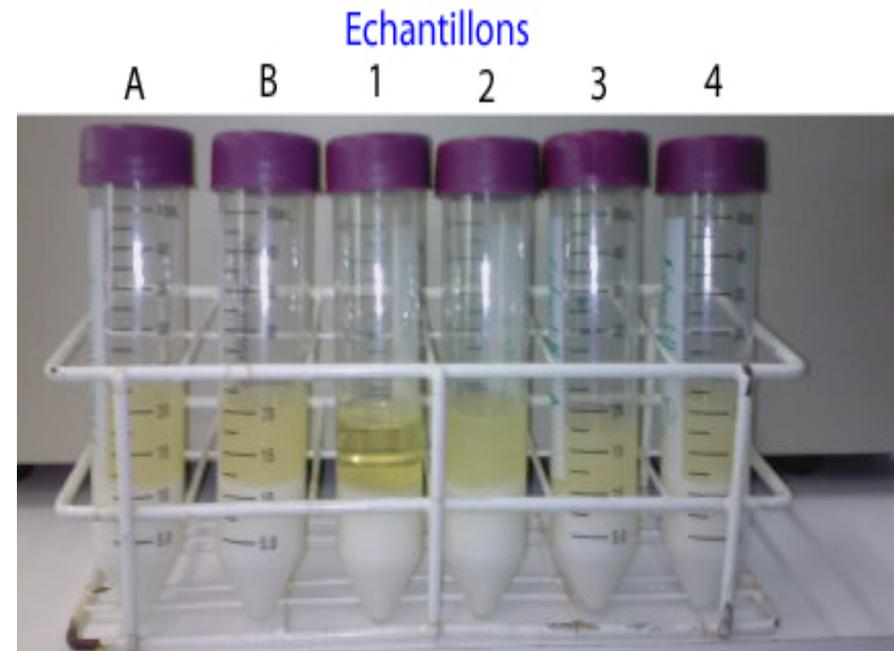
- Sous Pression

. Homogénéisateur Lap-APB

-Ultrason

. Vibracell 750 W

Après conservation d'une journée, il y'a une formation de double couche.



4.2.14 Effet de l'oxygène dissous sur la stabilité des huiles de poisson

METHODE DYNAMIQUE Sans pression (creusets fermés)

Echantillon	Masse [mg]	OOT [°C]	OOT _{moyen} [°C]	OOT-Ecart-type	OIT [min]	OIT _{moyen} [min]	Variation de stabilité [°C]
FishOil 70% DHA Standard	4.734	122.57	122.30	0.39	9.27	9.24	-
	4.755	122.02			9.21		
FishOil 70% DHA Ultrason et barboté Azote	4.750	132.75	132.29	0.66	10.28	10.24	9.99
	4.787	131.82			10.19		
FishOil 70% DHA barboté Azote	4.822	132.85	132.31	0.76	10.29	10.24	10.02
	4.766	131.77			10.19		

METHODE DYNAMIQUE sous pression (P= 35 bar, Flow Oxygène =100ml/min) (Creusets ouverts)

Echantillon	Masse [mg]	OOT [°C]	OOT _{moyen} [°C]	OOT-Ecart-type	OIT [min]	OIT _{moyen} [min]	Variation de stabilité [°C]
FishOil 70% DHA Standard	4.709	136.78	136.47	0.45	10.67	10.64	-
	4.904	136.15			10.61		
FishOil 70% DHA barboté Azote	4.851	137.02	137.48	0.65	10.69	10.74	1.02
	4.755	137.94			10.78		

METHODE DYNAMIQUE Sans pression (Creusets ouverts)

Echantillon	Masse [mg]	OOT [°C]	OOT _{moyen} [°C]	OOT-Ecart-type	OIT [min]	OIT _{moyen} [min]	Variation de stabilité [°C]
FishOil 70% DHA Standard	4.854	132.23	132.73	0.71	10.23	10.28	-
	4.794	133.23			10.33		
FishOil 70% DHA barboté Azote	4.794	133.49	133.59	0.14	10.36	10.37	0.86
	4.730	133.69			10.37		

4.2.15 Influence de : l'atmosphère de séchage – la présence de silice ou non – du lavage ou non

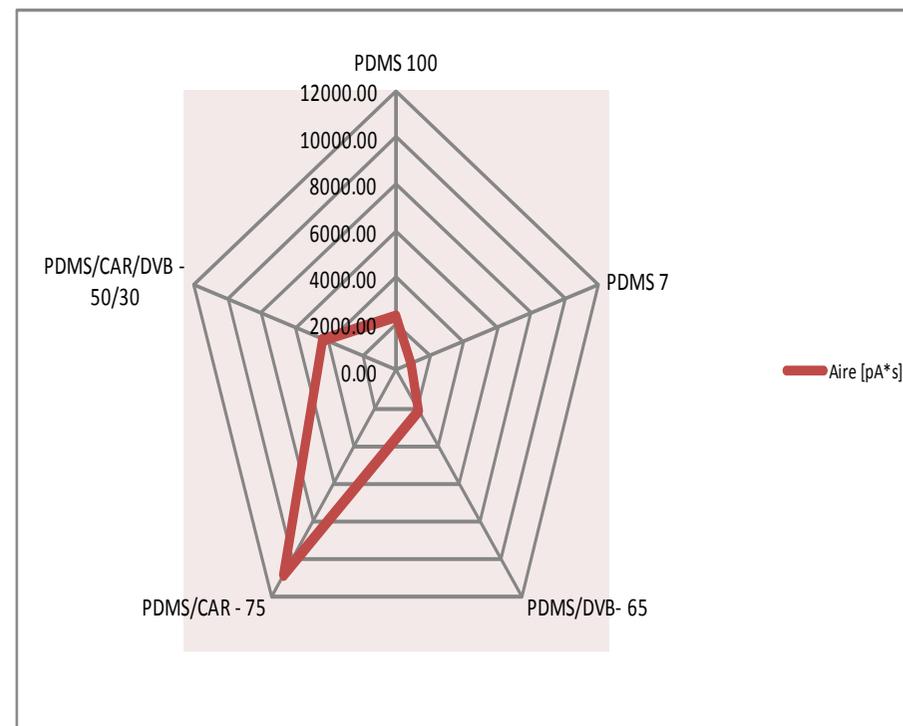
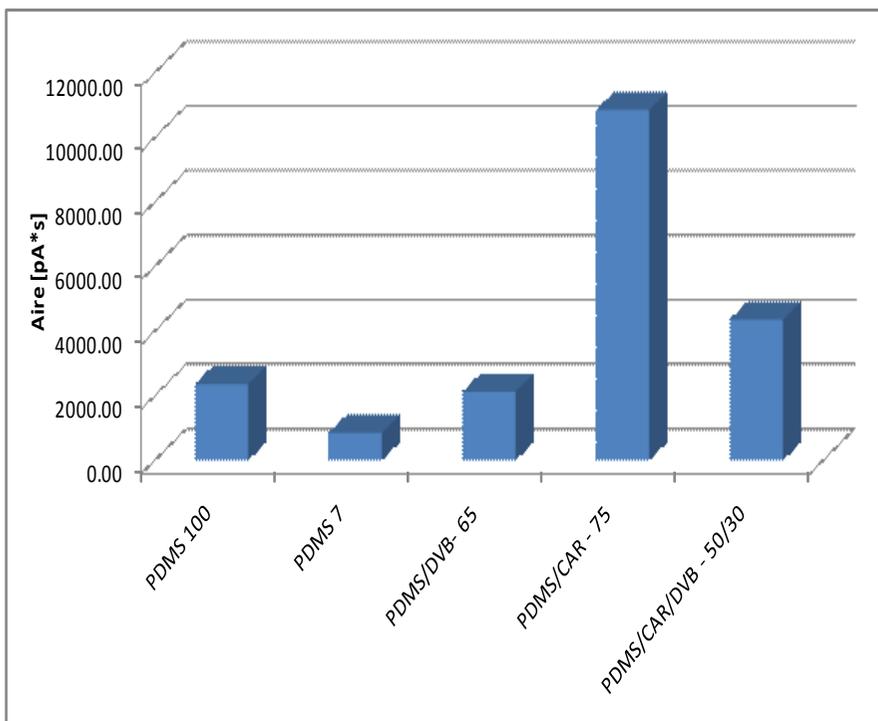
METHODE DYNAMIQUE (P= 35 bar, Flow Oxygène =100ml/min)							
Echantillon	Masse [mg]	OOT [°C]	OOT _{moyen} [°C]	OOT-Ecart-type	OIT [min]	OIT _{moyen} [min]	Variation de stabilité [°C]
Incromega 500	4.844	130.23	132.09	2.63	10.01	10.20	Référence
	4.902	133.95			10.38		
Alginate liquide 2%	5.148	184.78	184.63	0.22	15.47	15.58	
	5.043	184.47			15.68		
Alginate poudre	5.940	239.71	239.71	1.35	20.71	20.79	-
	5.194	241.62			20.86		
Microcapsules lavées	Sans silice	5.127	112.78	112.52	0.37	8.28	19.57
		5.521	112.26			8.22	
	Avec silice	4.870	116.25	116.03	0.32	8.62	16.07
		5.200	115.80			8.55	
Microcapsules Non lavées	Sans silice	5.389	112.18	112.55	0.52	8.24	19.54
		5.478	112.92			8.32	
	Avec silice	5.890	113.79	113.77	0.03	8.21	18.32
		5.900	113.75			8.41	
Microcapsules lavées	Sans silice	5.360	111.26	111.41	0.21	8.13	20.69
		5.235	111.55			8.16	
	Avec silice	5.854	115.01	115.40	0.55	8.50	16.69
		5.786	115.79			8.58	
Microcapsules lavées	Sans silice	5.200	96.30	97.15	1.20	6.63	34.95
		4.873	97.99			6.77	
	Avec silice	4.890	99.67	101.23	2.20	6.96	30.87
		5.210	102.78			7.28	
Microcapsules Non lavées	Sans silice	5.450	115.78	115.40	0.54	8.55	16.70
		5.995	115.01			8.61	

4.3 ANNEXES SPME-GC

4.3.1 Choix de la fibre adaptée à l'absorption des volatils totaux

	Aire [pA*s]				
	1	2	3	4	5
	PDMS 100	PDMS 7	PDMS/DVB- 65	PDMS/CAR - 75	PDMS/CAR/DVB - 50/30
essai 1	2434.4	998.59	2040.99	11094.00	4107.45
essai 2	2286.36	699.53	2211.41	10615.10	4611.11
Moyenne	2360.38	849.06	2126.20	10854.55	4359.28
Ecart-Type de la moyeene	74.02	149.53	85.21	239.45	251.83
Ecart-type	104.68	211.47	120.51	338.63	356.14
CV [%]	4.43	24.91	5.67	3.12	8.17

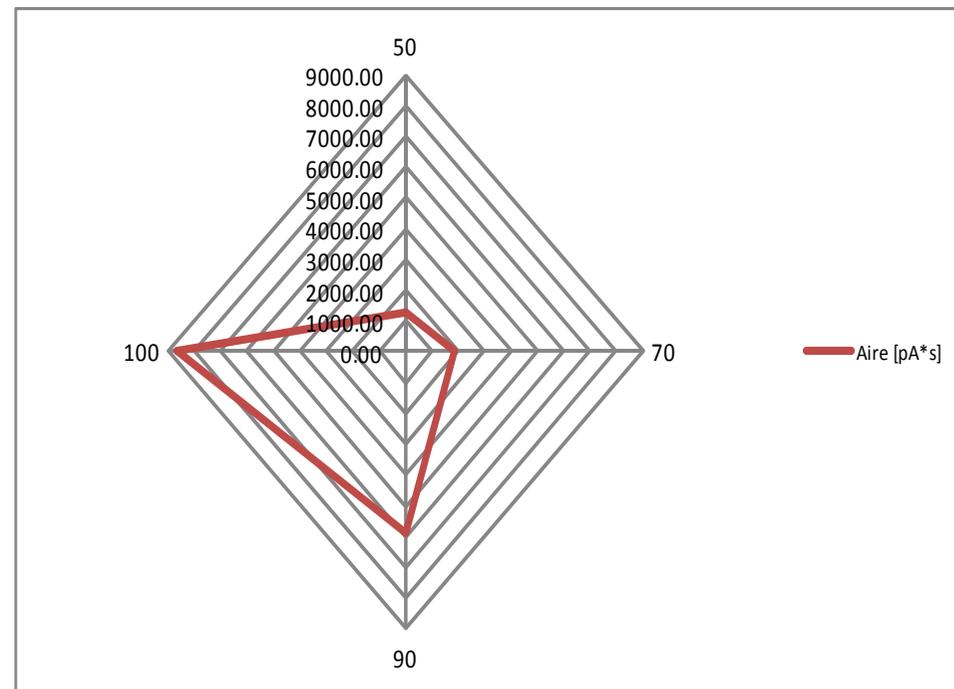
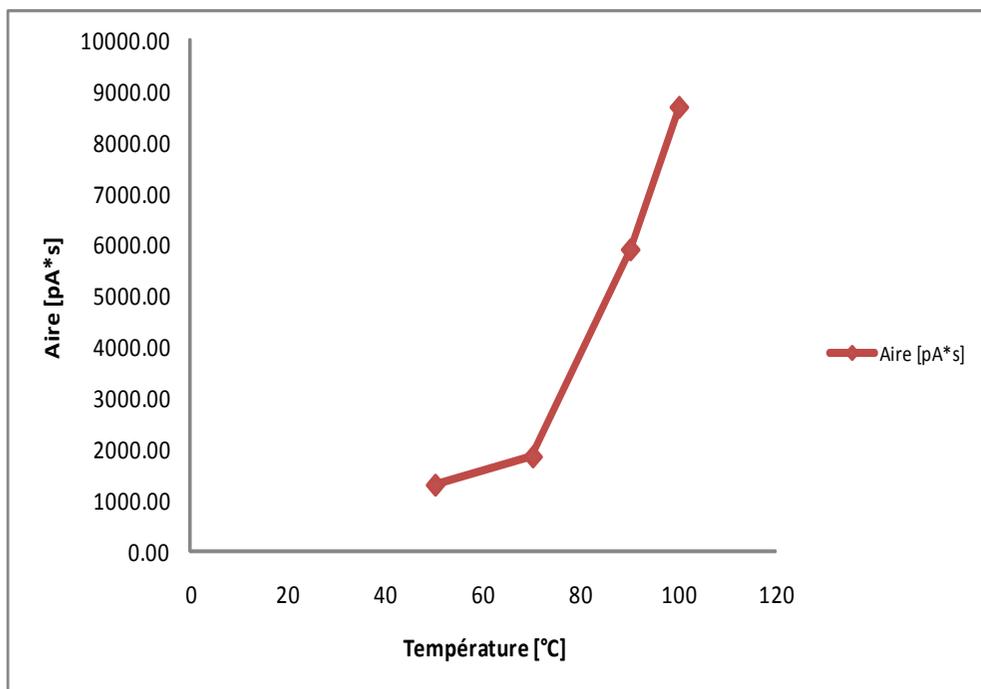
Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	300
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	300



4.3.2 Optimisation de la température d'incubation

Température [°C]	Aire [pA*s]					
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart-type	CV [%]
50	1366.44	1227.23	1320.56	1304.74	70.94	5.44
70	1820.92	1893.60	1853.62	1856.05	36.40	1.96
90	5796.63	6062.38	5826.54	5895.18	145.57	2.47
100	8383.03	9091.11	8545.78	8673.31	370.87	4.28

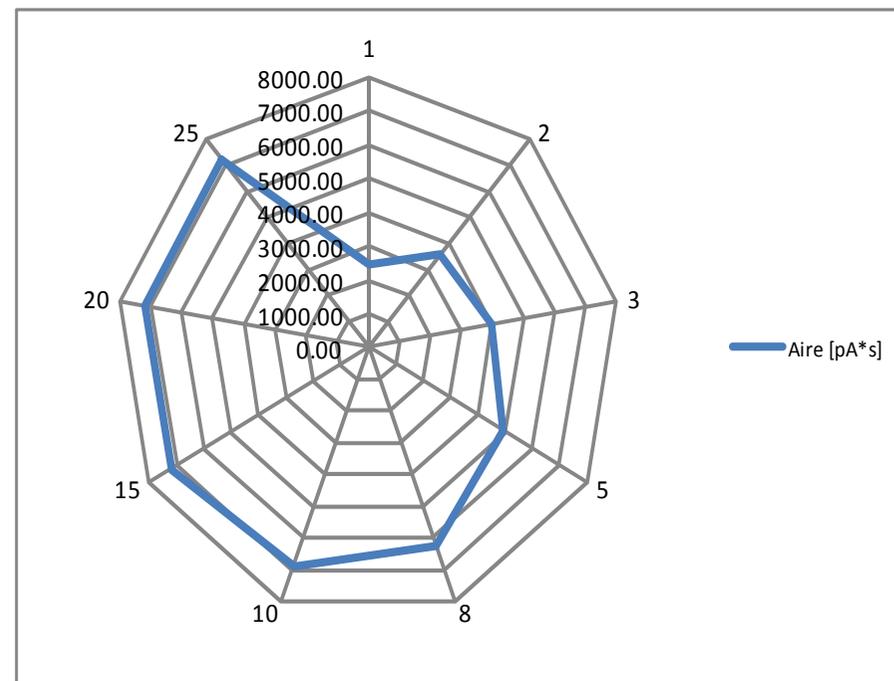
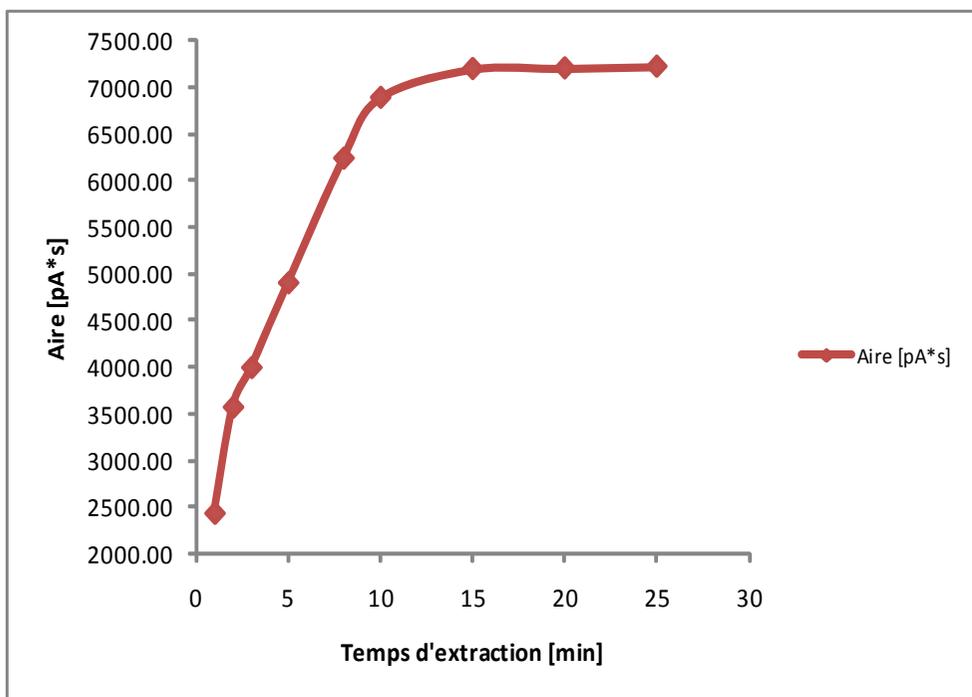
Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	300
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	300



4.3.3 Optimisation du temps d'extraction des volatils totaux

DHA50-SA	Aire [pA*s]					
Temps d'extraction [min]	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart-type	CV [%]
1	2437.22	2428.25	2430.13	2431.87	4.73	0.19
2	3341.19	3797.36	3567.34	3568.63	228.09	6.39
3	3955.71	4012.57	4008.23	3992.17	31.65	0.79
5	4878.27	4910.48	4911.1	4899.95	18.78	0.38
8	6141.86	6180.25	6378.98	6233.70	127.27	2.04
10	6818.03	6978.73	6856.98	6884.58	83.83	1.22
15	7209.67	7189.78	7178.9	7192.78	15.60	0.22
20	7218.91	7235.08	7145.05	7199.68	48.00	0.67
25	7201.13	7186.49	7267.33	7218.32	43.07	0.60

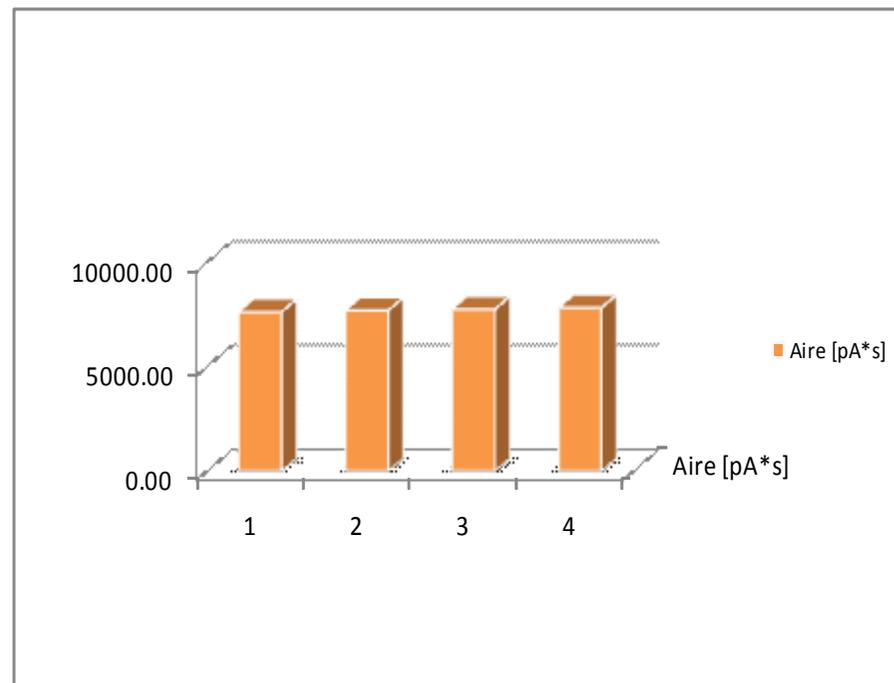
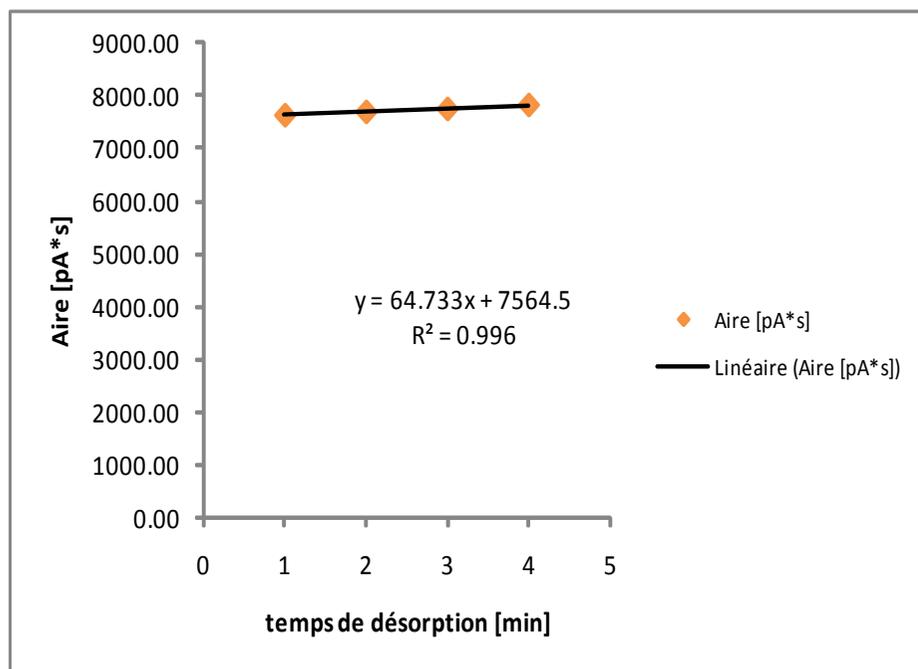
Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	variable
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	300



4.3.4 Optimisation du temps de désorption des volatils totaux

DHA50-SA		Aire [pA*s]				
Temps desorption [min]	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart-type	CV [%]
1	7586.80	7652.80	7654.34	7631.31	38.56	0.51
2	7686.31	7707.02	7690.7	7694.68	10.91	0.14
3	7732.87	7774.84	7745.98	7751.23	21.47	0.28
4	7831.98	7825.62	7827.12	7828.24	3.32	0.04

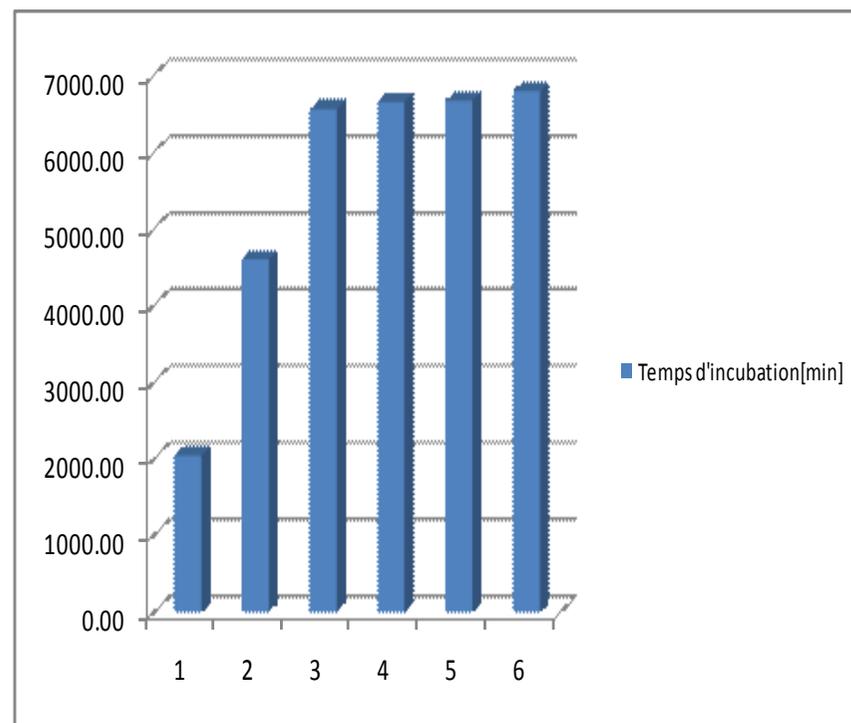
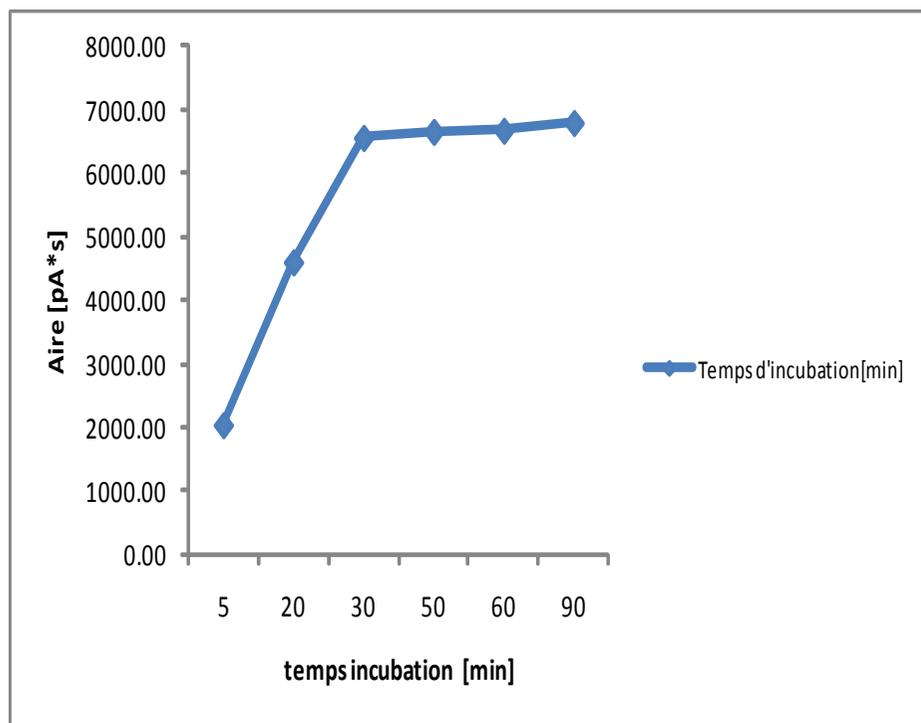
Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	300
Temps désorption [s]	variable
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	300



4.3.5 Optimisation du temps d'incubation

DHA50-SA	Aire [pA*s]					
Temps d'incubation [min]	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart-type	CV [%]
5	1950.22	2140.95	2034.23	2041.80	95.59	4.68
20	4530.13	4676.92	4598.40	4601.82	73.45	1.60
30	6572.83	6535.08	6565.90	6557.94	20.10	0.31
50	6656.64	6658.70	6645.37	6653.57	7.18	0.11
60	6685.03	6658.95	6667.80	6670.59	13.26	0.20
90	6698.55	6983.93	6695.41	6792.63	165.68	2.44

Temps incubation [s]	Variable
Temps extraction [s]	300
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	300
Température [°C]	90



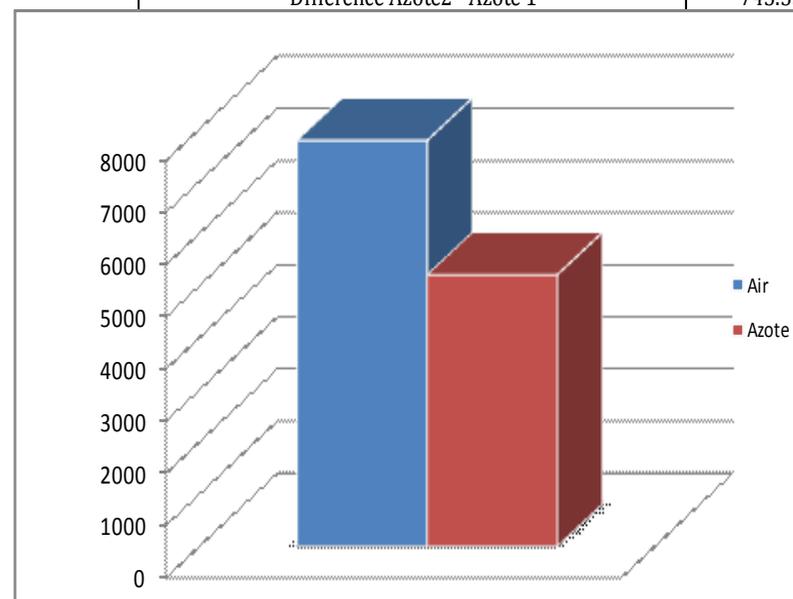
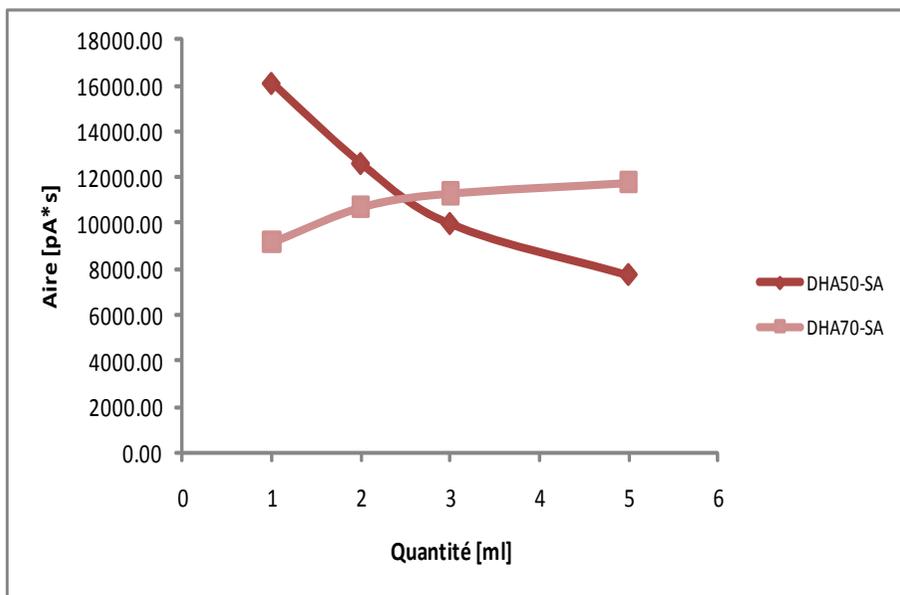
4.3.6 Influence de la quantité d'échantillon sur les volatils totaux

DHA50-SA		Aire [pA*s]				
Quantité [ml]	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart-Type	CV [%]
1	16191.30	16160.90	16020.45	16124.22	91.14	0.57
2	12640.80	12589.70	12590.70	12607.07	29.22	0.23
3	10044.50	9881.66	9998.10	9974.75	83.89	0.84
5	7797.08	7653.73	7756.82	7735.88	73.93	0.96

DHA70-SA		Aire [pA*s]				
Quantité [ml]	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart-Type	CV [%]
1	9000.73	9391.51	9106.50	9166.25	202.12	2.21
2	10725.00	10676.40	10711.63	10704.34	25.11	0.23
3	11248.40	11303.80	11367.92	11306.71	59.81	0.53
5	11730.00	11796.20	11767.34	11764.51	33.19	0.28

Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	300
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	variable
temps analyse [s]	300
Température [°C]	90

Type de gaz	Quantité [ml]	Aire [pA*s]		Moyenne	
		Essai 1	Essai 2		
Air	1	7567.8	7999.9	7783.85	Version 1
Azote	1	5280.63	5136.2	5208.415	
Air	1	7614.97	7594.73	7604.85	Version 2
Azote	1	5953.75		5953.75	
Différence Azote2 - Azote 1				745.335	

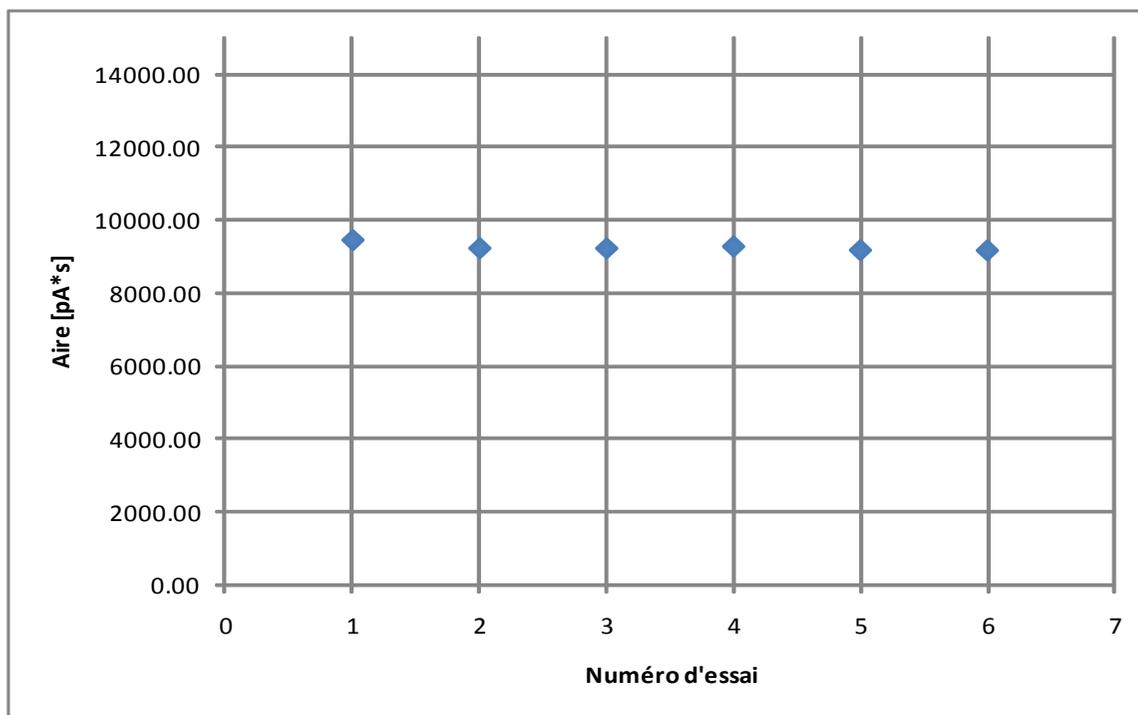


4.3.7 Répétabilité des mesures

DHA50-SA

N° Essai	Aire [pA*s]
1	9466.07
2	9248.67
3	9246.36
4	9297.59
5	9197.02
6	9190.50
Moyenne	9274.37
Ecart-type	101.74
coef de variation [%]	1.10

Temps incubation [s]	3600
Temps extraction [s]	300
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	900
Température [°C]	90



4.3.8 Influence de la quantité de tocophérols sur la volatilité totale

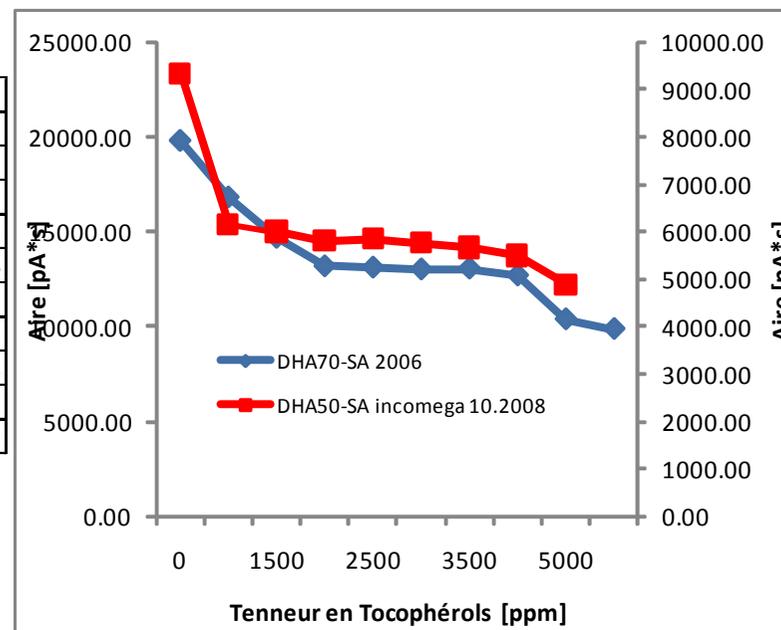
DHA70-SA 2006

Quantité [ppm]	Aire [pA*s]			Moyenne	Ecart-Type	CV [%]
	Essai 1	Essai 2	Essai 3			
0	19678.2	19864.2	19856.52	19799.64	105.24	0.53
1000	16831.2	16840.4	16780.7	16817.43	32.14	0.19
1500	15150.2	14405.5	14505.6	14687.10	404.17	2.75
2000	12940.7	13642.7	12987.65	13190.35	392.45	2.98
2500	13019.5	13177.1	13167	13121.20	88.22	0.67
3000	12974.2	13067.3	13023.98	13021.83	46.59	0.36
3500	13137.7	12973.4	13089.1	13066.73	84.40	0.65
4000	12675.8	12747.5	12698.09	12707.13	36.69	0.29
5000	10342.6	10466.6	10378.7	10395.97	63.78	0.61
6000	9615.92	10034.5	10007.22	9885.88	234.19	2.37

Temps incubation [s]	3600
Temps extraction [s]	900
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	900
Température [°C]	90

DHA50-SA inomega 10.2008

Quantité [ppm]	Aire [pA*s]			Moyenne	Ecart-Type	CV [%]
	Essai 1	Essai 2	Essai 3			
0	9466.07	9246.36	9334.79	9349.07	110.55	1.18
1000	6135.60	6192.62	6173.12	6167.11	28.98	0.47
1500	5970.45	6050.53	5998.24	6006.41	40.66	0.68
2000	5817.05	5821.10	5820.70	5819.62	2.23	0.04
2500	5887.96	5827.11	5845.63	5853.57	31.19	0.53
3000	5792.40	5756.20	5761.88	5770.16	19.47	0.34
3500	5666.40	5662.01	5669.15	5665.85	3.60	0.06
4000	5493.19	5541.84	5486.40	5507.14	30.24	0.55
6000	4873.49	4936.58	4883.76	4897.94	33.85	0.69



4.3.9 Influence de la quantité de romarin sur la volatilité totale

DHA70-SA enzymatic 2008 - Romarin

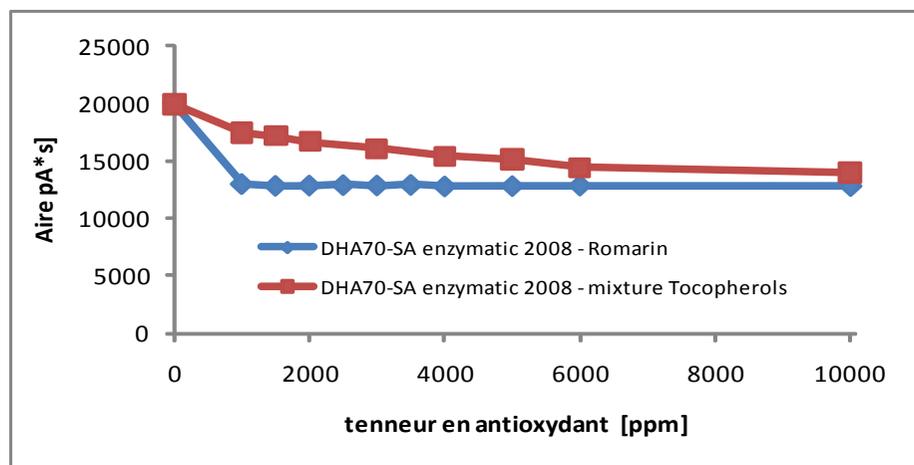
Quantité [ppm]	Aire [pA*s]			Ecart-Type
	Essai 1	Essai 2	Moyenne	
0	19914.80	19948.70	19931.75	23.97
1000	12940.83	13085.34	13013.09	102.18
1500	12850.29	12860.61	12855.45	7.30
2000	12905.71	12858.16	12881.94	33.62
2500	12902.16	12926.56	12914.36	17.25
3000	12862.75	12906.67	12884.71	31.06
3500	12930.46	12939.50	12934.98	6.39
4000	12762.86	12843.58	12803.22	57.08
5000	12780.86	12885.92	12833.39	74.29
6000	12861.19	12894.31	12877.75	23.42
10000	12802.05	12869.54	12835.80	47.72

DHA70-SA enzymatic 2008 - mixture Tocopherols

Quantité [ppm]	Aire [pA*s]			Ecart-Type
	Essai 1	Essai 2	Moyenne	
0	19914.80	19948.70	19931.75	23.97
1000	17681.20	17124.50	17402.85	393.65
1500	17244.90	17092.10	17168.50	108.05
2000	16920.60	16367.90	16644.25	390.82
3000	16232.30	15852.60	16042.45	268.49
4000	15500.40	15311.90	15406.15	133.29
5000	15181.30	15034.10	15107.70	104.09
6000	14402.8	14355.5	14379.15	33.45
10000	13895.6	13981.6	13938.60	60.81

Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	900
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	900
Température [°C]	90

Quantité [ppm]	Aire [pA*s]		Variation
	Mixture Tocophérols	Romarin	
0	19932	19932	0
1000	17403	13013	4390
1500	17169	12855	4313
2000	16644	12882	3762
3000	16042	12885	3158
4000	15406	12803	2603
5000	15108	12833	2274
6000	14379	12878	1501
10000	13939	12836	1103



4.3.10 Influence de la température sur la volatilité totale

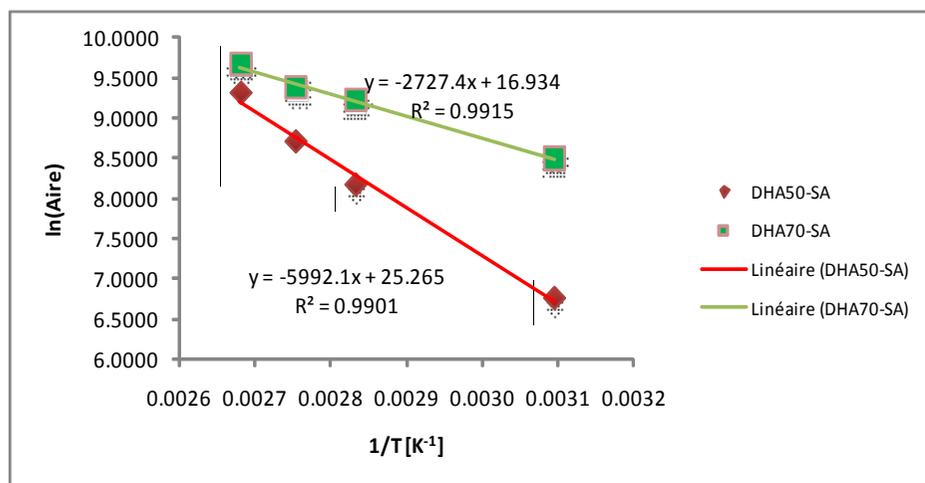
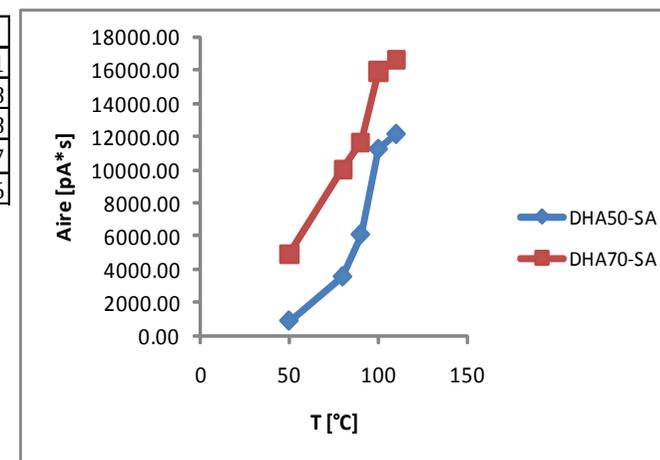
DHA50-SA

Température [°C]	Aire [pA*s]				Ecart-type	CV [%]	ln(Aire)	1/T
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne				
50	900.272	861.39	870.81	877.49	20.28	2.31	6.7771	0.0031
80	3532.50	3572.27	3538.16	3547.64	21.51	0.61	8.1740	0.0028
90	6091.15	6044.09	6134.80	6090.01	45.37	0.74	8.7144	0.0028
100	11402.70	11236.50	11090.90	11243.37	156.01	1.39	9.3275	0.0027
110	12157.20	12231.40	12071.00	12153.20	80.27	0.66	9.4053	0.0026

Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	900
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	1
temps analyse [s]	900
Température [°C]	variable
	Ea [Kj/mol]
DHA70-SA	22.6769946
DHA50-SA	49.8213754

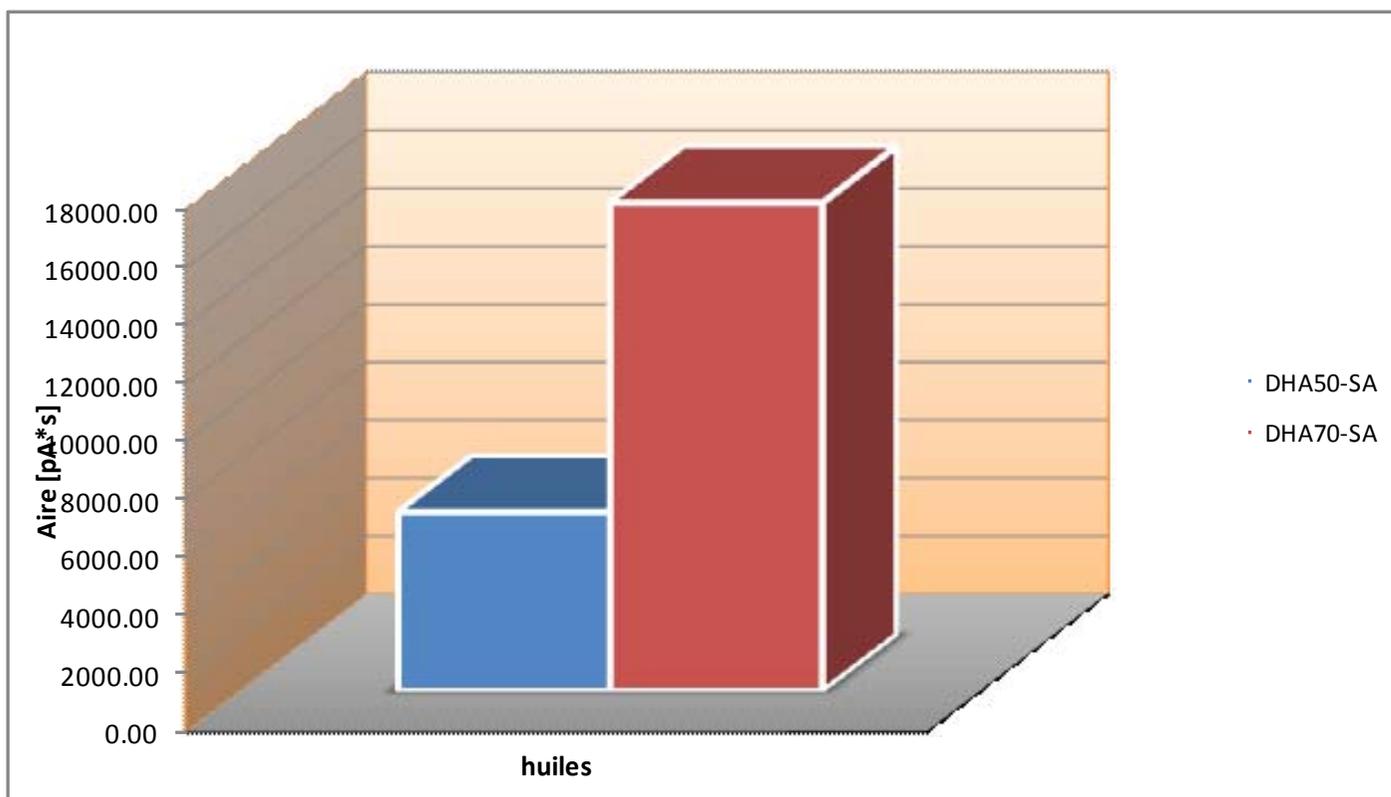
DHA70-SA

Température [°C]	Aire [pA*s]				Ecart-type	CV [%]	ln(Aire)	1/T
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne				
50	4906.80	4822.97	5087.18	4938.98	135.01	2.73	8.5049	0.0031
80	9948.67	10020.70	10086.50	10018.62	68.94	0.69	9.2122	0.0028
90	11683.50	11624.80	11650.20	11652.83	29.44	0.25	9.3633	0.0028
100	15920.40	15961.00	15850.80	15910.73	55.73	0.35	9.6747	0.0027
110	16615.70	16645.10	16603.50	16621.43	21.38	0.13	9.7184	0.0026



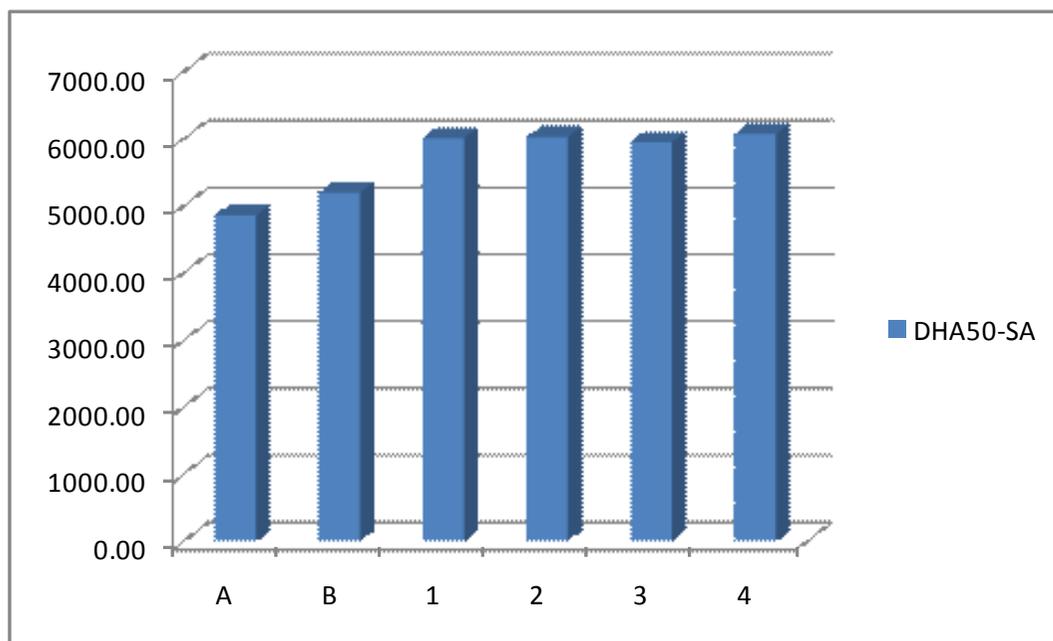
4.3.11 Influence de la quantité de DHA sur la volatilité totale

	Aire [pA*s]				Ecart-type	CV [%]
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne		
DHA50-SA	6135.60	6192.62	6156.92	6161.71	28.8106254	0.46757491
DHA70-SA	16831.20	16840.40	16837.23	16836.28	4.67350332	0.02775853



4.3.12 Influence de la technique d'émulsification sur la stabilité des huiles

DHA50-SA Echantillon	Aire [pA*s]			Méthode d'émulsion
	Essai 1	Essai 2	Moyenne	
A	4873.34	4846.39	4859.87	UltraSon
B	5265.93	5141.08	5203.51	
1	5952.31	6080.16	6016.24	250 bar
2	5725.54	6335.14	6030.34	
3	5932.08	5970.50	5951.29	
4	6063.78	6095.87	6079.83	400 bar



4.3.13 Teste de la fibre PDMS-CAR (avant utilisation)

4.3.13.1 Produits :

- Toluène : pureté > 99.5% (Fluka)
- Une solution de référence : Solution aqueuse de toluène à 0.5 mg/l

4.3.13.2 Matériel :

- Vials d'échantillons en verre de 22 ml (Supelco)
- Septum (Supelco)
- Capuchons (Supelco)
- Fibre SPME pour analyse en mode manuel (voir catalogue Supelco), montée sur un support adéquat (Supelco réf. 57330-U)
- Barreaux agitateur aimantés revêtus de téflon pour analyses en mode manuel
- Agitateur magnétique chauffante
- Chronomètre
- Micro pipettes

4.3.13.3 Procédure

- Préparer 2 échantillons avec la solution de référence (toluène 0.5 mg/l)
 - Placer un barreau aimanté dans chaque vial
 - Pipeter dans chaque vial 10 ml de la solution de référence
 - Fermer immédiatement le vial
 - Maintenir le vial pendant 30 min à 30 °C sous agitation à 500 rpm
- Préparer un vial vide fermé (air ambiant, dans un endroit le plus loin possible des solvants)
- Préparer 2 solutions de blanc avec 10 ml d'eau milliQ

4.3.13.4 Nettoyage de la fibre

- Désorber la fibre dans l'injecteur du GC et l'y laisser pendant 5 minutes (fibre déployer)
- Rétracter la fibre et ensuite sortir la sonde
- Désorber immédiatement à nouveau pendant 1 minute et vérifier que le signal est inférieur à 50 [pA*s]. Sinon il faut recommencer le nettoyage
- Quand la fibre est propre, la placer immédiatement dans un vial vide 1 minute au moins à température ambiante.

4.3.13.5 Mesures

Les mesures doivent être faites en double pour le toluène et le blanc

- Extraire l'espace de tête de chaque échantillon durant t_{ex} (Voir le tableau), à 30°C sous agitation
- Désorber pendant 1 à 2 minutes dans le GC
- Placer immédiatement la fibre dans le vial vide durant 2 minutes à température ambiante.

Pour la validation du tes de la fibre, on vérifie les résultats avec le tableau suivant :

Teste de la fibre PDMS-CAR

DHA50-SA

N° Essai	Aire [pA*s]	Hauteur [pA]	Lrgeur mi hauteur (L ₅₀) [min]	L ₅₀ [s]	H*L ₅₀ [pA*s]
1	11650.10	258.77	0.44	26.40	7171
2	11969.20	266.63	0.46	27.60	
3	12363.40	272.70	0.46	27.60	
4	11905.20	263.06	0.45	27.00	
5	11938.30	264.87	0.45	27.00	
6	11895.50	261.60	0.45	27.00	
Moyenne	11953.62	264.61	0.45	27.10	
Ecart-type	230.76	4.80	0.01	0.45	
coef de variation [%]	1.93	1.81	1.67	1.67	

Temps incubation [s]	1800
Temps extraction [s]	300
Temps désorption [s]	120
Agitation (rpm)	500
Quantité échantillon [ml]	2
temps analyse [s]	900
Température [°C]	40

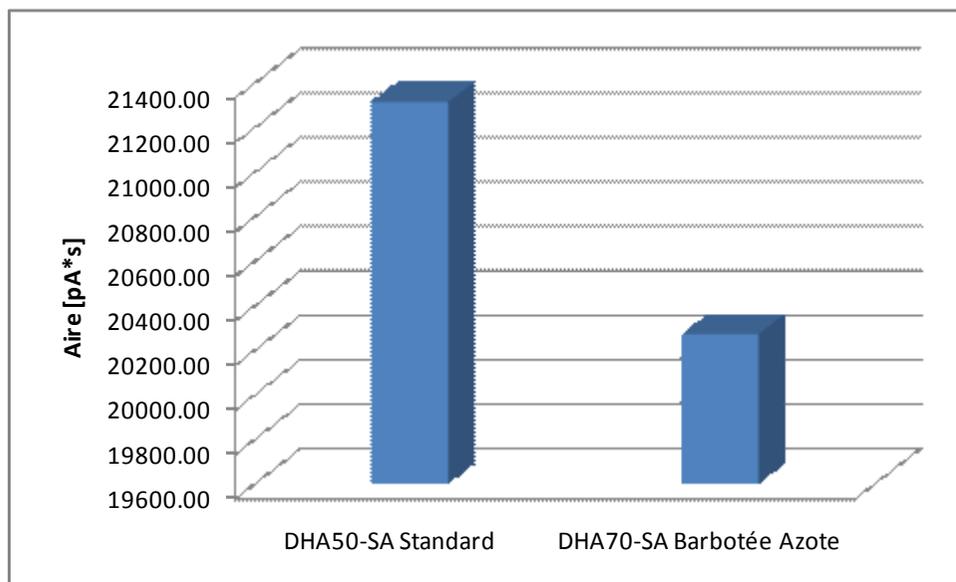
- L₅₀ : Largeur à mi-hauteur du pic
- H : Hauteur du pic

4.3.14 Effet de l'Oxygène dissous

Effet de l'oxygène dissout sur les aires de pics

	Atmosphère	Aire [pA*s]				Ecart-type	CV [%]
		Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne		
DHA50-SA Standard	Azote	21354.70	21220.10	21376.90	21317.23	84.85	0.40
DHA70-SA Barbotée Azote	Azote	20286.40	20398.90	20134.90	20273.40	132.48	0.65

	Atmosphère	Aire [pA*s]
DHA50-SA Standard	Azote	21317.23
DHA70-SA Barbotée Azote	Azote	20273.40



DHA70-SA					
V _L [ml]	V _{HS} [ml]	A[pA*s]	(A*V _L) ⁻¹	V _{HS} /V _L	1/A
1	21	9166.25	0.0001091	21.00	1.09E-04
2	20	10704.34	4.671E-05	10.00	9.34E-05
3	19	11306.71	2.9481E-05	6.33	8.84E-05
5	17	11764.51	1.7E-05	3.40	8.50E-05
Coefficient de partage	80				
			V _L [ml]	V _{HS} [ml]	A[pA*s]
			1	21	16124.22
			2	20	12607.07

4.3.15 Evaluation des coefficients de partage (méthode PRV)

