

Analyse de la composition lipidique de l'huile acide de grignon d'olive neutralisée par la chaux

K. Essid, M. Chtourou, W. Jahouach, M. Trabelsi^{*}, M. H. Frikha

*Laboratoire de Chimie Appliquée : Hétérocycles Corps Gras et Polymères, Faculté des Sciences de Sfax,
Route de Soukra, Km 3,5, 3018 Sfax*

(Reçu le 4 Juin 2002, accepté le 4 Avril 2003)

RESUME : La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide à haute performance ont été utilisées pour étudier la stabilité physicochimique de l'huile d'olive au cours de la neutralisation par la soude ou par l'hydroxyde de calcium. Cette étude a été réalisée sur des échantillons d'huile d'olive artificiellement acidifiés pris comme modèles et sur un échantillon d'huile naturellement hydrolysée (huile de grignon d'olive). Nous avons montré que la neutralisation par la soude ou par l'hydroxyde de calcium s'accompagne par une réaction d'hydrolyse des triacylglycérols. Cette réaction, touche essentiellement les positions internes dans les triacylglycérols et particulièrement celles qui sont estérifiées par l'acide linoléique. Nous avons, en effet, enregistré une diminution très importante du pourcentage de cet acide dans la composition acide, dans le cas de la neutralisation par la soude. Nous avons également montré que l'utilisation de l'hydroxyde de calcium pour la neutralisation des huiles d'olive acides permet de limiter les réactions d'hydrolyse des triacylglycérols.

Mots clés: neutralisation; huile de grignon d'olive; triacylglycérols; hydrolyse chimique; isomère de position.

ABSTRACT: The GC/MS and the HPLC were used to study the physicochemical features of neutralized oils either by lime or by sodium hydroxide. This study was carried out first on an artificially- acidified olive oil sample and second on a naturally- hydrolysed oil sample, the acid olive oil cake. The neutralization reaction by sodium hydroxide and that by lime are both accompanied with a triacylglycerol hydrolysis reaction, which attacks the internal positions of the triacylglycerol and particularly those esterified by linoleic acid. Indeed as concerns the sodium hydroxide we noticed in the acid composition analysis that the linoleic acid rate has dramatically dropped. However, the neutralization reaction by lime permitted to limit this triacylglycerol hydrolysis reaction.

Keywords: neutralization; olive oil cake; triacylglycerol; chemical hydrolysis; position isomer.

INTRODUCTION

L'huile d'olive peut, dans des conditions particulières de stockage ou même au cours de son extraction à partir des olives, se dégrader en s'hydrolysant ou bien en s'oxydant. L'hydrolyse de l'huile conduit à la formation d'acides gras libres en quantité plus ou moins importante.

L'huile extraite du grignon d'olive (sous-produit principal obtenu suite à la pression des olives) présente en général un pourcentage d'acides gras libres relativement important (de 5 à 60% en poids). Cette huile doit être raffinée avant toute utilisation dans le domaine alimentaire. L'élimination des acides gras libres ou neutralisation est l'opération la plus importante du raffinage. Plusieurs procédés de neutralisation ont été décrits dans la littérature :

- Le procédé de neutralisation par distillation, appelée aussi neutralisation physique [1], consiste à éliminer par distillation l'acidité libre contenue dans l'huile brute. Il est à noter que l'étape de distillation entraîne obligatoirement le chauffage de l'huile à haute température sous pression réduite. Cette opération engendre généralement des réactions secondaires faisant varier les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés organoleptiques du corps gras. De plus, l'acidité résiduelle dans les huiles neutralisées par distillation reste relativement élevée, de l'ordre de 3% [2]. Par ailleurs, les réactions thermiques et catalytiques conduisent à la formation d'alcènes, de di et de triterpènes et de produits aromatiques [3].

- Le procédé de neutralisation alcaline repose sur l'élimination des acides gras sous forme de savons appelés pâtes de neutralisation. Les pâtes contiennent également les mucilages, les diverses

^{*} correspondant, e-mail : Mah.Trabelsi@fss.rnu.tn



impuretés et de l'huile neutre entraînée sous forme d'émulsion. En plus de cet entraînement, si l'opération de neutralisation est mal conduite, l'agent alcalin peut non seulement neutraliser les acides gras libres, ce qui est le but recherché, mais aussi attaquer l'huile neutre par une réaction de saponification parasite conduisant à une hydrolyse partielle des triacylglycérols et à la formation de mono et de diacylglycérols dans l'huile neutre.

La neutralisation à la soude dans un milieu biphasique liquide-liquide [4,5], de point de vue rentabilité économique, ne peut pas être appliquée pour des huiles possédant une acidité supérieure à 15%. Au delà de ce seuil, la quantité d'huile neutre entraînée dans les savons devient très importante. La neutralisation par la soude en milieu biphasique liquide-liquide est, également, handicapée par la présence d'eau, pouvant engendrer une réaction secondaire d'hydrolyse des triacylglycérols [2].

Les techniques les plus récentes de neutralisation reposent sur l'estérification des acides gras libres par un monoalcool en présence d'acides minéraux [6] ou d'une résine échangeuse d'ions comme catalyseurs [7-9]. Ces méthodes, faciles à mettre en œuvre et pouvant être utilisées pour le traitement des huiles à acidité très élevée, ne s'appliquent que dans le domaine non alimentaire.

Il apparaît, à la lumière de cet aperçu bibliographique, que la neutralisation physique et la neutralisation chimique par la soude entraînent une modification plus ou moins importante au niveau de la composition chimique des huiles. Cette modification touche à la fois la partie glycéridique et la partie insaponifiable. Cela est constaté notamment dans le cas d'une neutralisation par des quantités non contrôlés de soude et se traduit par la formation de mono et de diacylglycérols dans l'huile neutre.

Dans un travail antérieur, nous avons mis au point une nouvelle technique de neutralisation des huiles végétales utilisant la chaux dans un milieu liquide-solide faiblement hydraté [10]. Cette technique permet de traiter des huiles à acidité très élevée. Elle a été utilisée, en effet, pour la neutralisation de l'huile de grignon d'olive d'acidité 30%. Nous avons montré que l'huile, neutralisée par la chaux, présente des indices courants (I_A : indice d'acidité; I_S : indice de saponification; I_I : indice d'iode et T_i : taux d'insaponifiables) identiques à ceux d'une huile destinée à la consommation.

Dans le présent travail, nous nous proposons d'effectuer les analyses physicochimiques complémentaires nécessaires pour appuyer encore nos résultats antérieurs. Cette étude analytique est réalisée sur des échantillons d'huile artificiellement acidifiée, puis neutralisée par l'hydroxyde de calcium ou par la soude, prise comme témoin. Une étude analytique analogue a été réalisée parallèlement sur un échantillon d'huile de grignon d'olive, d'acidité initiale 30%, neutralisée par l'hydroxyde de calcium ou par la soude.

Dans une première étape nous avons déterminé la composition acide, des huiles neutralisées, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS.

La deuxième étape de l'étude analytique consiste à déterminer la composition en triacylglycérols des huiles neutralisées par chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.).

Les résultats des analyses par GC/MS et par H.P.L.C., les résultats antérieurs concernant les indices de saponification, d'iode et d'insaponifiables et un calcul théorique portant sur la distribution des acides gras sur les positions internes et externes du glycérol [11], nous permettraient de suivre les modifications physicochimiques au niveau des triacylglycérols des huiles neutralisées par la chaux ou par la soude.

PARTIE EXPERIMENTALE :

Analyses chimiques :

- Détermination des indices courants

L'acidité est exprimée en pourcentage d'acide oléique, selon la norme ISO 660 [12]. La mesure de l'indice de saponification est réalisée conformément à la norme ISO 3657 [13].

L'indice d'iode, mesurant l'insaturation globale dans la matière grasse, est déterminé selon la norme ISO 3961 [14] et la détermination du taux d'insaponifiables est effectuée conformément à la norme ISO 3596-1 [15].

- Détermination de la composition en acides gras par Chromatographie en Phase Gazeuse

La méthode de choix utilisée pour la détermination de la composition acide de l'huile d'olive est la chromatographie en phase gazeuse. Les acides gras à chaîne courte ayant un nombre de carbone inférieur à 6 peuvent être analysés directement alors que ceux possédant une chaîne carbonée plus longue doivent être transformés en esters méthyliques plus volatils. L'analyse des acides gras s'effectue donc en deux étapes :

- préparation des esters méthyliques.
- analyse chromatographique des esters méthyliques obtenus.

Les esters méthyliques d'acides gras sont préparés par estérification de l'échantillon d'huile dans une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium selon la norme ISO-5509 [16]; ils sont ensuite analysés selon la norme ISO 5508 [17] à l'aide d'un Chromatographe en phase gazeuse Shimadzu GC 14B, dans les conditions suivantes :

- Colonne capillaire CARBOWAX 20m: phase stationnaire polyéthylène glycol.
- Intégrateur – enregistreur CR 7A.
- Détecteur FID.
- Température de four 190°C, température de l'injecteur et du détecteur 230°C, volume injecté 0,3µl.
- Gaz vecteur: Hélium.

Identification des acides gras :

Les esters méthyliques d'acides gras sont identifiées par GC/MS. L'appareil utilisé est du type Hewlet-Packard série 5973 interfacé avec un chromatographe Hewlet-Packard série 6890. Le spectromètre de masse est programmé à une énergie d'ionisation 70 eV, une température de source 230°C, une tension du photomultiplicateur 2500 V et un temps de balayage de l'échelle de masse de 2,9 s. La température de l'interface est fixée à 280°C. On a utilisé une colonne capillaire HP 5MS de longueur 30 m et de diamètre intérieur égal à 0,25 mm. La phase stationnaire est constituée par 5% diphenyl et 95 % diméthylpolysiloxane. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit égal à 1,7 ml/min.

- Détermination de la composition en triacylglycérols par Chromatographie en Phase liquide à haute performance

Les triacylglycérols possèdent des polarités très voisines, ce qui rend leur séparation et leur analyse par les méthodes chromatographiques classiques très difficiles. Pour cela, on a eu recours à une analyse par chromatographie liquide à haute performance sur colonne en phase inverse [18]. La technique d'analyse des triacylglycérols consiste à dissoudre une goutte d'huile dans 2 ml d'acétone. Après agitation pendant 2 minutes, 25 µl de la solution obtenue sont analysés par un appareil H.P.L.C. du type JASCO PU 980 dans les conditions suivantes :

- détecteur U.V. ($\lambda = 210\text{nm}$);
- colonne : 25cm ; C 18 en phase inverse ; granulométrie 5 µm;
- éluant : acétone-acétonitrile (50-50. v/v) ; débit de la phase liquide : 1 ml/mn.

- Détermination de la composition théorique en triacylglycérols

Il s'agit d'étudier la répartition des acides gras entre la position interne et l'ensemble des positions externes. Un moyen commode d'exprimer cette acylation préférentielle est le calcul du



nombre de molécules en position interne d'un acide gras donné pour 100 molécules de cet acide gras (proportion molaire relative) [11].

Calcul de la composition des acylglycérols en acides gras en positions 2 et 1-3 :

Les triacylglycérols sont regroupés en fonction de leur nombre de carbone équivalent (ECN). Seuls les acides gras ayant 16 ou 18 atomes de carbone sont pris en considération dans notre cas, car ce sont les plus abondants dans l'huile d'olive (tableau I).

Tableau I : Nombre de carbone équivalent des principaux acides gras dans l'huile d'olive.

Acide gras (AG)	Abréviation	Poids moléculaire PM (g/mol)	ECN
Acide palmitique	P	256.4	16
Acide palmitoléique	Po	254.4	14
Acide stéarique	S	284.5	18
Acide oléique	O	282.5	16
Acide linoléique	L	280.4	14
Acide linoléique	Ln	278.4	12

- Conversion en mole du pourcentage de l'aire (% aire) pour chaque acide gras:

Le pourcentage de l'aire d'un pic correspondant à un acide gras est assimilé à son pourcentage massique dans le mélange d'acides gras, on aura alors:

$$\text{mole (AG)} = (\% \text{ aire}) (\text{AG}) / \text{PM (AG)}$$

- Normalisation des acides gras à 100% :

$$\% \text{ molaire (AG)} = \text{mole (AG)} \times 100 / \text{mole (P+S+Po+O+L+Ln)}$$

Cette expression permet de calculer le pourcentage molaire de chaque acide gras dans toutes les position (1,2,3) dans les triacylglycérols.

Les acides gras portés par les triacylglycérols sont répartis en trois ensembles de la manière suivante : deux ensembles identiques pour les positions externes 1 et 3 et un pour la position interne 2, avec différents coefficients pour les acides saturés (P et S) et les acides insaturés (Po, O, L et Ln).

- *Acide gras saturé (A) en position 2 :*

$$\% \text{ molaire } A(2) = \% \text{ mole } A(1, 2, 3) \times 0.06$$

- *Acide gras insaturé (B) en position 2 :*

$$\% \text{ molaire } B(2) = \% \text{ mole } B(1, 2, 3) \times (100 - \text{moles } \% A(2)) / \text{moles } \% \text{ AGI}$$

- *Acide gras C en position 1 et 3 :*

$$\% \text{ molaire } C(1,3) = 0.5 [\% \text{ mole } C(1,2,3) - \% \text{ mole } C(2)] + \% \text{ mole } C(1,2,3)$$

avec $\% \text{ molaire AGI} = 100 - \% \text{ molaire AGS}$

$\% \text{ molaire AGI} = 100 - (\% \text{ mol P} + \% \text{ mol S})$; AGI: acides gras insaturés

AGS: acides gras saturés

Calcul des triacylglycérols :

On a cherché les combinaisons d'acides gras possibles, en tenant compte des isomères de position.

- *triacylglycérol avec un acide gras :*

$$\% \text{ molaire AAA} = [\% \text{ mol } A(1,3) \times \% \text{ mol } A(2) \times \% \text{ mol } A(1,3)] / 10\ 000$$

- *triacylglycérol avec deux acides gras AAB ou ABA :*

$$\% \text{ molaire AAB} = [\% \text{ mol } A(1,3) \times \% \text{ mol } A(2) \times \% \text{ mol } B(1,3) \times 2] / 10\ 000$$

$$\% \text{ molaire ABA} = [\% \text{ mol } A(1,3) \times \% \text{ mol } B(2) \times \% \text{ mol } A(1,3)] / 10\ 000$$

- *triacylglycérol avec trois acides gras ABC, BCA ou CAB :*

$$\% \text{ molaire ABC} = [\% \text{ mol } A(1,3) \times \% \text{ mol } B(2) \times \% \text{ mol } C(1,3) \times 2] / 10\ 000$$

$$\% \text{ molaire BCA} = [\% \text{ mol B(1,3)} \times \% \text{ mol C(2)} \times \% \text{ mol A(1,3)} \times 2] / 10\ 000$$
$$\% \text{ molaire CAB} = [\% \text{ mol C(1,3)} \times \% \text{ mol A(2)} \times \% \text{ mol B(1,3)} \times 2] / 10\ 000$$

RESULTATS ET DISCUSSION :

Analyse des huiles artificiellement acidifiées :

- Etude de la composition acide :

Dans certains cas, la détermination de la composition et de la teneur en certains acides gras peut être nécessaire pour juger de la qualité nutritionnelle de l'huile.

La détermination de la composition en acides gras par le couplage GC/MS a généralement une grande importance dans la mesure où elle permet de connaître le degré d'altération (hydrolyse des glycérides) de la matière grasse et d'évaluer ainsi les pertes atteintes au niveau de la neutralisation de l'huile.

L'analyse chromatographique des esters méthyliques d'acides gras avant et après neutralisation nous renseigne d'une manière générale sur les modifications apportées au cours de l'opération de neutralisation. Cette analyse est réalisée sur:

- un échantillon d'huile d'olive vierge d'acidité 2 %, choisi comme huile de référence.
- un échantillon d'huile d'olive artificiellement acidifié d'acidité 10%, obtenu par addition d'un mélange d'acides gras sur l'huile d'olive vierge de base. Ces acides gras sont préparés à partir de l'huile vierge de base par une réaction de saponification suivie d'une hydrolyse acide à l'aide de l'acide phosphorique.
- un échantillon d'huile d'olive artificiellement acidifié ayant subi la neutralisation par l'hydroxyde de sodium.
- un échantillon d'huile d'olive artificiellement acidifié ayant subi la neutralisation par l'hydroxyde de calcium.

Nous avons déterminé la composition acide, de ces huiles, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les surfaces des pics sont calculées à l'aide d'un intégrateur, ce qui nous a permis d'évaluer les pourcentages relatifs aux acides gras dans les différentes huiles. Les résultats obtenus montrent essentiellement la présence de pics correspondant aux acides gras à nombre pair d'atomes de carbone allant de C₁₆ à C₂₀.

Le tableau II montre la variation de la composition en acides gras dans les échantillons d'huile neutralisés par la chaux ou par l'hydroxyde de sodium par rapport à l'huile de base.

Tableau II: Composition en acides gras des échantillons d'huile (en % des AGT).

	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}
Huile de référence	21.33	3.33	0.03	0.07	2.66	51.37	17.20	0.55	0.35	0.16
Huile neutralisée par NaOH	24.11	3.1	0.03	0.07	2.79	51.58	12.94	0.53	0.40	0.16
Huile neutralisée par Ca(OH) ₂	20.82	2.94	0.03	0.07	2.69	51.69	15.32	0.52	0.39	0.16

Nous constatons que le pourcentage d'acide linoléique dans les échantillons d'huile ayant subi l'opération de neutralisation diminue notablement par rapport à celui de l'échantillon d'huile de référence. Cette diminution est plus importante dans le cas de la neutralisation par l'hydroxyde de sodium.



- Analyse des triacylglycérols:

Les corps gras naturels sont des mélanges extrêmement complexes de triacylglycérols renfermant, chacun, un, deux ou trois acides gras différents. Après avoir déterminé la composition en acides gras totaux, des différents échantillons d'huile, avant et après neutralisation, nous avons analysé leurs triacylglycérols par chromatographie liquide à haute performance à polarité de phases inversée. Ceci nous permet d'obtenir directement la composition triglycéridique et de déterminer les triacylglycérols différents entre eux par la nature des acides gras. L'identification des pics expérimentaux nous a été possible par l'utilisation des données de la littérature et le calcul du nombre de carbone équivalent (ECN) [19].

Avec $ECN = NC - 2$ (nombre de doubles liaisons); NC est le nombre total d'atomes de carbone.

La séparation des triacylglycérols dans ces conditions chromatographiques, tient compte à la fois de la longueur de chaîne du triacylglycérol et de son degré d'insaturation.

Les résultats de ces analyses sont résumés dans le tableau III.

Tableau III: Analyse par H.P.L.C. des triacylglycérols des échantillons d'huile issus de l'huile artificiellement acidifiée.

Pic	E.C.N.	Attribution du TAG	Huile de référence	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par Ca(OH) ₂
1	42	LLL	0.63	0.35	0.60
2	42	LnLO	0.30	0.20	0.28
3	42	LnLP	0.17	0.17	0.17
4	44	LLO	5.49	5.06	5.44
5	44	LnOO	4.28	4.24	4.21
6	44	PLL	0.46	0.57	0.49
7	46	LOO	15.79	15.99	15.85
8	46	LOP	15.74	15.69	15.87
9	46	PLP	2.63	2.49	2.52
10	48	OOO	19.35	19.65	19.58
11	48	POO	24.19	24.13	24.21
12	48	POP	5.84	5.65	5.75
13	50	ALO	0.26	0.14	0.14
14	50	SOO	3.45	3.37	3.38
15	50	SOP	1.36	1.33	1.35

Les résultats présentés dans le tableau III montrent la prédominance de six ou sept triacylglycérols. Les autres triacylglycérols ne sont présents qu'en faible quantité dans tous les échantillons analysés.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux de l'analyse de la composition acide par chromatographie en phase gazeuse. Nous remarquons, en effet, que la diminution de la teneur en acide linoléique dans les échantillons d'huile ayant subi la neutralisation est accompagnée d'une légère diminution du pourcentage des triacylglycérols estérifiés par l'acide linoléique en position interne (pics :1, 2, 4, 9 et 13). Cette position est préférentiellement occupée, dans les

triacylglycérols naturels, par des chaînes grasses insaturées, prioritairement et dans l'ordre les acides linoléique, oléique et linoléique [20].

Cette diminution semble traduire une réaction d'hydrolyse qui accompagne l'opération de neutralisation et qui paraît plus importante dans le cas de la neutralisation par l'hydroxyde de sodium. Par ailleurs, les résultats des analyses par GC/MS et par H.P.L.C., sont en accord avec les résultats des analyses concernant les indices: (I_A : indice d'acidité; I_S : indice de saponification; I_i : indice d'iode et T_i : taux d'insaponifiables), rassemblés dans le tableau IV.

Tableau IV: Analyses physicochimiques et détermination des indices courants.

	Huile de référence	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par Ca(OH)_2
I_A	2	0.08	0.08
I_S	191.44	175.31	185.13
I_i	107.86	98.66	106.59
T_i	0.45	0.42	0.45

La diminution de l'indice de saponification (I_S) des échantillons ayant subi l'opération de neutralisation, par rapport à l'échantillon d'huile de base peut être attribuée à l'hydrolyse de quelques fonctions esters des triacylglycérols, conduisant à la formation de mono et de diacylglycérols qui restent dans l'huile neutre. Les acides gras hydrolysés subissent une saponification et passent sous forme de sels dans la phase savonneuse. La comparaison entre les indices de saponification (I_S) des huiles neutralisées par la soude et par l'hydroxyde de calcium montre que la réaction d'hydrolyse était plus importante dans le cas de la neutralisation par la soude.

La diminution de l'indice d'iode (I_i), traduisant une diminution du taux d'insaturation dans la matière grasse, peut également être attribuée à l'hydrolyse des fonctions esters portant des insaturations. Le taux d'insaponifiables reste inchangé au cours de la neutralisation.

Il apparaît à la lumière de ces résultats que la neutralisation par la soude ou par l'hydroxyde de calcium s'accompagne par une réaction d'hydrolyse des triacylglycérols. Cette réaction, plus importante dans le cas de la neutralisation par la soude, touche la position interne dans les triacylglycérols particulièrement celle qui est estérifiée par l'acide linoléique. Ceci traduit la diminution importante du pourcentage de cet acide dans la composition acide. La position interne, préférentiellement occupée par les chaînes grasses insaturées dans les TAG naturels, correspond, en effet, à un ester d'alcool secondaire plus facilement hydrolysable que l'ester d'alcool primaire.

Pour confirmer les résultats expérimentaux concernant les modifications physicochimiques au niveau des TAG des huiles neutralisées par la chaux ou par la soude, nous les avons confronté à un calcul théorique portant sur la distribution des acides gras sur les position interne et externes du glycérol.

- Composition théorique des TAG en acides gras :

Un moyen commode d'exprimer l'acylation préférentielle est le calcul du nombre de molécules en position interne d'un acide gras donné pour 100 molécules de cet acide gras (proportion molaire relative).



Pour simplifier le problème de l'identification de ces TAG, dans notre cas, nous n'avons pris en considération que les acides gras ayant 16 ou 18 atomes de carbone, car ce sont les seuls qui sont importants dans l'huile d'olive [11].

Les résultats du calcul, résumés dans le tableau V, représentent la répartition en pourcentage molaire de chaque acide gras dans les positions (1,3) et dans la position (2) dans les TAG. Ces résultats permettent de constater que la répartition d'acide linoléique, estérifiant les positions interne et externe, de la molécule de glycérol est particulièrement touchée suite aux opérations de neutralisation.

Tableau V : Acides gras en positions (2) et (1,3) dans les TAG des huiles.

Acides Gras (mole %)	Huile de référence		Huile neutralisée par NaOH		Huile neutralisée par Ca(OH) ₂	
	Positions (1,3)	Position (2)	Positions (1,3)	Position (2)	Positions (1,3)	Position (2)
P	34.861	1.423	39.866	1.627	34.939	1.426
S	3.917	0.160	4.155	0.169	4.066	0.166
Po	3.295	5.296	2.808	4.926	2.806	4.527
O	43.108	69.298	42.095	73.84	44.469	71.733
L	14.544	23.375	10.641	18.660	13.270	21.406
Ln	0.466	0.750	0.438	0.768	0.459	0.713

Pour confirmer ces propos nous avons déterminé la composition théorique des TAG, comportant l'acide linoléique, dans nos échantillons d'huile.

Dans un premier temps, nous avons étudié les TAG qui diffèrent entre eux par la nature de leurs acides gras. Nous avons, ensuite, déterminé pour chaque type de TAG ses structures probables en différenciant les positions 2 et 1,3. Pour ce faire, nous nous sommes aidés de la répartition des acides gras sur les positions internes et externes de la molécule de glycérol tout en tenant compte des isomères de position. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI.

Tableau VI: Répartition théorique des acides gras dans les TAG comportant l'acide linoléique.

ECN	TAG	Huile de référence	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par Ca(OH) ₂
42	LLL	0.494	0.214	0.380
42	LnLO	0.280	0.206	0.258
42	LnLP	0.154	0.131	0.136
44	LLO	4.390	2.506	3.780
44	PLL	0.240	0.160	0.200
46	LOO	13.030	9.920	12.690
46	LOP	14.230	12.670	13.470
46	PLP	2.900	2.100	2.700

Il apparaît à la lumière des résultats du tableau VI que la répartition des acides gras dans les TAG, comportant l'acide linoléique, respectent les règles générales de distribution stéréospécifique des acides gras dans les TAG d'origine végétale [21-23]. Les acides gras insaturés estérifient majoritairement la position 2 de la molécule de glycérol.

Par ailleurs nous constatons que les résultats du calcul théorique (tableau VI) sont parfaitement en accord avec les résultats expérimentaux (Tableau III). Nous n'avons pas remarqué, en effet, de différence significative entre les valeurs de la composition théorique des TAG, et les résultats des analyses par chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.). Les résultats expérimentaux et théoriques (Tableaux III, IV, V et VI) mettent en évidence une nette diminution de la teneur en acide linoléique au cours de la neutralisation. Cette diminution est attribuée à l'hydrolyse des TAG estérifiés par cet acide. Il semble que ce sont les TAG estérifiés par l'acide linoléique en position interne qui sont particulièrement hydrolysés (LLL, LnLO, LLO, ALO).

Analyse des huiles de grignon d'olive neutralisées:

L'huile de grignon d'olive d'acidité 30% se présente sous la forme d'un liquide noir visqueux. Cette huile a été neutralisée en présence d'un excès de 10 % d'agent neutralisant, dans un milieu légèrement hydraté en présence d'hexane comme solvant [10].

L'huile neutre, séparée par centrifugation du mélange obtenu après l'opération de neutralisation, présente une couleur jaunâtre dans le cas d'un traitement par la soude et jaune verdâtre dans le cas du traitement par $\text{Ca}(\text{OH})_2$. La plus grande partie des colorants (pigments et cendres) a été éliminée de la phase huileuse au cours de la neutralisation. Ces colorants sont récupérés dans la phase savonneuse.

Dans la première partie de l'étude analytique, nous avons déterminé les indices courants (I_A : indice d'acidité; I_S : indice de saponification; I_i : indice d'iode et T_i : taux d'insaponifiables). Les valeurs de ces indices sont rassemblés dans le tableau VII.

Tableau VII: Caractéristiques physico-chimiques d'une huile acide ayant subi une neutralisation par NaOH ou par $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

	Huile acide	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par $\text{Ca}(\text{OH})_2$
A	30	0.1	0.2
I_S	195.30	184.22	188.83
I_i	89.67	90.94	89.88
T_i	1.21	1.2	1.3

Ces indices nous renseignent d'une manière générale sur la qualité des huiles traitées. Les huiles recueillies après neutralisation par la soude ou par l'hydroxyde de calcium présentent une acidité très faible de l'ordre de 0.2%. La diminution de l'indice de saponification des huiles neutralisées a été déjà observée dans le cas des huiles artificiellement acidifiées et neutralisées et a été attribuée à l'hydrolyse des TAG. On remarque que la réaction d'hydrolyse est plus importante dans le cas de la neutralisation par la soude. Le taux d'insaponifiable, dans les huiles de grignon d'olive neutralisées est relativement plus élevé que celui des huiles d'olive vierges (huile de référence).

La composition acide des huiles de grignon d'olive neutralisées (tableau VIII), montre la présence de tous les acides gras rencontrés dans les huiles d'olive vierges (huile de référence). On note, cependant, des variations au niveau des pourcentages des acides gras majoritaires. Les huiles de grignon d'olive neutralisées sont, en effet, plus riches en acide oléique et beaucoup moins riches



en acide palmitique que l'huile de référence. La teneur en acide linoléique est à près la même dans l'huile de référence et les huiles de grignon d'olive neutralisées. Cette variation dans la composition acide est probablement liée à la variété de l'olivier.

Tableau VIII: Composition acide des huiles de grignon d'olive neutralisées.

	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:0}	C _{20:1}
Huile neutralisée par NaOH	13.88	1.64	0.05	0.07	2.58	64.22	16.2	0.52	0.40	0.24
Huile neutralisée par Ca(OH) ₂	14.19	1.78	0.06	0.08	2.56	63.83	16.43	0.58	0.44	0.19
Huile de référence	21.33	3.33	0.03	0.07	2.66	51.37	17.20	0.55	0.35	0.16

La composition acide (tableau VIII) se reflète automatiquement sur la composition triglycéridique (TAG) (tableau IX). Nous constatons, en effet, que les pourcentages molaires des TAG comportant l'acide oléique (OOO, LOO) dans les huiles de grignon d'olive neutralisées sont plus élevées que ceux de l'huile de référence et les TAG comportant l'acide palmitique (LOP, POO, POP) ont des pourcentages molaires plus faibles.

Tableau IX: Analyse par H.P.L.C. des TAG des huiles de grignon d'olive neutralisées.

Pic	E.C.N.	Attribution du T.G.	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par Ca(OH) ₂	Huile de référence
1	42	LLL	0.80	0.83	0.63
2	42	LnLO	0.45	0.49	0.30
3	42	LnLP	0.16	0.15	0.17
4	44	LLO	6.02	5.88	5.49
5	44	LnOO	3.16	3.14	4.28
6	44	PLL	0.62	0.64	0.46
7	46	LOO	18.05	17.89	15.79
8	46	LOP	11.45	11.35	15.74
9	46	PLP	1.41	1.38	2.63
10	48	OOO	28.09	27.76	19.35
11	48	POO	20.23	20.17	24.19
12	48	POP	3.81	3.87	5.84
13	50	ALO	0.29	0.40	0.26
14	50	SOO	3.94	4.64	3.45
15	50	SOP	1.45	1.20	1.36

La différence (tableau XII) entre la composition réelle, déterminée par HPLC, (tableau X) et la composition théorique des TAG à ECN 42 (tableau XI) constitue une norme internationale visant

à détecter la présence de faibles quantités d'huile de graine riche en acide linoléique dans chaque catégorie d'huile. La différence maximale entre les teneurs effective et théorique des TAG à ECN 42 tolérée est de:

- 0.2 pour les huiles d'olive vierges
- 0.3 pour les huiles d'olive
- 0.3 pour les huiles d'olive raffinées
- 0.5 pour les huiles de grignons d'olive

Tableau X: Analyse par H.P.L.C. des TAG à ECN 42 dans les huiles de grignon d'olive neutralisées.

Pic	Attribution du T.G.	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par Ca(OH) ₂
1	LLL	0.80	0.83
2	LnLO	0.45	0.49
3	LnLP	0.16	0.15

Tableau XI: Composition théorique des TAG à ECN 42 des huiles de grignon d'olive neutralisées.

TAG	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par Ca(OH) ₂
LLL	0,4	0,44
PoLL	0.135	0.15
PoPoL	0.015	0.019
OLLn	0.299	0.34
PLLn	0.043	0.09
PoOLn	0.033	0.04
SLnLn	0.0002	0.00026
PpoLn	0.0088	0.007

Tableau XII: Différence entre compositions réelle et théorique des TAG à ECN 42.

	Huile neutralisée par NaOH	Huile neutralisée par Ca(OH) ₂
Σ % ECN 42 (composition réelle)	1.410	1.480
Σ % ECN 42 (composition théorique)	0.934	1.086
Δ ECN 42	0.470	0.390

Les caractéristiques physico-chimiques, les compositions acides et triglycéridiques et la différence entre la composition théorique des TAG à ECN 42 et la composition réelle des huiles de



grignon d'olive neutralisées par la chaux ou par la soude restent conformes aux normes internationales adoptées pour les huiles d'olive [24].

CONCLUSION

Ce travail est une contribution à la valorisation des huiles végétales fortement dégradées. Nous avons étudié la stabilité physico-chimique de ces huiles, au cours de l'étape de neutralisation par la soude ou par l'hydroxyde de calcium.

Il nous a semblé que la neutralisation par la soude ou par l'hydroxyde de calcium s'accompagne par une réaction d'hydrolyse des TAG. Cette réaction, touche essentiellement les positions internes dans les TAG et particulièrement celles qui sont estérifiées par l'acide linoléique. Cette position, préférentiellement occupée par les chaînes grasses insaturées dans les TAG naturels, correspond à un ester secondaire facilement hydrolysable.

La soude qui est une base plus forte que l'hydroxyde de calcium serait à l'origine d'une réaction d'hydrolyse plus importante. Nous avons, en effet, enregistré une diminution très importante du pourcentage de l'acide linoléique dans la composition acide, dans le cas de la neutralisation par la soude.

Nous avons également montré que les caractéristiques physico-chimiques et les compositions acides et triglycéridiques des huiles de grignon d'olive neutralisées par la chaux ou par la soude, restent conformes aux normes internationales concernant les huiles d'olive.

REFERENCES

- [1] J. P. Wolef, *Manuel d'analyse des corps gras*, Azoulay, éd. Paris, 1968.
- [2] G. Amelotti, Modificazioni indotte del processo di raffinazione fisica nella struttura dei trigliceridi dell'olio di oliva, *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 1987, 64, 23.
- [3] G. Cechi, Transformation des stérols pendant la fabrication du squalène végétal: incidence de cette transformation sur la présence de stéranes dans le squalène d'origine olive, *OCL*, 1998, 5, 149.
- [4] L.O. Bergman, Apparatus for neutralizing fatty oils, *U.S. Patent*, 3 362 794, 1968.
- [5] W. Deman, Process for continuously deacidifying glyceride oils, *U.S. Patent*, 3 419 588, 1968.
- [6] K.S. Markley, *Fatty Acids, Their chemistry, Properties, Production, and uses*, Part 1, 2nd Ed, Interscience Publishers, Inc., New York, 1960.
- [7] M.H. Frikha, M. Benzina, M. Salem, Equation cinétique de l'estérification des acides gras libres de l'huile de grignon d'olive par l'éthanol au dessus de l'azéotrope eau-éthanol. *Entropie*, 1997, 206, 48.
- [8] M.H. Frikha, M. Benzina, S. Gabsi, Etude des équilibres liquide-vapeur d'un mélange eau-éthanol dilué dans les lipides au dessus de la température de l'azéotrope. Application à l'estérification des acides gras, *Entropie*, 1996, 197, 53.
- [9] M.H. Frikha, M. Benzina, S. Gabsi, Estérification des acides gras libres de l'huile de grignon d'olive par l'éthanol à une température supérieure à celle de l'azéotrope-influence des phénomènes diffusionnels sur la cinétique de la réaction, *Entropie*, 1995, 191, 41.
- [10] K. Essid, F. Ladhar, M.H. Frikha, Utilisation de la chaux pour la neutralisation des huiles acides de grignons d'olive, *Journal SCT*, 2001, 4, 1015.
- [11] NORME INTERNATIONALE, Détermination de la différence entre la composition réelle et la composition théorique des triglycérides à ECN42, 1998, COI / T. 20.
- [12] NORME INTERNATIONALE, Corps gras d'origine animale et végétale- Détermination de l'indice d'acide et de l'acidité, 1996, ISO 660.
- [13] NORME INTERNATIONALE, Corps gras d'origine animale et végétale- Détermination de l'indice de saponification, 1988, ISO 3657.
- [14] NORME INTERNATIONALE, Corps gras d'origine animale et végétale- Détermination de l'indice d'iode, 1996, ISO 3961.



- [15] NORME INTERNATIONALE, *Corps gras d'origine animale et végétale- Détermination de la teneur en matières insaponifiables*, 1988, ISO 3596-1.
- [16] NORME INTERNATIONALE, *Corps Gras d'origines animales et végétale- Préparation des esters méthyliques d'acides gras*, 1978, ISO 5509.
- [17] NORME INTERNATIONALE, *Corps Gras d'origines animales et végétale- Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras*, 1990, ISO 5508.
- [18] NORME INTERNATIONALE, *Corps Gras d'origines animales et végétale- Détermination de la teneur en benzo[a]pyrène – méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance en phases inversées*, 1996, ISO / DIS 15302.
- [19] J.P.Wolef, F.X.Morderet, A.Kiffenbacher, Determination of triglycerides in vegetable oils in terms of their partition numbers by high performance liquid chromatography, *Pure and Appl. Chem.*, 1991, 63, 1173.
- [20] C.Aubert-Mammou, Magliozzi, M.Farines, J.Soulier, Les triacylglycérols de l'huile de graines de sisymbre (*Sisymbrium* sp. L., Brassicaceae), *OCL*, 1996,3, 65.
- [21] W.W.Christie, The positional distributions of fatty acids in triglycerides. In: *analysis of oils and fats*, London. Ed. Elsevier Applied Science Publisher, 1986, p. 313.
- [22] F.D.Gungstone, The distribution of fatty acids in natural glycerides of vegetable origin, *Chemistry and Industry*, 1962, 23, 121.
- [23] F.D.Guangstone, R.J.Hamilton, F.B.Padley, I.M.Qreshi, Glycerides studies V. The distribution of unsaturated acyl groups in vegetable triglycerides, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1965, 42, 965.
- [24] Conseil Oléicole Internationale, *Amélioration de la qualité d'huile d'olive*, Madrid, 1990.