



HAL
open science

Développement de nouveaux aliments santé à partir de graines et fruits d'origine tropicale

Thavarith Chunhieng

► **To cite this version:**

Thavarith Chunhieng. Développement de nouveaux aliments santé à partir de graines et fruits d'origine tropicale. Génie chimique. INPL - Institut National Polytechnique de Lorraine, 2003. Français. NNT : 2003INPL027N . tel-02019759

HAL Id: tel-02019759

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02019759v1>

Submitted on 14 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

N° attribué par la bibliothèque :

[N] 2003 CHUNHIENG

136 035151 5

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'INPL

Discipline : Procédés biotechnologiques et alimentaires

Présentée et soutenue publiquement

Par **M. Thavarith CHUNHIENG**

Le 3 juin 2003

Titre : Développement de nouveaux aliments santé à partir de graines et fruits d'origine tropicale : application à la noix du Brésil *Bertholettia excelsa* et au fruit du Cambodge *Morinda citrifolia*

Directeur de thèse : Didier MONTET

Membres du jury

M. Jacques FANNI	Président
M. Jean-Claude BACCOU	Rapporteur
M. Gérard VILAREM	Rapporteur
Mme Isabelle BOMBARDA	Membre du jury
M. Yves LOZANO	Membre du jury
M. Didier MONTET	Directeur de thèse
M. Ly Hay	Membre du jury

REMERCIEMENTS

Avant de présenter ce travail, je voudrais ici remercier tous ceux qui, sous différentes formes, ont contribué à sa réalisation.

Ce travail a été effectué au sein du Programme Agro-Alimentaire du Cirad-Amis, grâce à une bourse qui m'a été accordée par l'AUPELF-UREF.

J'exprime ma profonde gratitude à M. Didier Montet, Dr. HDR, chef de projets au Programme Agro-Alimentaire du Cirad-Amis, d'avoir accepté d'être le directeur de cette thèse dont il a suivi l'avancement pas à pas. Je le remercie tout particulièrement pour l'attention qu'il m'a accordée tout au long de ces années. J'ai été très touché par la gentillesse de Didier Montet, qui a toujours accepté de se libérer pour répondre à mes questions et problèmes divers.

Je remercie également M. Fernand Texier, directeur de l'Institut Technique du Cambodge, d'avoir accepté de me libérer de mes fonctions d'enseignant pour que je réalise cette thèse de Doctorat.

J'ai particulièrement apprécié l'aide de M. Yves Lozano, Dr. HDR, chercheur au Programme Agro-Alimentaire du Cirad-Amis qui a pris la peine de discuter, de travailler avec moi sur certains procédés de filtrations et de vérifier dans le détail les parties de ce travail relatives aux études sur le jus de Noni.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. Thierry Goli, chercheur au Programme Agro-Alimentaire du Cirad-Amis, qui a pris la peine de relire et de corriger en détail les parties relatives à la noix du Brésil avant reproduction. Que M. Daniel Pioch, Dr. HDR, chef de l'équipe de Cirad-Amis/Paa/Pcbm trouve également ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour m'avoir accepté dans son équipe.

Mes plus vifs remerciements vont à M. Jean-Claude Baccou, Professeur à l'Université Montpellier 2, et à M. Gérard Vilarem, Professeur à l'ENSIACET de Toulouse, pour avoir accepté de participer au jury de soutenance de cette thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie de l'honneur que Mme Dr Isabelle Bombarda, chercheur au CNRS de Marseille et M. Jacques Fanni, Professeur à l'ENSAIA de Nancy, m'ont fait en acceptant de lire et de juger ce travail.

*Je tiens à remercier Dr. Ly Eang Hay, Directeur de Theraprim pour m'avoir gracieusement fourni le fruit et le jus de *Morinda citrifolia* nécessaires à l'étude.*

J'exprime ma gratitude à tous ceux qui ont participé à ces travaux de recherche, en particulier M. Michel Ollé (Laboratoire de la Répression des fraudes) qui m'a aidé à réaliser certaines des analyses chromatographiques.

Je tiens à adresser un remerciement particulier à : Daniel, Isabelle, Marie-Christine, Bruno, Nathalie, Chandy et Pisey pour avoir été des supers collègues de travail et Josette Appe pour avoir mis en forme ce travail et géré les budgets relatifs à ce projet.

Je remercie également M. Chhel Sam Phâl qui m'a soutenu moralement et qui s'est occupé de tous mes problèmes pendant mon séjour à Montpellier.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME

I INTRODUCTION GENERALE 1

I.1 Contexte 1

I.2 Objectifs 2

II ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES 4

II.1 La noix du Brésil 4

II.2 Le Noni ou *Morinda citrifolia* 12

II.2.1 Les principales actions médicales du Noni 13

II.2.2 Quelques propriétés chimiques du Noni 14

II.2.3. Les effets pharmacologiques du jus de Noni 14

II.3 Les molécules d'intérêt 15

II.3.1 Généralités sur l'oxydation 15

II.3.2 Les chlorophylles 17

II.3.3 Les acides gras 20

II.3.4 Les stérols 24

II.3.5 Les tocophérols 28

II.3.6 Les phospholipides 31

II.3.7 Le sélénium 35

II.3.8 Les acides aminés 37

III MATERIELS ET METHODES 43

III.1 Matériels 43

III.1.1 Le tourteau déshuilé de la noix de Brésil 43

III.1.2 Le fruit de *Morinda citrifolia* ou Noni 43

III.2 Méthodes 43

III.2.1 Détermination de la matière sèche par séchage à l'étuve 43

III.2.2 Détermination de l'activité de l'eau des tourteaux 43

III.2.3 Teneur en minéraux des tourteaux par carbonisation à 550°C 44

III.2.4 Dosage des matières minérales des tourteaux 44

III.2.4.1 Minéralisation par voie sèche et destruction de la silice par HF 44

III.2.4.2 Dosages de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Se par spectrométrie d'émission plasma I.C.P. 45

III.2.5 Détermination de la teneur en soufre des tourteaux 45

III.2.6 Détermination de la teneur en azote totale 45

III.2.7 Extraction de l'huile des tourteaux par la méthode de Soxhlet 46

III.2.8 Détermination de la matière minérale de l'huile de tourteau 46

III.2.9 Détermination de la plage de fusion de l'huile de tourteau 46

III.2.10 Détermination de la densité de l'huile de tourteau 46

III.2.10.1 Standardisation du pycnomètre 46

III.2.10.2 Détermination 47

III.2.11 Détermination de l'acidité de l'huile 47

III.2.12 Détermination de l'indice de peroxyde des huiles 48

III.2.13 Détermination de l'indice d'iode des huiles 51

III.2.14 Teneur en insaponifiable de l'huile 51

III.2.15 Détermination de la composition en acides gras des huiles	52
III.2.15.1 Préparation des esters méthyliques	52
III.2.15.2 Analyse des esters méthyliques par CPG	54
III.2.16 Détermination de la composition en tocophérols de l'huile par HPLC	54
III.2.17 Détermination de la composition en stérols de l'huile par CPG	54
III.2.18 Quantification des phospholipides de l'huile par spectrophotométrie	56
III.2.19 Teneur totale en sucres	57
III.2.19.1 Extraction des sucres au reflux d'éthanol à 80 %	57
III.2.19.2 Dosage des mono et disaccharides par chromatographie ionique	58
III.2.20 Extraction des différentes fractions protéiques de la noix du Brésil	60
III.2.20.1 Fractionnement des protéines du tourteau déshuilé de la noix du Brésil	60
III.2.20.1.1 Extraction des protéines totales	60
III.2.20.1.2 Fractionnement des protéines	60
III.2.21 Détermination du pH optimum de solubilisation et de précipitation des protéines	60
III.2.22 Capacité d'absorption d'huile de la protéine	61
III.2.23 Analyse des acides aminés	61
III.2.23.1. Hydrolyse des protéines par voie enzymatique	61
III.2.23.2 Détermination des acides aminés	61
III.2.24 Identification de la sélénocystéine et de la séléénométhionine par couplage HPLC/spectrométrie de masse	62
III.2.25 Fabrication du lait de tourteau de la noix du Brésil	63
III.2.26 Production de jus de <i>Morinda Citrifolia</i> par pressage	63
III.2.27 Clarification du jus de Noni par microfiltration tangentielle	64
III.2.28 Concentration du jus de Noni par osmose inverse	64
III.2.29 Détermination du degré Brix	64
III.2.30 Détermination de la teneur en chlorophylle	65
III.2.31 Détermination de la teneur en huile des jus	65
III.2.31.1 Extraction de l'huile par la méthode Soxhlet	65
III.2.31.2 Extraction liquide-liquide de l'huile : hexane-jus	65
III.2.31.3 Extraction de l'huile par la méthode de Folch	65
III.2.32 Détermination des anions minéraux et organiques du jus	66
III.2.33 Etude de la stabilité physique du jus de <i>Morinda Citrifolia</i>	67
III.2.34 Mesure de la turbidité des jus	68
III.2.35 Mesure de la longueur d'onde d'absorption maximale du jus de Noni	68
III.2.36 Etude de la stabilité microbiologique des jus	68

IV RESULTATS ET DISCUSSION	71
IV.1 PREMIERE PARTIE : Valorisation de la Noix du Brésil <i>Bertholletia excelsa</i> sous forme d'aliment santé	71
IV.1.1 Introduction	71
IV.1.1.1 Contexte	71
IV.1.1.2 Objectifs de l'étude	71
IV.1.2 PREMIER CHAPITRE : Etude de la composition biochimique de la Noix du Brésil <i>Bertholletia Excelsa</i>	72
IV.1.2.1 Composition chimique du tourteau déshuilé	72
IV.1.2.1.1.Teneur en eau et activité de l'eau	72
IV.1.2.1.2 Composition minérale	72
IV.1.2.1.3 Analyse des sucres	73
IV.1.2.1.4 Teneur en fibres du tourteau	74

IV.1.2.1.5 Teneur en protéine du tourteau	74
IV.1.2.1.6 Analyse de l'huile de la noix du Brésil	75
IV.1.2.1.7 Composition détaillée de l'huile de noix du Brésil	77
IV.1.2.1.7.1 Composition en acides gras de l'huile de la noix du Brésil	77
IV.1.2.1.7.2 Composition de la fraction tocophérolique de l'huile de noix du Brésil	78
IV.1.2.1.7.3 Composition de la fraction stérolique de l'huile de noix du Brésil	79
IV.1.2.1.7.4 Composition de la fraction phospholipidique de l'huile de noix du Brésil	80
IV.1.2.1.8 Récapitulatifs sur l'analyse biochimique de la noix du Brésil	83
IV.1.2.2 Conclusion	85
IV.1.3 DEUXIEME CHAPITRE : Mise en évidence d'une liaison covalente liant le sélénium aux fractions protéiques de la Noix du Brésil <i>Bertholletia excelsa</i>	87
IV.1.3.1 Extraction des différentes fractions protéiques de la noix du Brésil	87
IV.1.3.1.1 Détermination du pH optimum de solubilisation et de précipitation des protéines	88
IV.1.3.1.2 Effet du volume d'eau sur la quantité de protéines extraites	89
IV.1.3.1.3 Extraction des protéines à plus grande échelle	90
IV.1.3.2 Capacité des protéines extraites du tourteau de la noix du Brésil à se complexer avec les lipides	91
IV.1.3.3 Analyses des protéines	92
IV.1.3.4 Quantité de sélénium trouvée sur les fractions protéiques extraites du tourteau de la noix du Brésil	94
IV.1.3.5 Identification de la sélénométhionine et de la sélélocystéine par couplage HPLC-SM	95
IV.1.4 TROISIEME CHAPITRE : Valorisation du tourteau déshuilé de la noix du Brésil sous forme de lait végétal	99
IV.1.4.1 Introduction	99
IV.1.4.2 Résultats et discussion	100
IV.1.5 Conclusion	102
IV.2 DEUXIEME PARTIE : Production d'un aliment santé à partir du fruit Cambodgien <i>Morinda Citrifolia</i>	103
IV.2.1 Rappels des objectifs généraux	103
IV.2.2 Production du jus de <i>Morinda Citrifolia</i>	104
IV.2.2.1 Présentation du process général et des analyses réalisées	104
IV.2.2.2 Rendement en jus extrait à la presse hydraulique Sakaya	105
IV.2.2.3 Clarification du jus par micro-filtration tangentielle	105
IV.2.2.4 Concentration par osmose inverse du jus clarifié	106
IV.2.2.5 Composition du jus de <i>Morinda Citrifolia</i>	107
IV.2.2.5.1 Composition en matière sèche du jus	107
IV.2.2.5.2 Teneur en chlorophylle du jus de <i>M. citrifolia</i>	108
IV.2.2.5.3 Teneur en huile du jus de <i>M. citrifolia</i>	108
IV.2.2.5.4 Composition en glucides du jus de <i>M. citrifolia</i>	109
IV.2.2.5.5 Composition en anions minéraux et acides organiques du jus de <i>M. citrifolia</i>	110
IV.2.2.5.6 Composition en minéraux du jus et des fibres résiduelles	110
IV.2.2.5.7 Composition en acides aminés et teneur en protéines du jus initial	114

IV.2.2.5.8 Composition en acides gras de l'huile du jus brut	115
IV.2.2.6 Tableau récapitulatif de la composition du jus de <i>M.Citrifolia</i>	118
IV.2.2.7 Etude de la stabilité physique du jus de <i>M. Citrifolia</i>	119
IV.2.2.7.1 Stabilité de la couleur lors d'une pasteurisation à 70°C / 10 min	119
IV.2.2.7.2 Stabilité de la couleur des jus en fonction de la température de conservation	121
IV.2.2.7.3 Etude la turbidité des jus	122
IV.2.2.7.3.1 Turbidité des jus avant et après pasteurisation à 70°C/10 min	123
IV.2.2.7.3.2 Effet du temps de pasteurisation (5 à 60 min à 70°C) sur la turbidité des jus de Noni filtrés et centrifugés	123
IV.2.2.7.4 Mesure du spectre UV-Visible du jus de Noni	124
IV.2.2.8 Etude la stabilité microbiologique des jus après pasteurisation	126
IV.2.2.8.1 Etude la stabilité microbiologique des échantillons bouchés pasteurisés	126
IV.2.2.8.2 Etude la stabilité microbiologique sur des échantillons ouverts 1/4 d'heure avant analyse	127
IV.2.2.8.3 Etude la stabilité microbiologique des échantillons micro-filtrés pasteurisés conservés à 4 °C pendant une semaine	128
IV.2.2.9 Etude de la composition de la graine de <i>M. Citrifolia</i>	129
IV.2.2.9.1 Extraction de l'huile de la graine de <i>Morinda Citrifolia</i>	129
IV.2.2.9.2 Composition en acides gras de l'huile de la graine	129
IV.2.2.9.3 Composition de l'huile de la graine en stérols	131
IV.2.2.9.4 Composition en tocophérols de l'huile de la graine de <i>M. Citrifolia</i>	132
IV.2.2.9.5 Composition de la graine en cellulose brute	133
IV.2.2.10 Composition du tourteau obtenu après pressage du jus	134
IV.2.2.10.1 Comparaison de la composition en minéraux du culot fibreux, du jus et du tourteau de Noni	134
IV.2.2.10.2 Composition du tourteau en cellulose brute et lipides totaux	135
IV.2.2.10.3 Composition en acides gras de l'huile du tourteau	136
IV.2.2.11 Récapitulatif sur les rendements	138
IV.2.3 Conclusions sur le Noni	140

V CONCLUSION GENERALE 143

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 145

ANNEXES 175

ANNEXES A 175

A.1 Quantité de protéine obtenue à partir du mélange tourteau de noix du Brésil/eau (10g/150mL) à différents pH de solubilisation et à pH de précipitation.	175
A.2 Quantité de protéines obtenues avec une réduction de la quantité d'eau de 150 à 90 mL à partir du mélange tourteau de noix du Brésil/eau à pH de solubilisation fixé à 10 et à pH de précipitation fixé à 4 ou 5.	175
A.3 Quantité de protéine obtenue avec une augmentation du rapport tourteau de noix du Brésil/eau à 100g/1300mL et 1500 mL à pH de solubilisation fixé à 10 et à pH de précipitation fixé à 5	176
A.4 Quantité de protéine obtenue à partir de 10g de tourteau de noix du Brésil en réduisant la quantité d'eau à pH de solubilisation fixé à 10 et pH de précipitation fixé à 4 ou 5.	176
A.5 Quantité de protéine obtenue à partir de 10g de tourteau de noix du Brésil en réduisant la quantité d'eau à pH de solubilisation fixé à 10 et pH de précipitation	177

	fixé à 5 ou 5,5.	
A.6	Quantité de protéines obtenues à partir du rapport tourteau de noix du Brésil/quantité d'eau variable à pH de solubilisation fixé à 10 et pH de précipitation fixé à 5,5.	177
ANNEXE B :		178
Photo 1	Jus non pasteurisés : (1) jus initial non filtré, (2) retentât, (3) jus micro-filtré, (4) jus concentré par osmose inverse.	178
Photo 2	Jus filtrés pasteurisés : (1) = 70°C/10 min, (2) = 70°C/30 min.	179
ANNEXE C :		180
Figure 1	Courbes standards des phospholipides.	180
Figure 2	Chromatogramme sur couche mince ; E : huile de noix du Brésil, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, PA : acide phosphatidique.	181

INTRODUCTION GENERALE

Aliments-santé, nutraceutiques, aliments fonctionnels ou encore alicaments sont des termes qui définissent une nouvelle génération d'aliments-médicaments. Le principe est simple et existe déjà ; le nutraceutique est un aliment ou un produit qui a des propriétés thérapeutiques, voire même médicales (Amabilia, 2002). On trouve maintenant dans la grande distribution plusieurs aliments qui ont cette valeur-santé ajoutée. A titre d'exemple, on peut trouver des œufs qui contiennent des acides gras ajoutés, de la vitamine E, des jus renfermant de la vitamine C, des fibres, du fer ; de l'eau minérale enrichie en magnésium, etc.

1.2 Objectifs

Le but de ce travail est de développer des aliments-santé à partir de deux fruits tropicaux déjà utilisés traditionnellement par les populations locales, la noix du Brésil *Bertholettia excelsa* et le fruit Cambodgien *Morinda Citrifolia*.

Le fruit de la plante *Morinda Citrifolia* appelé également Noni, est connu depuis des milliers d'années et fait partie de la culture des habitants dans les régions tropicales, mais ce n'est que récemment qu'il a été présenté au grand public comme supplément alimentaire de santé. Les revendications faites à propos de ce fruit sont époustouflantes mais les théories actuelles qui en expliquent les effets positifs sont peu connues. Plus de 50 nutraceutiques ont été identifiés dans le Noni, mais l'élément le plus important du Noni est une molécule appelée pro-xéronine (Naturamedic, 2001).

La Pro-xéronine selon le Prof. Heinicke (2001) qui exerce à Tahiti et qui commercialise déjà du jus de Noni, est le précurseur d'un alcaloïde, la xéronine. Le fruit de Noni a la réputation d'être lié à la synthèse de la xéronine dans le corps humain et donc favorable à la santé. La teneur en alcaloïde du fruit de Noni est tenue pour être responsable de ses activités thérapeutiques. Les alcaloïdes sont des molécules organiques azotées qui ont un éventail d'activités pharmacologiques et biologiques dans le corps humain. Ils sont souvent à la base de nombreux médicaments (Heinicke, 2001).

La noix du Brésil est déjà valorisée de façon artisanale pour son huile qui contient plus de 70% d'acides gras insaturés, dont 41% d'acide linoléique et pour la teneur importante en sélénium de certaines espèces issues de certains biotopes.

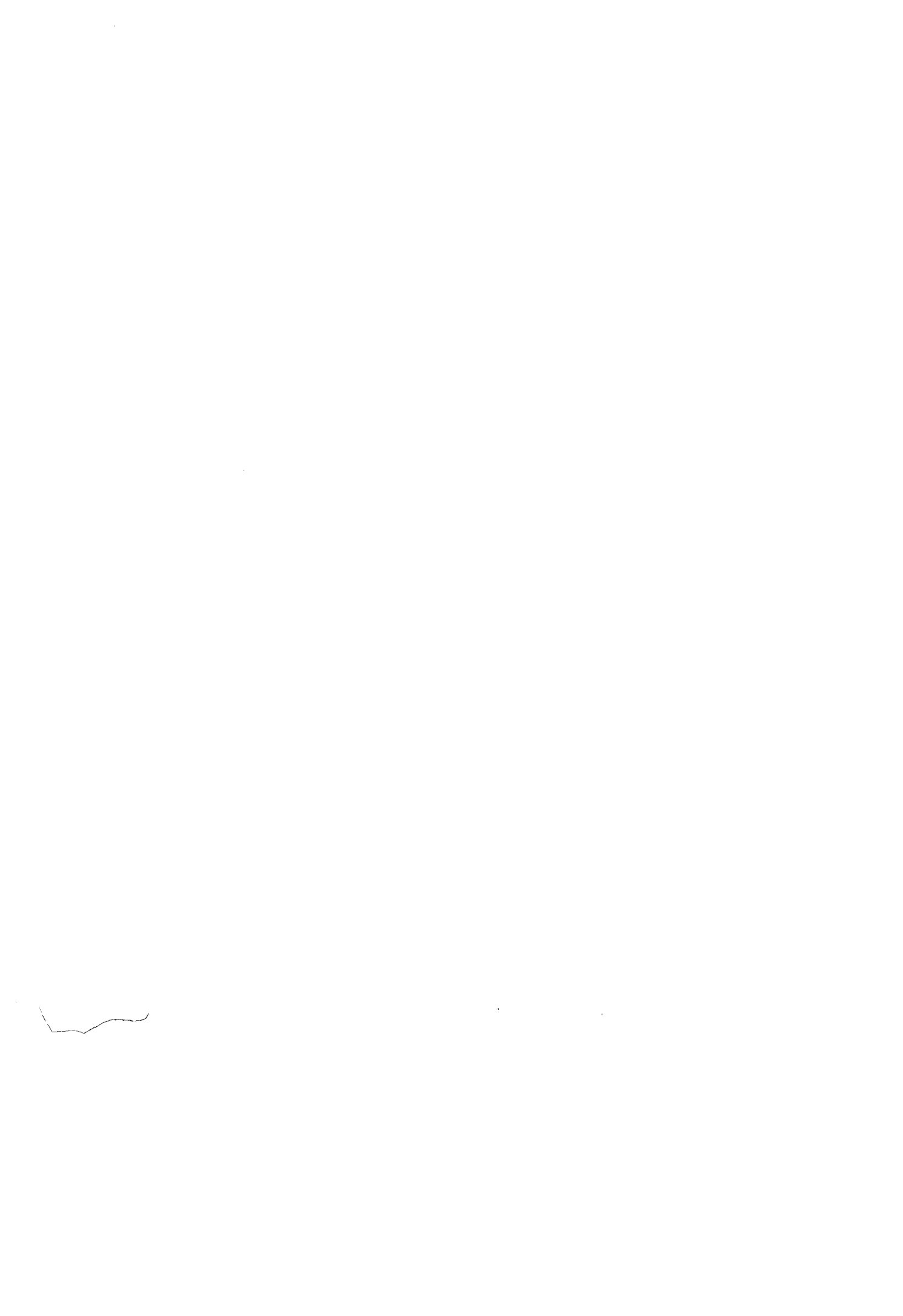
Le corps humain n'est pas capable de synthétiser l'acide linoléique, acide gras di-insaturé C18:2, qui est de ce fait dit essentiel ou indispensable (AGI). Il est donc favorable d'un point de vue nutritionnel de trouver cet AGI dans l'alimentation ou dans les produits cosmétiques.

En cosmétique, l'huile de *Bertholettia excelsa* est considérée comme un bon émollient et un bon hydratant. Elle pénètre facilement la peau et procure une sensation de confort. Elle est hypoallergénique. L'huile de noix de Brésil est obtenue par pression à froid des noix du Brésil.

Les fruits qui renferment ces précieuses noix sont récoltés sur l'arbre appelé *Bertholettia excelsa*. C'est un très grand arbre qui pousse à l'état sauvage dans la forêt tropicale Amazonienne.

Le renouveau actuel de l'intérêt porté à la noix du Brésil est dû à la présence importante de sélénium (Codina, 2002) dans certaines espèces. Le sélénium est un oligo-élément indispensable au corps humain, considéré maintenant comme un fort anti-oxydant. Le sélénium favorise l'action de la glutathion-péroxidase, enzyme qui joue un rôle important dans le ralentissement de l'oxydation des graisses qui est souvent à l'origine des maladies cardio-vasculaires.

Le sélénium est réputé agir sur les dommages dus aux radicaux libres, la prévention des cancers et plus particulièrement le cancer des poumons, avoir des effets significatifs sur l'humeur, la mémoire, l'anxiété et la dépression. Il augmente l'efficacité des cellules responsables de l'immunité, stimule l'activité sexuelle masculine, entretient la santé des cheveux et de la peau. Les hommes ont besoin de 75 et 200 µg de sélénium par jour (Info Nutrition.org, 2002).



**ETUDES
BIBLIOGRAPHIQUES**

II. ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

II.1 La noix du Brésil

Nombreuses sont les personnes qui connaissent la noix du Brésil. Ces noix proviennent d'un grand arbre de la forêt tropicale (*Bertholletia excelsa et nobilis*) éternellement vert de la famille des Lécythidacées répandu dans le bassin de la haute et moyenne Amazone, jusqu'en Bolivie (Figure 1).

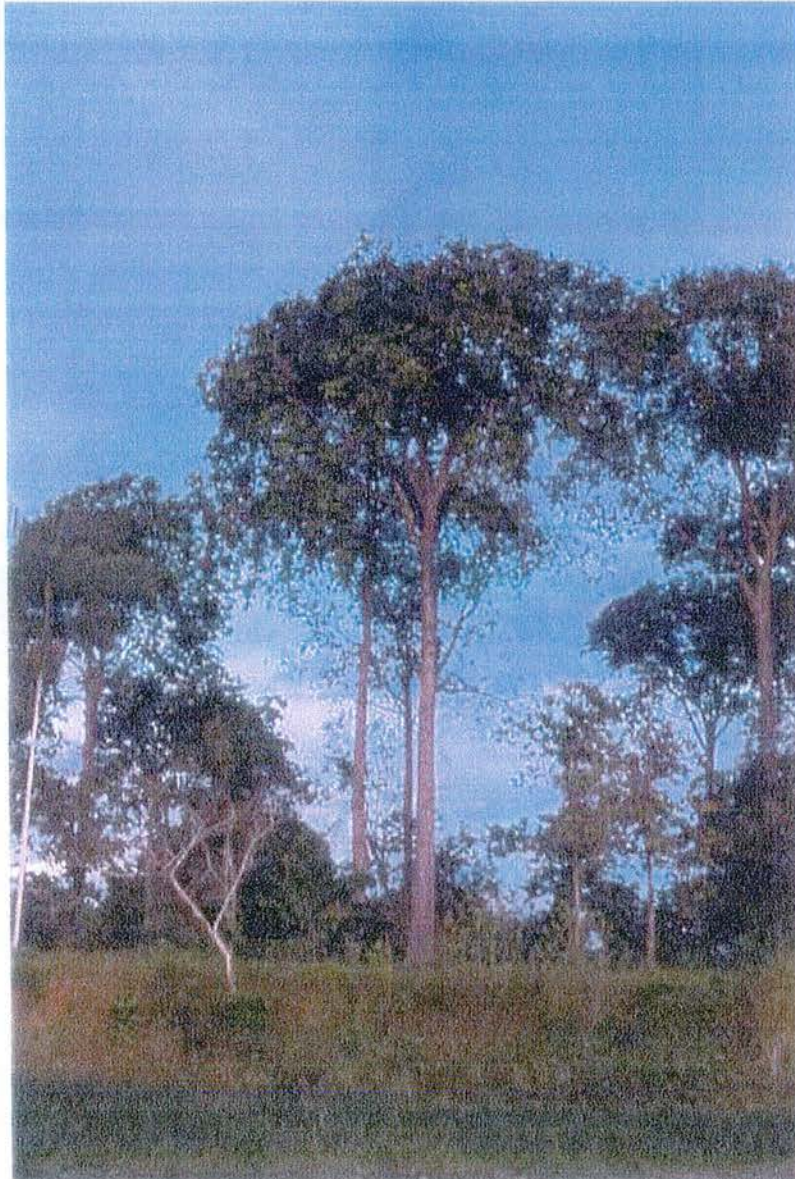


Figure 1 : Arbre producteur de noix du Brésil (Junglephotos, 2002).

Les arbres portant les noix, localement appelées "Castana", sont cultivés un peu partout en Amazonie. Elles sont une source de revenu importante pour les populations locales. Les noix se développent à l'intérieur d'une grande cabosse dont les noix sont disposées comme les segments d'une orange. Chaque cabosse contient environ 12 noix.

Les fleurs sont pollinisées par des chauves-souris, et les rongeurs tels que les agoutis qui facilitent la reproduction de l'arbre en enterrant les graines.

Les principaux pays producteurs de noix sont le Brésil, le Pérou, la Bolivie, la Colombie, le Venezuela et la Guyane. Les noix du Brésil sont généralement commercialisées en coques ou décortiquées (Figures 2 et 3) et sont consommées crues, grillées, salées, mélangées à des crèmes glacées, dans des chocolats et des produits de pâtisserie et de confiserie (Readysoft, 2002).

La noix du Brésil *Bertholletia excelsa* originaire du Brésil est une noix anguleuse, au fin goût de noisette, de noix de coco ou d'amande qui possède une coque très dure (Figure 2).



Figure 2 : Noix du Brésil *Bertholletia excelsa* entières (Aromatiques.tropicales, 2002).



Figure 3 : Noix du Brésil décortiquées (*Bertholletia excelsa*) (Csdm, 2002)

La première référence historique qui a été retrouvée remonte à 1569, lorsqu'un officier colon espagnol rassembla des milliers de ces fruits pour nourrir ses troupes exténuées et affamées. Les soldats récupérèrent rapidement grâce à la valeur énergétique élevée de la noix du fait de sa teneur élevée en lipides, en calcium, phosphore, potassium et vitamine B (Readysoft, 2002).

En 1633, un commerçant hollandais envoya un petit bateau chargé d'oléagineux sauvages du Brésil aux Pays Bas. Au XVIII^{ème} siècle, les habitants des Pays Bas continuèrent d'envoyer des cargaisons de noix de Maranhão "Castanhas de Maranhão".

En 1810, c'est le premier envoi vers les Etats Unis de la noix d'Amazonie qui accompagne depuis cette date le cacao et la noix de cajou. En 1818, des quantités importantes furent exportées de l'état de Para sous la dénomination "Para Nuts" vers les USA.

En 1866, la rivière Amazone fut ouverte au commerce étranger et la production de noix du Brésil fut développée en diversifiant les régions agricoles. La noix du Brésil devint une récolte vitale pour les régions Amazoniennes.

La noix du Brésil n'est pas encore très bien connue mais c'est pourtant l'un des premiers produits à être exporté du bassin Amazonien. C'est également le plus important revenu des habitants en Amazonie. La culture des arbres de la variété *Bertholletia excelsa* a donné lieu à de nombreuses expérimentations destinées à améliorer la taille des fruits, la couleur des fleurs et le nombre de noix contenues dans la coque (Sheabutter, 2002).

Les arbres gigantesques qui produisent la noix du Brésil poussent spontanément dans la vallée de l'Amazonie et jusqu'en Bolivie. Ces noix peuvent être produites par deux espèces d'arbres différentes :

- *Bertholletia excelsa* : Arbre de 30 mètres de haut avec de grandes feuilles vertes, des fruits allongés mélangés à des fruits étroits.
- *Bertholletia nobilis miers* : Arbre encore plus grand pouvant atteindre 50m, dont le tronc peut atteindre 5 m de circonférence. Ses feuilles sont de couleur brunâtre et ses fruits sont sphériques.

L'écorce est lisse chez les jeunes arbres et profondément sillonnée longitudinalement chez les arbres adultes. La cime est arrondie. Les inflorescences sont de couleur blanche crème et se situent au sommet de l'arbre.

Les fruits sont très gros et peuvent peser jusqu'à 3 kg. A maturité, la baie décortiquée atteint 10 à 12 cm de diamètre. Elle est charnue au niveau des zones internes et ligneuse dans les zones externes. Elle renferme 15 à 20 graines trigones ayant des arêtes vives. Les graines sont en fait de grosses coques contenant 12 à 18 noix. Ces noix ont une coquille grisâtre et mesurent un peu moins de 5 cm de long.

L'amande à l'intérieur est très blanche, de tégument brun foncé. Les graines des deux espèces d'arbre sont sensiblement les mêmes. Un arbre produit au plus 150 kg de noix par an. La propagation de l'espèce se fait naturellement. Si les fruits tombent dans une position favorable, alors les graines commenceront à germer. Une fois les graines libérées, la germination interviendra après 6 à 12 mois. Les amandes décortiquées contiennent de 50 à 75% d'huile (Antunes et Markakis, 1977 ; Smith *et al.*, 1992).

La récolte des noix se fait directement sur les arbres sauvages. Ces arbres poussent dans des zones ensoleillées sur un sol profond et humide. Les fruits mûrissent en novembre mais la récolte se fait seulement en janvier. Les amazoniens préfèrent en effet attendre la chute des fruits car il semblerait que l'amande soit alors de meilleure qualité. De toute façon, en raison de l'importante hauteur des arbres, la cueillette est toujours difficile. Le fait d'attendre la chute des fruits qui pèsent environ 3 kg rend le ramassage dangereux à la période de maturation.

Dès le mois de décembre, les cueilleurs ou "Castanheiros" font leurs bagages, prennent des provisions et partent en canot sur les rivières d'Amazonie. La période de cueillette tombe à la saison des pluies, le niveau de l'eau étant haut, il facilite les déplacements en barques. Le cueilleur navigue et accoste au plus près de la "Castanhal", terme qui désigne la cabane qui lui servira d'abri pendant toute la durée de la récolte. Elle est couverte d'un toit de feuilles de palmier.

La vie du castanheiro est dure et misérable. Il vit dans sa cabane avec sa famille pendant les saisons de récoltes, c'est à dire de février à juin. Il se nourrit de poissons, de fruits et de manioc bouilli. Ses conditions d'hygiène font qu'il est atteint de maladies tels que le paludisme et la dysenterie. Il possède souvent un animal domestique pour se protéger des jaguars, serpents ou autres animaux sauvages.

Le travail s'organise près de ces grands arbres à noix du Brésil. Le sol est d'ailleurs jonché de fruits mûrs. Le ramassage se fait lorsqu'il y a très peu de vent afin de limiter les risques d'accidents dus à la chute des fruits. Bien souvent, toute la famille participe à la récolte. Certains ramassent les fruits, d'autres les ouvrent au moyen d'une machette pour en extraire les châtaignes. Elles sont alors transportées à la cabane puis déposées dans des paniers ou hottes tressés sur place.

Ainsi, le fait d'ouvrir les noix en forêt permet d'éviter de transporter du poids superflus lors du retour du castanheiro dans son village.

Pour conserver les noix, il est nécessaire de les sécher. Le séchage est généralement une étape difficile puisque cette opération se fait durant la saison des pluies. La déshydratation permet d'éviter les moisissures qui peuvent produire des mycotoxines.

En vue de l'exportation, les noix sont tout d'abord mises en sachet de 20 kg sous vide ou sous azote puis les cartons sont expédiés vers l'Europe en conteneur. A l'arrivée, les noix sont triées et calibrées selon certains critères (couleur de la coque notamment, taille des noix...). Les noix sont généralement conservées au froid pour éviter le rancissement de l'huile.

Ce fruit de cueillette est consommé traditionnellement par les populations autochtones, mais il fait également l'objet d'une industrie locale (décorticage, conditionnement) et d'exportations (90 % de la production) en l'état vers les USA, l'Angleterre et l'Allemagne principalement. Il est consommé dans ces pays comme fruits sec de grignotage, ou comme matière première pour la confiserie, au même titre que les amandes ou les arachides.

Une estimation récente de la production mondiale de la noix du Brésil en coque est donnée par le tableau 1. Les trois pays d'Amazonie que sont le Brésil, le Pérou et la Bolivie sont les premiers pays producteurs mondiaux. Ils produisent à eux seuls la totalité des 20 000 tonnes de noix du Brésil disponibles sur le marché international. La Bolivie est le premier pays producteurs avec 10 000 tonnes et l'autre moitié de la production est partagé entre le Pérou 2.200 tonnes et le Brésil (7 800 tonnes). La Bolivie est également le premier pays exportateur de noix avec 75% des ventes (Tableau 2).

	Brésil	Bolivie	Pérou	Total
Production (tonnes)	7 800	10 000	2 200	20 000
Pourcentage	39 %	50 %	11%	100 %

Source : "Economic Viability of Brazil Nut Trading in Peru" (Collinson, Burnett et Agreda, 2000)

Tableau 1 : Production mondiale de la noix du Brésil

	Brésil	Bolivie	Pérou	Total
Million US \$	6,0	22,5	1,5	30.0
pourcentage	20,0%	75,0%	5,0%	100,0%

Source : Consejo Nacional de la castaña (Bolivia)-Conseil National Bolivien de la noix du Brésil (1999)

Tableau 2 : Exportations mondiales de la noix du Brésil.

La noix du Brésil rentre en compétition avec de nombreuses autres noix de bouche (Tableau 3). On entend par noix de bouche tout un groupe de graines poussant dans les régions à climat tempéré et tropical. Les noisettes, les arachides, les amandes et les noix de cajou dominent le marché, suivies par le coco râpé, les noix, les noix de pécan. La noix du Brésil est donc un acteur mineur du marché des noix de bouche, puisqu'elles ne représentent que 1,62% des volumes totaux échangés.

Noix de bouche	Principaux pays producteurs	Volume (tonnes)
Noisettes	Turquie, Italie	136 000
Arachides	USA, Inde, Argentine	731 000
Amandes	USA, Espagne	123 000
Noix de Cajou	Inde, Brésil	59 000
Noix	USA, Chine	61 000
Noix de coco	Phillippines, Sri Lanka	106 000
Noix du Brésil	Brésil, Bolivie et Pérou	20 000

Source : Dominguez, 1991 et Man Producten, Rotterdam 1999

Tableau 3 : Marché mondial des noix de bouche

Ses qualités nutritionnelles exceptionnelles, et en particulier sa richesse en sélénium et magnésium, acides aminés soufrés (Ampe *et al.*, 1986 ; Sun *et al.*, 1987) et l'équilibre de ses acides gras essentiels pourraient en faire un ingrédient essentiel entrant dans la composition d'aliments à fort potentiel nutritionnel.

D'un point de vue nutritionnel, la noix du Brésil est un aliment intéressant. Elle contient environ 66 % de lipides, 18,3% de glucides dont 8,3% de fibres et 13% de protéines. C'est également une bonne source de calcium avec environ 178mg/100g et de magnésium avec 318 mg/100 g (Tableau 4).

Constituants	Teneur (g/100g)
Eau	5,9
Protéines	13
Glucides disponibles	3,5
Glucides disponibles (monosaccharides)	3,7
Sucres	2,8
Amidon	0,7
Fibres	8,3
Lipides	66
Acides gras saturés	16,1
Acides gras mono insaturés	23,0
Acides gras polyinsaturés	24,1
Sodium	0,002
Magnésium	0,318
Phosphore	0,595
Potassium	0,680
Calcium	0,178
Fer	0,003
Vitamine E	0,007
Thiamine	0,001
Riboflavine	0,00008
Niacine	0,0008
Acide pantothénique	0,00024
Vitamine B6	0,00021
Folate	0,012
Valeur énergétique	2722 KJoules

Tableau 4 : Composition et valeur énergétique des noix du Brésil (Sheabutter, 2002)

L'huile de noix du Brésil est une huile alimentaire. L'huile obtenue après pression mécanique à froid de la noix est de couleur très claire. Elle devient jaune foncé lorsqu'elle subit une légère augmentation de température. La noix peut être légèrement chauffée pour faciliter l'extraction de l'huile. L'huile est ensuite décantée et filtrée pour donner une huile dorée de grande finesse. Eventuellement selon la demande, l'huile peut être raffinée (Sheabutter, 2002).

L'huile de la noix du Brésil a une odeur et un goût plaisant et doux. Elle est souvent employée dans des shampoings, des savons et des lotions capillaires. On peut la trouver également dans des produits de soin de la peau où elle agit comme hydratant ou émollient (Hennessey, 2001). L'huile pénètre facilement la peau et procure une sensation de confort, (Codina, 2002).

L'huile de Noix du Brésil contient plus de 70 % d'acides gras insaturés dont 33,6 % d'acide oléique et 41,0 % d'acide linoléique (Tableau 5).

Acides gras		%
Acide palmitique	C16:0	15,0
Acide palmitoléique	C16:1	0,3
Acide stéarique	C18:0	10,2
Acide oléique	C18:1	33,6
Acide linoléique	C18 :2	41,0
Acide linoléinique	C18:3	0,1
Acide Arachidique	C20:0	----

Tableau 5 : Composition en acides gras de l'huile de noix du Brésil (Sheabutter, 2002)

Son indice de saponification est de 180-200 et son indice d'iode de 95-110. Sa teneur en tocophérols est 21,5 mg/100g (Huile, 2002). Sa composition en tocophérols est donnée par le tableau 6.

Tocophérols	%
α -tocophérol	16,2
γ -tocophérol	83,8
δ -tocophérol	traces

Tableau 6 : Composition en tocophérols de l'huile de noix du Brésil (Sheabutter, 2002)

Mais la particularité la plus importante est que les noix contiennent une quantité substantielle de sélénium. Le sélénium est un antioxydant reconnu dont la teneur dans certaines variétés de noix du Brésil excède la dose journalière recommandée par l'USDA.

Les teneurs en sélénium signalées, 16-30 µg/g (Ip et Lisk, 1994) et 35 µg/g (Vonderheide *et al.*, 2002) font de cette graine un aliment qualifié de bénéfique comme protecteur anti-radicalaire ou anti-cancer (Thorn *et al.*, 1978; Ip et Lisk, 1994). Les apports journaliers observés sont de 30 à 220 µg/jour (48 en France). Les apports journaliers recommandés sont calculés à partir de ces données et vont de 1 à 5 µg de sélénium par kg de poids corporel. On relève peu de cas de toxicité liée au sélénium dans l'alimentation, et des études mentionnent 500 µg/jour comme un apport journalier maximum sur du long terme.

Les fonctions principales du sélénium dans le corps qui ont été découvertes jusqu'ici sont résumées par le Dr Clarke (2000) de l'université d'Arizona. Le sélénium est trouvé dans le site actif de nombreuses enzymes telles que la thiorédoxine réductase, qui catalysent des réactions d'oxydation/réduction. Une enzyme qui aide à empêcher le processus d'oxydation, la glutathion peroxydase a besoin de sélénium pour sa formation. Le sélénium semble améliorer le fonctionnement du système immunitaire et sa réponse aux infections. Il semble favoriser la formation des cellules tueuses naturelles, qui détruisent les bactéries étrangères infectant le corps. Les enzymes P450 qui aident à détoxifier quelques substances pro-cancéreuses peuvent être induites par le sélénium. Le sélénium inhibe l'action des prostaglandines qui sont responsables des réactions inflammatoires dans le corps. La fertilité masculine peut être augmentée par le sélénium qui favorise la mobilité du sperme. A doses élevées, le sélénium peut diminuer le taux de croissance des cellules tumorales.

Le sélénium peut être toxique aux doses très élevées. La toxicité chez l'homme a été rarement observée. Cependant, la toxicité a été rapportée dans les régions du monde où les niveaux d'ingestion de sélénium sont extrêmement élevés. Les symptômes observés de cette toxicité chez l'homme incluent l'augmentation de la fragilité des ongles ou des cheveux, les éruptions cutanées, les sensations d'aiguilles, l'irritabilité, la nausée ou le vomissement. On a observé ces effets secondaires dans approximativement 10% des sujets chinois consommant un régime avec plus de 1000 µg/jour de sélénium.

Un des objectifs de ce travail est de montrer que le sélénium est lié de façon covalente aux différentes fractions protéiques du tourteau de la noix du Brésil. Pour réaliser cette étude, nous avons travaillé avec des échantillons de noix du Brésil très riches en sélénium fournis par la société JBA (Castries, France). En effet, ces échantillons de noix issus d'un biotope particulier, contiennent plus de 120 ppm de sélénium.

Les protéines de la noix ont tout d'abord été fractionnées par affinité pour différents solvants (Landry et Moureaux, 1970 ; Landry *et al.*, 1972 ; Landry, 1979 ; Sun *et al.*, 1987 ; Ampe *et al.*, 1986) puis un couplage HPLC/spectrométrie de masse (Ganther *et al.*, 1984 ; Léonil *et al.*, 2000) a été utilisé pour confirmer la présence de sélénocystéine et sélénométhionine dans les protéines (Petritis *et al.*, 2000). Afin de protéger les acides aminés, l'hydrolyse des protéines a été réalisée par voie enzymatique en utilisant des protéases (Villanueva *et al.*, 1999).

Les noix ont été valorisées de deux façons, la première a été la fabrication d'aliments synergiques par notre partenaire Althéus (Lyon, France), filiale de JBA et la deuxième sous la forme d'un lait végétal qui a donné lieu à la rédaction d'un chapitre dans cette thèse.

II.2 Le Noni ou *Morinda citrifolia*

Le Noni (*Morinda citrifolia*) possède une longue histoire liée à des utilisations médicales dans la plupart des pays du sud-est asiatique, en Malaisie, en Polynésie et en Inde et son pourtour où cette plante tropicale pousse naturellement. On pense que c'est la plante qui a été la plus utilisée avant l'ère des médecines européennes modernes (Whistler, 1992).

Le genre *Morinda*, de la famille des Ribiaceae, inclut environ 80 espèces, dont la majorité provient d'Europe. A l'époque de Guppy (1917), il n'y avait que 50 espèces connues, et il avait estimé que 60% étaient confinées dans les îles, dans le Malaya et dans la zone des océans Indien et Pacifique, et que pas plus de 15% des espèces se trouvaient en Amérique (Guppy, 1917). Aujourd'hui, il semble que moins de 20 espèces soient reconnues comme ayant une valeur économique. Une espèce est la reine du genre, pour ses remarquables caractéristiques, ses multiples utilisations, et sa répartition sur la plupart des côtes sans avoir été disséminée par l'homme. Cette merveilleuse plante est *Morinda citrifolia* L. (Morton, 1992).

Originaire du sud-est Asiatique, le Noni a été domestiqué et cultivé par les Polynésiens, d'abord à Tahiti et aux Marquises, et également sur le lieu le plus éloigné où cette plante est trouvée, Hawaï. Aujourd'hui, le Noni pousse dans la plupart des régions du Pacifique sud, en Inde, aux Caraïbes, en Amérique du sud et aux Antilles.

Un des challenges de ces dernières années est de transformer le jus de *Morinda citrifolia*, qui est un médicament traditionnel issu de la botanique en médicament plus moderne. Cette plante est en effet connue des populations du monde tropical comme un médicament pouvant soigner divers maux. En Malaisie, il est appelé Mengkudu, dans le sud-est Asiatique, Nhau ; dans les îles du Pacifique sud, Nonu au Samoa et Tonga; Nono au Raratonga et Tahiti; Noni aux îles Marquises et Hawaï (Heinicke, 2001).

Morinda citrifolia est un arbre qui pousse jusqu'à dix mètres de haut, avec une couronne brillante irrégulière, des feuilles vert sombre qui sont généralement par paires, excepté lorsqu'elles se transforment en fruit (Hmt, 2001).

Cet arbre est l'un des rares arbres fruitiers de la création qui produit des fruits 365 jours par an. Certains arbres peuvent produire jusqu'à deux tonnes de fruits par mois (Cam, 2001).

L'arbre possède une écorce marron clair à gris clair et son bois est peu coloré. Il fleurit plusieurs fois par an, produit des fleurs petites à cinq pétales. Les fleurs forment une tête globulaire, d'environ 2 cm de long. La tête des fleurs se transforme en fruit mature de 7 à 10 cm de diamètre.

Les fleurs ont une odeur sucrée agréable. *Morinda citrifolia* donne des fruits en toutes saisons. Ces fruits sont épais et de forme ovoïde avec des nervures circulaires. Ils mesurent 20 cm de long (Figure 4). Ils sont verts lorsqu'ils ne sont pas mûrs et jaunâtre-blanc lorsqu'ils sont totalement mûrs. Les fruits ont une chair molle et aqueuse, et un arôme de fromage qui devient de plus en plus prononcé et piquant pendant le processus de maturation (Hmt, 2001).



Figure 4 : Le fruit de *Morinda citrifolia* (Noniusers, 2002)

Les fruits de Noni contiennent environ 52% d'eau, 24-158 mg d'acide ascorbique pour 100 g de matière sèche. Des terpènes ont été mis en évidence par Peerzada *et al.* (1990). Les feuilles contiennent 2,6 à 3,9% de protéines (Terra, 1966).

La racine et l'écorce de l'arbre de Noni sont également la source d'un colorant naturel utilisé pour teinter les tissus. Cette utilisation était populaire en Polynésie, en Asie et en Europe jusque dans les années 1950. Selon le fixateur avec lequel il était mélangé, le colorant de Noni pouvait donner une couleur jaune, rouge ou pourpre. De l'Italie à l'Inde, la teinture de Noni a servi à colorer les tapis, les chemises et les turbans (Kilham, 2001).

II.2.1 Les principales actions médicales du Noni

Les principales propriétés médicinales connues du Noni sont : antibactérienne, analgésique, anticongestive, antioxydant, anti-inflammatoire, astringent, émoullient, laxative, sédative et hypotenseur.

II.2.2 Quelques propriétés chimiques du Noni

Levand et Larson (2003) de l'université de Guam et Hawaï, rapportent que : "le Noni possède de nombreux constituants chimiques intéressants". Il y a tout d'abord une gamme de terpènes, ont été identifiés pour leurs dérivés actyl. Les acides caproïque et caprylique qui sont responsables d'odeurs désagréables ont également été isolés.

Le carbonate d'alizarine, l'acide rubichlorique, le chrysophanol, des résines de stérols sont également cités.

Dans les feuilles de Noni, la plupart des acides aminés ont été retrouvés : alanine, arginine, acide aspartique, cystéine, glycine, acide glutamique, histidine, leucine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine et valine. On rapporte aussi la présence d'antraquinones, de glycosides, de composés phénoliques, des résines de β -sitostérols et de l'acide ursolique.

Dans le fruit sont trouvés les acides caproïque et caprylique, des huiles essentielles, du pentacétate de β -D-glycopyranose, de l'aspérulocide tetra acétate et de l'acide ascorbique en quantité importante.

II.2.3 Les effets pharmacologiques du jus de Noni

De nombreux composés à activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella paradysenteriae* et *Staphylococcus aureus* comme l'aucubine ont été identifiés.

Le jus de Noni a des effets bénéfiques sur le système immunitaire, sur la croissance des tumeurs, il normalise les fonctions physiologiques au niveau cellulaire et stimule la régénération des cellules, il permet de lutter contre les douleurs, réduit les inflammations et favorise le transit intestinal sans les effets secondaires des médicaments usuels.

Le Dr. Heinicke (2001) qui s'est rendu célèbre grâce à cette plante affirme que le jus de cette plante contient de la xéronine qui a le pouvoir de soigner différentes maladies comme le cancer, le vieillissement, l'arthrite et l'hypertension. Un lien avec les douleurs dues à l'arthrite pourrait être lié à la digestion totale des protéines qui cristalliseraient et provoqueraient des douleurs dans les articulations. Cette activité hydrolytique des protéines serait due au fait que la xéronine favoriserait certaines activités enzymatiques.

Une étude conduite par une équipe de l'Université de Hawaï en 1994 relate les activités anti-cancer du Noni en particulier contre le cancer des poumons sur des souris de laboratoire. Les conclusions de cette recherche mettent en avance les effets positifs sur le système immunitaire qui agirait sur les cellules malignes en améliorant les activités des macrophages et lymphocytes. Des études similaires ont été conduites au Japon (Allnaturalcentral, 2001).

Le damnacanthol, un autre composé du jus de Noni, a montré sa capacité à bloquer les fonctions cellulaires des cellules pré-cancéreuses (Allnaturalcentral, 2001).

Les Polynésiens utilisent le jus de *Morinda citrifolia* (Noni) comme médicament traditionnel depuis plus de 2000 ans. Les mécanismes thérapeutiques demeurent cependant toujours inconnus (Wang *et al.*, 2001).

Dans le sud du Vietnam, les racines sont communément employées dans la médecine locale. Les racines et les feuilles de *Morinda citrifolia* L. sont utilisées à Maurice, au Tangatapu, au Vietnam, aux Philippines et en Inde comme analgésique ou anti-rhumatique et également pour le traitement de problème urinaire (Chopra *et al.*, 1956 ; Quan, 1975; Adjanohoun *et al.*, 1983 ; Singh *et al.*, 1984 ; Singh *et al.*, 1986). De nombreux auteurs ont démontré que les racines de *M. citrifolia* ont des actions anti-hypertensive (Younos *et al.*, 1990).

Au Cambodge, les racines râpées trempées dans l'alcool sont utilisées pour arrêter les vomissements dus au choléra (Petelot, 1953). Les feuilles, broyées avec des épices, sont données pour arrêter la diarrhée et la dysenterie chez l'adulte; les feuilles mélangées à de la moutarde sont prescrites contre la diarrhée chez les enfants (Dastur, 1952)

Dixon *et al.* (1999) ont interviewé 185 scientifiques qui ont identifié un total de 346 médicaments issus du fruit de Noni qui vont du traitement de certaines maladies spécifiques comme le diabète à des traitements plus généraux comme la purgation du corps.

Au Cambodge, le fruit mûr de *Morinda citrifolia*, est mis en conteneur où il se décompose et fermente. Le jus âcre et de couleur ambre qui est extrait sur le dessus du conteneur est consommé tous les jours comme un prophylactique pour favoriser la vitalité et le bien être. En médecine traditionnelle, au Cambodge, le jus du fruit mûr devient de plus en plus populaire pour stabilisé la teneur en sucres dans le sang dans les cas de diabète chez les adultes, les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maux de tête, l'arthrite et les maladies dégénératives. De nombreux marchands ont cru au Noni et cela a stimulé le marché et créé une confusion sur ce qui est vraiment connu sur ce fruit.

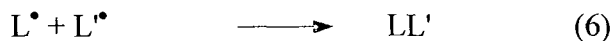
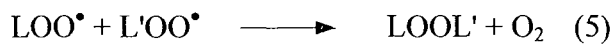
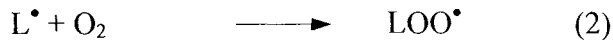
II.3 Les molécules d'intérêt

II.3.1 Généralités sur l'oxydation

L'utilisation des antioxydants dans les aliments est aujourd'hui en pleine expansion. Une des principales raisons de l'utilisation des antioxydants est l'apparition de rancidité due à l'oxydation des lipides dans les aliments.

Les aliments peuvent être oxydés selon deux processus basiques : l'autoxydation et la photo-oxydation. Afin de comprendre le mécanisme de protection des aliments par les antioxydants, il est important de rappeler les mécanismes de base de ces deux formes d'oxydation.

L'autoxydation se passe en trois étapes (Shahidi et Wanasundara, 1992) ; Ces trois étapes peuvent être résumées ainsi :

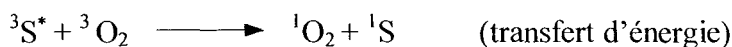
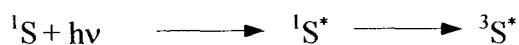


Lors de l'initiation (Equations 1 et 2), les acides gras (LH) forment un radical libre (L[•]) qui réagit ensuite avec l'oxygène (O₂) pour former un radical peroxy (LOO[•]). L'oxygénation du radical libre (L[•]) en radical peroxy est très rapide ; LOO[•] est donc le premier produit de l'autoxydation.

La propagation (Equation 3) met en jeu la même réaction commencée lors de l'initiation en l'accélérateur. A ce stade, le radical peroxy supprime un atome d'hydrogène d'un acide gras adjacent pour produire un radical libre. Le radical libre produit (L[•]) peut alors s'oxygéner, en formant un radical peroxy qui permet d'accélérer le cycle d'oxydation.

La terminaison est le stade lors duquel les radicaux libres (Equation 4 à 6) commencent à réagir entre eux pour former des espèces chimiques non radicalaires. Les hydroperoxydes (LOOH) peuvent aussi se décomposer pour produire des alcools, des aldéhydes, des acides, des cétones et d'autres substances dérivant des premières. La terminaison complète le premier cycle de l'autoxydation des lipides; Ensuite, il y a de nouveau une initiation et le cycle se répète à nouveau. Ce phénomène se continue à l'infini ou tout au moins jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de substrat disponible.

La photo-oxydation ou oxydation photosensible se produit dans les aliments selon le mécanisme suivant (Gollnick, 1968) :



Dans ce mécanisme, ³S^{*}, une molécule sensible comme la chlorophylle, absorbe les rayons ultraviolet (UV) et l'énergie (hν) et devient excitée et passe à un stade énergétique supérieur (³S^{*}). La molécule sensible excitée revient ensuite à son stade énergétique de base sous forme (¹S) ou, plus important, subit un croisement inter-système et transfère son énergie au plus bas état vibratoire d'énergie de l'oxygène (³O₂), provoquant la montée de l'énergie de l'oxygène vers une énergie vibratoire plus haute définie comme un oxygène singulet (¹O₂) (Foote,

1976). L'oxygène singulet, qui est devenu extrêmement électrophile, peut directement attaquer les acides gras insaturés, dont les doubles liaisons ont une haute densité électronique. Il en résulte un radical peroxyde (LOO[•]) et finalement des hydroperoxydes (LOOH).



La vitesse de photo-oxydation est beaucoup plus rapide que celle de l'autoxydation (Shahidi, 1997).

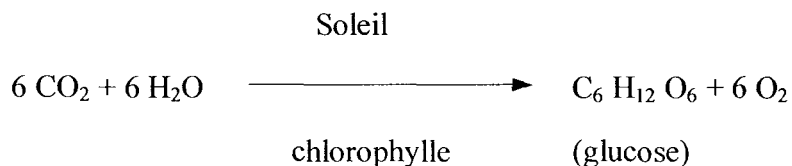
Le consommateur devient de plus en plus concerné par l'utilisation des antioxydants synthétiques par l'industrie alimentaire, comme le butyl hydroxyanisole (BHA) et le butyl hydroxytoluène (BHT), qui peuvent avoir des propriétés carcinogènes (Chen *et al.*, 1992). Devant le danger présenté par certains antioxydants, la recherche s'est focalisée sur le développement et l'utilisation d'antioxydants provenant du monde végétal.

Les huiles végétales sont des produits naturels complexes composées d'un mélange de triglycérides, monoglycérides, diglycérides, insaponifiables, tocophérols, chlorophylles, phospholipides, protéines et de nombreux autres composants mineurs (Xu *et al.*, 1992 ; Singleton, 1993).

Les composés mineurs comme les acides gras libres, les phospholipides, les tocophérols, les stérols, et les traces de métaux ont été étudiés pour leur capacité à jouer un rôle dans l'oxydation. (Trost, 1989 ; Duh, 1999).

II.3.2 Les Chlorophylles

La chlorophylle est un pigment vert photosynthétique présent dans les chloroplastes qui fournit l'énergie nécessaire à la photosynthèse. La couleur verte intense de la chlorophylle est due à sa forte absorbance dans le rouge et le bleu du spectre électromagnétique. Elle est capable de transformer l'énergie de la lumière en énergie chimique grâce à la photosynthèse. Par ce procédé, l'énergie absorbée par la chlorophylle transforme le dioxyde de carbone et l'eau en carbohydrates et oxygène.



Structure chimique de la chlorophylle

La chlorophylle est un pigment porphyrinique, comme l'hème notamment. Au centre de l'anneau se trouve un ion magnésium. La chaîne latérale varie avec le type de chlorophylle. La chlorophylle *a* est toujours trouvée dans les végétaux alors que les chlorophylles *b* et *c* ne sont trouvées que dans certains d'entre eux.

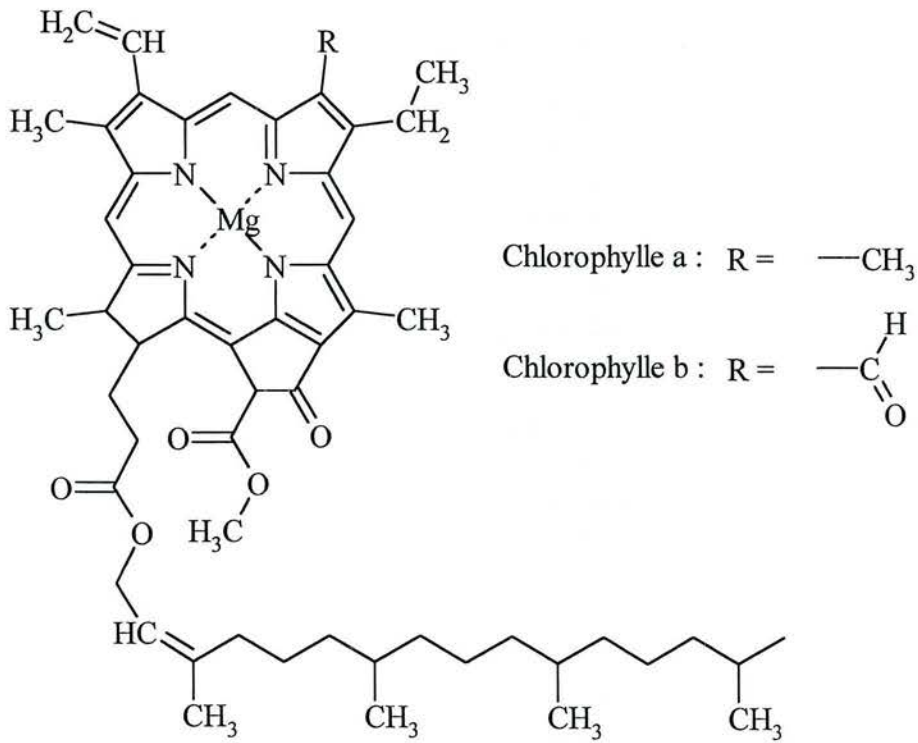


Figure 5 : Structure commune des chlorophylles a et b (Gened.emc.maricopa, 2001)

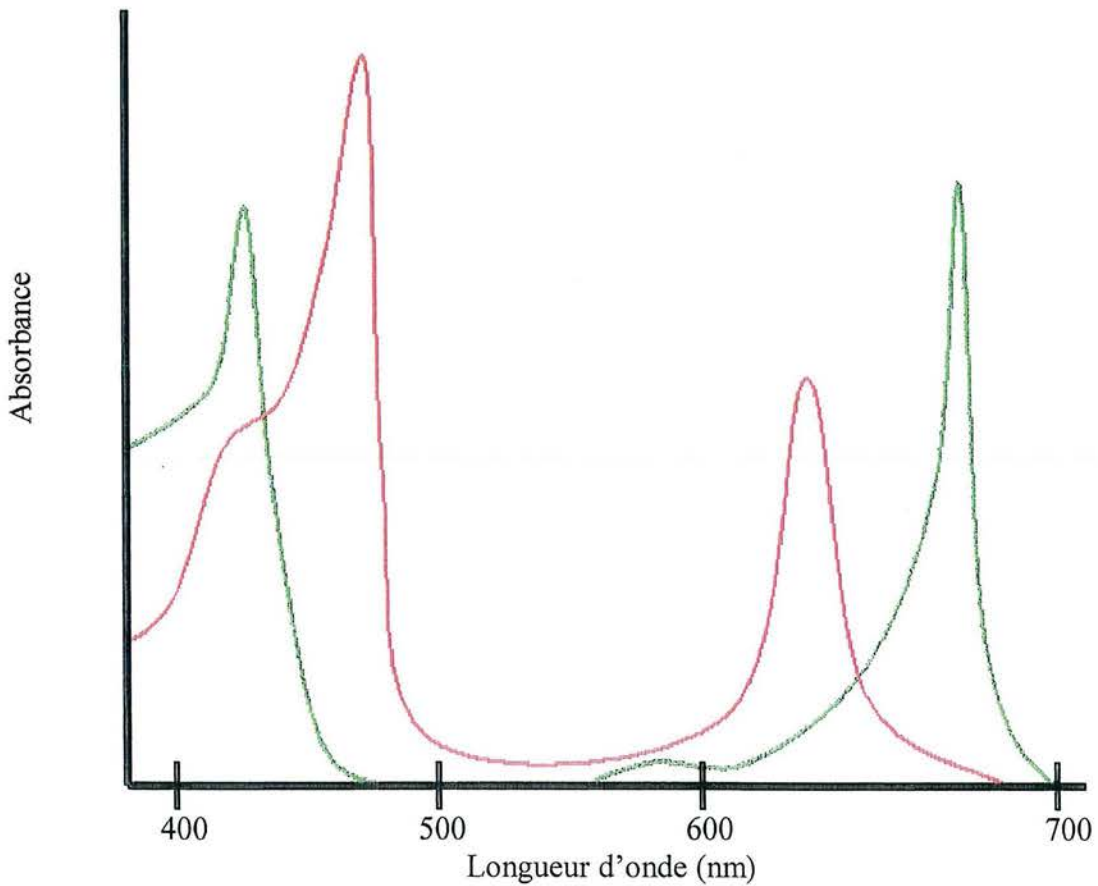


Figure 6 : Spectre d'absorbance des chlorophylles a (vert) et b (rouge) (Wikipedia, 2001).

Mise en évidence de la relation lumière-chlorophylle

Il peut être facilement montré que la chlorophylle est essentielle pour la photosynthèse en détachant les feuilles d'une plante et en les exposant à la lumière pendant plusieurs heures. Les feuilles de la plante ont des secteurs verts qui contiennent la chlorophylle et des secteurs blancs qui n'en ont pas. En testant les feuilles avec une solution d'iode, un changement de couleur montre la présence d'amidon qui est seulement présent dans les régions de la plante verte qui contiennent de la chlorophylle. Ceci prouve que la photosynthèse ne se produit pas dans les secteurs où la chlorophylle est absente, et soutient donc la théorie que la présence de la chlorophylle est une condition pour que la photosynthèse ait lieu (Wikipedia, 2001).

La chlorophylle (du grec chloros "vert jaunâtre") est un pigment vert étonnant des plantes, qui transforme l'énergie du soleil en sucres nutritifs. La chlorophylle est riche en traces de minéraux et a presque la même composition chimique que le sang humain. C'est une sorte de lumière liquide. C'est le sang de la plante.

La photosynthèse est le processus par lequel les plantes fabriquent leur propre nourriture, convertissant les minéraux absorbés du sol en vitamines, graisses, protéines et amidons.

Les couches externes de la chlorophylle et de l'hémoglobine sont semblables, sauf que son centre est un atome simple de magnésium. La chlorophylle, comme l'hémoglobine, est un chélate, ayant un ion métallique intégré à une molécule organique (Inde Guzman, 2002). Plus la plante est verte, plus la quantité de chlorophylle est grande et plus le contenu en minéraux et en vitamine est élevé. Elle contient du potassium qui est à la base de la croissance et la régénération des muscles. Sa haute teneur en calcium est excellente pour les os, la peau, les ongles, et la croissance de cheveux. Le fer favorise la formation des cellules du sang et empêche la coagulation du sang. La chlorophylle possède quatre qualités importantes :

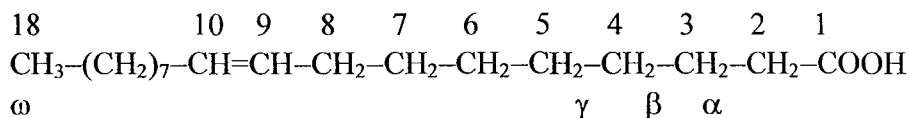
- Nettoyant et curatif, lutte contre les toxines, accélère l'activité des cellules des tissus et la croissance normale des cellules qui aide le corps à guérir plus rapidement; lutte contre le cancer, empêche la croissance et le développement des bactéries toxiques.
- Santé du système digestif : équilibre le pH, antiseptique naturel de la région intestinale qui reste sans modification jusqu'à ce qu'elle atteigne le petit intestin, réduit l'acidité qui produit la putréfaction dans les intestins.
- Nutrition et digestion : Abaisse le cholestérol, équilibre la flore intestinale, augmente le fer qui passe dans le lait des mères allaitantes, aide dans le contrôle du glucose dans le sang chez les diabétiques, hypoglycémique, aide au contrôle du niveau de calcium dans le sang. La chlorophylle aide à contrôler les pertes mensuelles de calcium.
- Purification : prévient la constipation, agit comme un agent nettoyant pour le corps, aide à purifier le foie et à éliminer les drogues, les produits chimiques dispersés dans les aliments, les arômes artificiels, les colorants et autres molécules qui peuvent être stockés dans le foie (Grace, 2001).

II.3.3 Les Acides Gras

Les acides gras sont largement répandus dans les plantes. On les rencontre à l'état libre ou sous forme estérifiée. Les acides gras sont des acides monocarboxyliques ayant une chaîne hydrocarbonée non ramifiée et de longueur variée. Les acides gras naturels peuvent être saturés ou insaturés.

Les acides gras saturés ont sur tous les atomes de carbone la totalité de leurs liaisons covalentes occupées par des atomes d'hydrogène. Les acides butyrique en C₄, caproïque en C₆, caprique en C₈, palmitique en C₁₆, arachidique en C₂₀ sont des exemples d'acides gras saturés.

Les acides gras insaturés possèdent des doubles liaisons entre certains carbones. L'acide oléique en C₁₈ possède une double liaison, l'acide érucique en C₂₂ également, l'acide linoléique en C₁₈ a deux doubles liaisons, l'acide linoléinique en C₁₈ a trois doubles liaisons, l'acide arachidonique en C₂₀ a quatre doubles liaisons. Les acides gras saturés ont pour formule brute C_nH_{2n+1}COOH. Les acides gras insaturés qui ont une seule double liaison sont décrits par la formule brute C_nH_{2n-1}COOH. La numérotation des carbones dans la molécule commence par le carboxyle COOH terminal dont le carbone reçoit le numéro 1 (C1). Le carbone voisin (C2) est désigné par le carbone α. Le carbone du méthyle situé à l'autre extrémité de la chaîne hydrocarbonée est désigné par le carbone ω :



La place de la double liaison dans les noms des acides gras est marquée par le signe Δ (le signe Δ⁹ signifie une double liaison entre carbones 9 et 10).

Dans les acides gras insaturés, deux formes stéréoisomériques sont possibles selon l'orientation de la double liaison : les isomères *cis* et *trans*. Dans la forme *cis*, les substituants homogènes sont situés du même côté. Dans la forme *trans*, ils sont situés sur les côtés opposés de la double liaison (figure 7). La forme *cis* est prédominante chez les acides gras naturels.

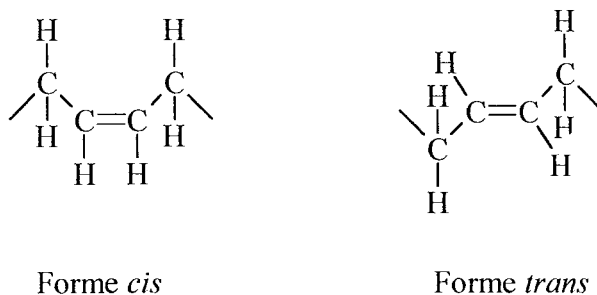


Figure 7 : Formes *cis* et *trans* de la double liaison dans les acides gras insaturés (Rakipov, 1987)

Les acides gras majeurs des plantes sont des acides monocarboxyliques saturés ou non avec une chaîne hydrocarbonée non ramifiée toujours à nombre pair de carbones (Tableau 7). Les acides gras insaturés ont des doubles liaisons principalement sous forme *cis*.

Nom	Symbole	Formule structurale	Point de fusion (°C)
Acide laurique	C12 :0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	+ 43,5
Acide myristique	C14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	+ 54,4
Acide palmitique	C16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	+ 62,9
Acide stéarique	C18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	+ 69,6
Acide oléique	C18 :1 (9c)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	+ 13,4
Acide linoléique	C18:2 (9c,12c)	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₂ (CH ₂) ₇ COOH	- 5,0
Acide α-linolénique	C18:3 (9c,12c,15c)	CH ₃ (CH ₂ CH=CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOH	-11,0

Tableau 7 : Acides gras majeurs des plantes (Rakipov, 1987)

NB : Entre parenthèses est mis le numéro d'ordre du carbone (en commençant par le carboxyle) auprès duquel se trouve la double liaison. La lettre *c* ou *t* qui suit immédiatement le chiffre, correspond à la forme *cis* ou *trans*.

Ce sont les acides palmitique, oléique et linoléique qui prédominent dans les plantes. Les lipides des chloroplastes sont riches en acide α-linolénique. L'acide linoléique di-insaturé et l'acide linoléique en C18:3 ne sont synthétisables que par les plantes. Pour l'homme et les animaux, ils sont donc essentiels ou indispensables. Les besoins de l'homme en ces acides sont minimes, environ 1 g par jour pour l'acide linoléique. L'acide arachidonique est synthétisé dans l'organisme humain à partir de l'acide linoléique et est donc également considéré comme indispensable (Figure 8).

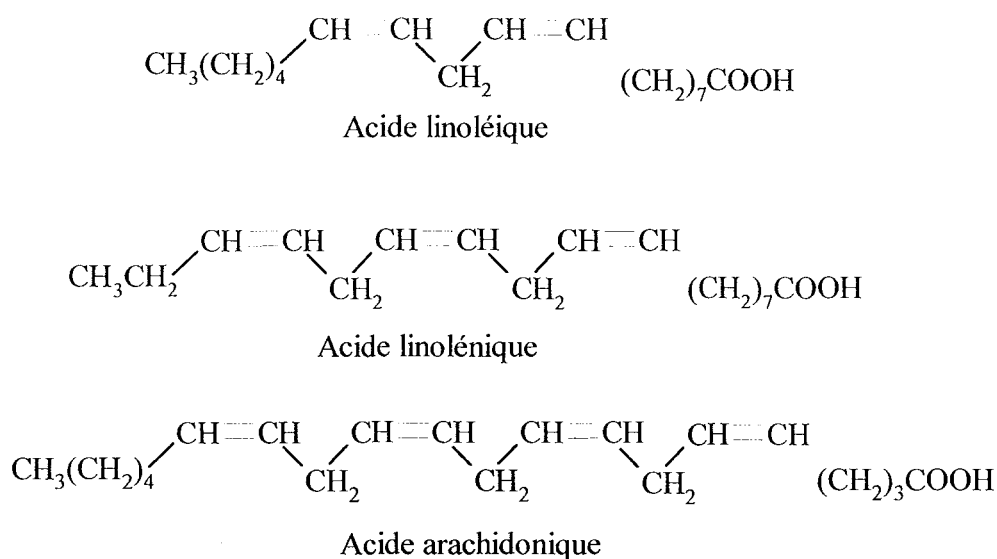


Figure 8 : Acides gras essentiels (Rakipov, 1987)

Néanmoins, des acides en C₁₅ et C₁₇ ont été découverts dans la nature. Parmi les acides gras *cis*- Δ^9 -mono-insaturés mineurs, les plus répandus sont les acides palmitoléique (16:1, 9c) et myristoléique (14:1, 9c). Parmi les acides gras polyinsaturés mineurs, les acides eicosadiénoïque (20:2, 11c, 14c) et γ -linoléique (18:3, 6c, 9c, 12c) sont présents dans certaines familles de végétaux comme la famille des *Boraginaceae*. L'acide arachidonique (20:4, 5c, 8c, 11c, 14c) est trouvé dans les algues, la mousse et les fougères, mais non dans les plantes supérieures. L'acide hexadécatriénoïque (16:3, 7c, 10c, 13c) a été trouvé dans les feuilles du navet (Rakipov, 1987).

Les acides gras rares des plantes sont caractérisés par la présence dans leur molécule :

1. de doubles liaisons non conjuguées créant une trans-conformation ou se trouvant dans une position inhabituelle,
2. de doubles liaisons conjuguées,
3. de doubles liaisons alléniques (–CH=C=CH–),
4. de triples liaisons (–C \equiv C–),
5. de groupements fonctionnels oxygénés : hydroxyle, cétone, époxyde,
6. de chaînes ramifiées (Rakipov, 1987).

Le processus métabolique de conversion des acides gras est présenté dans la figure 9. On a récemment montré qu'après absorption de l'acide linoléique alimentaire, celui-ci est directement et efficacement converti en acides gras plus longs, principalement l'acide arachidique. Ces réactions ont lieu conjointement dans le plasma et le réticulum endoplasmique catalysées par des enzymes désaturases (Pérez-Galvez *et al.*, 1999).

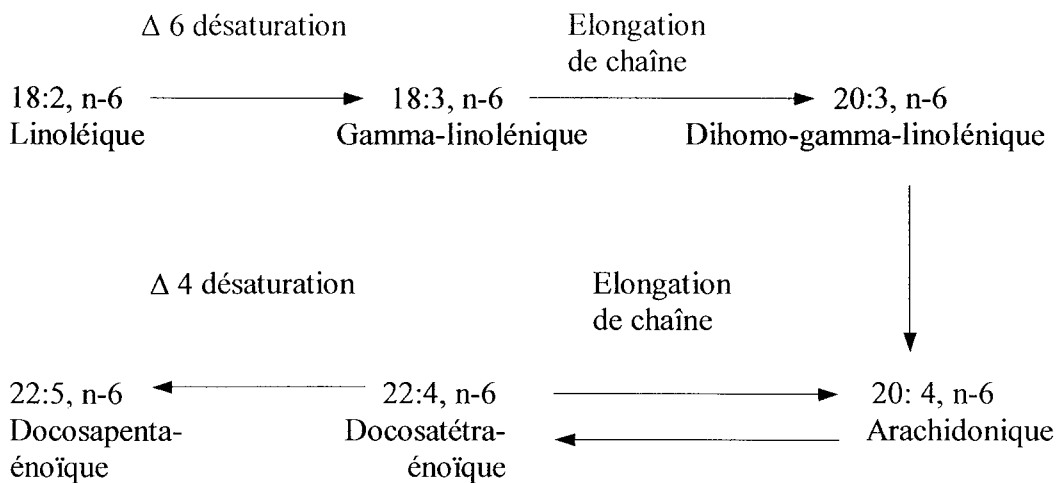


Figure 9 : Processus métabolique de conversion des acides gras (Williams, 1980)

L'acide γ -linoléique est rarement présent dans la nature, on en trouve dans quelques espèces de mousses et dans les graines de bourrache et d'onagre. C'est à partir de cette dernière source que des quantités importantes d'huile ont été extraites et commercialisées pour des usages alimentaires et médicinaux (Williams, 1980).

La qualité de l'huile dépend de sa composition en acides gras qui détermine son utilisation dans l'industrie (Sekhon, 1980). Le Dr Kritchevsky, un nutritionniste américain, écrit une revue de l'état de la recherche concernant le comportement de l'acide palmitique C16:0 (Loke, 1992) qui agit comme un acide gras neutre sur les niveaux de cholestérol dans le sang sur des modèles animaux et humains. Un régime enrichi en acide palmitique (provenant de l'huile de palme) a permis de réduire le cholestérol et le LDL-cholestérol dans le sérum plus efficacement qu'un régime enrichi en acide laurique C12:0 et acide myristique C14:0 (provenant de l'huile de noix de coco), et cela malgré la croyance largement entretenue que tous les acides gras saturés produisent les mêmes effets anti-cholestérolémiques (Hayes *et al.*, 1991).

Deux acides gras sont essentiels : l'acide linoléique (C18:2, n-6) et l'acide linoléique (C18:3, n-3), qui sont les éléments indispensables pour la biosynthèse des acides gras à longues chaînes. La famille n-6 est la plus importante, la famille n-3 a fait l'objet de nombreuses études et apparaît d'un intérêt certain pour la bonne santé de la peau. La carence en acides gras essentiels a pour conséquences : la tendance à l'infection cutanée, la perte de cheveux, les démangeaisons, l'érythème avec écailles, l'accroissement de la perte en eau par voie transépidermique (Platon, 1997).

Des régimes enrichis en acides gras polyinsaturés (PUFA) ont prouvé leur efficacité pour réduire la tension artérielle chez les rats et chez l'homme (Hoffmann, 1986). Les acides gras polyinsaturés et les acides gras monosaturés permettent de réduire le niveau des lipoprotéines à basse densité dans le sang mieux que les acides gras saturés (Toro-Vazquez *et al.*, 1999). Les acides polyinsaturés n-3 sont les précurseurs directs des hormones réglant un éventail de fonctions biologiques telles que l'inflammation et la pression artérielle. Par conséquent, ils ont un potentiel d'utilisation pour la prévention et le traitement des maladies du cœur, des maladies circulatoires et des formes particulières de cancer (Schmitt-Rozieres *et al.*, 2000 ; Arcos *et al.*, 2000 ; Liang *et al.*, 2000). Ils ont une place sur le marché des produits pharmaceutiques, des additifs et des suppléments de santé (Alkio *et al.*, 2000).

Mais l'autoxydation des acides gras insaturés et polyinsaturés conduit à la formation d'hydroperoxydes (LOOH) qui sont des produits de base de l'oxydation (Li *et al.*, 2000).

Lors de la progression de l'oxydation des lipides, des produits secondaires de dégradation (aldéhydes, cétones, alcools, etc...) sont formés par décomposition des hydroperoxydes. Des interactions entre ces composés et des protéines conduisent à la formation de complexes de peroxyde d'acide aminé-lipide ou des produits de réaction, qui peuvent affecter la saveur et la qualité nutritive des produits alimentaires (Kaitaranta, 1992 ; Shahidi *et al.*, 1992 ; Thomsen *et al.*, 2000) et génèrent des composés toxiques qui sont connus pour contribuer aux maladies et accélérer le processus de vieillissement (Kuck *et al.*, 1978 ; Plank et Slikkerveer, 2000 ; Tian *et al.*, 2000). Par conséquent, les oxydations biologique et chimique des lipides ont été intensivement étudiées (Tamura et Shibamoto, 1991). Les huiles végétales et surtout, l'huile d'olive sont relativement résistantes à l'oxydation (autoxydation) en raison de leur faible proportion d'acides gras polyinsaturés (Paz et Molero, 2000) et surtout par leur teneur en anti-oxydants naturels.

II.3.4 Les stérols

Bien que non efficaces en tant qu'antioxydants à température ambiante, les stérols ont un pouvoir d'antipolymérisation des huiles au cours du chauffage (Yan *et al.*, 1990). L'insaponifiable isolé des huiles d'olive, de maïs, de blé et de l'huile de *Vernonia anthelmintica* est efficace contre la polymérisation de l'huile de carthame au cours de la friture. Le Δ^5 -Avenastérol et les mélanges de stérol de l'huile d'olive contenant du Δ^5 -Avenastérol permettent de réduire la polymérisation de l'huile de coton au cours des fritures (Boskou *et al.*, 1976). White et Armstrong (1986) ont étudié les effets anti-polymérisant du Δ^5 -Avenastérol, extrait de l'huile d'avoine, sur l'huile de soja à 180°C et constaté que toutes les huiles chauffées en présence des fractions de stérols et l'huile d'avoine contenant le Δ^5 -Avenastérol sont détériorées plus lentement que les contrôles ne contenant aucune addition de stérol.

Les stérols sont des constituants non glycéridiques importants qui sont présents dans beaucoup d'espèces végétales et animales (Acuña-Cueva *et al.*, 2000). Ils sont également essentiels en diététiques humaine et animale (Blas, 1996). Les huiles végétales contiennent différents stérols (Dutta, 1997). Les plantes ont une gamme de stérols plutôt différente de celle des animaux. Les stérols communs sont le campestérol, le sitostérol, le brassicastérol, le stigmastérol et l'avénastérol (Figure 11).

Comme leur nom le suggère, les brassicastérols sont trouvés principalement dans la famille des Brassicacées. D'autres stérols peuvent être présents dans les plantes dont les quantités et les proportions relatives dépendent de l'espèce de plante. A titre d'exemple, un mélange typique de stérols végétaux serait : sitostérol 70%, stigmastérol 20% et campestérol 5%. Le cholestérol est habituellement un composant mineur des plantes à l'exception des algues rouges qui peuvent en contenir des quantités importantes. On pense que le sitostérol et le 24-méthylcholestérol peuvent régler la fluidité et la perméabilité des membranes dans les plantes d'une façon semblable au cholestérol dans les cellules de mammifères. En outre, les stérols végétaux peuvent moduler l'activité des enzymes membranaires.

Le stigmasterol est nécessaire à la prolifération de cellules. Depuis quelques temps, on voit un intérêt croissant pour les sources commerciales de stérols végétaux que l'on ajoute comme "nutraceutique" aux margarines car il s'avère qu'ils peuvent abaisser le cholestérol dans les régimes.

Dans les tissus animaux, le cholestérol est de loin le plus abondant des stérols. Le cholestérol joue un rôle important dans les membranes et dans le métabolisme des lipides. Le cholestérol est biosynthétisé à partir du squalène par l'intermédiaire du lanostérol comme illustré figure 10.

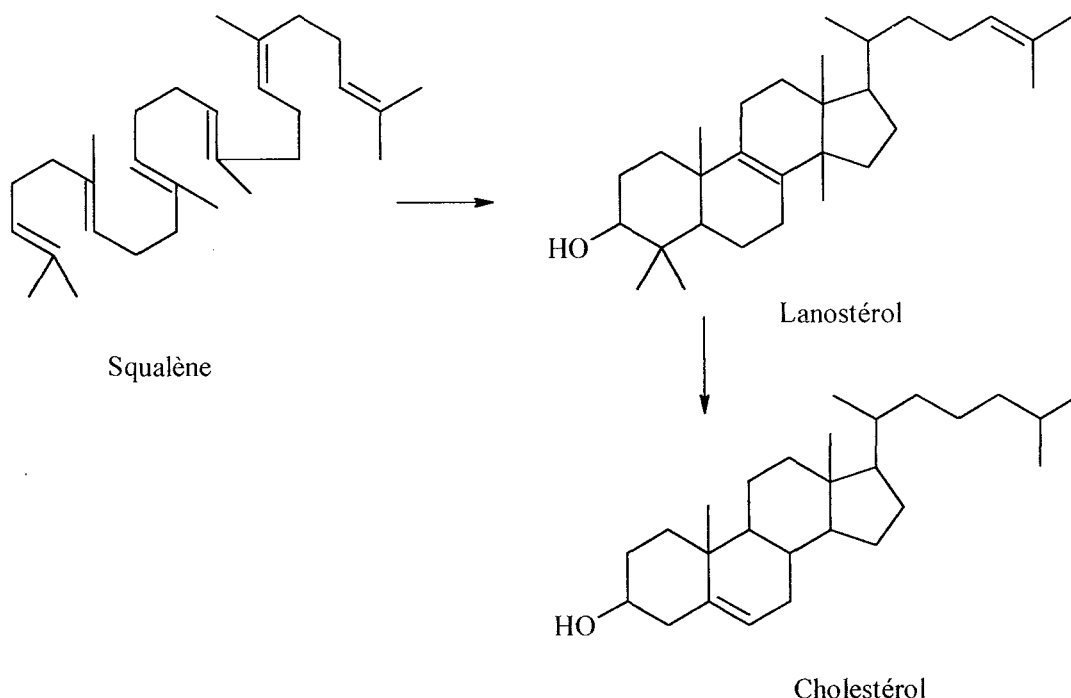


Figure 10 : Formation du cholestérol (Christie, 2002)

C'est un composant omniprésent dans les tissus animaux et les mycètes dont une grande partie est située dans les membranes (près de 30% des lipides membranaires). Dans les plantes, il est seulement un composant mineur rentrant dans la composition des stérols. Il se trouve sous forme libre ou/et estérifié à des acides gras à longue chaîne (esters de cholestérol) dans les tissus animaux, incluant les lipoprotéines du plasma. Les animaux synthétisent en général une proportion élevée de cholestérol qui s'ajoutent aux quantités ingérées. Beaucoup d'invertébrés, incluant les insectes, ne peuvent pas synthétiser le cholestérol et doivent le recevoir de leur alimentation ; ils peuvent cependant plus facilement utiliser les stérols végétaux que les animaux. On pense que la fonction du cholestérol est de moduler la fluidité des membranes en agissant sur les glycérolipides et plus spécifiquement les phospholipides (Christie, 2002).

Sous l'influence de conditions oxydatives ou de radiation ionisante, le cholestérol est transformé en un nombre substantiel de produits collectivement connus sous le nom d'"oxydes de cholestérol" (Smith *et al.*, 1981). La nature de ces produits est semblable à ceux produits par l'autoxydation (Maerker et Jones, 1992).

Parmi les lipides oxydés, les dérivés du 5-cholestène-3 β -ol (cholestérol) oxydés montrent des activités biologiques spécifiques ayant des activités cytotoxique, cancérigène, athérogène et sur le métabolisme des lipides (Ohshima *et al.*, 1993), et peut exercer une suppression de la fonction immunitaire (Osada *et al.*, 1999 ; Larkeson *et al.*, 2000).

Des avantages diététiques potentiels des stérols végétaux, y compris la réduction de cholestérol, ont été étudiés durant les dernières décennies (Quattro, 2000). Les phytostérols concurrencent l'absorption du cholestérol dans le petit intestin puisque leur forme moléculaire est voisine de celle du cholestérol, ce qui conduit à une chute de la teneur en cholestérol dans le sang (PlantSterols, 2002). Le sitostérol est le phytostérol principal. Les autres phytostérols communs sont le campestérol, le sitostanol et le stigmastérol. Les graines représentent la source la plus riche en stérols (Tomlinson, 2002). L'utilisation des stérols végétaux est autorisée aux USA, au Royaume Unis et en France (Smith, 2001).

Les Δ^5 et Δ^7 -avenastérols ont des effets anti-polymérisants qui pourraient protéger les huiles végétales contre l'oxydation à températures élevées (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1994). La susceptibilité du cholestérol à l'oxydation est bien connue et a été étudiée depuis plus de cinquante ans. Un grand nombre de produits d'oxydation dérivés du cholestérol a été identifié (Hwang et Maerker, 1993).

Le cholestérol et les autres phytostérols, le campestérol, le stigmastérol et le β -sitostérol sont des alcools polycycliques possédant un seul groupe hydroxyle. Ils sont aisément solubilisables dans les solvants non polaires tels que l'éther de pétrole et le benzène et devraient être extractibles d'une suspension aqueuse lipidique par ces solvants (Jacobsohn *et al.*, 1986).

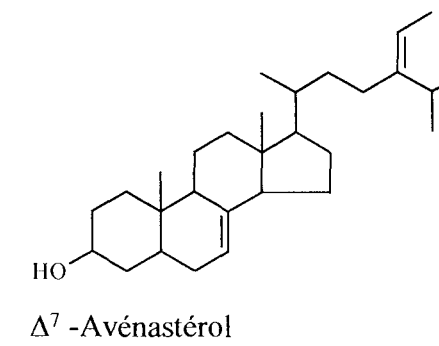
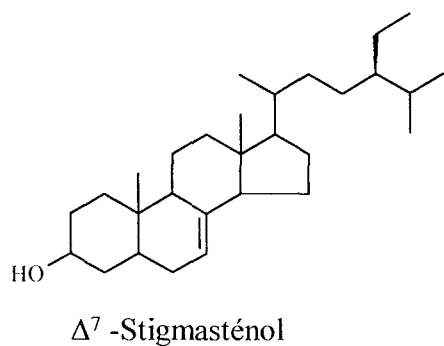
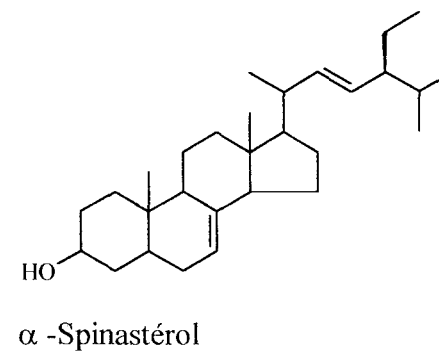
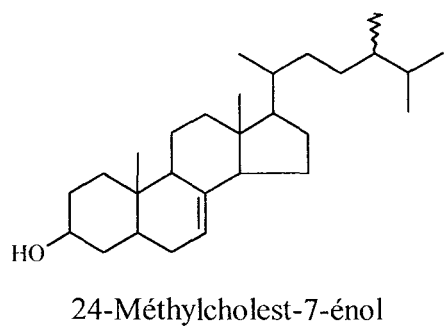
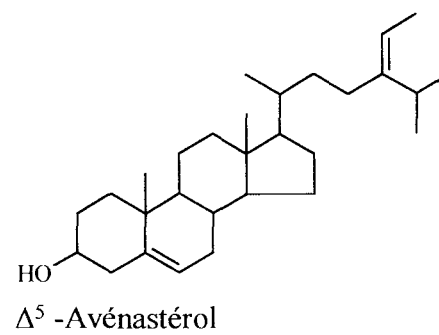
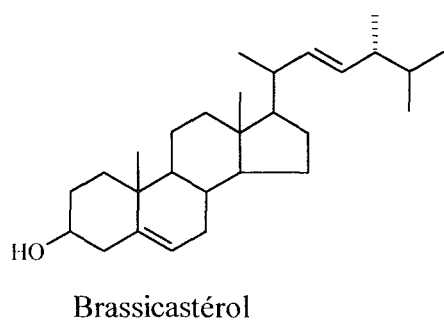
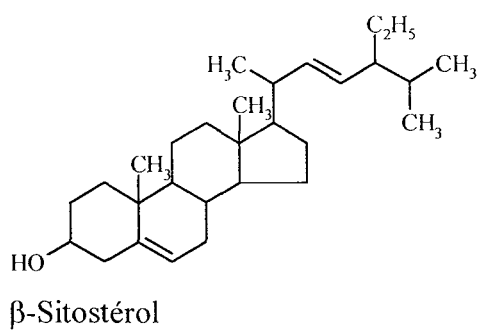
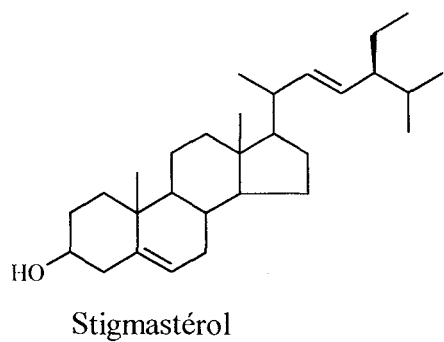
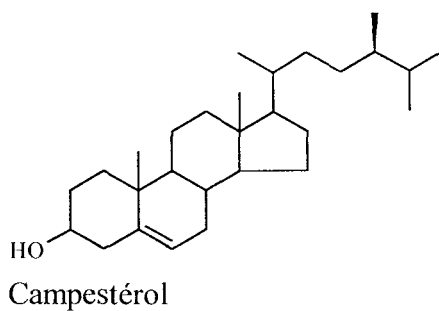
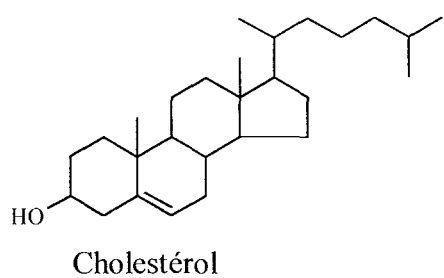


Figure 11 : Formules structurales des stérols des huiles végétales (Itoh *et al.*, 1974)

II.3.5 Les tocophérols

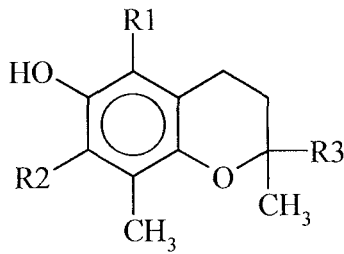
Le terme vitamine E est employée comme description générique pour les quatre tocophérols et les quatre tocotriénols qui ont qualitativement l'activité biologique de l' α -tocophérol (Jensen *et al.*, 1998). Les tocophérols sont trouvés principalement dans les huiles végétales et les fluides biologiques. Les céréales et les légumes sont des sources importantes de tocophérols. La teneur dépend grandement de la variété et des conditions de croissance des plantes, du traitement et du stockage de l'huile (Schuler, 1990). L' α -tocophérol est le tocophérol le plus abondant dans la nourriture et également le plus biologiquement actif (Wennermark *et al.*, 1994).

Les tocotriénols sont trouvés principalement dans le germe et le son des céréales, l'huile de palme et le latex (Shin et Godber, 1993).

Les quatre isomères (α , β , γ , δ) du tocophérol ont une chaîne latérale saturée, tandis que les tocotriénols ont une chaîne latérale insaturée. Les quatre tocophérols et tocotriénols (α , β , γ et δ) diffèrent dans leur degré de méthylation de l'anneau de chromanol (Figure 12).

Les tocophérols grâce à leurs propriétés anti-oxydantes, protègent les lipides insaturés contre l'oxydation dans les membranes biologiques (Burton et Ingold, 1990). Le mécanisme implique une réaction de propagation des radicaux libres, particulièrement les radicaux peroxydes, ayant pour résultat la formation de radicaux relativement stables de phénoxyde (Goh *et al.*, 1990).

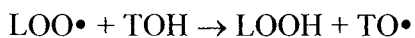
L'activité anti-oxydante relative des différents tocophérols dépend de la température, de la composition en lipides, de l'état physique (phase en bloc ou émulsion d'huile), et des concentrations en tocophérols (Pongracz, 1973). Une partie des changements majeurs qui se produisent pendant le traitement, la distribution et la préparation finale des aliments est due à l'oxydation (Shibata *et al.*, 1986 ; Sant'Ana et Mancini-Filho, 2000). Les antioxydants sont donc employés par l'industrie alimentaire (Brand-Williams *et al.*, 1995).



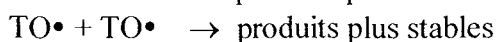
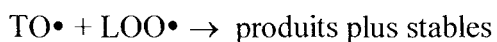
	R ₁	R ₂	R ₃
<u>Tocophérols</u>			
α-tocophérol	CH₃	CH₃	CH₂[CH₂ CH₂CH(CH₃)CH₂]₃H
β-tocophérol	CH₃	H	„
γ-tocophérol	H	CH₃	„
δ-tocophérol	H	H	„
<u>Tocotriénol</u>			
α-tocotriénol	CH₃	CH₃	CH₂[CH₂ CH=C(CH₃)CH₂]₃H
β-tocotriénol	CH₃	H	„
γ-tocotriénol	H	CH₃	„
δ-tocotriénol	H	H	„

Figure 12 : Structure des tocophérols et tocotriénols (Fereidoon, 1997)

Les tocophérols (TOH) agissent comme des antioxydants en donnant un atome d'hydrogène à un radical de peroxyde (LOO•) d'une molécule de lipide insaturée, formant un hydroperoxyde (LOOH) et un radical de tocophéroxyle (TO•).



Le radical tocophéroxyle a une capacité inférieure de propager la peroxydation des lipides comparée au radical peroxyde. Au lieu de cela, les radicaux de tocophéroxyle réagissent avec d'autres peroxydes formant des produits plus stables.



La capacité d'un α -tocophérol à donner un atome d'hydrogène est plus haute que celle du γ -tocophérol, ce qui signifie que l' α -tocophérol devrait être un antioxydant plus efficace que le γ -tocophérol. Cependant, les tocophérols et les radicaux tocophéroxyles peuvent également participer à d'autres réactions que celles mettant en oeuvre des radicaux peroxydes lorsqu'ils sont présents à des concentrations élevées.

$\text{TOH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{produits inconnus}$

$\text{TO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{TOH} + \text{L}\cdot$

$\text{TO}\cdot + \text{LOOH} \rightarrow \text{TOH} + \text{LOO}\cdot$

Il y a désaccord sur la pertinence des "réactions secondaires" qui prétendent conduire à l'activité pro-oxydante des tocophérols. Plusieurs revues récentes ont discuté l'importance de ces réactions comme causes déterminantes des activités antioxydantes absolues et relatives des différents tocophérols. Ces articles passent en revue et soulignent l'importance des conditions d'oxydation, telles que la température et la disponibilité de l'oxygène, de la nature chimique et de l'état physique du lipide ainsi que la concentration en tocophérol dans l'évaluation du rôle des tocophérols comme inhibiteurs d'oxydation des lipides (Lampi *et al.*, 1997 ; 1999).

L'addition des antioxydants est devenue populaire comme moyen d'augmenter la durée de conservation des produits alimentaires et d'améliorer la stabilité des lipides et des aliments contenant des lipides en empêchant la perte de leur qualité sensorielle et nutritionnelle (Tsuda *et al.*, 1993). En raison des effets toxiques possibles des antioxydants synthétiques, beaucoup d'antioxydants naturels ont été utilisés pour empêcher l'oxydation (Xing *et al.*, 1997). Parmi eux, les tocophérols sont des antioxydants naturels (Chevolleau *et al.*, 1993) qui empêchent l'oxydation des lipides dans les aliments et les systèmes biologiques en stabilisant le hydroperoxydes et autres radicaux libres (Dolde *et al.*, 1999; Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996).

La peroxydation des acide gras polyinsaturés des phospholipides membranaires contribue à de nombreuses maladies. Il peut en résulter des dommages causés au muscle cardiaque associés à des ischémies cardiaques. La vitamine E est présente dans le muscle cardiaque et peut aider à empêcher les dommages dus à l'oxydation myocardique par les radicaux libres produits dans le cœur normal ou malade. Les données cliniques suggèrent que la supplémentation diététique avec de la vitamine E est associée à un risque réduit de mortalité humaine et de maladie cardiovasculaire. La vitamine E a été employée thérapeutiquement chez des patients en ischémie cardiaque (David *et al.*, 1989).

Il existe *in vivo* un équilibre entre les oxydants tels que les radicaux libres et les antioxydants tels que les vitamines E (McCord, 1994). Par conséquent, les dommages dus aux oxydants qui se produisent *in vivo* sont liés aux maladies chroniques telles que le cancer et l'athérosclérose (Baublis *et al.*, 2000 ; Ames, 1989). Les tocophérols sont beaucoup plus efficaces lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec d'autres antioxydants. Des phospholipides comme la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine ont été largement utilisés en synergie avec des antioxydants phénoliques (Bandarra *et al.*, 1999).

En plus de leur fonction connue d'inhibiteur de la synthèse du cholestérol, les tocophérols sont essentiels pour la protection contre la détérioration oxydante des acides gras polyinsaturés chez les plantes et les animaux (Yoshida *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1986 ; Pearce *et al.*, 1992).

L' α -tocophérol est employé comme substance pharmaceutique, comme ingrédient des produits de beauté et comme aliment santé. Un mélange contenant 60% en poids des isomères α , γ et δ est largement utilisé comme additif dans des aliments variés (Shimada *et al.*, 2000). Les α - et γ -tocophérols sont les antioxydants naturels les plus abondants dans les lipides des plantes. On convient généralement que la puissance de donation d'hydrogène des différents tocophérols diminue : $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (Burton et Ingold, 1981). Dans les membranes des cellules végétales, on présume que comme chez les cellules animales, les tocophérols interrompent la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides par fixation des radicaux peroxydes et ainsi augmentent la stabilité de membrane. Les tocophérols empêchent également la peroxydation des triacylglycérols au cours de l'initiation en acceptant les radicaux libres (Almonor *et al.*, 1998).

Plusieurs changements relatifs au vieillissement du système nerveux central, tels que les dépressions et les troubles du sommeil résultent peut être des réactions des radicaux libres et de la peroxydation des lipides. De toute évidence, cela indique que la vitamine E peut jouer un rôle important en neurobiologie du vieillissement et qu'elle peut agir sur le vieillissement. Il y a une interrelation biochimique entre la vitamine E et le sélénium en ce qui concerne leurs fonctions antioxydantes protectrices (Meydani *et al.*, 1986).

II.3.6 Les phospholipides

La lécithine a été découverte en 1846 par le français Gobley. A cette date, il isola de l'œuf une substance collante aux propriétés émulsifiantes qu'il nomma lécithine du grec, Lekithos, signifiant jaune d'œuf. On remarqua rapidement que cette substance contenait du phosphore et avait une composition chimique complexe.

On sait aujourd'hui que les phospholipides sont des constituants indispensables des membranes cellulaires et qu'ils sont présents dans tous les organismes animaux (cerveau, moelle épinière) et végétaux (oléagineux, légumineuse, céréales).

Bien que le jaune d'œuf soit le plus riche en lécithine, la principale source de fabrication industrielle de la lécithine est le soja (Schneider, 1989).

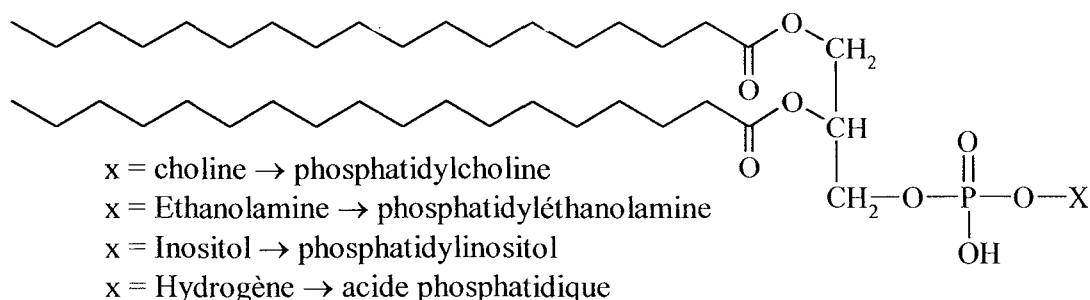


Figure 13 : Structure moléculaire des principaux phospholipides (Schneider, 1989)

S'il s'agit d'un ester de choline, on parle de phosphatidylcholine. Les autres composants importants de la lécithine sont la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol, l'acide phosphatidique pour lesquels l'acide phosphorique est esterifié par l'éthanolamine, l'inositol ou demeure non esterifié (Tableau 8). La lécithine de soja contient également quelques autres phospholipides et quelques glycolipides (Schneider, 1989).

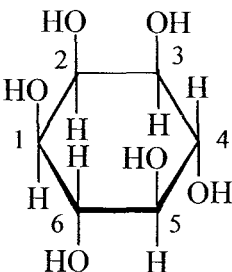
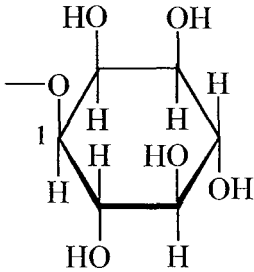
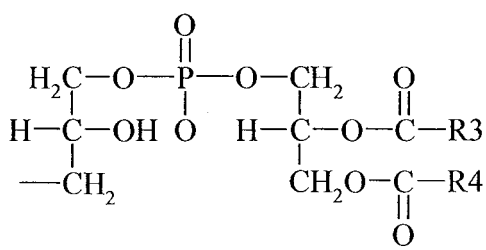
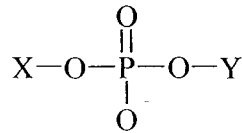
Glycérophospholipides	Alcool	Radical de l'alcool ¹
	HOCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ Choline	-CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃
Phosphatidyléthanolamines	HOCH ₂ CH ₂ NH ₂ Ethanolamine	-CH ₂ CH ₂ N ⁺ H ₃
Phosphatidylsérines	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOCH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ L-sérine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$
Phosphatidylinositols	 Myo-inositol	
Monophosphatidylglycérols	$\begin{array}{c} 1 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ 3 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ Glycérol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ -\text{CH}_2 \end{array}$
Diphosphatidylglycérols (cardiolipide)		

Tableau 8 : Glycérophospholipides et alcools entrant dans leur composition (Rakipov, 1987)

D'un point de vue chimique, on peut se représenter les phospholipides comme des diesters de l'acide orthophosphorique ayant pour formule développée :



où X et Y sont des groupes d'alcool unis par une liaison ester à l'acide orthophosphorique. Le glycérol ou la sphingosine sont les deux seuls alcools possibles entrant dans la composition des phospholipides. C'est pourquoi on distingue les glycérophospholipides et les sphingophospholipides. Parfois, seuls les glycérophospholipides sont appelés phospholipides.

Un ou deux radicaux d'acides gras supérieurs sont unis par une liaison ester avec la sphingosine ou le glycérol pour former les molécules de phospholipides. Les acides gras peuvent être aussi bien saturés qu'insaturés (acide palmitique, stéarique, linoléique, linoléinique, etc.). Les phospholipides sont donc des esters d'alcools (glycérol ou sphingosine) et d'acides gras à longues chaînes contenant un groupe phosphorique et un autre constituant alcoolique uni lui aussi par une liaison ester, ce constituant étant le plus souvent azoté.

La fraction de lécithine naturelle est riche en acides gras polyinsaturés (surtout linoléique), ce qui lui donne des propriétés sur le plan diététique. Elle est donc sensible à l'oxydation mais sa teneur naturelle en α -tocophérol la protège.

La lécithine présente la particularité de baisser la tension superficielle et de stabiliser les émulsions grâce à la bipolarité de sa structure moléculaire (pôles hydrophyles et lipophiles).

Schématiquement, il est possible de rendre compte de ce phénomène par l'emprisonnement d'un liquide aqueux dans de l'huile (émulsion eau dans l'huile) ou à l'inverse (émulsion huile dans l'eau) par l'emprisonnement de gouttelettes d'huile dans de l'eau (Figure 14).

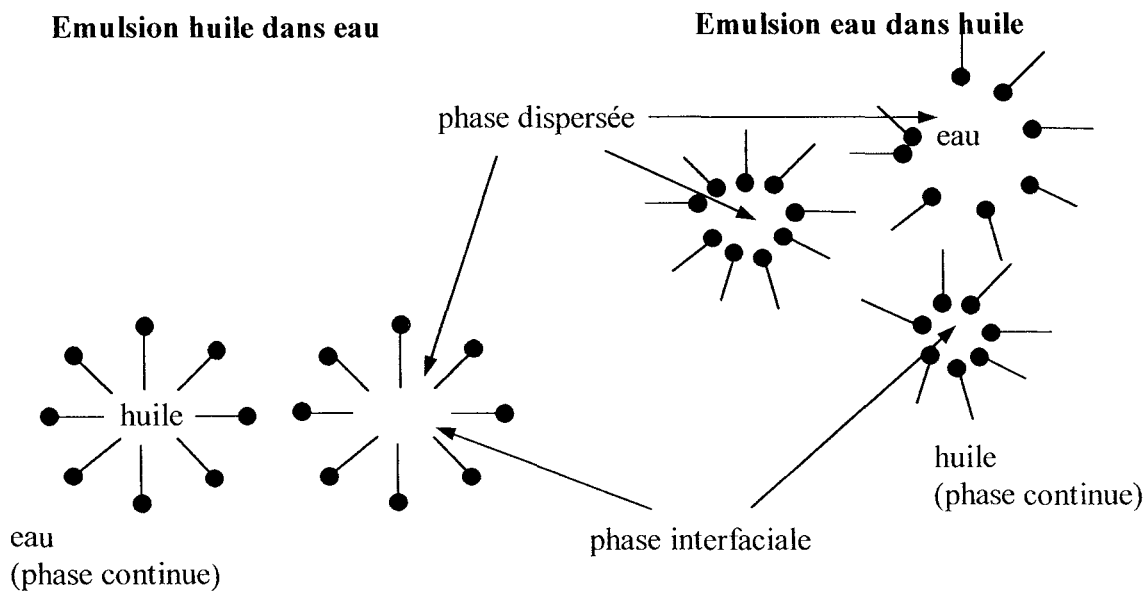


Figure 14 : Emulsion huile dans l'eau et eau dans huile (Schneider, 1989)

Contrairement aux lécithines d'œuf, riches en acides gras saturés, les lécithines de soja sont riches en polyinsaturés. Elles peuvent toutefois être hydrogénées. Les phospholipides les plus abondants dans la lécithine sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (Scholfield *et al.*, 1985). L'industrie alimentaire emploie le terme "lécithine commerciale" pour qualifier les émulsifiants préparés à partir d'huile végétale raffinée (Hanras et Perrin, 1991). Les lécithines commerciales sont celles du soja, du colza, de l'œuf, de la graine de coton (Dornbos *et al.*, 1989 ; Juneja *et al.*, 1989 ; Hollo *et al.*, 1993 ; Ingvarlsen *et al.*, 1994).

Les applications de la lécithine sont nombreuses :

La lécithine est en général utilisée en association avec des mono-diglycérides pour maintenir l'émulsion des margarines qui sont des émulsions eau dans huile (80% de matières grasses et 20% d'eau).

Lors de la cuisson des farines, la lécithine :

- augmente la capacité de rétention d'eau des pâtes
- augmente le volume du produit fini
- retarde le phénomène de rétrogradation de l'amidon
- stabilise les protéines (gluten)
- améliore la répartition des matières grasses dans les produits de biscuiterie/pâtisserie
- évite les problèmes de collage et de brisure (gaufrette)
- joue un rôle de conservateur grâce à sa teneur en alpha-tocophérol.

En diététique, la lécithine :

- Apporte des acides gras essentiels
- Apporte de la phosphatidylcholine qui est le précurseur de l'acétylcholine (Schneider, 1989).

Les phospholipides sont trouvés en grande quantités dans les légumineuses et les céréales. La teneur en phospholipides des huiles est importante d'un point de vue technologique en raison des pertes néfastes que ces composés peuvent engendrer en émulsionnant les huiles à l'eau au cours du procédé de neutralisation. Plusieurs études rapportent que les phospholipides chélatent les oligo-éléments métalliques et les transportent au cours du raffinage. Ceci contribue à l'instabilité de l'huile par autoxydation des acides gras insaturés (White et Xing, 1996). D'un autre côté, Hudson *et al.* (1984) et Hudson et Mahgoub (1981) ont montré sur du saindoux et de l'huile de soja que les phospholipides peuvent agir en synergie avec les tocophérols pour empêcher l'autoxydation des acides gras polyinsaturés. Linow et Mieth (1976) ont constaté que l'activité anti-oxydante de l' α -tocophérol a été augmentée en ajoutant 1% de phosphatidyléthanolamine et 1% de phosphatidylcholine. Parmi la PC, la PE et l'acide phosphatidique, le PE est l'antioxydant le plus efficace dans l'autoxydation du ghee (matière grasse clarifiée) (Bhatia *et al.*, 1978).

Hildebrand *et al.* (1984) ont montré que l'addition de tocophérols et de phospholipides [PE, PI et PC] a permis d'augmenter la stabilité de l'huile de soja dégommée et blanchie. Le PI et la PE étaient plus efficaces que la PC. L'effet du phospholipide n'était pas simplement une question d'inactivation du métal pro-oxydant mais il semble plutôt prolonger l'efficacité du tocophérol dans l'arrêt du radical libre.

White et Xing (1996) ont constaté que la PC a empêché la dégradation des tocophérols et de leurs dimères et ont rapporté une activité protectrice semblable de la PC envers des tocophérols dans l'oxydation des triacylglycérols.

Kashima *et al.* (1991), Segawa *et al.* (1994), Saito et Ishihara (1997) ont trouvé un effet synergique entre la PE et la PC et des tocophérols pour stabiliser des huiles de poissons contre l'oxydation. King *et al.* (1992) ont rapporté que l'activité antioxydante de la PC est équivalente à celle de la PE dans un modèle constitué d'huile de saumon. Ohshima *et al.* (1993) ont trouvé que l'activité antioxydante de la PE et de la PS est plus forte que celle de la PC dans plusieurs systèmes composés d'huile de poissons.

Une évaluation précise de l'activité anti-oxydante des phospholipides et une explication raisonnable du mécanisme de l'activité anti-oxydante n'ont pas encore été réalisées (Saito et Ishihara, 1997).

Les propriétés anti-oxydantes ou pro-oxydantes des phospholipides ont été étudiées par Chen et Nawar (1991) et Nwosu *et al.* (1997). Von Schler et Löschner (1985) ont trouvé que des phospholipides extraits du krill de l'antartique ont une activité antioxydante en synergie avec des tocophérols dans un système de graisse animale. Kashima *et al.* (1991) ont noté que l'action anti-oxydante de l'huile de perilla est accrue nettement après addition du phosphatidyléthanolamine (PE) et de phosphatidylsérine (PS), mais la phosphatidylcholine (PC) n'a pas montré d'effet antioxydant.

Les phospholipides sont des composants importants des membranes biologiques (Wang *et al.*, 1999 ; Bafor *et al.*, 1988). La teneur en phospholipides des huiles végétales brutes varie de 0,1% à 3,2% (Wang et Gordon, 1991 ; Przybylski et Eskin, 1991) alors que celle des huiles végétales raffinées est habituellement de moins de 40 ppm.

Les phospholipides et leurs dérivés ont des fonctions multiples dans les processus métaboliques : sources d'énergie, vitamines, apport de phosphore, d'acides gras essentiels, émulsification des lipides pendant la digestion et l'absorption (Lochman et Brown, 1997). Les phospholipides peuvent affecter l'activité des lipases (Wang *et al.*, 1991).

La demande en divers types de phospholipides a augmenté fortement. A l'heure actuelle, les phospholipides sont employés dans des formules infantiles, des produits alimentaires, des lubrifiants industriels, des stabilisateurs de pâte à pain, dans les liposomes, les produits de beauté et comme excipients et émulsifiants dans les médicaments (Smiles *et al.*, 1989 ; Gudmundur *et al.*, 1999).

L'intérêt d'utiliser les phospholipides est lié à leur origine naturelle et à leur biocompatibilité. Certains phospholipides, et en particulier la PC, se sont avérés très importants dans le traitement des maladies neurologiques.

II.3.7 Le Sélénium

Le sélénium est un minéral essentiel pour le corps humain. Il peut exister sous plusieurs formes chimiques, organiques et inorganiques dans les aliments et les suppléments alimentaires. Cet élément est un constituant essentiel de certaines enzymes anti-oxydantes qui protègent les cellules contre les effets des radicaux libres qui sont produits pendant le

métabolisme oxydatif normal. Le sélénium est également essentiel pour le fonctionnement normal du système immunitaire et de la glande thyroïde.

Le sélénium peut également être trouvé dans les viandes et les fruits de mer. La teneur en sélénium des viandes, des graines et des légumes dépend de la teneur en sélénium du sol où de le produit s'est développé. Le sélénium dans le sol est absorbé par les plantes et plus tard par les personnes et les animaux qui les consomment (Office of Dietary Supplements, 2002).

Quelques noix et en particulier la noix du Brésil (Chunhieng *et al.*, 2003) et la noix de Grenoble, sont également de très bonnes sources de sélénium.

La plupart des fruits et légumes contiennent moins de 0,01 µg sélénium/g. Les graines peuvent contenir de 0,02 à 0,7 µg/g de sélénium. Les viandes de poulet, de porc et de bœuf sont une bonne source de sélénium avec 0,1 à 0,4 µg/g. Il est intéressant de noter que le thon contient un niveau assez élevé de sélénium dont la biodisponibilité semble inférieure à celle de la noix du Brésil (Ip et Lisk, 1994).

Le régime moyen des Anglais a été calculé pour fournir approximativement 60 µg de sélénium par jour, dont la moitié provient des céréales et des produits céréaliers et dont 40% proviennent de différentes viandes et poissons. Le lait, les graisses, les fruits et les légumes fournissent peu ou pas de sélénium alors que les farines de blé, les farines de poissons gras, la noix du Brésil et plusieurs autres variétés de noix en contiennent généralement plus de 0,2 µg/g (Thorn *et al.*, 1978).

Les Nations Unies ne donnent aucune recommandation au sujet des ingestions diététiques de sélénium (WHO, 1973), mais l'US National Research Council a récemment interprété les résultats obtenus sur l'animal pour suggérer une dose pour l'homme d'approximativement 60-120 µg de Se/jour avec une toxicité qui apparaîtrait après l'ingestion prolongée de 2400-3000 µg Se/jour (Food and Nutrition Board, 1976). Le sélénium peut être toxique à doses très élevées. La toxicité chez l'homme a été rarement observée. Cependant, la toxicité a été rapportée dans les régions du monde où les niveaux d'ingestion de sélénium sont extrêmement élevés. Les symptômes observés de cette toxicité chez l'homme incluent l'augmentation de la fragilité des ongles ou des cheveux, les éruptions cutanées, les sensations d'aiguilles, l'irritabilité, la nausée ou le vomissement. On a observé ces effets secondaires dans approximativement 10% des sujets chinois consommant un régime avec plus de 1000 µg/jour de sélénium (Clark, 2000).

Les fonctions biochimiques du sélénium sont semblables à celles du soufre, qu'il remplace dans les acides aminés, la méthionine et la cystéine. La sélélocystéine $\text{HSe-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ et la sélénométhionine $\text{HSe-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ sont présentes dans certaines protéines (Aller, 1990). Le Se a un certain nombre de fonctions biologiques importantes qui dépendent de l'activité de certaines séléno-protéines. Leur rôle est de décomposer le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques produits par les radicaux libres, qui peuvent endommager les membranes cellulaires et perturber les fonctions cellulaires (Reilly, 1998).

Les fonctions principales du sélénium dans le corps qui ont été découvertes jusqu'ici sont résumées par le Dr. Clarke (2000) de l'université d'Arizona. Le sélénium est trouvé dans le site actif de nombreuses enzymes telles que la thiorédoxine réductase, qui catalysent des réactions d'oxydation/réduction. Une enzyme qui aide à empêcher le processus d'oxydation,

la glutathion peroxydase a besoin de sélénium pour sa formation. Le sélénium semble améliorer le fonctionnement du système immunitaire et sa réponse aux infections. Il semble favoriser la formation des cellules tueuses naturelles, qui détruisent les bactéries étrangères infectant le corps. Les enzymes P450 qui aident à détoxifier quelques substances pro-cancéreuses peuvent être induites par le sélénium. Le sélénium inhibe l'action des prostaglandines qui sont responsables des réactions inflammatoires dans le corps. La fertilité masculine peut être augmentée par le sélénium qui favorise la mobilité du sperme. A doses élevées, le sélénium peut diminuer le taux de croissance des cellules tumorales.

II.3.8 Les acides aminés

Les acides aminés sont quelquefois décrits comme antioxydants, quelquefois comme pro-oxydants et/ou pour n'avoir aucun effet sur l'oxydation des lipides. Les groupes protonés aminés (NH_3^+) accélèrent la peroxydation des lipides, tandis que les non-protonés aminés (NH_2) empêchent l'oxydation des lipides. Dans les émulsions, les effets antioxydant/pro-oxydant des acides aminés dépendent du pH. L'activité pro-oxydante des acides aminés est augmentée lorsque le pH diminue (Chen et Nawar, 1991).

Les acides aminés sont les éléments structuraux à partir desquels sont construites toutes les molécules protéiques. Les aminoacides possèdent une fonction amine ($-\text{NH}_2$) et une fonction carboxylique ($-\text{COOH}$). On connaît actuellement plus de 200 composés naturels qui possèdent ces deux fonctions à la fois. Cependant, 20 seulement entrent dans la composition des protéines. On les appelle ordinairement acides aminés protéinogènes ou protéiques. La formule générale des aminoacides est présentée figure 15. Cette formule montre qu'en plus de la fonction amine libre ($-\text{NH}_2$), du carboxyle ($-\text{COOH}$) et de l'atome d'hydrogène ($-\text{H}$), la molécule d'acide aminé contient un substituant organique, le radical R fixé également à l'atome de carbone en α .

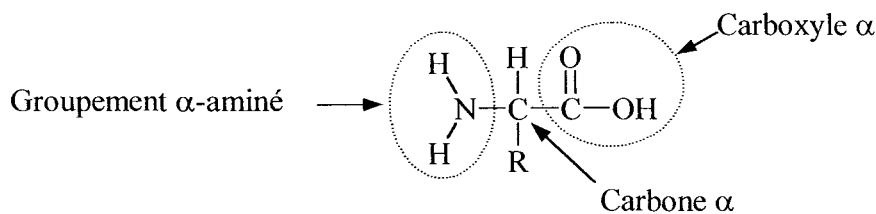


Figure 15 : Structure d'un acide aminé (Rakipov, 1987)

Les acides aminés renferment deux groupements aptes à l'ionisation : le carboxyle qui a des propriétés acides et la fonction amine dont les propriétés sont basiques. Par conséquent, les acides aminés sont des électrolytes amphotères, ils peuvent donc se dissocier avec formation d'ions H^+ et OH^- (Figure 16).

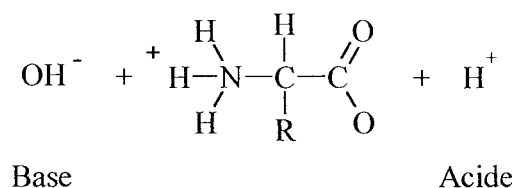


Figure 16 : Dissociation d'un acide aminé avec le pH (Rakipov, 1987)

Suivant la valeur du pH du milieu, n'importe quel aminoacide peut posséder une charge soit positive, soit négative. La valeur du pH du milieu à laquelle les acides aminés sont électriquement neutres est appelée point isoélectrique ou pK. D'après la structure et la charge du radical R à pH 7, c'est à dire à une valeur de pH correspondant aux conditions intracellulaires, les acides aminés protéinogènes se subdivisent en : 1/ aliphatiques neutres (ne portant pas de charge) ; 2/ aliphatiques neutres renfermant du soufre ; 3/ aromatiques neutres ; 4/ aliphatiques acides (à charge négative) ; 5/ aliphatiques basiques (à charge positive) ; 6/ imines neutres.

Le tableau 9 présente les acides aminés naturels des protéines en accord avec cette classification. Chez les acides aminés neutres, le radical R ne porte jamais de charge, indépendamment de la valeur du pH de la solution. Chez les acides aminés acides et basiques, le radical R porte une charge qui est négative ou positive en fonction du pH.

Le radical R des acides aminés aromatiques renferme un noyau à cinq ou six carbones. Les acides aminés aliphatiques sont dépourvus de ce noyau, mais ils renferment une chaîne carbonée linéaire ou ramifiée. Les acides iminés possèdent une fonction imine NH et non pas une fonction amine NH₂. Le radical R des acides aminés peut être hydrophobe (par exemple, chez les acides aminés aliphatiques neutres et la phénylalanine) ou hydrophile (chez les acides aminés acides et basiques). La glutamine (Gln) et l'asparagine (Asn) sont les produits des acides glutamique et aspartique, ils entrent aussi dans la composition des protéines.

En plus des 20 acides aminés rencontrés dans les protéines, il y a des acides aminés que l'on ne trouve que dans quelques protéines, l'hydroxyproline et l'hydroxylysine.

L'organisme de l'homme et celui des animaux synthétisent environ la moitié des acides aminés indispensables à la synthèse des protéines. D'autres acides aminés, une dizaine, ne peuvent être synthétisés dans l'organisme même. Ils doivent lui parvenir des aliments ingérés, ils s'appellent acides aminés exogènes ou plus souvent, essentiels. Les acides aminés essentiels sont : la valine, la leucine, l'isoleucine, la thréonine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, le tryptophane et la méthionine.

L'absence même d'un seul des acides aminés peut rendre impossible la synthèse de certaines protéines indispensables comme les hormones et les enzymes.

Nature du radical R à pH 7	Acide aminé	Symbole	Structure à pH 7
Neutre (non chargé), aliphatique	Alanine	Ala	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
	Valine	Val	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array} $
	Leucine	Leu	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array} $
	Isoleucine	Ile	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{HC}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
	Glycine	Gly	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H} \end{array} $
	Sérine	Ser	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
	Thréonine	Thr	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $

Neutre, aliphatique, soufré	Méthionine	Met	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} - \text{CH}_3 \end{array} $
	Cystine	Cys	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $
Neutre, aromatique	Phénylalanine	Phe	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} $
	Tyrosine	Tyr	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
	Tryptophane	Trp	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{N} \end{array} $
Acide (chargé négativement), aliphatique	Acide aspartique	Asp	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array} $

	Acide glutamique	Glu	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{O} = \text{C} - \text{O}^- \end{array} $
Basique (chargé positivement), aliphatique	Lysine	Lys	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
	Arginine	Arg	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} = \text{NH} \end{array} $
	Histidine	His	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HC} = \text{C} \\ \quad \\ \text{HN} \quad \text{NH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} $
Acides iminés neutres	Proline	Pro	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array} $

Tableau 9 : Acides aminés entrant dans la composition des protéines (Rakipov, 1987)

Modification du radical R de l'acide aminé initial	Acide aminé dérivé	Structure à pH 7
Amination	Glutamine (Gln)	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{NH}_2 \end{array} $
	Asparagine (Asn)	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{NH}_2 \end{array} $
Hydroxylation	Hydroxyproline	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
	Hydroxylysine	$ \begin{array}{c} + \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \\ + \end{array} $

Tableau 10 : Dérivés des acides aminés (Rakipov, 1987)

MATERIELS & METHODES

III MATERIELS ET METHODES.

III.1 Matériels

III.1.1 Le tourteau déshuilé de la noix de Brésil

Le tourteau déshuilé par pressage de la noix du Brésil a été founit par la société JBA Agroconcept (Castries, France). Les échantillons de noix du Brésil utilisés lors de cette étude ont été collectés en Février 2000 dans la région amazonienne du Brésil. L'origine exacte de cette variété de noix du Brésil très riche en sélénium est volontairement tenue secrète en raison des applications industrielles qui ont découlées de cette étude. Depuis le début de cette étude, en Avril 2000, les échantillons de noix sont stockés dans un placard à température ambiante à une température moyenne de 25 °C.

III.1.2 Le fruit de *Morinda citrifolia* ou Noni

Les lots de fruits frais entiers de *Morinda Citrifolia* proviennent du Cambodge. Ils ont été envoyés par avion et ont été conservés congelés à -20°C durant toute la durée de l'expérimentation.

Du jus de Noni de Tahiti a été acheté en bouteille pasteurisé dans une pharmacie à Paris pour servir de référence.

III.2 Méthodes

III.2.1 Détermination de la matière sèche par séchage à l'étuve

Tourteau de noix du Brésil : 2g de tourteau, pesé exactement, sont séchés à l'étuve à 105°C jusqu'à avoir une masse constante (AOAC, 1990).

Jus de Noni : La matière sèche des échantillons de jus a été déterminée après passage à l'étuve sous vide (Bioblock Scientifique) pendant 24 heures à la température de 70°C.

III.2.2 Détermination de l'activité de l'eau (Aw) des tourteaux

L'activité de l'eau a été mesurée à l'aide d'un Aqualab, Série 3TE (USA).

Vérification des standards

Quatre standards servent à vérifier la précision de l'appareil : $A_w = 0,983$; $0,760$; $0,500$ et $0,250$. Ces standards sont stables durant 1 an. Les échantillons doivent être homogènes. Les A_w sont obtenues en 40 secondes avec une précision de $\pm 0,001$.

Vérification des standards à 20°C	Activité de l'eau (A_w)
0,5 M KCl	$0,983 \pm 0,001$
6,0 M NaCl	$0,760 \pm 0,003$
8,57 M LiCl	$0,500 \pm 0,003$
13,41 M LiCl	$0,250 \pm 0,003$

III.2.3 Teneur en minéraux des tourteaux par carbonisation à 550°C

5g de tourteau pesés précisément sont mis dans une étuve à 550° C et laissés jusqu'à obtenir une masse constante (AOAC, 1990).

III.2.4 Dosage des matières minérales des tourteaux

Ces mesures ont été réalisées au laboratoire normalisé d'analyses du Cirad-Amis/Agronomie.

III.2.4.1 Minéralisation par voie sèche et destruction de la silice par HF

(Code Interne : Procédure N° PP0904)

En éliminant la matière organique et la silice des échantillons, cette méthode permet de mettre en solution, en vue de leur dosage, des éléments minéraux tels que P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn et Se. Elle s'applique à toutes matrices végétales et environnementales et notamment celles riches en silice.

Minéralisation

500 mg de matériel végétal préalablement séché, sont introduits dans une capsule en platine. La capsule est placée dans un four dont la température est augmentée progressivement jusqu'à 500°C et maintenue pendant 2 heures. Un pallier est effectué aux alentours de 200°C jusqu'à la fin du dégagement de fumées.

Une étape supplémentaire est ajoutée au protocole de simple minéralisation qui consiste à détruire la silice contenue dans les cendres en ajoutant de l'acide fluorhydrique, les composés SiF_6 étant volatils.

La reprise des cendres étant réalisée en deux étapes, l'acidité finale correspond à 3 mL d'acide HCl 6N pour 50 mL. Les solutions sont prêtes à analyser par la technique appropriée (ICP, AAS, FES, ...).

III.2.4.2 Dosages de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Se par spectrométrie d'émission plasma I.C.P.

(Code Interne : I.L.ICP)

Les échantillons mis en solution selon la procédure de minéralisation par voie sèche, sont prêts à être analysés par spectrométrie d'émission plasma (ICP). Cette technique permet d'analyser simultanément les éléments : P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Se.

La validation des résultats analytiques repose sur l'analyse d'échantillons de référence internes témoins, dont la teneur en éléments minéraux est connue. Ces témoins sont introduits à raison de 1 pour 20 échantillons dans les grandes séries. Un témoin au minimum est incorporé lorsque le nombre d'échantillons est inférieur à 20. Les références suivent rigoureusement le même cheminement analytique que les échantillons.

III.2.5 Détermination de la teneur en soufre des tourteaux

(Code Interne: Procédure N° PP0909, Laboratoire d'analyse de Cirad-Amis/Agronomie).

Cette méthode s'applique aux végétaux et autres matrices agroalimentaires pour l'analyse du soufre total.

Le soufre minéral et organique de l'échantillon est oxydé en sulfate au cours de la minéralisation par voie sèche en présence de $Mg(NO_3)_2$. Le dosage du soufre total s'effectue par turbidimétrie après formation de sulfate de baryum sur un colorimètre à flux continu à la longueur d'onde de 420 nm. Il peut également être réalisé par spectrométrie d'émission plasma (ICP).

III.2.6 Détermination de la teneur en azote totale

(Code Interne: Procédure N°PS0931, Laboratoire d'analyse de Cirad-Amis/Agronomie).

Une prise d'essai de 50 à 150 mg de chaque échantillon préalablement broyé et homogénéisé est pesée dans une feuille d'étain et placée sur un passeur d'échantillon. L'échantillon, placé dans une feuille d'étain, est introduit dans un four à environ 850°C dans un flux d'oxygène.

Les gaz de combustion subissent une série de piégeage pour éliminer les poussières, les halogènes, la vapeur d'eau et les oxydes de carbone. Une réduction sur colonne de cuivre à 730°C dans un flux d'hélium permet de réduire les oxydes d'azote en gaz N_2 .

La teneur en azote est déterminée par une cellule thermoélectrique (catharométrie) après une calibration avec des substances de compositions en N connue (EDTA, Glycine...).

III.2.7 Extraction de l'huile des tourteaux par la méthode de Soxhlet

(Laboratoire d'analyse de Cirad-Amis-Paa. Code : PC0918A (2000).

20g de tourteaux pré-séchés et pesés exactement dans une cartouche adaptée sont mis dans un extracteur de Soxhlet. Le processus d'extraction s'effectue pendant 6 heures à l'hexane. Le solvant est ensuite évaporé et les échantillons séchés à l'étuve à 105°C pendant 30 min.

III.2.8 Détermination de la matière minérale de l'huile des tourteaux

(Code Interne: Procédure N° PP0912, Laboratoire d'analyse de Cirad-Amis/Agronomie).

Cette méthode s'applique aux huiles et aux corps gras pour réaliser le dosage des éléments minéraux tels que P, Ca, Mg et Na par spectrométrie d'émission plasma (ICP).

Les échantillons doivent être conditionnés dans des flacons hermétiques et homogénéisés avant d'effectuer la prise d'essai. 10 g d'échantillon sont pesés dans un bêcher de 100mL et recouverts d'un verre de montre, puis placés dans un four à moufle froid.

La minéralisation est effectuée en montant progressivement la température jusqu'à 300°C que l'on maintient pendant 24 h, puis en réalisant des paliers à 350°C, 400°C puis 450°C, chaque palier étant maintenu pendant 4h. La minéralisation est terminée après avoir effectué un dernier palier de 4 h à 475°C.

Les cendres sont dissoutes par 4 mL de HCl au 1/2. La filtration est réalisée sur filtre rapide dans des fioles jaugées de 50mL. Le dosage des éléments minéraux est réalisé par spectrométrie d'émission plasma (ICP).

III.2.9 Détermination de la plage de fusion de l'huile de tourteau

1 g d'huile a été mis dans un tube à essai muni d'un thermomètre. Les échantillons sont congelés pendant 30 min. Le tube à essai est ensuite sorti du congélateur et porté à température ambiante. La température correspondant à la fonte totale de l'huile est notée.

III.2.10 Détermination de la densité de l'huile de tourteau (AOAC, 1990).

III.2.10.1 Standardisation du pycnomètre

Laver un pycnomètre de 50 mL en le remplissant avec une solution d'acide chromique et le laisser quelques heures au repos. Vider le pycnomètre et le rincer à l'H₂O. Remplir le pycnomètre avec de l'eau bouillante, le refroidir à température ambiante puis le mettre dans un bain marie à 25°C. Après 30 min, sortir le pycnomètre du bain marie et ajuster le niveau d'eau interne du pycnomètre, le boucher, le sécher soigneusement et le peser.

Après la mesure, vider le pycnomètre, le rincer quelques fois avec de l'alcool et de l'éther, le laisser sécher complètement, évaporer l'éther et peser.

La densité de l'eau est donnée par le calcul de la différence du poids du pycnomètre contenant l'eau et le pycnomètre vide.

III.2.10.2 Détermination

Remplir le pycnomètre sec avec l'échantillon préalablement refroidi à 20°C, le placer dans un bain marie 30 min à 25°C, ajuster le niveau de l'huile au point approprié sur le pycnomètre. Le retirer du bain, le sécher, et peser comme précédemment. La densité de l'huile à 25°C est donnée par le calcul de la différence du poids du pycnomètre contenant l'huile et le pycnomètre vide.

III.2.11 Détermination de l'acidité de l'huile

(Procédure code : PC0916A (1999), Laboratoire d'analyses de Cirad-Amis/Paa).

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode titrimétrique de détermination de l'acidité des corps gras d'origine animale ou végétale.

L'acidité d'un corps gras mesure le pourcentage d'acides gras libres contenu dans celui-ci. Il est exprimé par le pourcentage de l'acide gras libre le plus important contenu dans le corps gras.

<i>Nature du corps gras</i>	<i>Expression</i>	<i>Masse molaire</i>
Huile de coprah, huile de palmiste et huiles similaires	Acide laurique	200
Huile de palme	Acide palmitique	256
Tous autres corps gras	Acide oléique	282

Solution éthanolique 0.1 N d'hydroxyde de potassium

Dissoudre 5,6g d'hydroxyde de potassium dans un litre d'éthanol absolu. La solution est préparée au moins 24 heures avant la titration puis est filtrée sur filtre plissé.

Contrôle du titre de la solution d'hydroxyde de potassium

Dans un Bêcher de 100 mL, dissoudre dans l'eau distillée environ 100 mg d'hydrogénéphthalate de potassium ($M = 204,22$ g) exactement pesé à la balance analytique.

Titre à la burette par la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,1N en présence de 3 gouttes de phénolphaléine jusqu'à l'apparition d'une coloration rose persistante. Noter le volume V (mL) de descente de burette de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

La normalité N de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium est :

$$N = m \text{ (g)} \times 1000 \text{ (mL)} / M \text{ (g)} \times V \text{ (mL)}$$

où m est la masse en gramme de la prise d'essai d'hydrogénophthalate de potassium.
la moyenne arithmétique de deux déterminations est prise comme résultat.

Mode opératoire

- Dissoudre environ 2g de corps gras pesé exactement dans environ 40 mL du mélange oxyde diéthylique / éthanol (1/1 v/v) dans un erlenmeyer de 100 mL.
- Ajouter 3 gouttes de la solution de phénolphtaléine (solution à 20 g/L dans l'éthanol absolu). La quantité de solvant pourra varier en fonction de la coloration du corps gras.
- Titrer, en agitant sur agitateur magnétique avec la solution d'hydroxyde de potassium 0,1 N jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose persistant durant au moins 10 secondes). Soit V (mL) le volume de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

Parallèlement est effectué un essai à blanc sans corps gras. Soit V_0 (mL) le volume de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation de la même quantité du mélange oxyde diéthylique / éthanol utilisé lors du titrage du corps gras.

Calcul et expression des résultats :

L'acidité, exprimée en pourcentage en masse est égale à :

$$(V - V_0) \times N \times M / 1000 \times 100 / PE = (V - V_0) \times N \times M / 10 \times PE$$

où :

- V est le volume en mL de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée lors du titrage du corps gras.
- V_0 est le volume en mL de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée lors de l'essai à blanc.
- N est la normalité exacte en mole par litre de la solution d'hydroxyde de potassium.
- M est la masse molaire en gramme par mole de l'acide gras adopté pour l'expression du résultat.
- PE est la masse en gramme de la prise d'essai du corps gras.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique de deux déterminations.

III.2.12 Détermination de l'indice de peroxyde des huiles

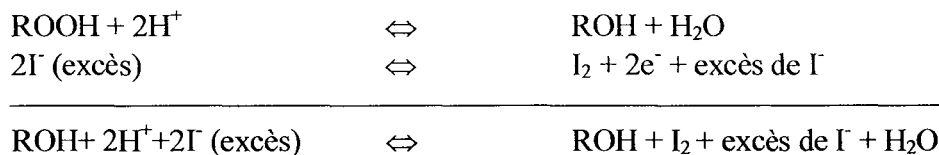
(Procédure code : PC0917A (1999). Laboratoire d'analyse de Cirad-Amis-Paa).

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode de détermination de l'indice de peroxyde dans les corps gras d'origine animale et végétale.

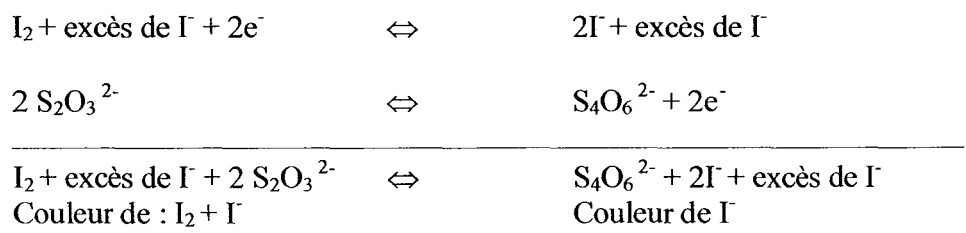
L'indice de peroxyde (IP) d'un corps gras mesure son état d'oxydation. Il est exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par kg de matière grasse pouvant oxyder l'iodure de potassium en présence d'acide acétique et de chloroforme. L'iode libéré est titré en retour par une solution de thiosulfate de sodium.

Schéma réactionnel :

➤ Oxydation de l'iodure de potassium en excès par rapport au corps gras (ROOH) :



➤ Titration de l'iode libérée par $Na_2S_2O_3$:



Préparation des réactifs :

- Solution aqueuse de thiosulfate de sodium 0,002N :

Préparation :

1 solution 1N de $Na_2S_2O_3$ est préparée à partir de $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$ (M = 248,18) dont on pèse 0,496g par litre d'eau.

Contrôle du titre de $Na_2S_2O_3$:

Préparer par dilution avec l'eau pure une solution 0,1N de $KMnO_4$ ou $K_2Cr_2O_7$ de titre exact. Prendre 50 mL de solution $Na_2 S_2 O_3$ que l'on titre en présence d'une goutte d'acide sulfurique 97% avec la solution 0,01N jusqu'à apparition de la couleur de $KMnO_4$ (violet) ou de $K_2Cr_2O_7$ (orange). Noter le volume de descente V (mL).

$$\text{Titre de } Na_2S_2O_3 = (0,01 \times V) / 50$$

- Solution aqueuse saturée d'iodure de potassium (KI), récemment préparée, exempte d'iode et d'iodate : 3g de KI dans 2 mL d'eau pure.

Tous les réactifs, chloroforme, acide acétique cristallisable (glacial) 100%, eau pure ($\leq 5 \mu S/cm$), $Na_2S_2O_3$ 0,002N, Solution aqueuse saturée d'iodure de potassium (KI) sont débarrassées de l'oxygène dissous par barbotage d'un courant de gaz inerte pur et sec (Hélium ou N_2).

Mode opératoire

Selon l'indice de peroxyde présumé, peser (PE) dans un erlenmeyer (à col rodé séché et rempli d'un gaz inerte et bouchon) 100 à 500mg de corps gras extrait à l'hexane.

Dans un erlen contenant le corps gras introduire :

- 10 mL de chloroforme et dissoudre le corps gras en agitant rapidement.
- 15 mL d'acide acétique cristallisable (glacial) 100%.
- Boucher aussitôt l'erlen, l'agiter pendant une minute et l'abandonner cinq minutes à l'abri de la lumière.
- Ajouter 75 mL d'eau pure mesurée à l'éprouvette.
- Titrer sur agitateur magnétique, en présence de thiodène de sodium (indicateur d'iodométrie) (ou empois d'amidon) comme indicateur, l'iode libéré avec la solution de thiosulfate de sodium 0,002N (virage du bleu au blanc).
- Deux déterminations sont effectuées sur le même échantillon.

Echantillon de contrôle

Un essai à blanc sans le corps gras est effectué parallèlement. Si la descente de burette excède un volume V_0 de 25 mL de solution 0,002N de thiosulfate de sodium, de nouveaux réactifs doivent être préparés.

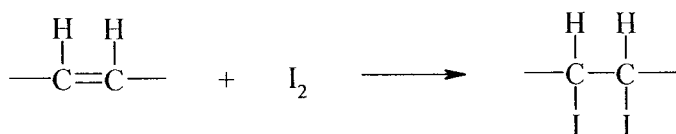
Calcul et expression des résultats

- Soit V le volume (mL) de la solution de thiosulfate de sodium 0,002N utilisé pour la titration de l'échantillon.
- Soit V_0 le volume (mL) de la solution de thiosulfate de sodium 0,002N utilisé pour l'essai à blanc.
- Soit PE la prise d'essai de l'échantillon exprimée en gramme (g).
- Soit N la normalité de la solution thiosulfate de sodium 0,002N.
- L'indice de peroxyde IP exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par Kg de matière grasse est donné par la formule :

$$IP = (V - V_0) \times N \times 1000 / PE$$

III.2.13 Détermination de l'indice d'iode des huiles

L'indice d'iode est le nombre de grammes d'iode fixés par 100 g d'huile. L'indice d'iode permet de juger de la teneur des huiles en acides gras insaturés, c'est-à-dire du degré de son insaturation, car la fixation de l'iode se produit sur les doubles liaisons (Rakipov, 1987 ; Alais, 1984).



$$\text{I.I} = \sum^n \frac{\text{PM}(\text{I}_2)}{\text{PM}(\text{esterAG})} \times \% \text{AG} \qquad \frac{\text{PM}(\text{I}_2)}{\text{PM}(\text{esterAG})} = \text{K}$$

$$\text{I.I} = \text{K}_{16^-} \times (\%_{\text{C}_{16:1}}) + \text{K}_{18^-} \times (\%_{\text{C}_{18:1}}) + \text{K}_{18^2} \times (\%_{\text{C}_{18:2}}) + \text{K}_{18^3} \times (\%_{\text{C}_{18:3}}) + \text{K}_{20^-} \times (\%_{\text{C}_{20:1}})$$

III.2.14 Teneur en insaponifiable de l'huile (IUPAC, 1965).

La méthode est applicable à toutes les matières grasses. Toutefois son exactitude n'est qu'approximative pour certaines matières grasses ayant une teneur en insaponifiable très élevée.

On désigne sous le nom d'insaponifiable les substances solubles dans la matière grasse, lesquelles, après saponification, sont insolubles dans l'eau et solubles dans le solvant utilisé pour le dosage. Il comprend les constituants naturels des matières grasses (stérols, alcools, hydrocarbures...), ainsi que les substances organiques non volatiles à 100°C (huiles minérales) étrangères aux matières grasses qu'elles peuvent éventuellement contenir. Comme solvant, on utilise l'éther de pétrole ou bien l'oxyde d'éthyle.

Méthode à l'oxyde d'éthyle

Peser exactement à 0,01 g près environ 5 g de matière grasse dans un ballon. Ajouter 50 mL de la solution éthanolique de KOH environ 2N. Adapter un réfrigérant à reflux. Chauffer une heure à légère ébullition.

Après arrêt du chauffage, le réfrigérant est déconnecté et le contenu du ballon est transvasé dans une ampoule à décanter. Laver avec 100 mL d'eau distillée en une ou plusieurs fois.

Rincer le ballon et le réfrigérant avec 100 mL d'oxyde d'éthyle et verser dans l'ampoule. Boucher et agiter vigoureusement pendant que le contenu est encore tiède; tenir l'ampoule verticale jusqu'à ce que les deux couches se séparent limpides (au cas où une émulsion persisterait, causée par une alcalinité trop forte du milieu, ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique environ 1N).

Extraire la couche hydro-éthanolique et la verser dans le ballon qui a servi pour la saponification. Extraire la couche étherée de l'ampoule et la verser dans une autre ampoule contenant environ 40 mL d'eau.

Epuiser la solution hydro-éthanolique de savon, deux fois encore, et chaque fois avec environ 100 mL d'oxyde d'éthyle de la même manière, et réunir les fractions étherées dans la deuxième ampoule à décanter. Si les fractions étherées contiennent des matières solides en suspension, avoir soin de les filtrer et laver le filtre quantitativement avec un peu d'oxyde d'éthyle.

Faire tourner sur elle-même sans secousses violentes, l'ampoule contenant l'oxyde d'éthyle et les 40 mL d'eau, puis, après séparation des phases, soutirer l'eau de lavage. Laver la solution étherée deux fois avec environ 40 mL d'eau en agitant vigoureusement chaque fois. Puis laver successivement avec environ 40 mL de solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 0,5N, environ 40 mL d'eau, et de nouveau avec environ 40 mL de solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 0,5N, et encore au moins deux fois avec environ 40 mL d'eau.

Continuer les lavages à l'eau jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus de coloration rose par addition d'une goutte de solution de phénolphaléine.

Transvaser en plusieurs fois la solution étherée, quantitativement (en faisant de petits lavages de l'ampoule avec le solvant) dans un ballon taré de 200 mL, puis évaporer à petit volume.

Ajouter 6 mL d'acétone, et éliminer complètement le solvant volatil en s'aidant d'un léger courant d'air, le ballon se trouvant presque entièrement immergé, le tenir obliquement, et le faire tourner dans un bain d'eau bouillante.

Terminer le séchage dans étuve à 104°C pendant 15 min en plaçant le ballon en position horizontale. Peser après refroidissement dans un dessiccateur. Répéter le séchage de quart d'heure en quart d'heure jusqu'à ce que la perte de poids entre deux pesées successives soit inférieure à 0,1%.

Après avoir pesé le résidu, le dissoudre dans environ 20 mL d'éthanol à 95 % (v/v) fraîchement distillé et neutralisé. Titrer avec une solution éthanolique de KOH 0,1N en présence de phénolphaléine. Si le volume utilisé excède 0,2 mL, le dosage doit être entièrement recommencé.

Calcul

$$\text{Insaponifiable \%} = 100 \times a / p$$

Avec a = poids en g du résidu

p = poids en g de la prise d'essai

III.2.15 Détermination de la composition en acides gras des huiles

III.2.15.1 Préparation des esters méthyliques

(Procédure code : PC0919A, Cirad-Amis/Paa).

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode de préparation d'esters méthyliques d'acide gras à partir de corps gras d'origine animale et végétale. Les esters méthyliques ainsi obtenus sont destinés à être analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Cette préparation présente les avantages suivants:

- Élimination de la polarité (inhibition des phénomènes d'association)
- Augmentation de la volatilité (inhibition des phénomènes d'association)
- Amélioration de la stabilité chimique et thermique
- Recul des limites de détection
- Possibilité d'utiliser des détecteurs spécifiques.

La transformation de corps gras en esters méthyliques se déroule en deux étapes successives, une méthanolyse basique suivie d'une estérification acide.

A. Méthanolyse Basique :

Dans cette étape, les parties neutres glycériques sont transformées en esters méthyliques et les acides gras libres, éventuellement présents, sont transformés en savons (Figure 17).

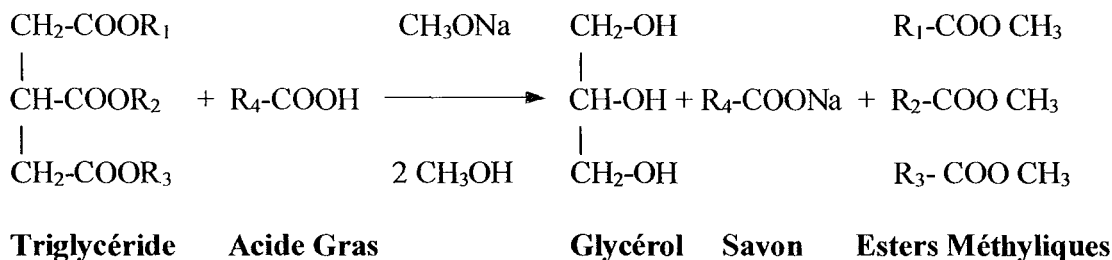


Figure 17 : Equation de la méthanolyse alcaline par méthylate de sodium.

B. Estérification acide :

L'acidification du milieu par excès de méthanol chlorhydrique provoque une décomposition des savons précédemment formés en acides gras qui sont estérifiés (Figure 18).

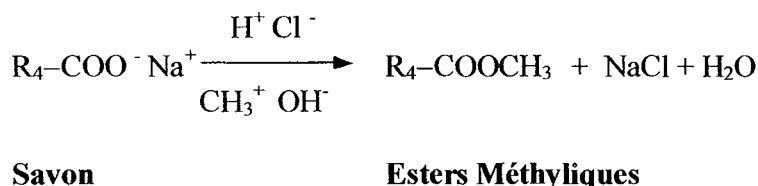


Figure 18 : Equation de l'estérification des acides gras en présence de méthanol chlorhydrique.

Les échantillons sont conservés sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière.

Préparation des réactifs

A. Solution de méthylate de sodium :

Une solution de méthylate de sodium est préparée en mélangeant 62 mL d'une solution de méthylate de sodium à 0,5 M dans du méthanol, 560 mL de méthanol pour HPLC, 240 mL de benzène pour analyse et quelques mg de phénolphtaléine pure.

B. Solution de méthanol chlorhydrique :

Une solution de méthanol chlorhydrique est préparée en mélangeant avec 50 mL de chlorure d'acétyle à 625 mL de méthanol pour HPLC :

- Introduire le chlorure d'acétyle dans l'ampoule à décanter sous hotte aspirante.
- Introduire le méthanol dans l'erenmeyer placé sur un agitateur magnétique. Agiter modérément.
- Faire couler goutte à goutte le chlorure d'acétyle dans le méthanol.

Mode opératoire

A l'aide d'une pipette pasteur introduire dans le ballon 50 mL 2 à 3 gouttes du corps gras. Ajouter dans le ballon 2 à 3 pierres ponce pour réguler l'ébullition et 3 mL de la solution de méthylate de sodium. Une canne à saponification est placée au dessus du ballon et le mélange est chauffé à reflux pendant 10 min.

3 mL de méthanol chlorhydrique sont alors ajoutés dans le ballon de 50 mL par le haut de la canne à saponification jusqu'à décoloration de la phénolphtaléïne. Le mélange est à nouveau chauffé à reflux pendant 10 min.

Après refroidissement du mélange à température ambiante, environ 10 mL d'eau distillée puis 15 mL hexane sont rajoutés dans le ballon.

La phase hexanique (que l'on peut éventuellement sécher sur du sulfate anhydre de sodium) contenant les esters méthyliques d'acides gras est prélevée.

III.2.15.2 Analyse des esters méthyliques par CPG

(1 μ l) de solution d'esters méthyliques, dissous dans l'hexane, sont injectés dans un chromatographe Ceinstruments (Modèle GC 8000 Top) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur à fuite. Les températures des injecteur et détecteur sont de 250°C et 260°C respectivement. La colonne est une Supelcowax 10 (0.32mm i.d. \times 30m de long, 0.25 μ m d'épaisseur de film). Le gaz porteur est de l'Hélium utilisé avec un débit de 2mL./min. Le programme de température est de 100°C pendant 5 min, qui augmente à 230°C à la vitesse de 10°C/min. Les pics sont intégrés grâce à un intégrateur Merck D-2000. Les acides gras sont identifiés par comparaison des temps de rétention des acides gras d'une huile de palme et par comparaison avec la littérature (Rakipov, 1987).

III.2.16 Détermination de la composition en tocophérols par HPLC

1.0 g d'huile sont dissous dans 13 mL d'hexane. 10 μ L sont injectés dans une colonne de 150 \times 4.6 mm de 5 μ m Hypersil® Silica. Le Chromatographe liquide (Spectra SYSTEM P1000 XR) est équipé d'un détecteur Spectra SYSTEM FL 3000 de longueur d'onde d'excitation de 294 nm et d'émission de 336 nm. La phase mobile est un mélange de 97% n-hexane et 3% 1,4 dioxane, son débit est fixé à 1 mL/min. L'intégrateur Getek est utilisé pour calculer la surface des pics.

III.2.17 Détermination de la composition en stérols de l'huile par CPG

Saponification de l'huile (I.U.P.A.C, 1965)

Peser exactement à 0,01g près environ 5 g de matière grasse dans un ballon. Ajouter 50 mL d'une solution éthanolique de KOH environ 2N. Chauffer à reflux durant une heure avec une légère ébullition.

Après arrêt du chauffage, déconnecter le réfrigérant et transvaser le contenu du ballon dans une ampoule à décanter. Laver avec 100 mL d'eau distillée en plusieurs fois.

Rincer le ballon et le réfrigérant avec 100 mL d'oxyde d'éthyle et verser dans l'ampoule. Boucher et agiter vigoureusement pendant que le contenu est encore tiède; tenir l'ampoule verticale jusqu'à ce que les deux couches se séparent et soient limpides.

Extraire la couche hydro-éthanolique et la verser dans le ballon qui a servi pour la saponification. Extraire la couche étherée de l'ampoule et la verser dans une autre ampoule contenant environ 40 mL d'eau. Epuiser la solution hydro-éthanolique de savon, deux fois encore, et chaque fois avec environ 100 mL d'oxyde d'éthyle de la même manière, et réunir les fractions étherées dans la deuxième ampoule à décanter.

Faire tourner sur elle-même sans secousse violente l'ampoule contenant l'oxyde d'éthyle et les 40 mL d'eau, puis après séparation des phases, soutirer l'eau de lavage.

Laver la solution étherée deux fois avec environ 40 mL d'eau en agitant vigoureusement chaque fois. Puis, laver successivement avec environ 40 mL de solution aqueuse de KOH 0.5N, environ 40 mL d'eau, et de nouveau avec environ 40 mL de solution aqueuse de KOH 0,5N, et encore au moins deux fois avec environ 40 mL d'eau.

Transvaser en plusieurs fois la solution étherée, quantitativement (en faisant de petits lavages de l'ampoule avec le solvant) dans un ballon taré de 200 mL, puis évaporer.

Ajouter 6 mL d'acétone et éliminer complètement le solvant en s'aidant d'un léger courant d'azote. L'échantillon est conservé dans 10 mL d'hexane à -20°C pour analyse.

Isolement des stérols par chromatographie sur couche mince

La solution obtenue est déposée sur une plaque de Silica gel 60F254 de 0,5 mm d'épaisseur (Merck, 64271 Darmstadt, Germany) 20×20 cm en une bande continue de 14 cm (*ca.* 20mg/plaque) grâce à un Linomat-3 auto applicator (CAMAG, Switzerland) à 25 mm des côtés droit et gauche de la plaque. La solution étalon de cholestérol est déposée à 10 mm du bord gauche et 10 mm du bord droit de la plaque. Le solvant de migration est du chloroforme/éther (90/10, v/v). Après séchage, les plaques sont pulvérisées avec une solution de dichlorofluoresceine dans l'éthanol et observées sous UV (Chromato-vue modèle CC20, Ultra-Violet Products Inc). Les taches sont extraites des plaques par grattage et extraction par deux fois avec du chloroforme.

Préparation des dérivés triméthylsilyl éthers des stérols

L'insaponifiable total est dérivé en triméthylsilyl éthers par ajout de 100 mL de réactif Tri-Sil (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA). Les tubes sont incubés à 60°C pendant 45 min. Le solvant est évaporé sous courant d'azote. Les éthers TMS dérivés sont dissous dans 1 mL d'hexane. Les tubes sont soumis aux ultra-sons dans un bain ultrasonique pendant 1 min et centrifugés pendant 3 min. La phase hexanique est transférée dans un autre tube et séchée par évaporation puis dissoute dans 0,5mL d'hexane pour analyse en GC.

Analyse des stérols par CPG

Les stérols sont analysés sur une colonne capillaire (30m × 0.32 mm i.d.) avec une phase stationnaire de 0,15 µm d'épaisseur (DB-1701, Germany) de 50% phenyl-/50% methyl-polysiloxane (TAP, Crompack, Inc., Raritan, NJ, USA). Le gaz vecteur est de l'hydrogène

(Pression à l'entrée de 0,7 bars avec un débit de 2mL/min). La température des injecteur et détecteur est de 280°C. La température du four est de 254°C. L'intégration des pics est réalisée avec un intégrateur HP 6890 (Hewlett-Packard GC System, Avondale, USA).

III.2.18 Quantification des phospholipides par spectrophotométrie

Préparation des échantillons

A. *Extraction par osmose :*

6 g de lipides dans de l'hexane sont mis dans un doigt de gant de chirurgien en latex pour la séparation des lipides neutres de phospholipides. L'osmose est réalisée contre de l'hexane avec un débit de 0,5 mL/min pendant 24 hrs. Les phospholipides sont transférés du doigt de gant vers un tube à hémolyse. L'hexane est évaporé à sec sous un courant d'azote et conservé dans 1mL de chloroforme à -20°C pour les analyses suivantes.

B. *Chromatographie en couche mince des Phospholipides :*

Les phospholipides sont appliqués sur des plaques de silice de 0,5 mm d'épaisseur, de 5 × 20 cm 60 F254 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) en bande de 2 cm (ca. 0,8mg/plaque) grâce à un déposeur automatique Linomat-3 (Camag, Switzerland). Les étalons de phospholipides sont déposés sur une autre plaque et les plaques sont mises à migrer dans un solvant chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50/20/10/10/5, v/v/v/v/v). Les plaques sont ensuite révélées au bleu de molybdène.

Quantification des phospholipides par spectrophotométrie

Une plaque de chromatographie couche mince est réalisée selon le protocole précédent mais cette plaque n'est pas révélée et les bandes sont mises en évidence par transparence puis grattées et analysées selon la méthode de Ames (1966).

200 µL d'eau distillée et 20 µL de nitrate de magnésium sont ajoutés aux échantillons. Les échantillons sont minéralisés au bec Bunsen jusqu'à apparition d'un dépôt blanc. 300µL de HCl 0,5N sont ajoutés. Les échantillons sont alors mis à incuber dans un bain d'eau à 45°C pendant 20 min et refroidit ensuite à température ambiante. 700 µL d'une mixture contenant le mélange 10% d'acide ascorbique et de molybdate d'ammonium (1/6 p/p) est ajoutée. Les concentrations en phosphore des échantillons ont été obtenues par comparaison de leurs absorbances avec celles de solutions standard préparées selon le même protocole que les solutions à analyser.

Tubes	0	1	2	3	4	5	6
Solutions de phosphore (µL)	0	10	15	20	30	40	50
Eau distillée (µL)	100	90	85	80	70	60	50
10% Mg(NO ₃) ₂ dans éthanol 96° (µL)	60	60	60	60	60	60	60

Tableau 11 : Composition des solutions standards de phosphore

III.2.19 Teneur totale en sucres

III.2.19.1 Extraction des sucres au reflux d'éthanol à 80 % (Procédure code : PC 0901A (1999), Cirad-Amis/Paa).

Cette méthode a pour objet de décrire une méthode d'extraction des sucres des matières végétales diverses. Les échantillons contenant une teneur en lipides supérieur à 5% sont délipidés à l'hexane avant extraction éthanolique.

Les sucres sont extraits de leur matrice végétale par l'alcool éthylique à 80 % au reflux, deux fois une heure. L'extraction des sucres est l'étape préalable à leur quantification. Celle-ci s'effectuera par chromatographie liquide haute pression. Le principe de la méthode décrite ci-après est d'amener en solution les sucres présents dans les échantillons dans un solvant compatible avec la phase mobile utilisée pendant le processus de dosage chromatographique et avec le type de colonne employée.

Selon la teneur en sucres supposée de l'échantillon et le mode de détection utilisé pendant le processus de dosage chromatographique, la prise d'essai variera de 1g à 10g.

Dispositions générales

Peser à 0,1 mg près 10g d'échantillon broyé que l'on introduit dans un erlenmeyer auquel 100 mL d'alcool éthylique à 80% sont ajoutés avec un barreau aimanté.

Porter à ébullition douce sur à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant et laisser sous reflux pendant 1 heure.

Filtrer ensuite dans un ballon de 500 mL. Récupérer le résidu insoluble, le réintroduire dans l'erlenmeyer et ajouter 100 mL d'alcool éthylique à 80%. Recommencer l'opération d'extraction une deuxième fois pendant une heure.

Filtrer dans le même ballon que précédemment (réunion des deux filtrats) en prenant soin de bien rincer à l'alcool éthylique à 80% le résidu insoluble.

Evaporer à 45°C l'alcool éthylique à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtenir 15 à 20 mL d'extrait. Introduire l'extrait obtenu dans une fiole jaugée de 50 mL et ajuster à 50 mL avec de l'eau pure.

Conditionner l'extrait dans un godet en polyéthylène de 10 mL identifié, filtrer à 0,2 µm si le dosage chromatographique suit l'extraction. Dans le cas contraire conserver l'extrait au congélateur, la filtration s'effectuant après la décongélation.

Conserver une 2^{ème} partie aliquote de l'extrait dans un godet en polyéthylène (50x35mm) identifié et numéroté. Stocker au congélateur.

III.2.19.2 Dosage des mono et disaccharides par chromatographie ionique DX600 (Procédure code : PC 08A (2001), Cirad-Amis/Paa).

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode de dosage des sucres extraits de diverses matrices végétales ou animales.

Les sucres en milieu fortement basique ($\text{pH} > 12$) se comportent comme des acides faibles (pK_a entre 12 et 14). Ionisés, ils peuvent être séparés par échange d'anions. Les résines utilisées sont constituées de billes de polystyrène-divinyl-benzène de 5 à 10 μm recouvertes de micro particules de latex de 0,1 μm porteuses de groupements d'ammonium quaternaire. Cette technologie confère au système des cinétiques d'échanges très rapides et une stabilité pour une gamme de pH étendus (0 à 14).

La détection par ampérométrie basée sur la mesure du courant d'oxydation des sucres à un potentiel déterminé, présente une spécificité liée à la réaction électrochimique des groupements d'alcools secondaires.

Préparation des échantillons

Les solutions sont au besoin décongelées et homogénéisées avant toute manipulation et filtrées sur membrane de porosité 0,2 ou 0,45 μm . Selon la teneur en sucres supposée, la solution est diluée de manière à avoir des teneurs pour chaque sucre comprises entre 5 et 30 mg par litre. 0,8 mL de solution filtrée ou centrifugée sont versés à l'aide de la pipette automatique dans un pilulier adapté au passeur d'échantillon utilisé.

Préparation des standards

- Préparation de la solution mère de glucose, fructose, saccharose :

Dans une fiole de 50 mL, peser à +/- 0,1 mg, environ 50 mg de glucose, 70 mg de fructose et 300 mg de saccharose. Ajuster à 50 mL avec de l'eau déminéralisée.

Diluer au 1/20 puis au 1/10^{ème} la solution mère obtenue. Les solutions mère et fille se conservent 72 heures à 120 heures à + 4°C ou plusieurs mois à - 20°C.

- Préparation des solutions de référence :

Dégeler une solution mère de jus d'orange (marque Joker). Homogénéiser la solution, centrifuger et effectuer une dilution à 2000 à l'aide du diluteur automatique. Verser les solutions diluées dans des piluliers appropriés. Ces solutions références J2000 peuvent se conserver plusieurs mois à - 20°C.

Préparation des éluants

- Acétate de sodium 0,2M.

Vérifier avant chaque manipulation qu'il n'y ait pas de dépôt dans la solution utilisée. Peser 8,2g d'acétate de sodium dans une fiole jaugée de 500 mL et ajuster avec de l'eau pure, l'introduire dans le flacon réservé à cet usage préalablement rincé et nettoyé.

- Hydroxyde de sodium 0,1M.

Introduire dans un bidon 1 litre d'eau pure, faire buller de l'hélium 1 à 2 min puis ajouter 5,2 mL de soude à 50%.

- Hydroxyde de sodium 0,002M.

Introduire dans un bidon 2 litres d'eau pure, faire buller de l'hélium 1 à 2 min puis ajouter 0,2 mL de soude à 50%.

- Hydroxyde de sodium de la post-colonne 0,3M.

Dans une fiole jaugée de 2 litres, introduire au choix 31,2 mL de soude à 50% ou 24g de soude en pastilles. Compléter au trait de jauge.

Mode opératoire

Disposer les échantillons à analyser sur le passeur automatique d'échantillons. La séparation est réalisée sur un chromatographe ionique Dionex DX600 muni d'une colonne et d'une colonne de garde échangeuse d'anion DIONEX Carbo pac PA1 (250 mm x 4 mm) et d'un détecteur ampérométrique (PAD).

Appliquer le gradient d'élution suivant :

A = NaOH 2mM

B = NaOH 100mM

C = Acétate

D = Eau

Temps 0 min	24 min	30 min	33 min	36 min
Flow = 1.00	Flow = 1.00	Flow = 1.00	Flow = 1.00	End
%B = 50.0	%B = 0.0	%B = 100.0	%B = 50.0	
%C = 0.0	%C = 100.0	%C = 0.0	%C = 0.0	
%D = 0.0	%D = 0.0	%D = 0.0	%D = 0.0	

Calcul et expression des résultats

Les concentrations sont calculées suivant la méthode d'intégration dite de l'étalon externe. Les résultats sont exprimés en mg/L de solution.

$$\% \text{ sucre X} = (C(\text{mg/L}) \times V \times \text{Dil} \times D \times 100) / (\text{Pe} \times 1000 \times 1000)$$

C(mg/L) : concentration en milligrammes par litre,

V : volume de la fiole jaugée utilisée dans la procédure d'extraction des sucres en mL,

D : dilution supplémentaire éventuelle,

Dil : facteur de dilution avant dosage chromatographique,

Pe: prise d'essai en g.

III.2.20 Extraction des différentes fractions protéiques de la noix du Brésil

III.2.20.1 Fractionnement des protéines de tourteau déshuilé de la noix du Brésil

III.2.20.1.1 Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales a été effectuée sur 10 g de tourteau délipidé dont la taille de granule est environ 1 mm qui a été dispersé dans 150 mL de NaOH 1N à pH 10 directement dans des tubes à centrifuger qui ont été ensuite gardés sous agitation rotative à 225tr/min pendant 60 min puis centrifugés à 4700g à 20°C pendant 20 min. Le surnageant a été alors ajusté à pH 5 par addition de HCl 1N. Les protéines précipitent alors et la séparation est effectuée par centrifugation à 4700g à 10°C pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et les protéines sont ensuite séchées à 60°C pendant 16h puis pesées.

III.2.20.1.2 Fractionnement des protéines

Le fractionnement des protéines a été effectué en 3 étapes afin d'obtenir 3 fractions différentes. Elles ont chacune été analysées indépendamment. Tout d'abord, une extraction à l'eau à pH 7, suivie d'une extraction du résidu précédent avec du NaCl 0,5N à pH 8 et ensuite une extraction du résidu précédent avec de NaOH 1N à pH 10. La somme des masses totales de ces 3 extraits a été comparée à la quantité de protéines extraites directement par NaOH 1N à pH 10. Les fractions ont été nommées en référence à l'article de Rakipov (1987).

L'extraction des protéines totales a été effectuée sur 10 g de tourteau dégraissé qui a été dispersé dans 150 mL de solvant (eau à pH 7, NaCl 0,5N à pH 8, NaOH 1N à pH 10) directement dans des tubes à centrifuger qui ont été ensuite gardés sous agitation rotative à 225tr/min pendant 60 minutes puis centrifugés à 4700g à 20°C pendant 20 min. Le surnageant a été alors ajusté à un pH pouvant aller de 5 à 10 par addition de HCl 1N. Les protéines précipitent alors et la séparation est effectuée par centrifugation à 4700g à 10°C pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les protéines est ensuite séché à 60°C pendant 16h puis pesé.

III.2.21 Détermination du pH optimum de solubilisation et de précipitation des protéines

10 g de tourteau ont été dispersés dans 150 mL d'eau directement dans des tubes à centrifuger. Le pH (4; 5; 6; 7; 8; 9 et 10) a été ajusté pour la solubilisation de protéine. Les tubes ont été ensuite gardés sous agitation rotative à 225tr / min pendant 60 min puis centrifugés (Beckman) à 4700g à 20°C pendant 20 min. Le surnageant a été récupéré et a été ensuite ajusté au pH (5; 5,5 ; 6; 6,5 ; 7 ; 8 ; 9 et 10) pour la précipitation de protéine. Le pH de la solubilisation et précipitation de protéine a été ajusté par NaOH et HCl à 1N. Les protéines précipitent et la séparation a été effectuée par centrifugation (Jouan) à 4700g à 10°C pendant 20 min. Le surnageant a été éliminé et les protéines ont été séchées à 60°C pendant 16h puis pesées.

III.2.22 Capacité d'absorption d'huile de la protéine

5 g de protéines ont été mélangées avec 50 g d'huile de tournesol raffinée dans un bêcher de 100 mL. Le mélange est agité pendant 30 min grâce à un barreau magnétique sur une plaque chauffante. Différentes températures ont été testées 20, 40, 50, 60 et 70°C. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 30 min à 20°C et l'huile surageante est éliminée. Le culot contenant les protéines et l'huile liée est pesé.

La capacité d'absorption de l'huile ou Fat Binding Index (sans unité) est calculée par la division du poids du culot (Protéines + huile) sur le poids de protéines originales (Phillips *et al.*, 1979).

III.2.23 Analyse des acides aminés

III.2.23.1. Hydrolyse des protéines par voie enzymatique

L'hydrolyse des protéines a été réalisée par voie enzymatique pour mieux respecter la structure des acides aminés libérés qui pourrait être altérée par une hydrolyse chimique classique à l'acide chlorhydrique 6N.

10 g de protéine sont mélangés à 100 mL d'H₂O déminéralisée (p/p) dans un réacteur sous agitation à 50°C, le pH est ajusté à 6 par de la soude 1N car le pH optimal d'activité de l'enzyme se situe entre pH 5,0 et 7,0.

0,1% (p/v) de Flavourzyme (Novo Nordisk, NL) qui présente à la fois des activités endoprotéasique et exopeptidasique, sont ajoutés aux protéines et l'hydrolyse est poursuivie pendant 7h à 50°C.

A l'issue de l'hydrolyse, le milieu réactionnel est porté à 90°C environ pendant 5 min afin de dénaturer l'enzyme. L'ensemble est ensuite filtré en cascade jusqu'à 0,2 µm. La solution obtenue est jaune et limpide.

III.2.23.2 Détermination des acides aminés

Les acides aminés ont été transformés en dérivés phénylthiocarbamyl par réaction des acides aminés avec 20 mL du mélange éthanol/triéthanolamine/phénylisothiocyanate (7/1/1/1, v/v/v/v).

L'analyse des acides aminés dérivatisés a été réalisée en double en RP-HPLC (2 hydrolysats par échantillon, 1 analyse chromatographique par hydrolysat) sur une colonne Pico Tag C 18 (3.93 mm i.d. × 15 cm, Waters).

L'élution a été réalisée avec un gradient d'acétonitrile dans un tampon acétate de sodium 0,14 M (éluant A: 100% tampon; éluant B: acétonitrile 60 % dans le tampon, v/v). Le tryptophane a été analysé. Les acides aminés souffrés ont été analysés après une oxydation performique, sous la forme de méthionine sulfone cystéique et d'acide cystéique.

III.2.24 Identification de la sélénocystéine et de la sélénométhionine par couplage HPLC/spectrométrie de masse

Réactifs

Ces expérimentations ont été sous-traitées à l'université d'Orléans par l'équipe de Mme Claire Elfakir de l'ICOA (Pétritis *et al.*, 2000).

L'acétonitrile de grade HPLC a été obtenu chez J.T. Baker (France), l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) à 99% chez Aldrich (France), la L-sélénocystéine (SeCys2) à 98% et la DL-sélénométhionine (SeMet) à 99+ % chez Acros (France), la méthionine (Met) et la cystéine (Cys2) chez Sigma (France). L'eau désionisée 18 M Ω utilisée pour la préparation des acides aminés standard et des solutions de réactifs a été produite par un système Elgastat UHQ II (Elga, France). L'hydrolysate a été seulement dilué au 1 :10 avec une solution aqueuse de HFBA 0,1% avant son injection en LC MS-MS.

Appareillage

La LC-ISP-MS/MS a été réalisée sur un appareil Perkin Elmer (Toronto, Canada) modèle LC-200 à double pompe et un spectromètre de masse Perkin Elmer Sciex (Forster City, USA) API 300 triple quadrupole avec un Turboionspray chauffé à 300°C comme source ionique. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode ion positif. L'azote a été utilisé comme gaz de collision. Après optimisation des paramètres de MS, les fichiers d'état ont été fixés comme suit ; NEB=9, CUR=7, CAD=1, IS=5000, OR=20, RNG=200, Q0=-5, IQ1=-6, ST=-10, RO1=-6, IQ2=-15, RO2=-20, IQ3=-35, RO3=-25, DF=400, CEM=2100. Quad 1: 30 (0.010), 100 (0.050), 1000 (0.400), 2000 (0.742). Quad 3: 10 (0.008), 100 (0.035), 1000 (0.285), 2000 (0.530). Le NEB=9 (nebulizer gas) correspond à un débit de gaz de 1,08 L min⁻¹ et une CUR=7 (curtain gas) correspond à un débit de 1,02 L min⁻¹. Le mode selective reaction monitoring (SRM) a été utilisé pour maîtriser les ions parents et produits. Le temps d'arrêt a été fixé à 100 ms et celui de pause à 5,0 ms.

Les injections ont été réalisées grâce à un injecteur automatique Perkin-Elmer series 200 (Toronto, Canada) alimenté par une boucle de 10- μ l. Les ions de transition pour les acides aminés par MS-MS sont : SeCys2 (337/247.5), Cys2 (241/152), SeMet (198/181), Met (150/104).

La séparation a été réalisée sur une colonne Purospher STAR RP-18e 125x2 mm I.D., taille des particules 5 μ m (Merck, Darmstadt, Germany) avec un débit de 200 μ L min⁻¹. Pour la LC-MS-MS, une fuite de 1/20 a été mise en oeuvre pour éviter un trop haut débit de la source d'ion. Le gradient d'éluion était: solvant A : HFBA 0,1% dans l'eau ; Solvant B acétonitrile ; Le gradient a démarré à 100% de A pour atteindre 70% de A en 15 min.

L'identification et le dosage des deux acides aminés : sélénocystéine et sélénométhionine de la protéine de la noix du Brésil ont été effectués par HPLC par comparaison à deux standards de sélénocystéine et sélénométhionine.

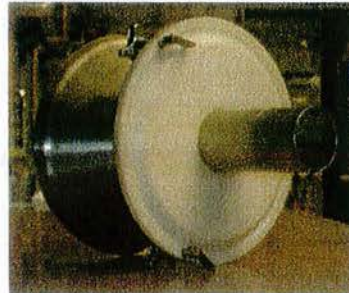
III.2.25 Fabrication du lait de tourteau de la noix du Brésil

300 g de tourteaux ont été mélangés avec 1000 mL H₂O directement dans un broyeur Mejisa Mectufry (Espagne). Le mélange a été instantanément broyé à température ambiante (25°C) avec la durée instantanée. Cette machine a été conçue pour fabriquer le lait d'amande traditionnel espagnol *la Chufa* (photo 1).

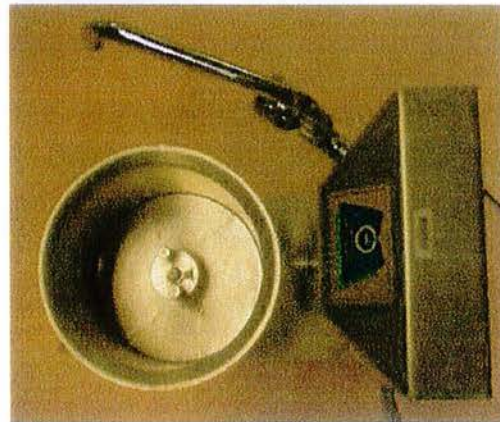
Le lait est ensuite congelé à -20°C et lyophilisé durant 24 heures.



(1)



(2)



(3)

Photo 1 : (1) Broyeur Mejisa Mectufry (Espagne), (2) partie d'alimentation du broyeur, (3) vue de dessus.

III.2.26 Production de jus de *Morinda Citrifolia* par pressage

Les lots de fruits frais (3811,53g, 5185,47g) sont enfermés dans un sac synthétique qui est posé sous le piston d'une presse hydraulique Sakaya (Thaïlande) (photo 2).

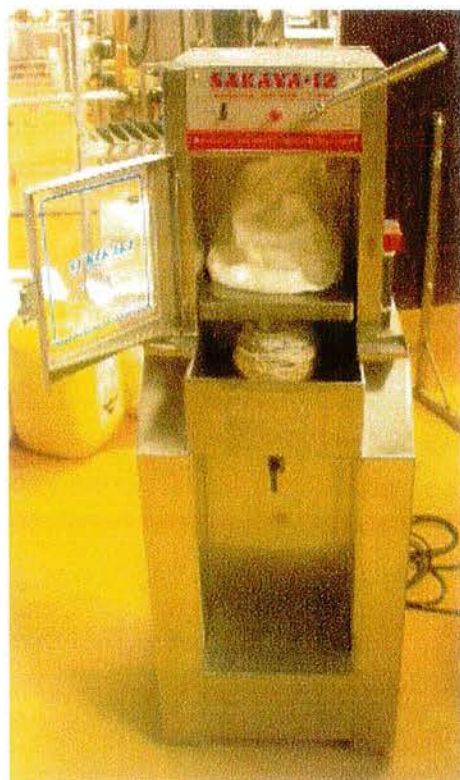


Photo 2 : Presse hydraulique Sakaya (Thaïlande).

III.2.27 Clarification du jus de Noni par microfiltration tangentielle

(Procédure opérationnelle de Cirad-Amis/Paa "Utilisation du pilote de microfiltration tangentielle" numéro de code : IH007A).

17 kg de jus ont été préfiltrés sur des filtres en fibres synthétiques et ensuite passés sur un filtre à membrane (Exekia. SCT. Type P1960. Membrane $0,2 \mu$, $0,3m^2$ 850mm) de 0,2 micron à la température de 60-66°C, avec une pression de $\Delta P = 1$ bar et un débit de $75,51 L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$.

III.2.28 Concentration du jus de Noni par osmose inverse

A la température de 27°C, 8,3 kg de filtrat qui est en fait le jus micro-filtré, ont été concentrés sur un filtre à membrane de 1 A° (Exekia. FILMTEC. Type SW 30.25.40. Membrane $2m^2$ 70 bars) avec une pression de $\Delta P = 40$ bar et un débit de $3,27 L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$.

III.2.29 Détermination du degré Brix

La mesure du degré Brix du jus a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre à main (Hand Refractometer, ATAGO, Brix 0-32%, Japan), graduée en %.

III.2.30 Détermination de la teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle a été déterminée selon la méthode spectrophotométrique de Oundle (1996). Une cuvette en verre de 1 cm est remplie de jus préalablement centrifugé. La densité optique des jus est lue à 645 nm et 663 nm grâce à un spectrophotomètre Mitton Roy (Spectronic 1201). Les résultats sont obtenus par l'équation suivante :

$$\text{Concentration en chlorophylle (mg/mL)} = [20,2 (\text{DO}_{645 \text{ nm}}) + 8,02 (\text{DO}_{663 \text{ nm}})].$$

III.2.31 Détermination de la teneur en huile des jus

Trois méthodes d'extraction d'huile ont été testées, l'une mettant en oeuvre une extraction par solvant selon la méthode de Soxhlet sur du jus lyophilisé et les deux autres mettant en oeuvre des techniques d'extraction liquide-liquide.

III.2.31.1 Extraction de l'huile par la méthode Soxhlet

(Laboratoire d'analyse de Cirad-Amis-Paa. Code : PC0918A, 2000).

Le jus brut est tout d'abord lyophilisé pendant 24 heures puis il est passé au Soxhlet avec comme solvant d'extraction l'hexane. Le processus d'extraction s'effectue pendant 6 heures. Le solvant est ensuite évaporé et l'échantillon séché à l'étuve à 105°C pendant 30 min.

III.2.31.2 Extraction liquide-liquide de l'huile : hexane-jus

20g de jus brut sont transvasés dans une ampoule à décanter de 1000 mL et ensuite mélangés avec 100 mL d'hexane. Le mélange est agité énergiquement pendant une minute.

Après séparation complète des deux phases, la phase inférieure est recueillie puis ré-extraite à l'hexane 3 fois. L'ensemble des phases hexanique est recueilli dans une autre ampoule à décanter. La phase hexanique est ainsi lavée à l'eau distillée 3 fois. La phase hexanique est ensuite séchée avec du sulfate de sodium anhydre, puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Après distillation du solvant et élimination des dernières traces sous un courant d'azote, la quantité de lipides totaux est obtenue par pesée.

III.2.31.3 Extraction de l'huile par la méthode de Folch

L'huile a été extraite du jus brut en utilisant un mélange de solvant : méthanol/acide acétique/chloroforme/eau à la température ambiante.

20g de jus brut sont homogénéisés à l'aide d'un mixer dans 20 mL de méthanol acidifié par 100 µL d'acide acétique. On ajoute successivement en agitant, 10 mL de chloroforme puis 20 mL d'eau distillée. L'ensemble est ensuite centrifugé à 6000g pendant 15 min. La phase inférieure chloroformique est prélevée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Après distillation du solvant et élimination des dernières traces sous un courant d'azote, la quantité de lipides totaux est obtenue par pesée.

III.2.32 Détermination des anions minéraux et organiques du jus

(Procédure Opérationnelle du Cirad-Amis/Paa "Dosage des anions organiques par chromatographie ionique", Code : PC0911B).

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode de dosage des acides organiques dans les végétaux. Les anions organiques et minéraux sont extraits de leur matrice végétale par une solution d'éthanol à 20%, dont le pH est inférieur à 3 et dosés par chromatographie ionique.

Préparation des échantillons

Les solutions sont décongelées et homogénéisées avant toute manipulation puis centrifugées et filtrées sur membrane de porosité 0,2 µm. La conductivité des solutions est mesurée directement par le chromatographe ionique. Les solutions sont diluées en fonction de leur conductivité et du nombre d'anions présents dans la solution.

0,8 mL de solution sont versés à l'aide d'une pipette automatique dans un pilulier adapté au passeur d'échantillon utilisé.

Les standards sont préparés suivant des solutions d'étalon certifiés à 1000 mg par litre. Les standards des anions minéraux proviennent de Spin (Limours), Fischer (Elancourt), ou Spex-ion (Longjumeau). Les standards des anions organiques sont achetés chez Analys (Manosque).

Une solution de référence est préparée à partir de jus d'orange (marque JOKER). La solution est homogénéisée, centrifugée puis diluée 50 fois à l'aide d'un diluteur automatique. La dernière dilution est effectuée en considérant l'ajout d'une quantité suffisante d'alcool éthylique pour avoir une solution à 20% d'éthanol. Les solutions diluées sont versées dans des piluliers appropriés.

La solution de régénération de la colonne est composée d'acide sulfurique 2N.

Les échantillons sont analysés sur un chromatographe Dionex. Les éluants sont de l'eau ultra pure décarbonatée par bullage d'hélium, de la soude (Baker) liquide à 50% et de l'acide sulfurique 96% pour analyse (Carlo Erba).

La pression du système de régénération est de 0,7 bars.

Le profil d'élution est le suivant :

Temps (min)	1/ NaOH 0,002M	2/ NaOH 0,1M	3/ CH ₃ COONa 0,1M	4/ H ₂ O
0	40	0	0	60
0,1-0,5	40	0	0	60
2	40	0	0	60
5	56	14	0	40
10	90	10	0	0
12	85	15	0	0
14	72	28	0	0
15	72	28	0	0
17	60	40	0	0
18	18	20	0	0

Les résultats sont exprimés en mg/L de solution ou en % pondéral, en relation avec la procédure d'extraction mise en œuvre.

$$\% = [(C_{\text{mg/L}}) \times V \times 100 \times \text{Dil}] / (P_e \times 1000)$$

avec :

C(mg/L) : concentration.

V : volume de la fiole jaugée utilisée dans la procédure d'extraction en mL.

Dil : facteur de dilution avant dosage chromatographique.

P_e : prise d'essai en mg.

III.2.33 Etude de la stabilité physique du jus de *Morinda Citrifolia*

Stabilité de la couleur des jus lors de la pasteurisation à 70°C / 10 min

Les jus micro-filtrés et concentrés ont été conservés dans des tubes à essais de 17,5 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre et pasteurisés ensuite à 70°C pendant 10 min au bain marie.

Le changement de couleur du jus brut et micro-filtré non pasteurisé, micro-filtré et concentré pasteurisé et du jus de Tahiti a été déterminé grâce à un colorimètre Lovibond, Tintometer Model E (G.B.). La cuve de mesure a un trajet optique de 1 inch.

Une cuve de 1 inch est remplie d'échantillon. La mesure de la couleur de l'échantillon au colorimètre Lovibond est faite en comparaison avec la couleur du mélange.

Stabilité de la couleur des jus à la température de conservation de 30°C

Le jus centrifugé conservé dans des tubes à essais de 17,5 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre est pasteurisé ensuite à 70°C pendant 10 et 30 min au bain marie. Les échantillons ont été ensuite conservés à la température de 30°C pendant 4 semaines.

Chaque semaine le changement de couleur de jus a été déterminé grâce à un colorimètre Lovibond, Tintometer Model E (G.B.).

Etude de la stabilité physique et de la couleur du jus non pasteurisé et pasteurisé à 70°C / 5-60 min conservé à 23 °C et 30°C pendant 3 mois

Cette étude a été réalisée sur le jus initial non centrifugé; non filtré; centrifugé et filtré non pasteurisé et pasteurisé à 70°C (5 à 60 min). Les échantillons ont été conservés dans des tubes à essais de 17,5 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre à la température ambiante (23°C) et (30°C) pendant 3 mois. Le changement de couleur a été mesuré après 3 mois de conservation par la procédure Lovibond. La hauteur du précipité a été mesuré avec une règle graduée.

III.2.34 Mesure de la turbidité des jus

La turbidité d'un liquide comportant des solutés macromoléculaires, des particules en suspension ou des micelles provoque diverses altérations du trajet optique des rayonnements incidents dues à une infinité de phénomènes de diffusion et de réfraction. Une source lumineuse est envoyée à travers une cellule contenant la solution à mesurer et on mesure les modifications du trajet optique.

Les turbidités des jus initiaux, micro-filtré, concentré, centrifugé et filtré non pasteurisé et pasteurisé à 70°C/10 min ont été mesurées dans des tubes à essais de 17,5 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre à l'aide d'un turbidimètre (Ratio/xr). La turbidité est exprimée en NTU (Unité de Turbidité Néphélométrique). L'appareil peut être utilisé dans quatre gammes de mesures différentes 2; 20; 200 ou 2000 NTU.

Une cellule de mesure sèche et propre est remplie avec l'échantillon à mesurer. La cuve de mesure est positionnée dans la cellule de mesure. La turbidité est lue directement sur l'afficheur au bout de 15 secondes.

III.2.35 Mesure de la longueur d'onde d'absorption maximale du jus de Noni

Les déterminations des spectres UV et Visible du jus de Noni ont été effectuées grâce à un spectrophotomètre Milton Roy, Spectronic 1201. Les jus centrifugés sont placés dans une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique.

III.2.36 Etude de la stabilité microbiologique des jus

Un prélèvement est effectué tous les 7 jours sur les tubes pasteurisés à 70°C/10 min et 70°C/30 min afin de déterminer la flore totale. La flore totale est estimée sur milieu PCA après 48h d'incubation. Les moisissures et les levures sont estimées sur un milieu YM agar après 48h d'incubation.

III.2.37 Analyses de la cellulose brute

(Laboratoire d'analyse de Cirad-Amis-Paa. Code : PC0930B, 2001).

La méthode permet de doser, dans les aliments, les matières organiques exemptes de graisses et insolubles en milieu acide et en milieu alcalin, conventionnellement désignées sous le nom de cellulose brute. La cellulose brute correspond au résidu résistant aux attaques successives acide et alcaline après déduction de la teneur en cendres. Le résidu obtenu ne correspond pas à de la cellulose pure : il se compose de 50 à 80% de cellulose, de 10 à 50% de lignine et d'environ 20% d'hémicellulose. Cette méthode n'est pas applicable à des substrats dont la teneur en cellulose est inférieure à 1%.

Principe

La méthode est adaptée à l'utilisation d'un matériel de type "Fibersac" : Récipient de 2 litres, en inox, thermostaté à 100°C, comprenant un système d'agitation et un support pouvant contenir les sachets appropriés.

L'échantillon, éventuellement dégraissé, est conditionné dans des sachets filtrants. Il est traité successivement par des solutions bouillantes d'acide sulfurique et d'hydroxyde de potassium de concentrations déterminées. Le résidu est lavé à l'eau chaude, séché à 105°C, pesé, calciné à 525°C et pesé à nouveau. La perte de poids résultant de la calcination correspond à la cellulose brute présente dans l'échantillon.

Mode opératoire

Peser environ 700 mg à 1 mg près d'échantillon finement broyé (de l'ordre de 0,5 mm). dans un sachet poreux (Sachets Humeau. réf. 6340480011. Fibersac 24 Ankom) que l'on ferme à la thermosouduse. Les échantillons contenant plus de 10% de matière grasse doivent être dégraissés à l'hexane avant l'analyse.

Disposer les sachets dans le panier de l'appareil Fibersac. Fermer le robinet de vidange de l'appareil. Préchauffer 2 litres d'eau pure (conductivité <5 µS/cm).

Attaque acide (H₂SO₄)

Introduire 2 litres de solution d'acide sulfurique 0,26N dans l'appareil. 2 mL de Termamyl LS (amylase thermostable, Novo Nordisk, Danemark), 3 gouttes de cyclohexanone (antimousse) sont ajoutés. Le système est fermé hermétiquement. Régler l'horloge du système sur 40 min (montée en température 10 min, maintien de l'ébullition pendant 30 min). Actionner l'agitation puis le chauffage de l'appareil. Le chauffage et l'agitation sont ensuite stoppés et on attend le retour à la pression atmosphérique avant d'ouvrir le couvercle de l'appareil.

L'échantillon est rincé à l'eau distillée bouillante 2 fois 5 minutes puis l'eau est vidangée.

Attaque basique (KOH)

2 litres de solution KOH 0,23N sont introduits dans l'appareil. 2 mL de Termamyl LS (Novo Nordisk), 3 gouttes de cyclohexane (antimousse) sont ajoutés. Le système est fermé hermétiquement. Régler l'horloge du système sur 40 min (montée en température 10 min,

maintien de l'ébullition pendant 30 min). Le chauffage et l'agitation sont ensuite stoppées et on attend le retour à la pression atmosphérique avant d'ouvrir le couvercle de l'appareil.

L'échantillon est rincé à l'eau distillée bouillante 2 fois 5 minutes puis l'eau est vidangée.

Actionner l'agitation puis le chauffage de l'appareil.

Les sachets sont rincés à l'acétone par trempage des sachets dans un bêcher contenant 200 mL d'acétone pendant 2 à 3 min.

Laisser sécher les sachets sur un support absorbant sous la hotte. Déposer les sachets et les capsules identifiables sur un plat en inox et les mettre à l'étuve à $104 \pm 3^\circ\text{C}$ pendant une nuit puis laisser refroidir dans un dessiccateur et peser.

Minéralisation

Déposer les sachets dans des capsules tarées. Placer l'ensemble dans le four à moufle froid. Effectuer une montée en température progressive du four en 15 min jusqu'à un palier de 200°C , laisser calciner pendant 30 min, monter à 515°C en 20 min, maintenir les capsules dans le four pendant 1h. Sortir les capsules du four, laisser refroidir au dessiccateur jusqu'à la température du laboratoire et peser.

Calcul et expression des résultats

La teneur en cellulose brute est exprimée en grammes pour 100 g d'échantillon brut. Elle est donnée par la formule :

$$\% \text{ cellulose} = (P1 - P2 / PE) \times 100$$

Dans laquelle :

PE : Masse de l'échantillon en g

P1 : Poids de l'échantillon en g après les 2 attaques successives acide basique et le séchage à l'étuve.

P2 : Poids des cendres en g après calcination au four.

RESULTATS & DISCUSSION

**Première Partie ■ Valorisation de la noix du Brésil
Bertholletia excelsa sous forme d'aliment santé**

IV RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 Première partie : Valorisation de la Noix du Brésil *Bertholletia excelsa* sous forme d'aliment santé

IV.1.1 Introduction

IV.1.1.1 Contexte

La noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*) est produite et exportée de la région d'Amazonie vers l'Europe et l'Amérique du Nord afin d'être utilisée soit native, soit transformée (Sun *et al.*, 1987). Elle contient 63-70% d'huile (Antunes et Markakis, 1977; Smith *et al.*, 1992); 15-17% de protéines sur masse fraîche, ce qui représente environ 50% de la matière sèche. La protéine contient 30 % d'albumine qui est riche en acides aminés soufrés, 18% de méthionine et de 8% de cystéine (Sun *et al.*, 1987). Cette noix contient entre 16 et 30 µg/g de sélénium (Lisk, 1994) quand les autres aliments contiennent seulement de 0,01 à 1 µg/g (Ip *et al.*, 1994). De nombreux chercheurs ont montré l'importance du sélénium pour la vie humaine (Bunton, 1977) et nous avons développé plus particulièrement cet aspect au chapitre introductif sur la noix du Brésil car la variété de noix étudiée est particulièrement riche en cet élément.

IV.1.1.2 Objectifs de l'étude

Le but de cette étude est de montrer que le sélénium, dont la variété de noix du Brésil étudiée est particulièrement riche, est lié de façon covalente à la protéine de la noix. Nous avons tout d'abord réalisé une analyse fine des principaux composants de la noix qui serviront d'arguments complémentaires à l'allégation santé recherchée.

Ainsi ont été déterminés les teneurs en eau, en cendres, en huile et en protéines. L'analyse détaillée de ces composants a été également réalisée. L'huile de la noix du Brésil contient une palette de molécules naturelles que nous avons analysé comme les acides gras, les stérols, les tocophérols et les phospholipides. Les protéines ont soigneusement été analysées afin de déterminer les liaisons qui relient le sélénium à certains acides aminés. La composition en acides aminés a ainsi été déterminée sur différentes fractions isolées spécifiquement par optimisation de leurs extractions par différents solvants (eau, sel et NaOH).

Chapitre 1

**Etude de la composition biochimique
de la Noix du Brésil *Bertholletia excelsa***

IV.1.2 Premier chapitre : Etude de la composition biochimique de la Noix du Brésil *Bertholletia Excelsa*

IV.1.2.1 Composition chimique du tourteau déshuilé

IV.1.2.1.1 Teneur en eau et activité de l'eau

La teneur en eau du tourteau de la noix du Brésil obtenu par pression fourni par la société JBA est de 5,7 %. Cette valeur est inférieure à celle trouvée par Antunes et Markakis (1977) également sur le tourteau de la noix de Brésil (8,7%). La différence dépend du temps passé entre la chute du fruit et le moment où celui-ci est séché, de la méthode de séchage (temps et température) et des conditions de stockage etc.

La seule connaissance de la teneur en eau est insuffisante pour prévoir la stabilité d'un aliment. Les prévisions en matière de conservation reposent sur la disponibilité de l'eau comme solvant ou comme réactant qui dépend de ses interactions avec les autres composants du produit (Adrian *et al.*, 1998). C'est l'activité de l'eau (A_w) qui permet de quantifier sa disponibilité (Slade *et al.*, 1991). Afin de conserver les aliments dans de bonnes conditions sanitaires et biochimiques lors du stockage, l'humidité et la température de l'atmosphère entourant les aliments doit être telle que la teneur en eau soit maintenue dans des conditions limites assurant la qualité de l'aliment (Gunjal *et al.*, 1987). La noix déshuilée du Brésil a une activité de l'eau A_w de 0,47 à 23°C. Ce résultat confirme que le tourteau sera stable d'un point de vue microbiologique pendant sa conservation (Aqualab, 2000) à condition bien sûr d'être conditionné dans un emballage barrière à la vapeur d'eau ou dans une ambiance de faible humidité relative (< 65%).

IV.1.2.1.2 Composition minérale

La teneur en matières minérales du tourteau est un peu plus élevée (10,7%) que celle du tourteau de la noix du Brésil (7,3%) trouvée par Antunes et Markakis (1977), celle du tourteau de colza (9,0%) (Vioque *et al.*, 2000) ou celle de la noix du Cambodge (7,5%) *Irvingia malayana* (Bandelier *et al.*, 2002). La teneur totale en minéraux est également plus importante que celle des noix plus classiques comme la noix de Grenoble *Juglans regia* avec 3,5% (Livernais-Saettel, 2003).

La teneur en cendres de la noix dépend de variété de la noix, de la hauteur des arbres et de la nature des sols...

La noix du Brésil est riche en phosphore et en magnésium (Tableau 12). Le phosphore qui peut représenter plus de 2% du tourteau déshuilé est présent essentiellement sous forme minérale, puisqu'on en retrouve peu dans l'huile après une extraction à l'hexane (377 µg/g, travaux non publiés de notre équipe). Cette teneur est équivalente à celle que l'on peut rencontrer sur des graines comme le tournesol (1,01%), le sésame (1,22%), (G. R., 2003) et l'amande (1,6%) (Fr.almondsarein 2003), etc. La teneur en magnésium est élevée, environ 13,4 mg/g.

La teneur en calcium est faible mais toutefois supérieure aux deux autres graines : environ 6 mg/g dans le tourteau.

La teneur en sélénium du tourteau de ce cultivar est particulièrement élevée puisqu'elle atteint 126 µg/g en comparaison avec celles de 529 noix du Brésil commerciales analysées par Ivan *et al.* (1982). 6% des noix analysées par cet auteur contenaient 100 ppm de sélénium ou plus. La moyenne se situait à 29,6 ppm et la valeur médiane à 13,4 ppm (Ivan *et al.*, 1982). Aucune trace de sélénium n'a pu être décelée dans l'huile extraite à l'hexane. Cela signifie qu'un seul gramme de ce tourteau ou d'une demi-noix apporte la quantité journalière recommandée à un individu de 70 kg. Cette teneur est supérieure à celles observées dans les grains de céréales (0,11 µg/g), les légumes verts (0,01 µg/g), les racines (0,005 µg/g) ou les fruits (0,005 µg/g) (Thorn *et al.*, 1978) et celles observée dans le soja (0,8 à 1,3 µg/g) aux USA (Wauchope, 1978). Le tourteau de noix du Brésil peut donc être considéré comme une matière première de haute richesse pour formuler des aliments santé riches en sélénium.

Minéraux	Noix de Grenoble <i>Juglans regia</i> (µg/g)	Noix du Cambodge <i>Irvingia malayana</i> (µg/g)	Noix du Brésil <i>Bertholletia excelsa</i> (µg/g)
Azote	24368	23700	97470
Phosphore	3460	2700	23800
Potassium	4410	5600	19690
Sodium	20	nd	nd
Calcium	980	1700	6060
Magnésium	1580	2200	13380
Fer	29,1	108	80
Manganèse	34,14	300	50
Zinc	30,9	35	115
Cuivre	15,86	nd	nd
Sélénium	0,05	1,9	126

NB : nd = non déterminé

Tableau 12 : Composition minérale du tourteau de la noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*) comparée à celle de la noix du Cambodge *Irvingia malayana* (Bandelier *et al.*, 2002) et la noix de Grenoble *Juglans regia* (Livernais-Saettel, 2003)

IV.1.2.1.3 Analyse des sucres

La teneur en sucre total (glucose + fructose + saccharose) du tourteau de la noix du Brésil est de 8,2%. En tenant compte des teneurs en eau et de la teneur en huile, on obtient par calcul une teneur en sucre de 2,2% sur la noix entière (Tableau récapitulatif 21).

Cette teneur est équivalente à celles des noix entières de pécan (2,05%), de macadamia (4,2%), de l'amande (3,52%) (Fourie et Basson, 1990) et du tourteau de tournesol (6,3%)(Vioque *et al.*,

2000). Les teneurs en glucose, fructose et saccharose sont en effet très voisines dans ces trois noix (Tableau 13).

La teneur en glucose de la noix du Brésil est du même ordre de grandeur (0,06%) que celle de pécan (0,01%), de macadamia (0,08%) et dans les amandes (0,07%).

La teneur en fructose de la noix du Brésil est quasi égale (0,02%) à celles de la noix de pécan (0,02%), de macadamia (0,03%) et de l'amande (0,08%).

La teneur en saccharose de la noix du Brésil (2,1%) est équivalente à celle de la noix de pécan (2,02%) et deux fois inférieure à celles de macadamia (4,09%) et d'amande (3,37 %).

<i>Noix</i>	Glucose	Fructose	Saccharose
Noix du Brésil	0,06	0,02	2,09
Pécan	0,01	0,02	2,02
Macadamia	0,08	0,03	4,09
Amande	0,07	0,08	3,37

Tableau 13 : Comparaison de la composition en sucres de la noix du Brésil entière avec celles de l'amande, des noix de Pécan et de Macadamia (Fourie et Basson, 1990). Exprimés en % de sucre par rapport à la matière sèche totale des noix entières

IV.1.2.1.4 Teneur en fibres du tourteau

La teneur en fibres totale du tourteau est de 15,2%, ce qui représente une teneur sur la noix entière de 4,5%. Ces valeurs se rapprochent de celles de la noix de Grenoble (6,7%) (Livernais-Saettel, 2003) et de celles trouvées par Favier *et al.* (1995) et Soucy *et al.* (1994) qui situent la moyenne des teneurs en fibres des noix du Brésil entre 4 à 8 %. Antunes et Markakis (1977) trouvent une teneur en fibres de seulement 5,9% sur un tourteau de noix du Brésil. Bandelier *et al.* (2002) trouvent 7,5% de fibres sur la noix entière du Cambodge.

IV.1.2.1.5 Teneur en protéine du tourteau

Un chapitre complet est consacré aux protéines de la noix du Brésil car cette fraction contient une teneur importante en sélénium et a été valorisée industriellement (Chunhieng *et al.*, 2003). Nous avons recalculé dans le chapitre suivant le facteur de conversion azote/protéine qui n'est plus de 6,25 mais de 6,97. Le tourteau délipidé contient 97,47 mg/g d'azote, ce qui fait un contenu en protéines recalculé de $97,47 \times 6,97 = 679,36$ mg/g de protéines soit 67,9 % de protéines dans le tourteau. Cela représente pour la noix entière une teneur en protéine de 19,3%. Cette teneur est équivalente à celles des noix entières de la noix de Grenoble (15,23%) (Livernais-Saettel, 2003) et de l'amande (19%) (Fr.almondsarein, 2003).

IV.1.2.1.6 Analyse de l'huile de la noix du Brésil

La teneur en huile de la noix fraîche du Brésil obtenue par extraction à l'hexane au Soxhlet dans notre laboratoire est de 72,5%. Samuel (1987) rapporte une teneur en huile de 65-70%. La teneur en huile de la noix de Brésil est plus élevée que celle de l'amande (53%) et de la noix de Grenoble (55%) (Ali *et al.*, 1988).

La quantité d'huile obtenue à partir des matières premières dépend des processus de fabrication. Le tourteau déshuilé par pressage en usine au Brésil ne contient plus que 8% d'huile par rapport à la matière sèche. Par extraction à l'hexane, Antunes et Markakis (1977) ont obtenu un tourteau ne contenant que 1% d'huile. Vioque *et al.* (2000) en faisant de même ont obtenu un tourteau de tournesol contenant 3,9% d'huile.

Les minéraux sont présents en grande quantité dans le corps humain et chacun d'entre eux y joue des rôles spécifiques : le calcium au niveau des os ou de la contraction musculaire, le magnésium pour les muscles... L'huile de la noix du Brésil contient des minéraux dont l'utilité en nutrition humaine est bien connue.

Les besoins en calcium, constituant majeur de notre squelette, sont importants tout au long de la vie : chez l'enfant pour une croissance harmonieuse et la constitution de son capital osseux, chez l'adulte afin de maintenir ce capital et enfin chez les personnes âgées pour contribuer à la solidité osseuse.

La consommation de magnésium est souvent inférieure aux recommandations. Une forte carence en magnésium provoque des crampes, des crises de tétanie, de la fatigue, des insomnies... Le magnésium aurait également un rôle dans la prévention des maladies cardio-vasculaires.

Le sodium joue un rôle essentiel dans l'équilibre hydro-minéral de l'organisme. En excès, il peut être mis en cause dans certaines hypertensions chez les personnes sensibles (Danone, 2003).

Le phosphore est toujours présent dans l'organisme sous forme de phosphates, tricalciques dans les os, phosphoprotéines, phospholipides et acides nucléiques dans les cellules. D'où l'importance des enzymes du cycle des phosphates, phosphatases et protéine-kinases (Alais et Linden, 1994).

En suivant les Apports Nutritionnels Conseillés pour la population française, les hommes ont besoin de 900 mg/jour de calcium, 800 mg/jour phosphore et 420 mg/jour magnésium alors que les femmes en ont besoin respectivement de 900, 800 et 330 mg/jour (Dupin *et al.*, 1992).

Les besoins en potassium et en sodium étant couverts largement par l'alimentation, il n'y a pas d'Apports Nutritionnels Conseillés (E-sante, 2003).

L'huile de la noix du Brésil contient 377,3 ppm de phosphore, 152 ppm de calcium, 102,3 ppm de magnésium et 21,2 ppm de sodium. La teneur en magnésium est 2 fois plus faible (102,3 ppm) que celle de l'huile de son de millet (200 ppm) (Devittori *et al.*, 2000).

L'huile de la noix du Brésil est solide à la température du congélateur (-18°C). Cette huile redevient liquide après 1 minute et 30 secondes dès qu'elle est sortie du congélateur et portée à -10°C.

La densité de l'huile de la noix de Brésil (0,975) est normale. Elle est voisine de celle de l'huile de *Voacanga africana* (0,915) (Rafidison *et al.*, 1987), de l'huile raffinée de la noix de Grenoble (0,91-0,93) (Woodlandnut, 2003) et de l'huile d'amande (0,90-0,92) (Woodlandnut, 2003).

L'acidité de l'huile de la noix du Brésil, exprimée en masse d'acide oléique, est faible (0,64%) et montre que ces noix n'ont pas été maltraitées après récolte. Une étude détaillée de l'acidité des noix a été réalisée par un membre de notre équipe au Pérou (Etchessahar, 2000). Elle montre que l'acidité moyenne se situe plutôt aux alentours de 1,4% sur des noix également récoltées dans de bonnes conditions. L'acidité est voisine de celle de l'huile d'olive vierge (1,0%) trouvée par Rahmani *et al.* (1998). Cette acidité qui est inférieure à la valeur de 5% indique que l'huile pourra être raffinée sans problème d'émulsification due aux acides gras libres transformés en savons lors de la neutralisation. Elle est cependant un peu élevée et reflète le fait que les noix n'ont pas été traitées immédiatement après récolte mais stockées un certain temps laissant aux lipases naturelles intracellulaires le soin d'hydrolyser partiellement les huiles.

L'indice de peroxyde de l'huile de noix du Brésil analysée est de 9,8 meq/kg. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles trouvées par Rahmani *et al.* (1998) sur de l'huile d'olive (14,8 meq/kg) et par Hong *et al.* (2000) sur de l'huile de soja vierge (6,58 meq/kg). Bhattacharya *et al.* (1998) trouvent des valeurs supérieures sur de l'huile de soja (36,0 meq/kg). Malcolmson *et al.* (2000) trouvent des valeurs inférieures sur de l'huile de lin (0,6 meq/kg) et Savage *et al.* (1999) sur de l'huile de noix de Nouvelle Zélande (2,9 meq/kg).

Les valeurs de l'indice de peroxyde et de l'acidité indiquent une légère oxydation de l'huile et un problème de traitement après stockage. Cet indice de peroxyde peut avoir une incidence sur l'oxydation future de l'huile malgré que ces valeurs soient acceptables et se situent dans les limites de l'International Olive Oil Council pour les huiles d'olive qualifiée d'extra (Conseil Oléicole International, 2001). Cette limite en acidité libre, exprimée en acide oléique, est fixée à 1 gramme pour 100 grammes pour l'huile d'olive vierge extra et l'huile d'olive vierge. L'indice de peroxyde maximum toléré exprimé en milliéquivalents d'oxygène par kg d'huile doit être inférieur à 20.

La teneur de l'huile en matière insaponifiable est de 0,7%. Cette valeur est basse et inférieure à celles trouvées par Janssens (2000) pour l'huile de *Calendula officinalis* (1-11,8%), par Lozano *et al.* (1993) sur de l'huile du fruit d'avocat (4-9%), par Simon *et al.* (2000) sur de l'huile de tournesol (1,3%), par Reverchon *et al.* (2000) sur de l'huile de soja (1,6%) et par Kamal-Eldin et Andersson (1997) sur de l'huile de sésame (4,2%).

Par contre, cette teneur en insaponifiable est la même que celle de l'huile d'argan *Argania spinosa* L. marocaine avec 0,6-0,9 % et israélienne avec 0,3-1,1% (Yaghmur *et al.*, 1999). La norme commerciale applicable à l'huile d'olive et à l'huile de grignons d'olive (Conseil Oléicole International, 2001) fixe la teneur en insaponifiable de l'huile d'olive au maximum à 1,5% et celle de l'huile de grignons d'olive à 3,0%.

IV.1.2.1.7 Composition détaillée de l'huile de noix du Brésil

IV.1.2.1.7.1 Composition en acides gras de l'huile de la noix du Brésil

L'huile de la noix du Brésil est très insaturée puisqu'elle contient 75,6% d'acides gras insaturés avec en quantité à peu près égale les acides oléique C18:1 (39,3%) et linoléique C18:2 (36,1%). Elle contient peu d'acides gras saturés avec 13% d'acide palmitique C16:0 et 11% d'acide stéarique C18:0 (Tableau 14).

Cette insaturation est un peu plus faible que celles de l'huile d'olive 83% (Kamal-Eldin et Andersson, 1997) ; de l'huile de soja 85,5% (Lecerf *et al.*, 2002) ; de l'huile de maïs 86,19% (Jahaniaval *et al.*, 2000) ; de l'huile de tournesol 87 et de la noix de Grenoble 89,3% (Matthäus, 1996). Elle est très voisine de celle de l'huile de son de riz (78,53%) (Jahaniaval *et al.*, 2000) dont elle a une composition en acides gras semblable.

La teneur en acide oléique C18:1 est bien plus faible (39,3%) que celle de l'huile d'olive (71,6%) mais plus élevée que celle de la noix de Grenoble (18,6%) et de tournesol (20,7%) et de l'huile de soja 24,2%. Elle est par contre voisine de celle du son de riz (42,4%).

La teneur en acide linoléique C18:2 (36,1%) est plus élevée que celle de l'huile d'olive (9%) mais plus faible que celle de l'huile de soja 54,1%, de l'huile de la noix de Grenoble (58,4%) et de tournesol (66,2%). Elle est également voisine de celle du son de riz (34,8%).

L'huile de la noix du Brésil ne contient pas d'acide linoléique C18:3.

Cette huile est tout à fait classique en terme de composition en acides gras et représente un bon produit pour l'agro-alimentaire.

Cette nouvelle opportunité est tout à fait réalisable puisque l'entreprise Provence Régime S.A dirigée par Mr Noël (Pont St Esprit, 30) a accepté de la commercialiser.

Cette perspective est une opportunité exceptionnelle pour les partenaires tropicaux du Cirad car cette huile alimentaire est une huile de spécialité qui aura un prix de vente assez élevé.

L'industrie des cosmétiques reste également un client potentiel pour cette huile.

Acides gras	Noix du Brésil	Olive	Noix de Grenoble	Tournesol	Son de riz	Soja
C 12:0	0,2					
C 14:0	0,2				0,51	
C 16:0	13,0	13,8	7,3	6,1	18,6	10,9
C 16:1	0,2	1,4			0,23	
C 18:0	11,0	2,8	2,6	5,1	1,75	4,0
C 18:1	39,3	71,6	18,6	20,7	42,4	24,2
C 18:2	36,1	9,0	58,4	66,2	34,8	54,1
C 18:3		1,0	12,3	0,1	1,10	7,2
C 20:0					0,49	
Acides gras insaturés (%)	75,6	83,0	89,3	87,0	78,5	85,5

Tableau 14 : Composition centésimale en acides gras de l'huile de tourteau de la noix du Brésil déterminée par CPG comparée à celles de différentes huiles (Kamal-Eldin et Andersson, 1997 ; Matthäus, 1996 ; Jahaniaval *et al.*, 2000 ; Lecerf *et al.*, 2002)

IV.1.2.1.7.2 Composition de la fraction tocophérolique de l'huile de la noix du Brésil

Trois tocophérols ont été trouvés dans l'huile de tourteau déshuilé de la noix du Brésil : les α , β , et γ -tocophérols. (Tableau 15). En effet, le δ -tocophérol ne se trouve pas dans l'huile analysée alors que Da Silva et Rovellini (1997) en trouvent 11% dans une variété de noix du Brésil issue de l'Etat du Para (Brésil). Il ne se trouve pas non plus dans l'huile de noix du Cambodge (Bandelier *et al.*, 2002) et l'huile d'olive (Kamal-Eldin et Andersson, 1997) alors qu'il se trouve en quantité non négligeable dans l'huile de noix de Grenoble (8,5%) et en très faible quantité dans l'huile de la graine d'igname de Chine des espèces de *Pachyrhizus erous* (0,7%) et *Pachyrhizus ahipa* (1,3%) (Grüneberg *et al.*, 1999).

Le tocophérol le plus important en quantité est le β -tocophérol (88,3%). Cette teneur donne une originalité à l'huile de noix du Brésil. Les autres huiles n'en contiennent pas ou très peu : olive (5,3%), noix de Grenoble (1,8%).

Le γ -tocophérol se trouve en plus faible quantité (0,4%) alors que les autres huiles en contiennent généralement des quantités très importantes : olive (10,5%), noix du Cambodge (89,5%), noix de Grenoble (88,0%), noix de cajou (45 à 70%) (Toschi *et al.*, 1993), graine d'igname de Chine des espèces de *Pachyrhizus erous* (94,5%) et *Pachyrhizus ahipa* (98,4%).

L' α -tocophérol se trouve en quantité moyenne (11,3%) comme dans l'huile de noix du Cambodge (10,5%) et est très différencié de l'huile d'olive qui en contient 84,2%.

La composition en tocophérol de l'huile de noix du Brésil est caractéristique et son analyse peut être un bon moyen de discrimination de cette huile par rapport aux autres huiles commerciales en terme d'adultération. Il faut cependant noter que certains auteurs comme Poiana *et al.* (1996) trouvent des variations significatives entre variétés d'une même famille botanique chez la noix de Pécan par exemple.

Tocophérols	Noix du Brésil (%)	Noix du Brésil (%) (<i>Da Silva et Rovellini</i>)	Noix du Cambodge (%)	Olive (%)	Noix de Grenoble (%)	Graine d'igname de Chine (<i>P.erosus</i>)
α -tocophérol	11,3	26,0	10,5	84,2	1,7	4,8
β -tocophérol	88,3	62,0	-	5,3	1,8	
γ -tocophérol	0,4		89,5	10,5	88,0	94,5
δ -tocophérol	-	11,0	-	-	8,5	0,7

Tableau 15 : Composition centésimale de la fraction tocophérolique de l'huile de la noix du Brésil déterminée par HPLC comparée avec différentes autres huiles : noix du Brésil (*Da Silva et Rovellini*, 1997), graine d'igname de Chine (*Pachyrhizus* spp.) (*Grüneberg et al.*, 1999); noix du Cambodge *Irvingia malayana* (*Bandelier et al.*, 2002), olive et noix de Grenoble (*Kamal-Eldin et Andersson*, 1997, *Matthäus*, 1996)

IV.1.2.1.7.3 Composition de la fraction stérolique de l'huile de noix du Brésil

La fraction stérolique de l'huile de noix du Brésil est très voisine de celles trouvées par *Da Silva et Rovellini* (1977) sur une variété de noix du Brésil issue de l'Etat du Para (Brésil) ainsi que de l'huile d'olive (*Jiménez de Blas et al.*, 1996) et d'amande (*Itoh et al.*, 1974) mais est assez différente de celle du soja (*Gordon et al.*, 1996). Le stérol le plus important dans toutes ces huiles est le β sitostérol. La fraction stérolique de l'huile de noix du Brésil en contient 76% alors que celle de l'huile d'olive en contient 81% et celle de l'huile d'amande 77%. La fraction stérolique de l'huile de soja en contient seulement 44,8%.

Le cholestérol est présent en faible quantité (1%) dans l'huile de noix du Brésil ainsi que dans les autres huiles végétales comparées.

Le campestérol est le stérol qui apparaît en deuxième position en terme de quantité avec 2%. Cette teneur est également voisine de celles de l'huile d'olive (3,19%) et d'amande (4,0%). L'huile de soja en contient beaucoup plus avec 25,9%. Le stigmastérol permet de différencier sans ambiguïté ces quatre huiles puisque la fraction stérolique de l'huile de soja en contient 16,8%, celle de l'olive 1,3%, celle d'amande 3% et la noix du Brésil 8% (Tableau 16).

Stérols	Noix du Brésil	Noix du Brésil (Da Silva et Rovellini)	Olive	Amande	Soja
Cholestérol	1	0,3	0,23		
Campestérol	2	1,7	3,19	4	25,9
Stigmastérol	8	8,4	1,3	3	16,8
Cholesténol	2				
β Sitostérol	76	74,3	81	77	44,8
Sitostanol	8	6,1	2,3		
Δ 5-Avenastérol	2	1,1	2,7	12	6,5
Δ 7-Stigmasténol	1	4,5	0,55	2	1,4
Δ 7-Avenastérol		1,4	0,26	2	2,8

Tableau 16 : Composition (%) des fractions stéroliques de l'huile de noix du Brésil déterminée par CPG comparée avec celles de l'huile d'olive (Jiménez de Blas *et al.*, 1996), de l'amande (Itoh *et al.*, 1974) et du soja (Gordon *et al.*, 1997)

IV.1.2.1.7.4 Composition de la fraction phospholipidique de l'huile de noix du Brésil

La teneur en phosphore de l'huile de la noix du Brésil mesurée par spectrométrie de flamme est de 377,3 ppm. Cette teneur est plus importante que celle de l'huile brute de soja (260 ppm) (Clark et Synder, 1991), du lard (160 ppm) (Xu *et al.*, 1992) et du colza (32,4 ppm) (Ajana et Hafidi, 1992) (Tableau 17).

Huile brute	Phosphore (ppm)
Noix du Brésil	377,3
Soja	260
Lard	160
Colza	32,4

Tableau 17 : Comparaison des fractions phospholipidiques de différentes huiles brutes de soja (Clark et Synder, 1991) ; du lard (Xu *et al.*, 1992) et du colza (Ajana et Hafidi, 1992)

Les phospholipides ont ensuite été identifiés après séparation par chromatographie sur couche mince et comparés par comparaison avec un étalon standard de phosphatidylinositol (PI) ; phosphatidylsérine (PS) ; phosphatidycholine (PC) ; phosphatidyéthanolamine (PE) et acide phosphatidique (PA).

En utilisant le système de solvant de migration chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50/20/10/10/5, v/v/v/v/v), les valeurs de Rf respectives pour PI, PS, PC, PE et PA sont 0,08 ; 0,17 ; 0,21 ; 0,39 et 0,5. Deux taches inconnues ont été trouvées avec des valeurs de Rf de 0,78 et 0,86.

Les quatre phospholipides se trouvent à peu près en même quantité dans l'huile de noix du Brésil (Tableau 18).

Le phosphatidylinositol (PI) est le phospholipide le plus important avec 31% alors que les trois autres huiles commerciales en contiennent moins : tournesol 19,7% (Carelli *et al.*, 1997), soja 18,0% (Wang *et al.*, 1997, List *et al.*, 1999).

La phosphatidylcholine (PC) est par contre le phospholipide qui se trouve en plus grande quantité dans les trois fractions phospholipidiques des autres huiles : soja 32,3% (List *et al.*, 1999) à 55,3% (Wang *et al.*, 1997), tournesol 47,6% contre seulement 24,0% dans la noix du Brésil.

Phospholipides	PI	PC	PE	PA	Total
Noix du Brésil	31 +/- 0,7	24 +/- 0,8	21 +/- 0,4	24 +/- 0,5	100
Tournesol	19,7	47,6	20,9	11,8	100
Soja(Wang <i>et al.</i> , 1997)	18,4	55,3	26,3		100
Soja (List <i>et al.</i> , 1999)	17,4	32,3	29,8	20,5	100

Tableau 18 : Composition (%) des fractions phospholipidiques de l'huile de la noix du Brésil comparée à celles du tournesol (Carelli *et al.*, 1997) et de deux variétés de soja (Wang *et al.*, 1997, List *et al.*, 1999)

La composition en acides gras des phospholipides a été comparée à celle de l'huile de la noix du Brésil (Tableau 19).

L'huile de la noix du Brésil est plus insaturée (75,6%) que les phospholipides : PI, PC, PE et PA avec 39 ; 40 ; 68 et 30% respectivement. Cependant, les spots inconnus contiennent une proportion importante d'acides gras insaturés avec respectivement 65,5 % (Spot 0) ; 62% (Spot inconnu a) et 52% (Spot inconnu b).

Les acides gras trouvés en quantité les plus importantes dans l'huile de noix du Brésil sont les acides palmitique (13%), stéarique (11%), oléique (39,3%) et linoléique (36,1%).

La phosphatidyléthanolamine (PE) contient 68% d'acides gras insaturés. Elle contient 34,0% d'acide linoléique alors que les PI, PC et PA n'en contiennent que 4,0 ; 1,0 et 11,0% respectivement. Curieusement, l'huile de la noix du Brésil ne contient pas de C18:3.

Les phospholipides contiennent moins d'acide linoléique C18:2 que l'huile de noix du Brésil. Le PA n'en contient pas.

Acides gras	Spot 0	PI	PC	PE	PA	Inconnu a	Inconnu b	Huile de noix du Brésil
12:0	-	12,0	1,0	-	10,0	4,0	-	0,2
14:0	0,3	5,0	2,0	5,0	4,0	2,0	5,0	0,2
16:0	25,2	26,0	34	18,0	38,0	20,0	27,0	13,0
16:1	1,0	6,0	2,0	3,0	5,0	2,0	2,0	0,2
18:0	9,0	18,0	23,0	9,0	18,0	12,0	16,0	11,0
18:1	50,2	18,0	31,0	23,0	14,0	19,0	28,0	39,3
18:2	14,0	11,0	6,0	8,0	-	8,0	19,0	36,1
18:3	0,3	4,0	1,0	34,0	11,0	33,0	3,0	-
Acides gras insaturés	65,5	39	40	68	30	62	52	75,6

Tableau 19 : Composition centésimale en acides gras des phospholipides de l'huile de la noix du Brésil

Les phospholipides PC, PE et PI de l'huile de tournesol (Tableau 20) et de l'huile de palme (Tableau 21) ont une composition plus homogène que les phospholipides de l'huile de noix du Brésil. PC, PE et PI ont en effet quasiment la même composition en acides gras. PI diffère un peu des deux autres dans l'huile de tournesol.

L'acide linoléique (C18:2) est l'acide gras prépondérant dans les phospholipides de tournesol. Les PC, PE et PI de l'huile de tournesol en contiennent respectivement 71,50; 68,64 ; 56,65 alors que les phospholipides de l'huile de noix du Brésil en contiennent respectivement 6; 8 et 11 %. Dans l'huile de palme, c'est l'acide palmitique qui est prépondérant dans PC (37,5%) et PE (30,2%) et l'acide oléique dans PI (38,3%).

Les phospholipides de l'huile de tournesol ne contiennent pas d'acide linoléique (C18:3) alors que les phospholipides de l'huile de noix du Brésil en contiennent, PC = 1,0% ; PE 34,0% et PI = 4,0% respectivement et ceux de l'huile de palme également.

Il est intéressant de noter que l'huile de tournesol qui est plus insaturée que l'huile de palme, contient des acides gras de phospholipides qui sont plus saturés que ceux de l'huile de palme.

Encore trop peu de données sont disponibles dans la bibliographie sur les compositions en acides gras des phospholipides des huiles végétales qui permettraient de conclure que ces différentes compositions seraient de bons marqueurs d'identité des huiles végétales. Nos résultats montrent toutefois les possibilités de ces analyses dans l'identification des huiles végétales.

Phospholipides	Acides Gras				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PC	10,15	3,43	15,14	71,50	-
PE	15,74	4,78	11,37	68,64	-
PI	29,31	7,82	6,29	56,65	-

Tableau 20 : Composition en acides gras des phospholipides de l'huile de tournesol (Smiles *et al.*, 1988)

Phospholipide s	Acides Gras				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PC	37,5	19,2	20,0	19,3	5,0
PE	30,2	13,5	38,2	17,3	0,8
PI	24,2	20,2	38,3	16,0	1,3

Tableau 21 : Composition en acides gras des phospholipides de l'huile de palme *Elaeis guineensis* (Kulkarni *et al.*, 1991)

IV.1.2.1.8 Récapitulatifs sur l'analyse biochimique de la noix du Brésil

Le tableau 22 donne un récapitulatif de la composition globale du tourteau déshuilé par pressage de la noix du Brésil ainsi que la composition de la noix entière calculée à partir des données précédentes comparée à celle du tourteau de la noix de Brésil trouvée par Antunes et Markakis (1977) et du tourteau de colza déshuilé (Vioque *et al.*, 2000). Les valeurs sont données par rapport à la matière sèche.

La noix de Brésil peut être considérée comme un oléagineux de par sa forte teneur en huile (72,5%). Elle est également riche en protéines (19,3%) et en minéraux (2,9%) mais contient peu de sucres (2,23%) et d'amidon (0,7%). Elle contient également peu de fibres (4,5%).

La noix du Brésil étudiée a une composition minérale très intéressante puisqu'elle contient 126 ppm de sélénium. Cette caractéristique a particulièrement été étudiée dans le chapitre suivant et a donné la possibilité à cette noix de rentrer en grande quantité dans de nouveaux produits nutraceutiques commercialisés par la société Althéus, filiale de JBA Agroconcept, notre partenaire dans cette étude.

Le tourteau déshuilé devient un protéagineux intéressant de par sa forte teneur en protéine (67,9%). Sa teneur en fibres est relativement faible (15,2%) et destinerait plutôt ce tourteau à l'alimentation des volailles. Il est également très riche en sélénium et a conduit l'industriel Althéus à l'utiliser plutôt que la noix entière dans ses préparations réservant l'huile à des usages alimentaires plus classiques comme l'assaisonnement.

Etchessahar (2000) cite une application potentielle du tourteau dans son rapport de fin d'étude. En effet, elle propose de fabriquer un nouvel ingrédient la *Masapán* destinée au marché de la pâtisserie. Ce produit est similaire à la pâte d'amande et le goût semble agréable.

Composants	Tourteau de la noix du Brésil	Noix du Brésil Entière (calculé)	Tourteau de la noix du Brésil (Antunes et Markakis, 1977)	Tourteau déshuilé de colza
Teneur en eau <i>Aw</i> à 23°C	5,7 0,47	1,70	8,7	nd
Cendres	10,7	3,20	7,3	9,0
Sélénium (ppm)	126		40	
Huile (%)	8,0 dont	72,5	1,0	3,9
Ac. gras insaturés (%)	75,6			
C16:1	0,2			
C18:1	39,3			
C18:2	36,1			
Indice de Peroxyde ^a	9,8			
Acidité	0,6			
Densité	0,975			
Insaponifiable	0,7			
Stérols (mg/g)	1,45			
Tocophérols (mg/g)	0,21			
Phospholipides (µg P/g huile)	377			
Protéines Facteur de conversion azote/protéines 6,97	67,9	19,3		40,4
Fibres	15,2	4,54	5,9	
Sucres solubles	8,2 dont	2,2	2,6	6,3
Glucose	0,2	0,06		
Fructose	1,0	0,02		
Saccharose	7,0	2,09		
Total (sur MS)	≈ 100	≈ 100		

Tableau 22 : Composition du tourteau déshuilé par pressage de la noix du Brésil comparée à celles de la noix de Brésil trouvé par Antunes et Markakis (1977) et du tourteau de colza déshuilé (Vioque *et al.*, 2000)

^a *Indice de Peroxyde exprimé en milliéquivalent d'oxygène actif / kg de matière grasse.*

Les valeurs sont données par rapport à la matière sèche.

IV.1.2.2 Conclusion

Le tourteau de la noix du Brésil, de par sa richesse en sélénium (126 µg/g), peut être considéré comme une matière première pour formuler des aliments santé. Le sélénium est un composant de différentes enzymes protégeant le corps contre l'oxydation (Voedings, 2003). Un seul gramme de ce tourteau ou d'une demi-noix apporte la quantité journalière recommandée à un individu de 70 kg.

Outre le sélénium, le tourteau contient la plupart des éléments minéraux essentiels au bon fonctionnement du métabolisme. La teneur en cendres du tourteau est de 10,7%.

La noix du Brésil est riche en phosphore et en magnésium. Le phosphore qui peut représenter plus de 2% du tourteau déshuilé est présent essentiellement sous forme minérale. La teneur en magnésium est élevée (1,34%).

La teneur en eau (5,7 %) et l'activité de l'eau (0,47 à 23°C) donne à ce tourteau une stabilité d'un point de vue microbiologique pendant sa conservation.

La teneur en sucre simple total (glucose + fructose + saccharose) du tourteau de la noix du Brésil (8,2%) est équivalente à celles des noix entières de pécan (2,05%), de macadamia (4,2%), d'amande (3,52%) (Fourie et Basson, 1990) et du tourteau de tournesol (6,3%) (Vioque *et al.*, 2000).

Le tourteau de la noix de Brésil est également une bonne source de protéine. Le tourteau délipidé contient 67,9 % de protéines dans le tourteau, ce qui représente pour la noix entière une teneur en protéine de 19,3%. Le facteur de conversion azote/protéine a été recalculé à 6,97 en tenant compte de la composition en acides aminés de la protéine.

La noix fraîche du Brésil est un oléagineux puisque sa teneur en huile atteint 72,5%. Le tourteau déshuilé par pressage en usine au Brésil ne contient plus que 8% d'huile par rapport à la matière sèche.

L'huile de la noix du Brésil est très insaturée puisqu'elle contient 75,6% d'acides gras insaturés avec en quantité à peu près égale les acides oléique (39,3%) et linoléique (36,1%). Elle contient peu d'acides gras saturés avec 13% d'acide palmitique et 11% d'acide stéarique.

Le β-tocophérol avec 88,3% est le plus important en quantité des tocophérols trouvés dans l'huile. Le stérol le plus important est le β sitostérol avec 76% de la fraction stérolique alors que celle de l'huile d'olive en contient 81% (Jiménez de Blas *et al.*, 1996) et l'huile d'amande 77% (Itoh *et al.*, 1974).

Cette huile respecte les normes de qualité de l'International Olive Oil Council en terme d'acidité (0,64%) et d'indice de peroxyde (9,8 meq/kg). Ces valeurs correspondent aux normes exigées pour la commercialisation de l'huile d'olive vierge extra et de l'huile de grignons d'olive (acidité de 1%, indice de peroxyde de 20 milliéquivalents O₂/Kg d'huile).

La teneur de l'huile en matière insaponifiable (0,7%) est également dans la norme applicable à l'huile d'olive de l'International Olive Oil Council (1,5%).

L'huile de la noix de Brésil est plus riche en phosphore (377 ppm) que l'huile brute de soja (260 ppm) connue pour sa haute teneur en lécithine (Clark et Synder, 1991).

Chapitre 2

**Mise en évidence d'une liaison covalente liant le
sélénium aux fractions protéiques
de la Noix du Brésil *Bertholletia excelsa***

IV.1.3 Deuxième chapitre : Mise en évidence d'une liaison covalente liant le sélénium aux fractions protéiques de la Noix du Brésil *Bertholletia excelsa*

IV.1.3.1 Extraction des différentes fractions protéiques de la noix du Brésil

Les protéines de la noix du Brésil ont été fractionnées afin d'identifier quelle était la fraction la plus riche en sélénium.

Le processus d'extraction des protéines de la noix du Brésil est basé sur la variation du pH, de la température pendant l'extraction, de la précipitation et la quantité d'eau utilisée pour l'extraction. Tous ces paramètres ont montré une influence sur le rendement d'extraction.

Le fractionnement des protéines a été effectué en 3 étapes afin d'obtenir 3 fractions différentes. Elles ont chacune été analysées indépendamment. Tout d'abord, une extraction à l'eau à pH 7, suivie d'une extraction avec du NaCl 0,5N à pH 8. Enfin, une extraction au NaOH 1N à pH 10 est réalisée. La somme des masses de ces 3 extraits a été comparée à la quantité de protéines extraites directement à la NaOH 1N à pH 10. Les fractions ont été nommées en référence à l'article de Rakipov (1987).

L'extraction des protéines totales a été effectuée sur 10 g de tourteau dégraissé qui a été dispersé dans 150 mL de NaOH 1N à pH 10 directement dans des tubes à centrifuger qui ont été ensuite gardés sous agitation rotative à 225 tr/min pendant 60 minutes puis centrifugés à 4700g à 20°C pendant 20 minutes. Le surnageant a été alors ajusté à un pH voisin de 5 par addition de HCl 1N. Les protéines précipitent alors et la séparation est effectuée par centrifugation à 4700g à 10°C pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et les protéines sont ensuite séchées à 60°C sous vide pendant 16h puis pesées.

Ce premier chapitre décrit les étapes du fractionnement.

IV.1.3.1.1 Détermination du pH optimum de solubilisation et de précipitation des protéines

L'effet de la variation du pH de solubilisation et du pH de précipitation sur la quantité de protéines extraites a été étudié sur 10 g de tourteau solubilisés dans 150 mL d'eau. La figure 19 obtenue à partir des résultats présentés en annexe A1 montre que le pH de solubilisation a un effet linéaire croissant sur la quantité de protéines extraites. Pour des pH de solubilisation faible, il vaut mieux que le pH de précipitation soit fort. Les rendements en protéines extraites restent dans ce cas faibles (inférieures à 8%). Pour des pH de solubilisation forts et voisins de 10, les pH de précipitation voisins de 4 donnent de meilleures extractions en protéines pouvant aller jusqu'à 24%. L'optimum d'extraction doit se trouver aux alentours du couple pH de solubilisation/pH de précipitation de 10/5. Une vérification expérimentale au couple pH de solubilisation/pH de précipitation de 10/5,5 a conduit à 23% de protéines extraites du tourteau initial.

Le rendement d'extraction par couples pH solubilisation/précipitation de 10/5,5 et 10/5 par rapport aux protéines totales sont de $100 \times 23/67,94 = 33\%$ et $100 \times 20,5/67,94 = 30\%$ respectivement.

Au-delà des couples pH solubilisation/précipitation de 6/5 et 10/6, les quantités de protéines extraites sont extrêmement faibles.

Le pH isoélectrique qui favorise la précipitation des protéines se trouve donc autour de 5,5.

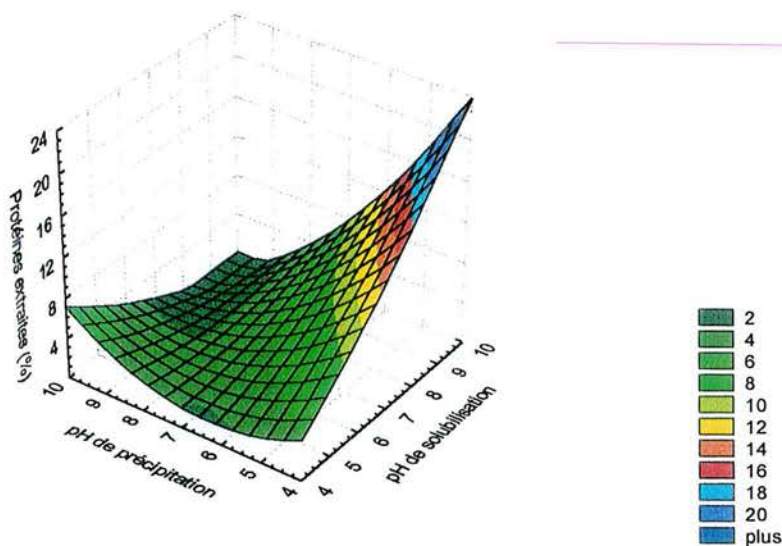


Figure 19 : Effet des différents pH de solubilisation et de précipitation sur l'extraction des protéines de 10 g de tourteau dispersés dans 150 mL d'eau.

IV.1.3.1.2 Effet du volume d'eau sur la quantité de protéines extraites

Le tourteau initial a été fixé à 10g et les volumes d'eau qui ont servi à la solubilisation ont varié de 90 mL à 250mL. Le pH optimum de solubilisation a été fixé à 10 et le pH de précipitation à 5 ou 5,5.

La quantité de protéines extraites augmente jusqu'à 25% à pH de précipitation de 5,5 lorsque le volume d'eau augmente de 90 à 170 mL. Au-delà de 190 mL et jusqu'à 250 mL, la quantité de protéines extraites reste constante à 22% qui est la même valeur que celle obtenue avec 150 mL d'eau (Figure 20). Le gain en protéines extraites est donc seulement de 2% du tourteau initial pour une augmentation de 20 mL d'eau.

Une simple modification du pH de précipitation de 5,5 à 5 permet d'extraire plus de protéines. On obtient en effet 31% de protéines extraites pour un volume d'eau d'extraction de 190 mL.

L'abaissement du pH de précipitation de 5,5 à 5,0 et l'augmentation de la quantité d'eau de 150 à 190 mL permet de gagner 6% de protéines extraites supplémentaires.

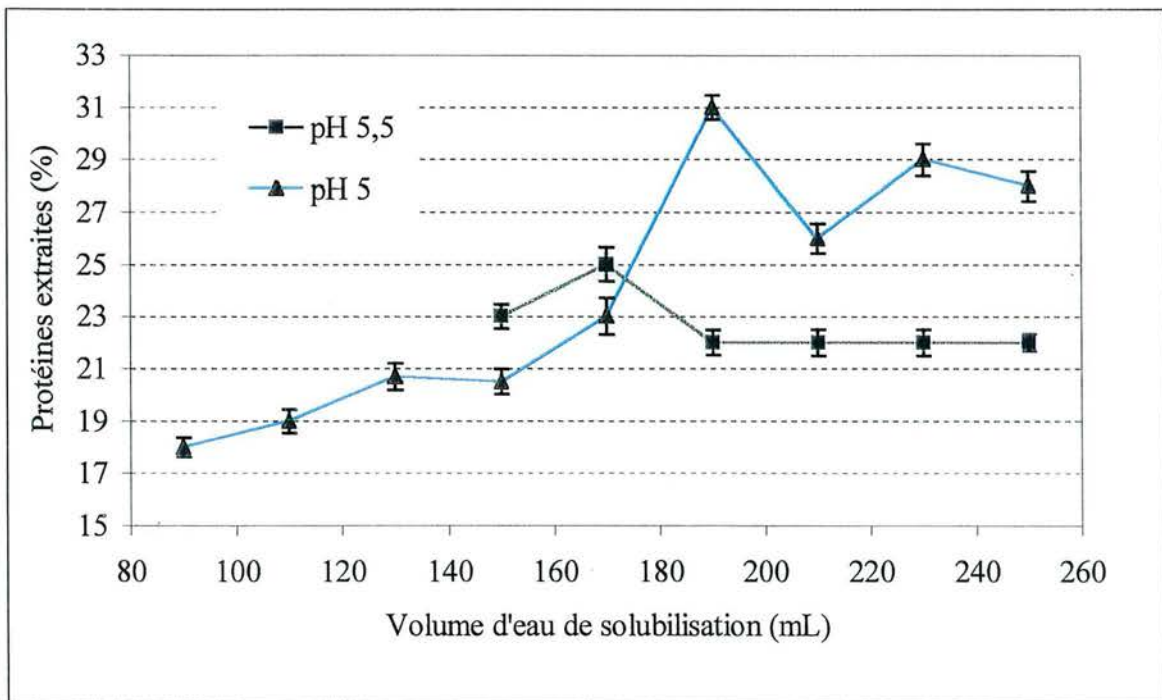


Figure 20 : Effet de l'augmentation du volume d'eau sur l'extraction des protéines de 10 g de tourteau à pH de solubilisation 10 et précipitation 5 ou 5,5

La proportion tourteau/eau a ensuite été conservée à 1/10 mais en faisant varier les quantités de 10g/100mL à 50g/500mL afin de produire plus de protéines (Figure 21). Les pH de solubilisation et de précipitation sont conservés aux valeurs optimales de 10 et 5,5 respectivement.

Le rapport 10 g de tourteau / 100 mL d'eau permet d'extraire 21% de protéine. Cette valeur diminue lentement jusqu'à 50 g de tourteau dispersés dans 500 mL d'eau qui permet d'extraire 19,7% de protéines. La quantité moyenne de protéine extraite est de 20,1%. (Figure 21).

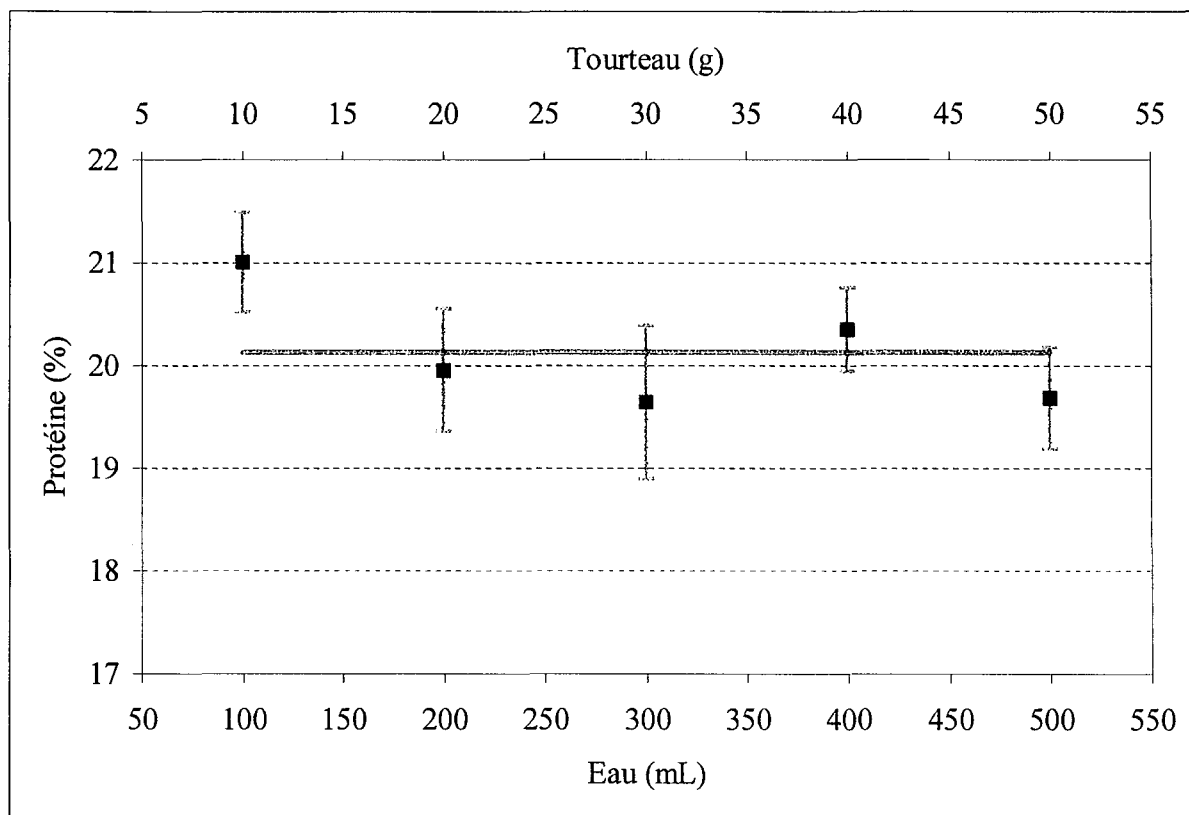


Figure 21 : Extraction des protéines du mélange tourteau/eau dans la proportion 1/10 à pH de solubilisation 10 et précipitation 5,5

IV.1.3.1.3 Extraction des protéines à plus grande échelle

L'objectif de cette expérience est d'augmenter la quantité initiale de tourteau à extraire jusqu'à 100 g. 25% de protéines ont été extraits de 100 g de tourteau dans 1300 et 1500 mL d'eau à pH de solubilisation 10 et pH de précipitation 5,0 (Tableau 23). Dans ce cas là, l'augmentation de volume d'eau de 1300 à 1500 mL (15%) n'augmente pas la teneur de protéine extraite. Donc, la quantité d'eau de 1300 mL est optimale pour extraire des protéines de 100 g de tourteau.

Ces résultats sont équivalents à ceux obtenus sur 10 g de tourteau avec 170 et 210 mL d'eau avec les couples pH de solubilisation/pH de précipitation de 10/5,5 et 10/5,0 qui donnent respectivement 25 et 26 % de protéines (Figure 20).

Tourteau (g)	H ₂ O (mL)	pH de solubilité	pH de précipité	Protéines extraites (%)
100	1500	10	5	25 +/- 0,4
100	1300	10	5	25 +/- 0,5

Tableau 23 : Effet de l'augmentation des volumes d'eau et quantité de tourteau sur l'extraction des protéines.

IV.1.3.2 Capacité des protéines extraites du tourteau de la noix du Brésil à se complexer avec les lipides

Les propriétés fonctionnelles des aliments dépendent de la structure physique de l'aliment : émulsion, poudre, pâte, liquide. La teneur en graisse détermine la qualité (succulence, texture, liens structuraux, aspect) et le rendement du produit fini (Lin *et al.*, 1987).

Beaucoup de propriétés des aliments découlent des interactions entre protéines et lipides : formation des émulsions (De Kanterewicz *et al.*, 1987), occlusion de graisse dans des émulsions de viande, absorption d'arômes et préparation des pâtes. L'absorption des graisses par les protéines est affectée par la source de protéine, le traitement, les additifs, la dimension particulaire et la température. Les protéines d'origine végétale contiennent de nombreuses chaînes latérales non polaires qui lient les chaînes d'hydrocarbure contribuant, de ce fait, à l'absorption accrue d'huile. Bien que le mécanisme de l'absorption des graisses n'ait pas été complètement expliqué, il est attribué principalement à l'occlusion physique des huiles (Lin *et al.*, 1987). Lier de la graisse avec d'autres composants des aliments, en particulier des protéines et des carbohydrates, influence les propriétés texturales et gustatives des produits alimentaires.

Nous avons étudié la complexation de l'huile de tournesol raffinée avec la protéine de tourteau de noix du Brésil. Quelle que soit la température à laquelle le contact entre l'huile et la protéine du tourteau est réalisé, on obtient toujours une valeur proche de 1,2 g d'huile liée par 5 g de protéine (Figure 22).

Lin *et al.* (1987) ont montré que la capacité d'absorption d'huile de la protéine du germe déshuilé de maïs est de 10% de la protéine du germe et que cette capacité d'absorption diminue proportionnellement à l'augmentation de la température de 0 à 70°C.

La capacité d'absorption de l'huile ou Fat Binding Index (sans unité) par les protéines, mise en contact avec l'huile pendant 30 min, en fonction de la température d'incubation, est calculée par la division du poids du culot (Protéines + huile) sur le poids des protéines originales (Phillips *et al.*, 1979). Les résultats montrent que lorsque la température augmente de 0 à 70°C, la capacité d'absorption de l'huile diminue peu pour passer de 1,24 à 1,21 g d'huile/g protéine du tourteau de la noix de Brésil, donc il n'y a pas de changement remarquable de la capacité d'absorption de l'huile en fonction de la température d'incubation.

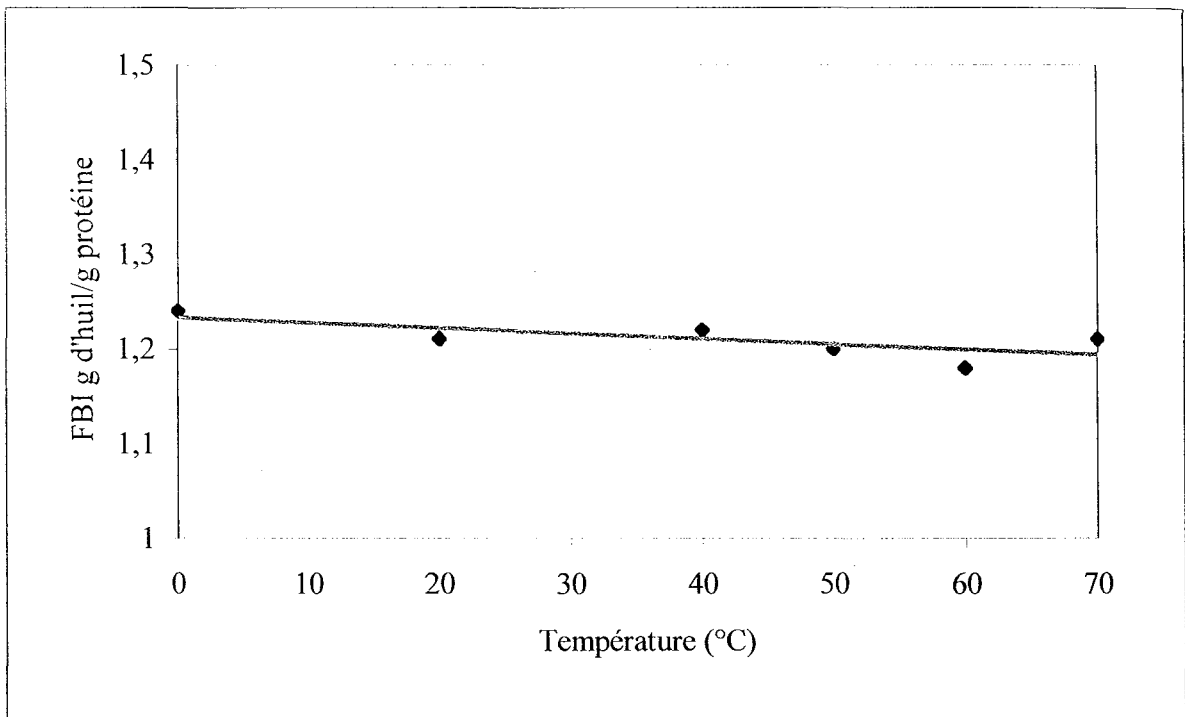


Figure 22 : Quantité d'huile de tournesol raffinée liée par 5 g de protéine extraite du tourteau de la noix de Brésil en fonction de la température.

FBI = Fat Binding Index

IV.1.3.3 Analyses des protéines

La composition en acides aminés des différentes fractions protéiques extraites à l'eau, au NaCl et à la soude a été analysée (Tableau 24). Les trois fractions ne présentent pas des compositions en acides aminés significativement différentes.

La composition en acides aminés des protéines de *Bertholletia excelsa* (Tableau 24) est proche de celle du tourteau de haricot (Antunes et Markakis, 1977) et de la noix du Cambodge (Chunhieng *et al.*, 2002). La teneur en lysine est faible (2,5 %) et la teneur en acides aminés soufrés méthionine (2,4 %) et cystéine (1,0 %) est élevée.

Acides aminés	Eau (Albumines)	NaCl (Globulines)	NaOH (Glutélines)	NaOH sur tourteau (Protéines totales)	Tourteau d'Haricot (%)	Noix du Cambodge (%)
Acide aspartique	7,7	8,6	8,8	8,4	12,8	8,5
Acide glutamique	18,0	16,0	16,1	17,7	15,9	19,4
Sérine	5,5	5,6	5,7	5,7	6,6	6,8
Glycine	8,7	9,2	8,9	8,8	3,7	8,4
Histidine	1,9	1,6	1,9	1,8	2,8	1,9
Arginine	12,4	11,0	11,1	11,8	6,3	6,9
Thréonine	4,8	4,8	5,0	4,3	5,3	5,3
Alanine	5,9	6,9	6,7	6,2	4,1	6,9
Proline	5,0	5,0	5,1	5,0	4,5	4,9
Tyrosine	2,4	2,6	2,5	2,4	3,2	2,8
Valine	6,3	7,4	7,1	6,3	6,1	5,4
Méthionine	2,2	0,9	0,6	2,4	0,8	1,4
Cystéine	1,1	0,6	0,6	1,0	0,6	1,7
Isoleucine	3,9	4,5	4,1	4,0	5,0	4,4
Leucine	8,0	8,3	8,5	7,9	8,8	7,2
Phénylalanine	3,7	4,2	4,2	3,8	6,4	3,2
Lysine	2,5	2,7	2,9	2,5	7,1	4,9

Tableau 24 : Composition centésimale en acides aminés (%) des fractions protéiques extraites de *Bertholletia excelsa* comparée avec le tourteau de la noix du Cambodge (Chunhieng *et al.*, 2002) et du tourteau de haricot (Antunes et Markakis, 1977)

Afin d'affiner le calcul de la teneur en protéines de la noix du Brésil, nous avons calculé le facteur de conversion azote/protéines (Morr, 1982). La teneur en azote obtenue par carbonisation totale du tourteau déshuilé est de 9,75 %.

Afin de déterminer ce facteur, la teneur en azote de chaque acide aminé a été calculée par rapport à son poids moléculaire puis le pourcentage d'azote dans les protéines a été établi en multipliant la quantité d'azote par le pourcentage en azote dans la protéine.

Le facteur de conversion ainsi obtenu (Tableau 25) est de 6,97. Le tourteau délipidé contient 97,47 mg/g d'azote, ce qui fait un contenu en protéines recalculé de $97,47 \times 6,97 = 679,36$ mg/g de protéines soit 67,94 % de protéines dans le tourteau.

Acides Aminés	Poids moléculaire (g)	Protéine de la noix du Brésil (%)	Azote /PM (g d'azote/g acide aminé)	Azote dans la protéine (g/100g)
Acide aspartique	133,10	8,4	0,105	0,882
Acide glutamique	147,10	17,7	0,095	1,681
Sérine	105,09	5,7	0,133	0,758
Glycine	75,07	8,8	0,186	1,637
Histidine	155,16	1,8	0,090	0,162
Arginine	174,20	11,8	0,321	3,788
Thréonine	119,12	4,3	0,117	0,503
Alanine	89,09	6,2	0,157	0,973
Proline	115,13	5,0	0,122	0,610
Tyrosine	181,19	2,4	0,077	0,185
Valine	117,15	6,3	0,119	0,750
Méthionine	149,21	2,4	0,094	0,226
Cystéine	240,30	1,0	0,116	0,116
Isoleucine	131,18	4,0	0,107	0,428
Leucine	131,18	7,9	0,107	0,845
Phénylalanine	165,19	3,8	0,085	0,323
Lysine	146,19	2,5	0,191	0,477
Total		100,0		14,344

Tableau 25 : Calcul du facteur de conversion azote/protéines pour les protéines de la noix du Brésil

IV.1.3.4 Quantité de sélénium trouvée sur les fractions protéiques extraites du tourteau de la noix du Brésil

Les fractions protéiques du tourteau déshuilé de la noix de Brésil ont été obtenues par extractions successives par différents solvants : eau à pH 7, solution saline à pH 8, éthanol à 70% et NaOH à pH 10. Le nom des fractions a été donné en référence à l'article de Rakipov (1987). Une extraction directe des protéines du tourteau par NaOH à pH 10 donnent les protéines totales.

La teneur en protéine totale extraite du tourteau de la noix du Brésil à la soude est de 20,5%. Cette teneur est inférieure à celle trouvée sur du tourteau de soja avec 50% (Vet-lyon, 2003), par

Baron *et al.* (2002) sur du tourteau de colza avec 35% mais voisine de celle trouvée par les mêmes auteurs sur du tourteau de tournesol (29%).

Le sélénium est inégalement réparti dans les quatre fractions protéiques (Tableau 26). La fraction extraite à l'eau qui est la plus importante en masse avec 17,7% de protéines est la plus riche en sélénium avec 153 ppm. La fraction extraite au NaCl qui représente 6% de la masse contient 63 ppm et celle extraite avec de la soude à pH 10 qui représente 3% de la masse contient un niveau équivalent de Se avec 56 ppm. On note l'absence de protéines de la famille des prolamines extraites à l'éthanol 70%. Le contenu en azote des différentes fractions montre que les protéines sont très pures surtout si le nouveau facteur calculé de 6,97 est utilisé. On obtient ainsi pour les albumines une pureté proche de 100% et une pureté un peu plus faible pour les globulines (87,8%) et les glutélines (76,2%). La quantité de protéines totale extraites est généralement proche de 21% avec un maximum de 25% qui a été obtenu en mélangeant 10g de tourteau avec 170 mL d'eau au lieu de 150 mL et une précipitation par ajout d'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 5,5. La protéine totale extraite directement sur le tourteau à la soude est très pure ($\cong 100\%$) et contient 142 ppm de sélénium.

La noix du Brésil étudiée est une espèce très riche en sélénium, beaucoup plus riche que les espèces citées dans la littérature qui contiennent entre 10 et 35 ppm de sélénium (Ip et Lisk, 1994 ; Vonderheide *et al.*, 2002) et celles analysées par notre laboratoire en provenance d'autres régions amazoniennes comme celle du Pérou dans lesquelles nous avons trouvé seulement 10 ppm de sélénium (Etchessahar, 2000).

Fractions	Solvants d'extraction	Protéine extraite (g)/100g de tourteau	Azote extrait (%)	Protéines (g)/100 g extraites (facteur 6,25/6,97)	Sélénium (ppm)
Albumines	Eau	17,7	14,76	92,2/ 100,0	153
Globulines	NaCl	6,0	12,6	78,7/87,8	63
Prolamines	Ethanol 70%	0	0	0/0	0
Glutélines	NaOH	3,0	10,93	68,3/76,2	56
Protéines Totales	NaOH sur tourteau	20,5	14,8	92,5/100.0	142

Tableau 26 : Teneurs en sélénium et protéines dans les différentes fractions protéiques extraites par fractionnement par différents solvants

IV.1.3.5 Identification de la sélénométhionine et de la sélénocystéine par couplage HPLC-SM

A partir de l'hydrolysât enzymatique de la noix du Brésil, deux composés A et B de même temps de rétention chromatographique que les deux standards de sélénocystéine et sélénométhionine ont été identifiés et ceci dans plusieurs systèmes chromatographiques différents. La teneur en sélénométhionine obtenue par HPLC par comparaison avec le standard est de 111 µM/L d'extrait. La teneur en sélénocystéine est très faible et difficilement quantifiable. La teneur en méthionine (14054 µM/L) est 126 fois supérieure à celle de la sélénométhionine. La teneur en cystéine est de 304 µM/L. La composition corrigée de la protéine de noix du Brésil qui tient compte de la teneur en sélénométhionine et sélénocystéine est donc peu différente de la composition classique (Tableau 27).

Fractions	Teneur en sélénium (ppm)	Teneur en sélénocystéine (ppm)	Teneur en cystéine (%)	Teneur en sélénométhionine (ppm)	Teneur en méthionine (%)
Albumines	152,7	297,7	1,1	379,0	2,2
Globulines	63,2	123,2	0,6	156,8	0,9
Glutélines	55,8	108,8	0,6	138,5	0,6
Protéine totale	141,6	276,1	1,0	351,4	2,4

Tableau 27 : Tableau récapitulatif des teneurs en sélénium, en sélénocystéine et en sélénométhionine des différentes fractions protéiques

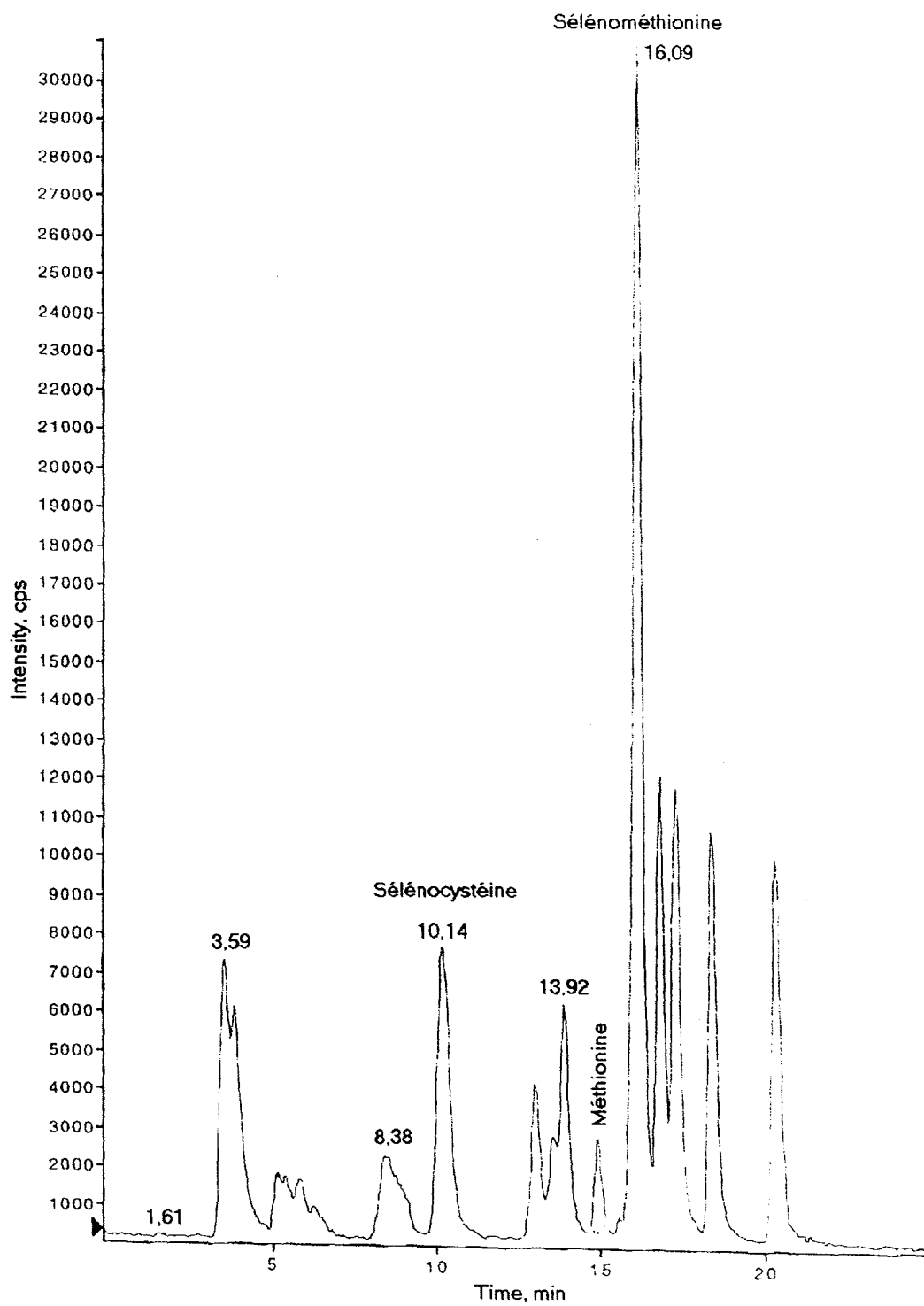
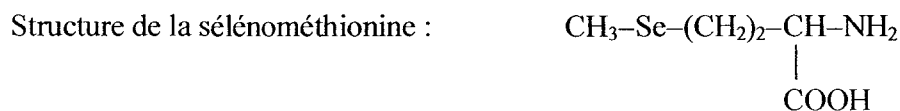
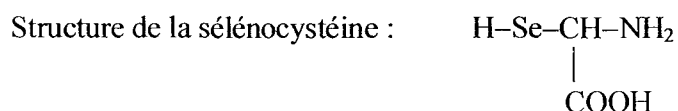


Figure 23 : Identification de la sélocméthionine et de la sélocystéine par couplage HPLC-MS

En couplage HPLC-MS tandem, il s'avère que les deux composés repérés A et B ont une masse molaire différente entre eux. Le composé A, a la même masse molaire que le standard de sélénocystéine et le composé B la même masse que le standard de sélénométhionine. Par ailleurs la fragmentation en spectrométrie de masse tandem du composé A est rigoureusement la même que celle observée pour la sélénocystéine dans les mêmes conditions et celle du composé B identique à celle de la sélénométhionine.

Nous avons ainsi conclu à la présence dans la noix du Brésil de deux composés A et B identiques aux deux standards. Ces résultats permettent donc d'affirmer la présence de liaison covalente avec le sélénium pour les deux acides aminés sélénométhionine et sélénocystéine.

A partir de la teneur en sélénium obtenue sur chaque fraction protéique, les teneurs en sélénocystéine et sélénométhionine de chaque fractions peuvent être calculées théoriquement en se basant sur le poids moléculaire de ces deux constituants (Tableau 27) :



Masse moléculaire de la sélénocystéine : 153,96 g/mole

Masse atomique du sélénium : 78,96 g/mole

Masse moléculaire de la sélénométhionine : 195,96 g/mole

La sélénocystéine et la sélénométhionine se trouvent en très faible quantité dans les différentes fractions protéiques si on compare par rapport aux teneurs en méthionine et cystéine mais ces teneurs sont quand même bien supérieures aux autres graines et plantes connues.

Chapitre 3

**Valorisation du tourteau déshuilé
de la Noix du Brésil *Bertholletia excelsa*
sous forme de lait végétal**

IV.1.4 Troisième chapitre : Valorisation du tourteau déshuilé de la noix du Brésil sous forme de lait végétal

IV.1.4.1 Introduction

L'équipe dirigée par Didier Montet possède une grande expérience dans la fabrication de boissons végétales à partir de substances végétales. En effet, cette équipe a mis au point des laits végétaux fabriqués à partir de différentes graines et amandes comme le riz (Lioret, 1996), le manioc (Khantisophon *et al.*, 2003), l'amande (Lugand, 1997) ou encore le maïs (El, 1996 ; Krespine, 1997 ; Guyot *et al.*, 2001).

Nous avons donc utilisé cette expérience pour valoriser la noix du Brésil sous forme d'un lait végétal. Ce lait pourra trouver des débouchés soit dans l'alimentation, soit dans le domaine médical ou para-médical en fonction de sa teneur en sélénium.

IV.1.4.2 Résultats et discussion

300 g de tourteau contenant 283 g de matière sèche sont mélangés avec 1000 mL H₂O permutée directement dans un broyeur Mejisa Mectufry (Espagne).

Après broyage, 490 mL de lait sont obtenus contenant 15,68 % de matière sèche et 780g de résidu humide. Le rendement en matière sèche est donc de 27% obtenu par le calcul suivant :
Rendement = $[15,68 \times 4,9] / 283 = 0,27$.



Figure 24 : Bilan matière de la production de lait de noix du Brésil

Ces 490 mL de lait sont ensuite lyophilisés et 41 g de lait sec sont obtenus. Le rendement en lait lyophilisé par rapport de la quantité de tourteau initial est donc de 13,7%.

Le détail du calcul montre que la masse totale au départ est de 300g de tourteau + 1000g d'eau = 1300g de mélange. 490 mL de lait sont obtenus donc il devrait rester en théorie 1300g – 490g = 810g que l'on peut rapprocher des 780g de résidus humides obtenus réellement.

Les résidus humides sont transformés par lyophilisation et donnent 216 g de résidu sec (27,7%).

Donc 216 g + 41 g de matières sèches sont récupérés au total pour une quantité initiale de 283g. Au cours de la fabrication du lait, 26 g de matières sèches sont perdus (Figure 24).

Le lait recherché par notre partenaire industriel, la société JBA Agroconcept, doit contenir une forte teneur en sélénium.

Les compositions en minéraux du lait lyophilisé et de son résidu lyophilisé ont ainsi été réalisées (Tableau 28). Les minéraux se trouvent quantité légèrement plus importante dans le lait que dans le résidu. Le lait a une composition minérale similaire à la noix initiale. La teneur du lait en sélénium (142,1 ppm) est dix fois plus élevée que celle trouvée dans le résidu (14,1 ppm). Cette teneur est légèrement supérieure à celle trouvée dans le tourteau de la noix (126 ppm). La teneur en protéine du lait lyophilisé (66,7%) est égale à celle de la noix (67,9%), ce qui donne à ces deux produits un potentiel intéressant comme aliment santé.

Le lait lyophilisé final contient donc 4,6% d'eau, 66,7% (p/v sec) de protéines, 17,4% (p/v sec) de matières minérales et 8% d'huile (p/v sec) apportée par le tourteau de départ.

	H₂O	N	P	K	Ca	Mg	Na (ppm)	Se (ppm)	S
Lait	4,60	9,57	2,39	2,119	0,618	1,340	377,0	142,1	1,318
Résidu	2,21	5,75	1,48	1,266	0,356	0,850	311,5	14,1	0,549
Tourteau de la Noix du Brésil	5,0	8,31	2,38	1,97	0,61	1,34	20,0	126,0	1,26

Tableau 28 : Composition centésimale en minéraux du lait lyophilisé et de son résidu comparée à la noix du Brésil (sauf quand c'est précisé : ppm)

IV.1.5 Conclusion

Le processus d'extraction des protéines de la noix du Brésil est basé sur la variation du pH lors de la solubilisation et de la précipitation. La température pendant l'extraction et la précipitation, la quantité d'eau influencent également le rendement en produits.

Le pH de solubilisation optimum a été fixé à 10 et le pH de précipitation à 5 ou 5,5. Cette combinaison a permis d'extraire 20,5% à 23% de protéines à partir du tourteau déshuilé de la noix du Brésil. Le rapport tourteau/eau optimal est de 10g/150mL. Le changement d'échelle en utilisant les quantités 100g/1500mL ne permet pas d'augmenter les rendements d'extraction.

Au contraire, la diminution du volume d'eau d'extraction conduit à une diminution de la quantité de protéine extraite. Ce phénomène est certainement dû à une solubilisation insuffisante des protéines.

Les protéines extraites du tourteau contiennent une teneur en sélénium très intéressante avec 142 ppm à 153 ppm.

Le fractionnement des protéines à l'eau, par une solution saline de NaCl puis NaOH a donné trois fractions de protéines : albumine, globuline et glutéline (Ampe *et al.*, 1986 ; et Rakipov, 1987). La famille des albumines a la teneur en sélénium la plus importante avec 153 ppm et représente 17,7 g pour 100 g du tourteau. Les glutélines sont également intéressantes avec 56 ppm de sélénium et 3 g de protéines/100 g de tourteau tout comme les globulines avec 63 ppm de sélénium pour 6 g pour 100 g de tourteau.

L'étude la plus récente sur ce sujet, qui émane de l'équipe américaine de Vonderheide *et al.* (2002), montre que les noix originaires des régions centrales et ouest du Brésil contiennent 35 ppm de sélénium et que ce sélénium est lié de façon covalente principalement à la sélénométhionine et en quantité moindre à la sélélocystéine.

Le couplage HPLC-MS a permis de montrer que le sélénium est fixé sur les protéines de façon covalente et que le sélénium remplace le soufre de la sélénométhionine et de la sélélocystéine sur une partie de ces acides aminés qui représente presque 1% dans le cas de la sélénométhionine.

Les noix étudiées sont donc extrêmement riches en sélénium. Les fractions protéiques extraites sont également très riches en sélénium et peuvent constituer un aliment santé intéressant à consommer avec modération. Les apports journaliers conseillés chez l'homme (35 µg pour 70Kg) sont en effet très rapidement atteints puisque les noix contiennent 126 µg/g de noix. Ce produit doit donc être utilisé dilué dans un mélange alimentaire adéquat.

Le lait de noix est un produit alimentaire intéressant qui pourrait par sa teneur en sélénium trouver des applications en cosmétique ou en alimentation santé.

RESULTATS & DISCUSSION

Deuxième Partie : Production d'un aliment santé à partir du fruit cambodgien *Morinda citrifolia*

IV.2 Deuxième partie : Production d'un aliment santé à partir du fruit Cambodgien *Morinda Citrifolia*

IV.2.1 Rappels des objectifs généraux

L'objectif de cette recherche est de mettre au point une méthode de traitement du jus de *Morinda Citrifolia* provenant du Cambodge en conservant ses propriétés naturelles. La recherche a été menée en 4 étapes :

- Extraction du jus de *Morinda Citrifolia*,
- Clarification du jus de *Morinda Citrifolia*,
- Etude de la composition biochimique du jus, des fibres extraites du jus, du tourteau résiduel après pressage et des graines,
- Etude la stabilité physique et microbiologique du jus de *Morinda Citrifolia*.

IV.2.2 Production du jus de *Morinda Citrifolia*

IV.2.2.1 Présentation du processus général et des analyses réalisées

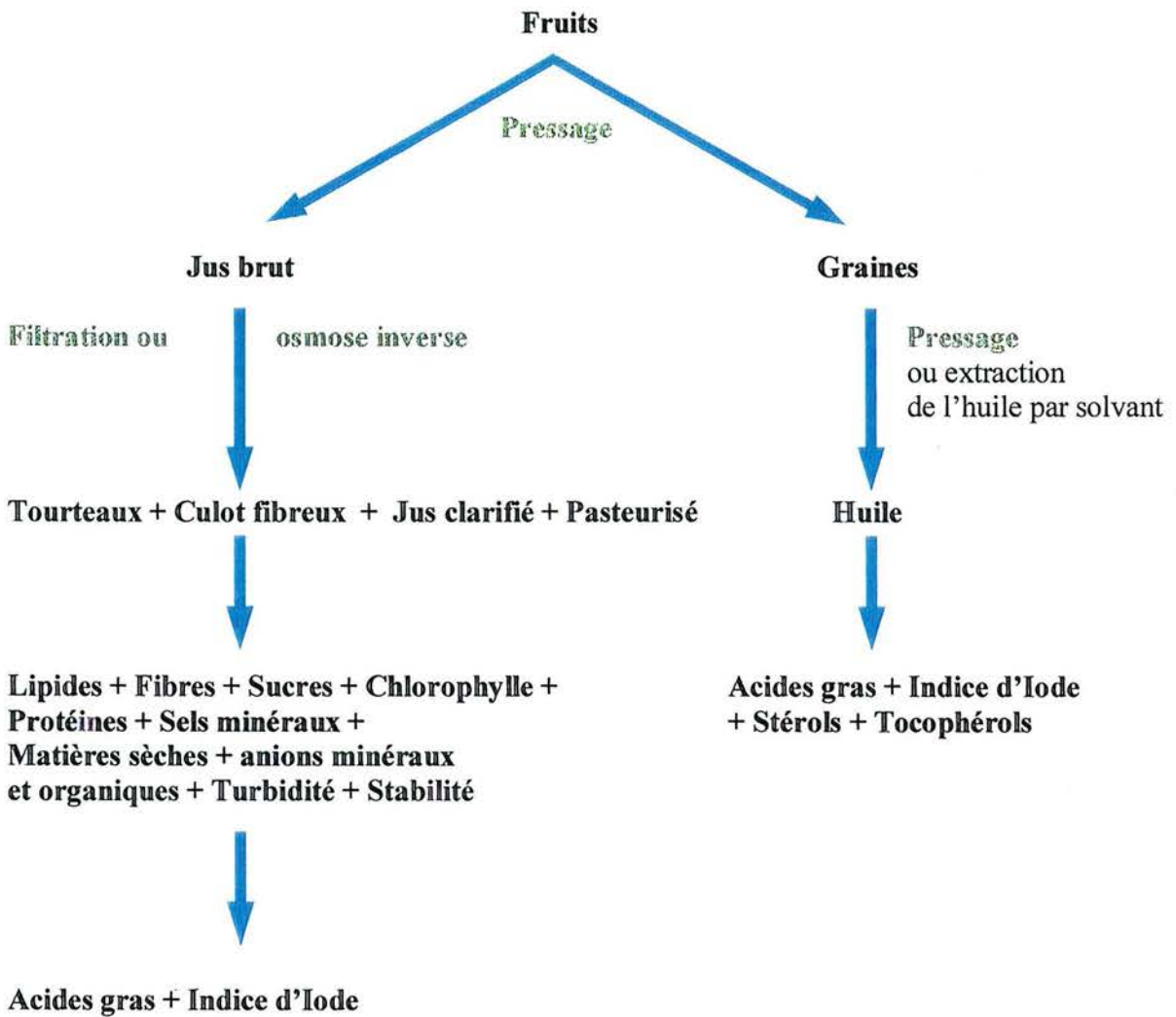


Figure 25 : Production du jus de *Morinda Citrifolia*

IV.2.2.2 Rendement d'extraction en jus obtenu par pressage hydraulique

L'extraction a été réalisée sur deux lots de fruits à l'aide d'une petite presse hydraulique, type presse à paquets, modèle Sakaya (importée de Thaïlande). Le pressage est réalisé par montée en pression maximum (clapet limiteur de pression), jusqu'à écoulement nul du jus. Le tourteau est rebêché puis remis sous pression maximale. L'opération est répétée consécutivement 3 fois.

- Un premier lot de fruits (3,81kg) est pressé. On en retire 2kg de jus trouble et 1,18 kg de tourteau, soit un rendement de 52,4% en jus.
- Un deuxième lot de fruits (5,18kg) pressés donne 2,63kg de jus et 2,05 kg de tourteau récupéré, soit un rendement de 50,8% en jus.

Le pH du jus est de 3,72.

IV.2.2.3 Clarification du jus par micro-filtration tangentielle

La technique de séparation par Micro Filtration Tangentielle (MFT) sur membranes minérales a été développée au Cirad pour des applications concernant la clarification et la concentration d'extraits de produits tropicaux : fruits, colorants, extraits à activité médicinale etc... (Dornier *et al.*, 1993, 1995 ; Decloux *et al.*, 1996 ; Olle *et al.*, 1997 ; Vaillant *et al.*, 1999, 2001 ; Lozano (1999) ; Vaillant *et al.*, 1999, 2001). Dans le cas du Noni, la MFT est utilisée dans un double but : produire un jus clarifié et un concentré de produits non solubles à partir de l'extrait de Noni obtenu par pressage du fruit entier. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à produire un jus de Noni clarifié et stabilisé dans cet état afin qu'aucun trouble ne puisse se former ultérieurement au cours du stockage du jus.

L'extrait de Noni obtenu par pressage hydraulique est préalablement préfiltré sur filtre en fibres synthétiques habillant un filtre conique métallique de type filtre chinois. Le jus préfiltré est microfiltré dans un pilote de microfiltration tangentielle sur membrane céramique industrielle P 19-60, de 0,2 μ m de diamètre de pore et de 0,3m² de surface totale filtrante.

17 kg de jus pré-filtré sont placés dans le bac d'alimentation du pilote et sont portés sur filtre en fibres synthétiques à la température de 60- 65°C, température à laquelle est conduite l'opération de MFT. A la pression transmembranaire d'opération fixée à $\Delta P = 1$ bar, on obtient un débit moyen de 75,5 L.h⁻¹.m⁻². La quantité de filtrat obtenu est de 9,5 kg. Le rendement en filtrat calculé est donc de $(9,5/17) \times 100 = 55,9\%$.

La figure 26 montre la quantité de filtrat (Kg/min) cumulée obtenue par micro-filtration tangentielle au cours du temps. Cette masse de filtrat croît linéairement avec le temps, indiquant que le colmatage n'évolue pas dans le temps dans les conditions opératoires appliquées pour la masse de jus préfiltré utilisée pour cet essai de faisabilité. Nous n'avons pas pu tester à partir de quelle quantité de jus microfiltré le débit du filtrat aurait pu être modifié notablement pour exiger un nettoyage de la membrane qui se serait colmatée par les produits retenus dans le rétentat (éventuellement appréciés par une augmentation du taux de matières sèches).

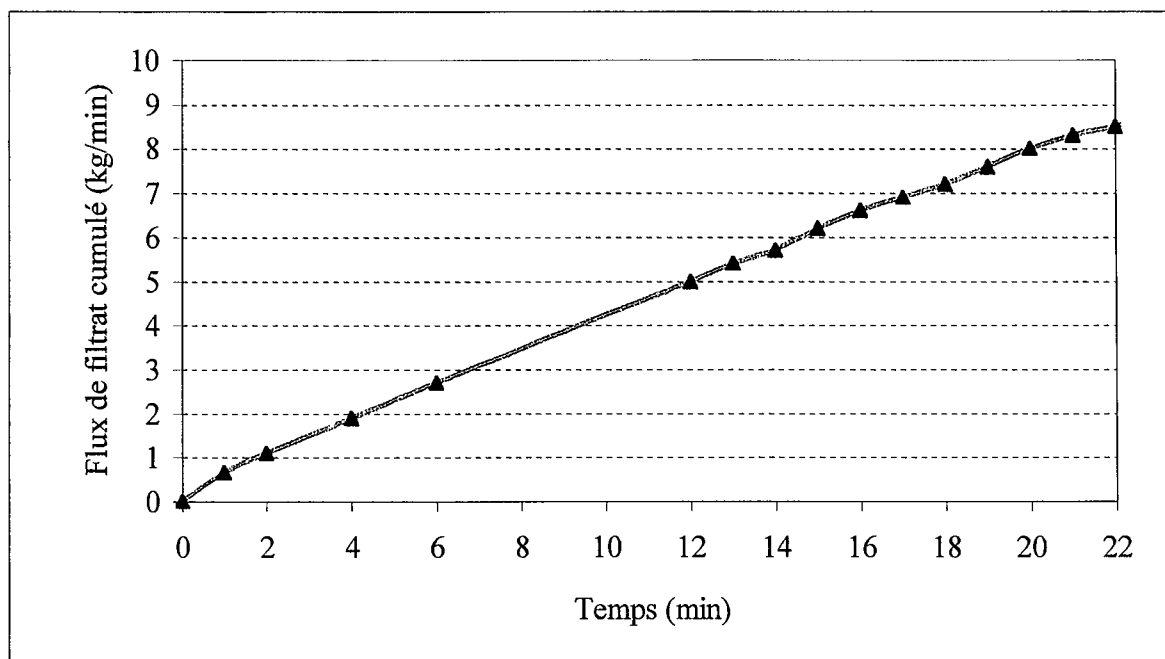


Figure 26 : Flux de filtrat cumulé obtenu par MFT d'un extrait de pressage de Noni au cours du temps ($\Delta P = 1$ bar, $T = 60-65^{\circ}\text{C}$, P19-60 pore= $0.2\mu\text{m}$, Surface filtrante= 0.3m^2)

IV.2.2.4 Concentration par osmose inverse du filtrat de MFT

8,3 kg de filtrat à 7 °brix issus de la MFT sont concentrés par osmose inverse à une température de 27°C , à une pression de $\Delta P = 40$ bar. On constate un débit moyen de $3,27 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ (Figure 27). 2,4 kg de jus concentré à 16 °brix sont obtenus.

Le degré Brix passe de 7°brix à 16°brix, ce qui suppose que les matières sèches solubles du jus sont concentrées $16 / 7 = 2,3$ fois.

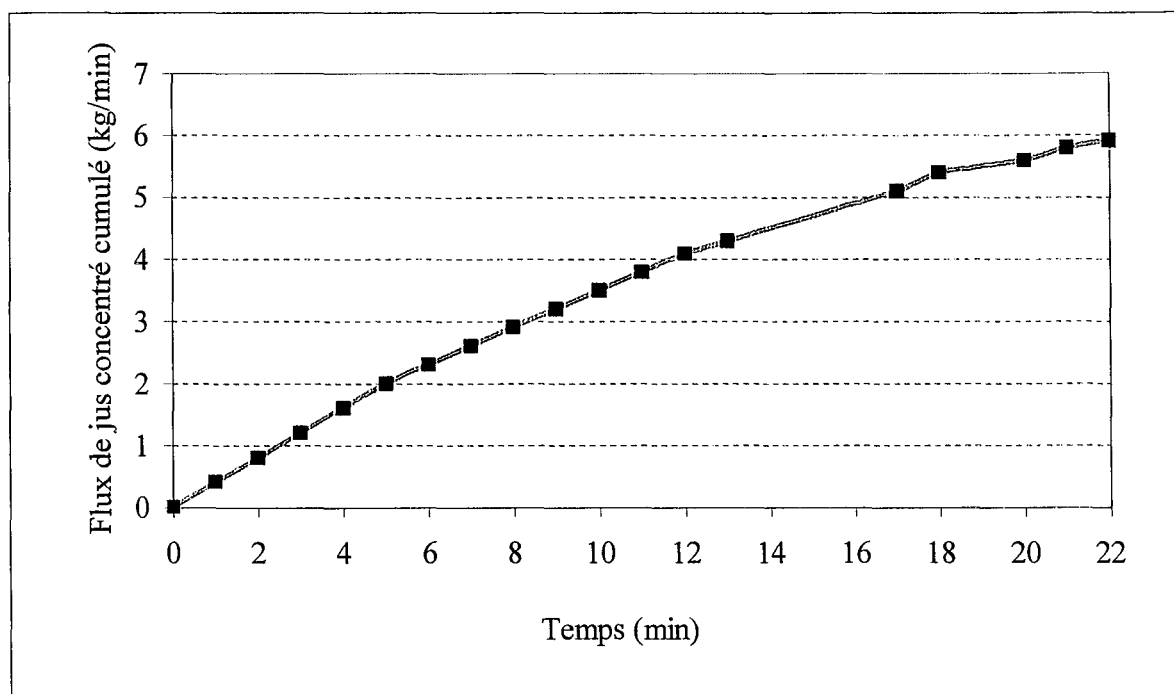


Figure 27 : Débit d'eau pure retirée du jus initial cumulé au cours du temps (débit $3,3 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, pression 40 bar et température $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

IV.2.2.5 Composition du jus de *Morinda Citrifolia*

IV.2.2.5.1 Composition en matières sèches du jus

Tous les co-produits obtenus avant et après clarification par MFT et concentration par OI ont été analysés. Le degré Brix du jus brut de Noni avant concentration par osmose inverse mesuré au réfractomètre est de $8 \text{ }^{\circ}\text{brix}$ et sa teneur en matière sèche de $9,75\% \pm 0,4$. Le degré Brix du filtrat par MFT est de 7 et la matière sèche totale obtenue par séchage sous vide en 24 h est de $7,4\% \pm 0,3$.

Le $^{\circ}\text{Bx}$ du jus concentré est environ 2,3 fois plus important que celui du filtrat obtenu par micro-filtration tangentielle (16 contre 7). On peut rapprocher ces chiffres à ceux de la matière sèche du filtrat qui est de $7,4\% \pm 0,3$ et du jus concentré qui est de $16,0\% \pm 0,1$ qui sont dans les mêmes proportions.

Ces valeurs sont nettement supérieures à celles obtenues sur le jus de Tahiti qui a un degré Brix de seulement 4,8 et une matière sèche totale de $5,1\% \pm 0,3$ (Tableau 29).

Jus de Noni	Jus	°Brix	Matière sèche (%)
Jus brut du Cambodge	Brut avant MFT	8,0	9,75 +/- 0,4
	Filtrat après MFT	7,0	7,4 +/- 0,3
	Rétentât	8,0	8,15 +/- 0,01
	Concentré par Osmose inverse	16,0	16,0 +/- 0,1
Jus de Tahiti	Tahiti commercial	4,8	5,1 +/- 0,3

Tableau 29 : Composition en matières sèches et degré Brix du jus de *Morinda Citrifolia* du Cambodge comparés au jus de Noni de Tahiti commercial

IV.2.2.5.2 Teneur en chlorophylle du jus de *M. citrifolia*

La couleur verte du jus de *M. Citrifolia* est due à la présence de chlorophylle. La mesure de la quantité de chlorophylle par une méthode densitométrique montre que le jus de *M. citrifolia* contient 0,29 mg/g de chlorophylle, ce qui est plus que la teneur en chlorophylle de l'huile d'olive de différentes espèces : *Picudo* (0,002 mg/g) et *Picual* (0,001 mg/g) (Minguez-Mosquera *et al.*, 1992).

IV.2.2.5.3 Teneur en huile du jus de *M. citrifolia*

L'extraction de l'huile du jus de *M. Citrifolia* a été réalisée par trois méthodes d'extraction différentes afin de les comparer :

- Extraction au Soxhlet à l'hexane après lyophilisation de l'échantillon,
- Extraction liquide-liquide hexane-jus,
- Extraction par la méthode de Folch en utilisant le mélange de solvant : méthanol/acide acétique/chloroforme/eau à température ambiante.

Les trois méthodes donnent la même teneur en l'huile de 1,5 % +/- 0,05 pour le jus brut de Noni obtenu par pressage par rapport à la matière sèche.

La comparaison peut être faite avec les jus d'agrumes. Le tableau 30 donne la composition centésimale de l'orange, de la mandarine du pamplemousse exprimée par rapport à la matière humide. Si on rapporte ces chiffres par rapport à la matière sèche, on obtient :

Pour le jus d'orange dont la matière sèche est de 11,7 %, la teneur en lipides est de $(0,2 / 11,7) \times 100 = 1,7$ %. Pour le jus de mandarine dont la matière sèche est de 11,1 %, la teneur en lipides est de $(0,2 : 11,1) \times 100 = 1,8$ %. Pour le jus de pamplemousse dont la matière sèche est de 9,8 %, la teneur en lipides est de $(0,1 : 9,8) \times 100 = 1,0$ %. Ces teneurs sont voisines de celles trouvées dans le jus brut de Noni (1,5%).

Variétés	Eau	Protéines	Lipides	Glucides		Cendres
				Solubles	Insolubles	
Orange						
fruit	86,4	0,7	0,2	12,0	0,5	0,7
jus	88,3	0,6	0,2	10,0	0,1	0,4
Mandarine						
fruit	87,0	0,8	0,2	11,6	0,5	0,4
jus	88,9	0,5	0,2	10,1	0,1	0,3
Pamplemousse						
fruit	88,9	0,5	0,1	10,1	0,2	0,4
jus	90,2	0,5	0,1	9,0		0,2

Tableau 30 : Composition centésimale d'extraits pulpeux de certains agrumes (g pour 100g) (Rakipov, 1987)

IV.2.2.5.4 Composition en glucides du jus de *M. citrifolia*

Deux lots de jus bruts de même origine du Cambodge ont été analysés (Tableau 31). Ils contiennent la même quantité de glucose (11,9 g/L) et de fructose (8,2 g/L). Le jus de Noni de Tahiti contient une quantité de glucose (8 g/L) et de fructose (10 g/L) équivalente. Ce qui différencie fortement les jus des deux origines est la teneur en saccharose qui est très faible dans les jus analysés par nos soins (<0,03 g/L) et 10 fois plus élevée chez le Noni de Tahiti (0,4g/L). Le jus de Tahiti contient en effet 0,41 g/L de saccharose, ce qui est plus que le jus de Cambodge concentré par osmose inverse (0,36 g/L).

L'osmose inverse permet de concentrer le jus en glucose (46,9 g/L), en fructose (33,0 g/L) et en saccharose (0,4 g/L) par un facteur voisin de 4.

La teneur en sucre total (glucose + fructose + saccharose) (18,8 g/L) du jus de Tahiti est équivalente à celles des deux lots de jus cambodgiens (20,1 g/L). La teneur en sucre total (glucose + fructose + saccharose) du jus concentré par OI atteint 80,3 g/L. Cette teneur est voisine de celle trouvée dans le jus commercial de pamplemousse (90 g/L), d'orange et de mandarine (100 g/L) (Tableau 31).

Jus	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Saccharose (g/L)	Sucres totaux (g/L)
Jus brut cambodgien	11,9 +/- 0,2	8,2 +/- 0,2	inférieur à 0,03	20,1 +/- 0,2
Concentré par osmose inverse	46,9 +/- 0,2	33,0 +/- 0,2	0,36 +/- 0,2	80,3 +/- 0,2
Tahiti	8,1 +/- 0,2	10,3 +/- 0,2	0,4 +/- 0,2	18,8 +/- 0,2

Tableau 31 : Composition en glucides du jus de *M. citrifolia* du Cambodge comparée à celle du jus de Noni de Tahiti (g/L).

IV.2.2.5.5 Composition en anions minéraux et acides organiques du jus de *M. citrifolia*

Les acides organiques sont largement répandus dans les plantes. Ils existent aussi bien à l'état libre que sous formes de sels, d'esters, de glucosides, etc. Tous sont ordinairement dissous dans le suc cellulaire. Leurs concentrations peuvent parfois être si fortes qu'ils se déposent sous forme de cristaux.

La teneur totale en anions du jus de Noni du Cambodge est de 8 g/L. Elle est un peu plus importante que celle du jus de Noni de Tahiti (5,5 g/L) et voisine de celle trouvée dans le jus d'ananas (4,5 à 18,75 g/L) (Tableau 32).

Le jus de Noni des deux origines contient peu d'acide citrique (0,03 g/L), cent fois inférieur à celui du jus d'ananas (3,0-13,5 g/L) (Rakipov, 1987).

La teneur en acide malique du jus d'ananas (1,5-5,2 g/L) est voisine de celles des jus de Noni (4 g/L). L'acide oxalique se trouve en beaucoup plus forte quantité dans les jus de Noni (0,7 g/L) que dans le jus d'ananas (0,05 g/L), ce qui pourrait provoquer des problèmes de santé liés à la complexation des sels et en particulier du calcium qui peut précipiter sous forme de d'oxalate de calcium.

Le jus de Noni du Cambodge concentré 2,3 fois par osmose inverse (16°brix) contient logiquement tous les anions minéraux et organiques en quantité environ deux fois plus importante que dans les jus bruts.

Jus	acétate (g/L)	chlorure (g/L)	malate (g/L)	sulfate (g/L)	oxalate (g/L)	phosphate (g/L)	citrate (g/L)	Total (g/L)
Lot 1	0,47	1,14	4,84	0,39	0,79	0,55	0,03	8,2
Lot 2	0,33	1,14	4,44	0,50	0,69	0,45	0,02	7,6
Concentré Par OI	0,66	2,60	11,37	1,12	1,37	1,13	0,04	18,3
Tahiti	0,25	0,89	3,84	0,15	0,14	0,19	0,02	5,5
Jus d'ananas			1,5-5,2		0,05		3,0-13,5	4,5-18,75

Tableau 32 : Composition en anions minéraux et organiques du jus de *M. citrifolia* comparée à celle du Noni de Tahiti et du jus d'ananas (Rakipov, 1987)

IV.2.2.5.6 Composition en minéraux du jus et des fibres résiduelles

La quantité de sélénium dans tous les jus est comprise entre 0,9 et 1,4 ppm (Tableau 33). Elle est très inférieure à celle du lait de la noix du Brésil délipidé 142 ppm (Chunhieng *et al.*, 2003), mais plus haute que celle d'autres produits alimentaires comme le soja américain 0,02-0,7 ppm (Wauchope, 1978) ou la pomme de terre 0,006 ppm (Rakipov, 1987). La teneur en sélénium du

jus de Tahiti (1,4 ppm) est identique à celle du filtrat obtenu par MFT (1,4 ppm). Les fibres contiennent la même teneur de sélénium (0,5 ppm) que les tourteaux (0,6 ppm).

Le sélénium, indispensable au fonctionnement de certaines enzymes comme l'érythrocyte glutathione peroxidase, protègerait l'organisme des effets néfastes des radicaux libres et les phénomènes de vieillissement liés aux rayons ultraviolets. Les apports en sélénium sont généralement insuffisants dans l'alimentation des Français (Danone, 2003).

Les femmes et les hommes ont besoin respectivement de 55 et 70 µg par jour de sélénium (Lactelo, 2003).

La teneur en soufre du jus de Noni concentré (0,26%), du filtrat (0,26%), du jus initial (0,30%) est voisine de celle du jus de Noni de Tahiti (0,18%), du culot fibreux (0,17%) et des tourteaux (0,15%). Celle du lait de la noix délipidée du Brésil est plus élevée (1,32%). La centrifugation conduit à une diminution de la teneur en soufre du jus, elle est seulement de 0,13%, après cette opération. Une attention particulière doit être donnée aux teneurs en soufre car elles peuvent être responsables d'odeurs (Wijesundera *et al.*, 1988).

Le soufre est un composant de nombreux éléments de l'organisme. Il se niche au sein des protéines où il exerce une fonction stabilisatrice. On le retrouve principalement dans les aliments riches en protéines (Voedings, 2003).

Les aliments végétaux naturels sont pauvres en sodium, en dehors de quelques espèces de légumes. Les fruits sont généralement tous très pauvres (Alais et Linden, 1994).

La teneur en sodium du jus centrifugé (0,28%) est voisine de teneur retrouvée dans le jus de Noni de Tahiti (0,28%). Le filtrat ne contient que 0,15 % de sodium, ce qui est inférieur au jus de Tahiti.

Le sodium gouverne, avec le potassium, tout l'équilibre hydrique de l'organisme. Il règle la répartition de l'eau corporelle, les mouvements d'eau dans l'organisme, les échanges entre l'eau intra-cellulaire (où se trouve le potassium) et l'eau extra-cellulaire et ainsi participe à l'utilisation de l'énergie et aux fonctions nerveuses (E-sante, 2003). Au cours d'un effort important, on perd de grandes quantités de sodium via la sueur. Un apport de liquide sous la forme de boissons riches en sodium est alors recommandé. Le même phénomène se produit en cas de diarrhée. Dans ce cas, du sodium et du glucose sont nécessaires pour permettre à l'intestin de réabsorber le liquide perdu. La plupart des aliments crus sont pauvres en sodium. Au cours de la production ou lors de la préparation des repas, on ajoute souvent du sel (NaCl) (Voedings, 2003).

La teneur en magnésium du jus de Noni de Tahiti (0,39%) est plus élevée que celles des autres jus, de culot fibreux et des tourteaux. Le filtrat n'en contient que 0,1%. La teneur en magnésium du jus initial (0,13%) est voisine du jus extrait de la graine de *L. breviflora* (0,24%) (Oderine, 1990). Le lait de la noix délipidée du Brésil a une teneur en magnésium plus forte que celle de tous les jus, des fibres et des tourteaux (1,34%).

Le magnésium est présent dans pratiquement tous les tissus, y compris le cerveau et dans la chlorophylle. Au niveau cellulaire, il joue un rôle dans le transport de l'énergie (Voedings, 2003). Notre consommation de magnésium est souvent inférieure aux recommandations.

En cas de forte carence en magnésium on a observé des crampes, des crises de tétanie, de la fatigue, des insomnies. Le magnésium aurait également un rôle dans la prévention des maladies cardio-vasculaires (Danone, 2003). Les femmes et hommes ont besoin de magnésium 330 et 420 mg respectivement par jour (Lactelo, 2003).

Les teneurs en calcium du jus centrifugé (0,26%) et du jus initial (0,29 %) sont similaires à celle de la graine de soja 0,25% (Rakipov, 1987), mais inférieures à la teneur en calcium du lait de noix de cajou 0,51% (Piva *et al*, 1971) et bien évidemment très inférieures aux teneurs trouvées dans les laits de vache (1,3%) (Alais et Linden, 1994).

La teneur en calcium des filtrat, rétentât, jus concentré et de Tahiti est de 0,09 ; 0,17 ; 0,14 et 0,16 % respectivement. Le culot fibreux et les tourteaux contiennent 0,66 et 0,36 % de calcium, ce qui est plus que les teneurs rencontrées dans les autres jus. Ces faibles teneurs sont en partie expliquées par la faible solubilité du calcium dans les jus de fruit. Le jus initial a la teneur la plus élevée en calcium avec 0,29%. La teneur en calcium de lait de la noix de Brésil est plus élevée (0,60%) que celle de tous les jus de Noni, mais elle est équivalente à celle des fibres (0,66%). La teneur en calcium de la graine de *Lagenria breviflora* du Nigeria (0,034 %) (Oderine,1990) est plus faible que la teneur du jus de Noni du Cambodge et de Tahiti.

Le calcium est surtout un constituant du squelette (1 kg de Ca) où il constitue environ 25% de l'os sec. La teneur du plasma sanguin est étroitement régulée à 100mg/L. Les végétaux contiennent peu de calcium. Les activités biologiques du calcium et du phosphore sont liés. Le rapport Ca / P doit être voisin de 1,7 (Alais et Linden, 1994). Le calcium pourrait jouer un rôle favorable sur la pression artérielle. Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques montrent que les forts consommateurs de calcium ont une pression artérielle inférieure à celle des faibles consommateurs.

Il a également été montré que chez des sujets hypertendus, une supplémentation en calcium abaisse la tension. La consommation des produits riches en calcium (ex. produit laitier) est fortement conseillée chez les sujets à risque : personnes âgées, diabétiques, etc. (Svplait, 2003).

Le calcium joue également un rôle métabolique essentiel dans la coagulation sanguine, la contraction musculaire, la synthèse d'hormones ou la transmission de l'influx nerveux (Voedings, 2003). Outre le calcium, les bienfaits du lait et des produits laitiers sur la tension artérielle seraient dus à tout un ensemble de nutriments, dont le potassium et le magnésium. Les femmes et hommes ont besoin 900 mg de calcium par jour (Lactelo, 2003).

La teneur en potassium du culot fibreux et tourteaux est de 2,3% et 1,15% respectivement. La teneur en potassium du jus de Tahiti (4,6%) est équivalente à celles du jus initial (4,01%), elle est voisine de celle du filtrat (3,04%). La teneur en potassium de lait de la noix délipidée du Brésil est plus faible que celle de tous les jus (2,1%), elle est voisine du culot fibreux, mais plus élevée que celle des tourteaux, cette teneur peut être comparée avec teneurs trouvées dans les laits de vache (1,6%) (Alais et Linden, 1994).

Le potassium est un minéral très répandu. Son destin, dans l'organisme, est étroitement lié à celui du sodium. Il se trouve essentiellement dans l'eau intracellulaire tandis que le sodium se trouve surtout dans l'eau extracellulaire. Le corps contient de 150 à 170 g de potassium dont la plus grande partie se trouve dans les muscles.

Il est aussi nécessaire à l'action d'une multitude d'enzymes, au bon fonctionnement neuromusculaire et cardiaque, à la sécrétion acide de l'estomac, pour la régulation de l'aldostérone, hormone surrénale qui intervient dans le métabolisme du sodium.

En cas de carence en potassium, on a observé des faiblesses musculaires, de la fatigue, du météorisme abdominal, des troubles cardiaques. Les besoins en potassium sont de l'ordre de 390 à 585 mg par jour. Une alimentation normale fournit chaque jour de 2 à 6 g par jour de potassium. Le surplus est éliminé dans les urines et dans la transpiration (E-sante, 2003). Les fruits et les légumes regorgent de potassium (Voedings, 2003). La teneur en potassium de la chair des l'ananas et des bananes est respectivement de 0,3 et 1,2-3,0% (Rakipov, 1987). La teneur en potassium des chou-fleur, soja et des haricots de Lima est respectivement de 0,3% (Aprifel, 2003) ; 1,6% (Rakipov, 1987) et 1,96 (Contreseing, 2003).

La teneur en phosphore de tous les jus, fibres et tourteaux (tableau 33) est très faible par rapport à la teneur en phosphore des graines de soja 0,58% (Rakipov, 1987). La quantité en phosphore des jus initial, jus concentré et du jus de Tahiti est de 0,25% ; 0,3 et 0,22% respectivement. La teneur en phosphore du jus centrifugé est identique à celle du jus concentré (0,3%).

La teneur en phosphore du filtrat 0,18% est plus faible que celle des autres jus. Ces teneurs sont inférieures aux teneurs trouvées dans le lait de vache 1% (Alais et Linden, 1994).

Le lait de la noix délipidé du Brésil a une teneur en phosphore de 2,39%, plus importante que celles des jus, fibres (0,11%) et tourteaux (0,12 %). La teneur en phosphore du filtrat est identique à celle du lait extrait de la chair de la noix de cajou 0,15% (Piva *et al*, 1971).

Le phosphore est un constituant fondamental de toute cellule vivante. 80% du phosphore du corps humain est présent sous la forme d'un sel de calcium dans le squelette et les dents, il intervient également dans l'utilisation et la mise en réserve de l'énergie, ainsi que dans l'activité enzymatique. (Svplait, 2003 ; Voedings, 2003).

Les hommes ont besoin de 800 mg de phosphore par jour (Lactelo, 2003).

Autres fractions	Jus	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (ppm)	S (%)	Se (ppm)	Ms (%)
	Jus brut obtenu par pressage manuel	3,64	0,25	4,01	0,29	0,14	2193	0,30	0,9	9,75
Tourteaux		3,24	0,12	1,15	0,36	0,15	0,07	0,15	0,6	31,38
	Jus centrifugé	0,90	0,32	4,27	0,27	0,21	2800	0,13	0,9	3,53
Culot fibreux de centrifugation		1,66	0,11	2,33	0,66	0,22	1656	0,17	0,5	18,74
	Filtrat après MFT	0,73	0,18	3,04	0,09	0,10	1500	0,26	1,4	7,4
	Rétentât après MFT	0,98	0,25	4,39	0,17	0,14	2386	0,27	1,3	8,15
	Jus concentré par OI	0,68	0,28	4,77	0,14	0,17	2580	0,26	1,1	15,96
Noni de Tahiti		0,77	0,22	4,68	0,17	0,39	2830	0,18	1,4	5,10
Lait de la noix délipidée de Brésil		9,47	2,39	2,12	0,62	1,34	377	1,32	142	15,68

Tableau 33 : Composition en minéraux des différentes fractions de jus de Noni par rapport au poids de matière sèche (OI = osmose inverse)

IV.2.2.5.7 Composition en acides aminés et teneur en protéines et du jus initial

Nous avons tout d'abord effectué l'analyse des acides aminés sur le jus de Noni brut lyophilisé afin de déterminer le facteur de conversion N/protéines exact et de recalculer ainsi la teneur exact en protéine des jus (Tableau 34).

L'analyse des acides aminés soufrés n'a pas été effectuée (cystéine et méthionine) car il aurait fallu effectuer une oxydation avant l'hydrolyse acide. En général, avec la seule méthode d'hydrolyse acide, on retrouve quand même des pics de cystéine et de méthionine. Dans notre cas, ces pics étaient très faibles, nous avons conclu qu'il y a très peu d'acides aminés soufrés dans nos échantillons de jus.

Détermination du facteur Azote/Protéines

La totalité des teneurs en acides aminés est 113,3 g /1000 g d'échantillon soit 11,33% du jus lyophilisé (Tableau 34). La composition centésimale en acides aminés du jus lyophilisé est recalculée à partir de cette teneur (11,33%). En prenant comme exemple de calcul la teneur en acide aspartique, on obtient :

- sa teneur est de 11,9g / 1000g ou 1,19% de jus lyophilisé,
- il représente donc : $(1,19 / 11,33) \times 100 = 10,5\%$ ou 10,5 g/ 100g du jus lyophilisé,
- sa masse moléculaire est de 133,10, celle de l'azote N est de 14, donc 133,10 g contiennent 14 g d'azote donc 10,5 g contient $(10,5 \times 14) / 132 = 1,104$ g d'azote.

Si on additionne les quantités d'azote contenu dans tous les acides aminés, on obtient pour l'azote total contenu dans les acides aminés du jus lyophilisé la somme de 14,18g. Le facteur en protéine/azote devient donc $100 / 14,18 = 7,05$.

Acides aminés du jus lyophilisé de Noni	Teneur en acides aminés (g/100g de jus lyophilisé)	Composition centésimale en acides aminés recalculée	Poids moléculaire (g/mole)	Azote/PM (g/g acide aminé)	Azote (g/100g) de jus lyophilisé de Noni
Acide aspartique	1,19	10,5	133,10	0,105	1,104
Acide glutamique	1,02	9,00	147,10	0,095	0,856
Sérine	0,59	5,2	105,09	0,133	0,693
Glycine	0,56	4,95	75,07	0,186	0,921
Histidine	0,68	6,00	155,16	0,270	1,624
Arginine	0,78	6,88	174,20	0,321	2,213
Thréonine	0,69	6,09	119,12	0,117	0,716
Alanine	0,63	5,56	89,09	0,157	0,874
Proline	0,63	5,56	115,13	0,122	0,676
Tyrosine	0,79	6,97	181,19	0,077	0,538
Valine	0,65	5,74	117,15	0,119	0,685
Isoleucine	1,23	10,86	131,18	0,107	1,158
Leucine	0,74	6,53	131,18	0,107	0,697
Phénylalanine	0,55	4,85	165,19	0,085	0,411
Lysine	0,6	5,3	146,19	0,191	1,014
Total	11,33	100,00			14,18

Tableau 34 : Calcul du facteur de conversion azote/protéine pour les protéines de jus lyophilisé

La teneur en protéine (Tableau 35) est obtenue par le calcul en multipliant la teneur en azote totale par le facteur de conversion international 6,25 (Hulse *et al.*, 1977 ; Rakipov, 1987) et la teneur en protéine réelle est recalculée en multipliant la teneur en azote par le facteur 7,05. En tenant compte de ce nouveau facteur, le jus initial avant micro-filtration contient plus de

protéines que les autres jus avec 25,7%. La filtration par MFT réduit fortement la teneur en protéine du jus qui ne contient alors que 5,1% de protéine. Le jus de Tahiti contient une quantité équivalente de protéine avec 5,4%. Le culot fibreux contient moins de protéine (11,7%) que le jus brut. Par contre la teneur en protéine des tourteaux est équivalente de celle du jus brut avec 22,8%. Si on calcule ces teneurs sur base humide, la teneur en protéine du jus de Noni brut (Tableau 35) est de 2,5%. Cette valeur est plus élevée que celle des jus agrumes comme l'oranger (0,6%), le mandarinier (0,5%) et le pamplemoussier (0,5%) (Rakipov, 1987).

Autres fractions	Jus	N (%)	Protéines Facteur 6,25 (%)	Protéines Recalculées Facteur 7,05 (%)
	Jus brut	3,64	22,7	25,7
Tourteaux		3,24	20,25	22,8
	Jus centrifugé	0,90	5,6	6,3
Culot fibreux de centrifugation		1,66	10,4	11,7
	Filtrat après MFT	0,73	4,6	5,1
	Rétentât après MFT	0,98	6,1	6,9
	Jus concentré par OI	0,68	4,25	4,8
Noni de Tahiti		0,77	4,8	5,4
Lait de la noix délipidée du Brésil		9,47	59,2	66,8

Tableau 35 : Teneur en azote et protéines des jus traités (% sur matière sèche).

IV.2.2.5.8 Composition en acides gras de l'huile du jus brut

Le jus brut initial contient 1,5 % de lipides totaux. La composition en acides gras de l'huile du jus de *Morinda Citrifolia* est donnée dans le tableau 36.

La comparaison de la composition trouvée lors de nos analyses avec les compositions d'autres huiles alimentaires montre les éléments suivants :

- l'huile du jus de *Morinda citrifolia* a une composition globale en acides gras voisine de celles de l'huile de maïs et de l'huile d'olive.
- l'acide oléique C18:1 (n-9) se trouve en beaucoup plus grande quantité (18,85%) dans nos échantillons que dans l'huile des fruits murs de *Morinda citrifolia* (0,06%) analysée par Farine *et al.* (1996), ce qui est étonnant et certainement dû à une variation variétale.

L'acide linoléique C18:2 (n-6) se trouve en quantité plus élevée (31,11%) que dans l'huile de tournesol (8,9%) et en quantité moindre que dans l'huile de maïs (53%). Il y a peu d'acide linoléique C18 :3 (0,3%) dans l'huile de jus de *Morinda citrifolia*.

Cette composition en acides gras et en particulier sa richesse en acide linoléique (C18:2) confère à cette huile une indéniable qualité diététique qui donnera au fruit un argument supplémentaire. La totalité des acides gras insaturés et poly-insaturés de l'huile de *Morinda citrifolia* du Cambodge est de 52,2%. Ce qui est cependant moins que dans l'huile de tournesol (95,6%), d'olive (83,4%) ou de maïs (85,50%). L'instabilité à l'oxydation devra toutefois être surveillée lors de la conservation du jus de fruit en bouteille. Les vitesses d'oxydation étant proportionnelles au nombre de doubles liaisons. A titre indicatif, elles sont pour la série des acides gras en C18 approximativement 1:10:100:200 pour C18:0, C18:1, C18:2 et C18:3 respectivement (O'Keef *et al.*, 1993).

Une des particularités de cette huile est qu'elle contient une proportion importante d'acide caprylique C8:0 (22,8%) et d'acide hexanoïque C6:0 (6,4%). Ces acides gras à courtes chaînes peuvent expliquer l'odeur indésirable du jus de *Morinda citrifolia*.

Afin de réduire ces odeurs indésirables, certains auteurs proposent en particulier pour l'huile de poisson de traiter l'huile à la lipoxygénase pour produire des composés plus volatils par hydrolyse des hydroperoxydes (Hu *et al.*, 2000).

Acides gras	Huile du jus de <i>Morinda citrifolia</i>	Fruits murs de <i>Morinda citrifolia</i>	Huile de tournesol	Huile d'olive	Huile de maïs
C4:0	nd	0,71	nd	nd	nd
C6:0	6,40	19,24	nd	nd	nd
C8:0	22,88	58	nd	nd	nd
C10:0	0,80	1,54	nd	nd	nd
C12:0	1,83	0,16	0	nd	nd
C14:0	0,18	0,14	0,05	nd	0,0
C16:0	11,29	0,49	4,13	13,8	11,7
C16:1	1,19	nd	0,16	1,4	0,1
C18:0	4,33	nd	0	2,8	2,2
C18:1 (n-9)	18,85	0,06	86,49	72	31,6
C18:1 (n-7)	0,67		nd		
C18:2	31,11	0,05	8,92	9,0	53,0
C18:3	0,34		0,04	1,0	0,8
C20:0	0,33		0,21	nd	0,4
Total	100	80,39	100	100	100
Insaturés (%)	52,2		95,6	83,4	85,5

Tableau 36 : Composition centésimale en acides gras de l'huile du jus de *M. citrifolia* comparée avec celle obtenue par Farine *et al.* (1996) et celle de l'huile de tournesol (Pérez-Galvez *et al.*, 2000), d'olive (Kamal-Eldin et Andersson, 1997) et de maïs (Gordon et Miller, 1997)

Détermination de l'indice d'iode de l'huile extraite du jus de Noni

L'indice d'iode de l'huile extraite du jus de Noni du Cambodge, calculé à partir de la composition en acides gras insaturés, est de 72,3.

Cet indice d'iode est assez faible et se situe entre celui de l'huile de palme (56,9) (Itoh *et al.*, 1974) et celui de l'huile de tournesol (90,0) (Pérez-Galvez *et al.*, 2000), de l'huile d'olive (81,3) (Kamal-Eldin et Andersson, 1997) et est très inférieur à celui des huiles insaturées comme l'huile d'amande (100,3) (Itoh *et al.*, 1974) ou l'huile de maïs (120,49) (Gordon et Miller, 1997). Ceci est dû en fait à la forte proportion d'acides gras courts et saturés inférieur ou égal à C12 (32%) contenus dans l'huile malgré une bonne proportion d'acide linoléique (31,1%).

L'indice d'iode de la plupart des graisses animales varie entre 30 et 70 alors que celui de la plupart des graisses végétales entre 120 et 160. Plus l'indice d'iode est élevé, plus les corps gras ont une plage de fusion basse et plus ils s'oxydent vite.

La valeur de l'indice d'iode permet de classer les huiles végétales en siccatives dont l'indice d'iode est supérieur à 130 (huile de lin) ; non siccatives dont l'indice d'iode est inférieur à 85 (huile de ricin, d'arachide), et demi-siccatives dont l'indice d'iode est intermédiaire (huile de cameline, de colza). Les huiles siccatives et demi-siccatives sont utilisées pour la fabrication des vernis, des peintures ainsi que des toiles cirées et du linoléum. Les huiles demi-siccatives et certaines huiles non siccatives sont employées dans l'industrie alimentaire (Rakipov, 1987).

IV.2.2.6 Tableau récapitulatif de la composition du jus de *M.Citrifolia*

Les différents résultats obtenus lors des chapitres précédents nous ont permis de produire le tableau 37 récapitulatif de la composition du jus de *M.Citrifolia*.

Composants	% massique sur jus	% massique sur sec
Eau	90,25	0
Protéines	2,5	25,6 +/- 0,3
Lipides	0,15	1,5 +/- 0,5
Matières minérales	0,86	8,8 +/- 0,3
Fibres	3,38	34,7 +/- 0,1
Sucres totaux	2,01	20,6 +/- 0,2
Anions minéraux et organiques	0,82	8,4 +/- 0,1
Chlorophylle	0,03	0,30 +/- 0,004
Total	≅ 100	≅ 100

Tableau 37 : Tableau récapitulatif de la composition du jus de *M.Citrifolia*.

IV.2.2.7 Etude de la stabilité physique du jus de *Morinda Citrifolia*

Le jus de *Morinda citrifolia* devra être stabilisé physiquement et microbiologiquement pour être commercialisé en bouteille. Nous avons donc étudié la stabilité de la couleur du jus, la décantation du jus au cours du temps pour différents couples temps/température de pasteurisation. Nous avons estimé que le pH initial du jus ne nécessitait pas une stérilisation totale des jus.

IV.2.2.7.1 Stabilité de la couleur lors d'une pasteurisation à 70°C / 10 min

L'intensité de la couleur du jus non pasteurisé est toujours plus faible que celle du jus pasteurisé (Tableau 38 et photo 3). Le jus étant jaune, il est normal que l'intensité de la couleur jaune des différents jus traités ou non soit plus intense que les autres couleurs. L'effet de la concentration est notable sur l'intensité de la couleur jaune puisque l'on passe de 7,9 pour le jus brut à 29,9 pour le jus concentré. Le jus de Tahiti a une prédominance dans le rouge bien plus forte (20,0) que celle du concentré (4,8). Ce changement peut être expliqué par l'effet de la température sur la couleur du jus et la durée prolongée du stockage du jus de Tahiti (photo 4).

Afin de situer le jus de Noni en terme de l'effet de l'oxydation sur la couleur jaune, nous avons comparé sa couleur à deux huiles végétales, l'huile de *Calendula officinalis* très insaturée et donc très oxydable et l'huile de soja (photo 4) plus stable vis à vis de l'oxydation. L'huile de *Calendula officinalis* (Janssens, 2000) est plus colorée (70 jaune, 23 rouge et 14 bleu) que celle du Noni brut (7,9 jaune, 0 rouge et 1,9 bleu). La couleur de l'huile de soja est la plus claire de tous les produits (3 jaune, 0 rouge et 0 bleu) (Tompkins et Perkins, 2000).

Jus	Rouge	Jaune	Bleu	Blanc
Brut non pasteurisé	0	7,9	1,9	0
Filtrat non pasteurisé	1	4,9	0	0
Filtrat pasteurisé	0	10	0,9	0
Concentré pasteurisé	4,8	29,9	0	0
Tahiti	20	19,9	10	0
Huile de <i>Calendula officinalis</i>	23	70	14	0
Huile de soja	0	3	0	0

Tableau 38 : Changements de couleur du jus de *M. Citrifolia* mesurés par Lovibond lors de la pasteurisation à 70°C/10 min comparée avec la couleur de l'huile de *Calendula officinalis* (Janssens *et al.*, 2000) et de soja (Tompkins et Perkins, 2000).

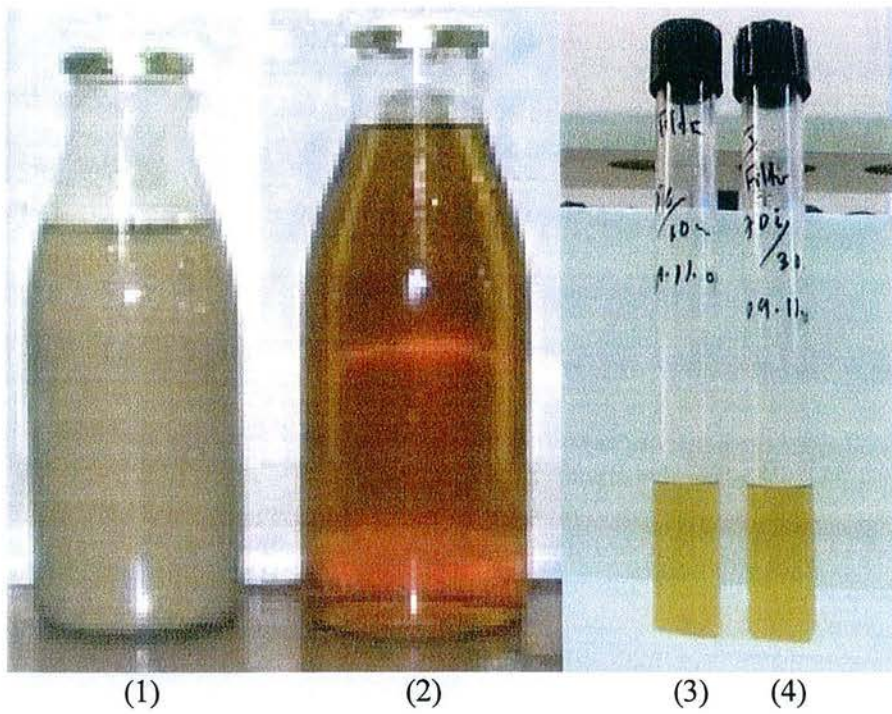


Photo 3 : (1) Jus brut non pasteurisé ; (2) Filtrat non pasteurisé ; (3) Filtrat pasteurisé à 70°C /10 min et (4) Filtrat pasteurisé à 70°C / 30 min



Photo 4 : (1) Jus de Noni de Tahiti pasteurisé ; (2) Huile de soja

IV.2.2.7.2 Stabilité de la couleur des jus en fonction de la température de conservation

La stabilité de la couleur des jus pasteurisés a été étudiée au cours du temps de conservation à 30°C, température voisine de la température ambiante en pays tropical et à 23 °C pendant plusieurs jours. La maîtrise de la stabilité et de la couleur est très importante pour la fabrication du jus de Noni.

L'intensité de la couleur du jus de Noni pasteurisé à 70 °C pendant 10 min et 30 min, déterminé au colorimètre Lovibond, change au cours du temps principalement durant la première semaine pour rester stable ensuite (Tableau 39). Les intensités du rouge et du jaune passent de 2,0 et 14,7 respectivement à 4,1 et 34,1 après une semaine. A partir de la deuxième semaine et jusqu'à la quatrième semaine, les intensités des deux couleurs restent stables à 4,1 et 34,1 respectivement.

La couleur du jus frais centrifugé non pasteurisé est jaune clair. La couleur déterminée par le colorimètre Lovibond donne : Rouge: 0,0 Jaune : 2,1 ; Bleu : 0,1 ; Blanc : 0,0. L'intensité de cette couleur reste constante à la température de 4 °C.

Le changement de l'intensité de la couleur peut être expliquée par l'oxydation des pigments du jus à la température de conservation de 30 °C.

Mesure hebdomadaire de la couleur			
Pasteurisation à 70°C	1^{ère} semaine	2^{ème} semaine	4^{ème} semaine
10 min	Rouge: 2,0 Jaune: 14,7 Bleu: 0 Blanc: 0	Rouge: 4,1 Jaune: 34,1 Bleu: 0 Blanc: 0	Rouge: 4,1 Jaune: 34,1 Bleu: 0 Blanc: 0
30 min	Rouge: 2,0 Jaune: 14,7 Bleu: 0 Blanc: 0	Rouge: 4,1 Jaune: 34,1 Bleu: 0 Blanc: 0	Rouge: 4,1 Jaune: 34,1 Bleu: 0 Blanc: 0

Tableau 39 : Changement de la couleur des échantillons incubés à 30°C au cours du temps

Outre le changement de couleur, il a été observé une apparition de précipité au cours du temps. L'étude de l'apparition du précipité a été étudiée en liaison avec l'évolution de la couleur du jus de Noni centrifugé et non centrifugé laissé à température ambiante (23°C) pendant 3 mois. Cette étude a été réalisée dans des tubes à essais de 17,5 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre et de volume de 40 mL (Tableau 40).

Lorsque le jus est non centrifugé, un précipité important apparaît (4,5 cm). Ce précipité est seulement et logiquement plus faible (<1 cm) lorsque le jus est préalablement centrifugé. La pasteurisation favorise la solubilisation des particules en suspension quelque soit la température utilisée.

La couleur du jus non centrifugé et non pasteurisé ou pasteurisé à 70 °C pendant 5 min est encore verte alors que le jus non centrifugé pasteurisé à 70 °C durant différents temps devient vert opaque. Ceci peut provenir de la répartition des particules dans le jus à la température lors de longues durées de pasteurisation.

Le jus centrifugé pasteurisé à 70°C et le jus centrifugé non pasteurisé conservés aux températures de 23°C et 30°C pendant 3 mois ont la même couleur de thé clair et contiennent très peu de précipité.

L'étude de la stabilité du jus et de la couleur du jus de Noni filtré laissés à température ambiante (23°C) pendant 3 mois dans des tubes à essais a été effectuée selon la même procédure que celle du jus centrifugé. La couleur est la même que celle des jus centrifugés mais un peu plus de précipité est obtenu.

		Temps de pasteurisation à 70°C (min)											
Nature du jus	Non pasteurisé	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Jus frais non centrifugé	4,5 cm de précipité Vert.	1,8cm précipitation Vert	1,8cm de précipité Vert Opaque										
Jus frais centrifugé	précipité faible Vert clair.	Précipité très peu Thé clair	Très peu de Précipité Thé clair										

Tableau 40 : Stabilité du jus non pasteurisé et du jus pasteurisé à 70°C et de sa couleur pendant 3 mois à différentes températures de conservation (23 °C et 30°C)

IV.2.2.7.3 Etude la turbidité des jus

Un des objectifs est de mettre sur le marché un jus clair sans précipité. Pour atteindre cet objectif, le jus de Noni a été micro-filtré sur 0,2 µm par micro-filtration tangentielle puis sa stabilité physique a été étudiée au cours du temps à différentes températures de conservation.

IV.2.2.7.3.1 Turbidité des jus avant et après pasteurisation à 70°C/10 min

La turbidité des jus initiaux qu'ils soient pasteurisés ou non est très importante (>2000). Les traitements technologiques comme la filtration, la concentration ou la micro-filtration permettent d'abaisser cette turbidité. Le produit micro-filtré est le plus clair que ce soit avant (3 NTU) ou après pasteurisation (17 NTU). Le jus centrifugé reste aussi clair (15 NTU) mais sa turbidité augmente brutalement après pasteurisation à 447 NTU. Ceci est certainement due aux particules en suspension qui s'agitent et ainsi augmentent la turbidité. Curieusement, la turbidité du jus concentré pasteurisé (135 NTU) est plus faible que celle du jus initial (Tableau 41).

Jus	Turbidité du jus non pasteurisé (NTU)	Turbidité du jus pasteurisé (NTU)
Initial	970	>2000
Filtrat (microfiltré sur 0,2 µm)	3	17
Concentré	nd	135
Centrifugé (6000g / 15 min)	15	447
Filtré sur filtres plissés Macherey-Nagel 713 1/4	438	537

Tableau 41 : Turbidité des jus avant et après pasteurisation à 70°C/10 min. nd : non déterminé.

IV.2.2.7.3.2 Effet du temps de pasteurisation (5 à 60 min à 70°C) sur la turbidité des jus de Noni filtrés et centrifugés

La centrifugation est plus efficace pour enlever les particules en suspension que la filtration. La turbidité du jus centrifugé est beaucoup plus faible (17 NTU) que celle du jus filtré (438 NTU) (Figure 28).

La turbidité du jus filtré augmente avec le temps de pasteurisation de 0 à 35 min et passe de 438 à 548 NTU. Ceci peut être dû à la coagulation à 70°C des micro-particules qui subsistent dans le jus. Ces particules ne précipitent pas complètement et augmentent la turbidité du jus. Le changement de la couleur du jus filtré observé lors de la pasteurisation peut être dû à l'augmentation de la turbidité. De 40 à 60 min de pasteurisation, la turbidité reste stable de 548-554 NTU.

Dès que l'on pasteurise le jus centrifugé, la turbidité du jus augmente du 15 à plus de 400 NTU puis conserve cette valeur jusqu'à un temps de pasteurisation de 35 min.

La valeur à 35 min est inférieure à celle obtenue pour le jus filtré. La couleur du jus passe du vert clair à thé clair. L'augmentation de la turbidité du jus centrifugé pasteurisé n'est pas proportionnelle au temps de pasteurisation. Cela peut être dû à d'autres facteurs comme la coagulation et la précipitation des particules ou la distribution de la température et l'homogénéisation de l'échantillon qui reste sans agitation durant le processus de pasteurisation.

De 40 à 60 min, la turbidité diminue et reste constante à 68-69 NTU. Il y a sûrement précipitation de micro-particules dans le jus centrifugé à partir de 40 min de pasteurisation (Figure 28).

La centrifugation est donc la méthode la plus efficace pour enlever les particules dans le jus. Les mesures de couleur et de turbidité l'ont montré.

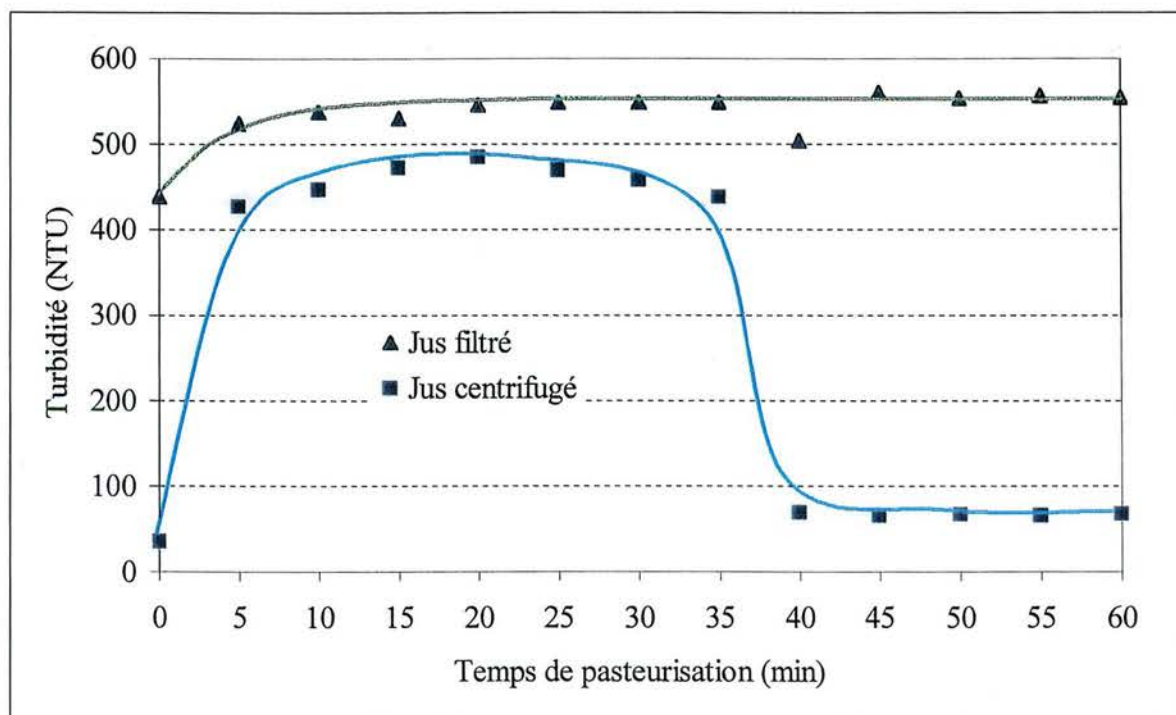


Figure 28 : Mesure de la turbidité du jus de Noni filtré ou centrifugé, pasteurisé de 5 à 60 min à 70°C

IV.2.2.7.4 Mesure du spectre UV-Visible du jus de Noni

Nous n'avons pas cherché à connaître les molécules responsables de la couleur du jus de Noni. La couleur verte du jus permet de penser qu'il est riche en chlorophylle.

La chlorophylle *a* absorbe à deux longueurs d'onde 430 nm et 663 nm (Scifun.chem.wisc, 2001). La chlorophylle *b* absorbe également à deux longueurs d'onde 453 nm et 645 nm (Whfreeman, 2001).

L'intense couleur verte des chlorophylles est due à sa forte absorbance dans le rouge (600-700 nm) et le bleu (400-500 nm) (Steer, 2001 ; Whfreeman, 2001).

A part les chlorophylles, le jus de Noni contient d'autres substances comme les protéines, les glucides, les anions organiques et minéraux, les lipides (stérols, tocophérols) et des anthraquinones comme la 7-hydroxy-8-méthoxy-2-méthyl anthraquinone ($C_{16}H_{12}O_4$) qui absorbe dans l'UV à 410 nm (Rusia et Srivastava, 1989), la 5,6-Dihydroxylucine ($C_{15}H_{10}O_7$) qui absorbe dans l'UV à 446 nm (Inoue *et al.*, 1980) etc.

La mesure du spectre UV du jus de Noni filtré pasteurisé ou non sur papier pasteurisé fait apparaître deux pics d'absorption, l'un vers 210-230 nm de DO maximale supérieure à 4 et un autre à 350 nm avec une DO maximale de 0,79 (Figure 29). Les pasteurisations de 10 ou 30 min ne modifient pas le spectre d'absorption.

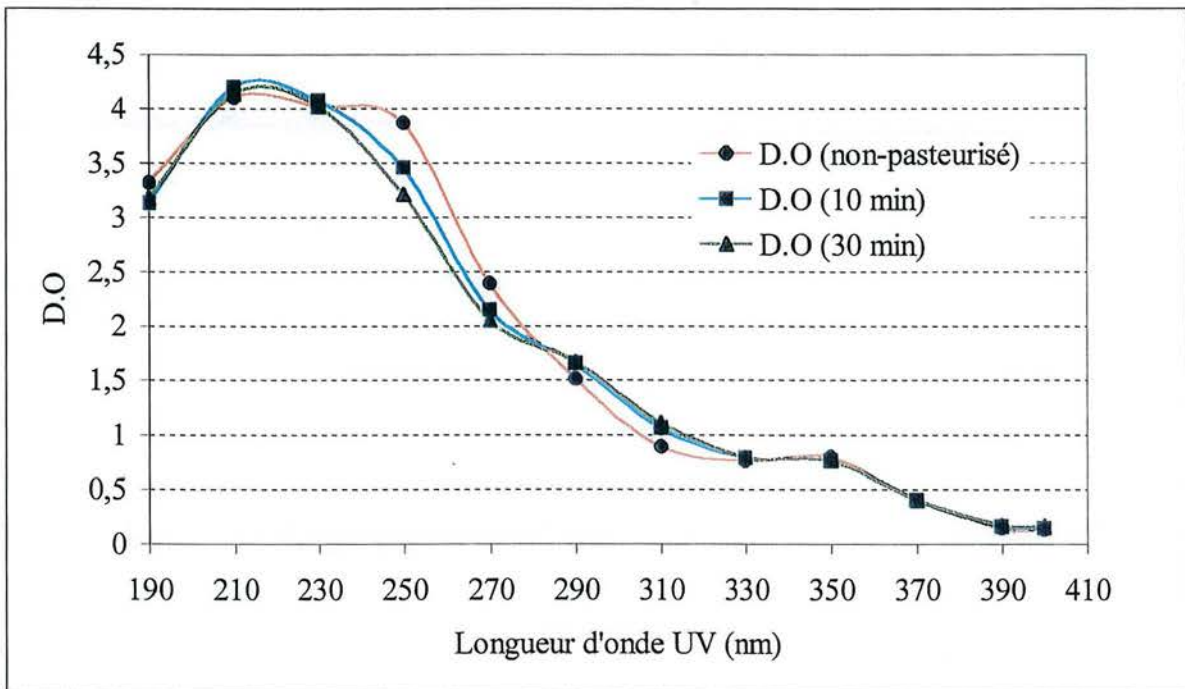


Figure 29 : Mesure de la longueur d'onde optimale en UV du jus de Noni filtré non pasteurisé ou pasteurisé 10 min ou 30 min à 70°C.

La mesure du spectre d'absorption dans le visible du jus de Noni filtré sur papier pasteurisé 10 ou 30 min ou non pasteurisé fait apparaître deux pics d'absorption. L'un absorbe essentiellement dans la zone proche de l'UV (440nm) de DO maximale 0,5 et un autre à 620 nm avec une DO maximale de 0,2 (Figure 30). Les trois jus absorbent de la même manière et la pasteurisation n'a donc pas d'effet sur les longueurs d'onde d'absorption.

On retrouve la bande d'absorption à 440 nm de la chlorophylle *a* mais pas la bande à 663 nm qui est remplacée par une absorption à 620 nm.

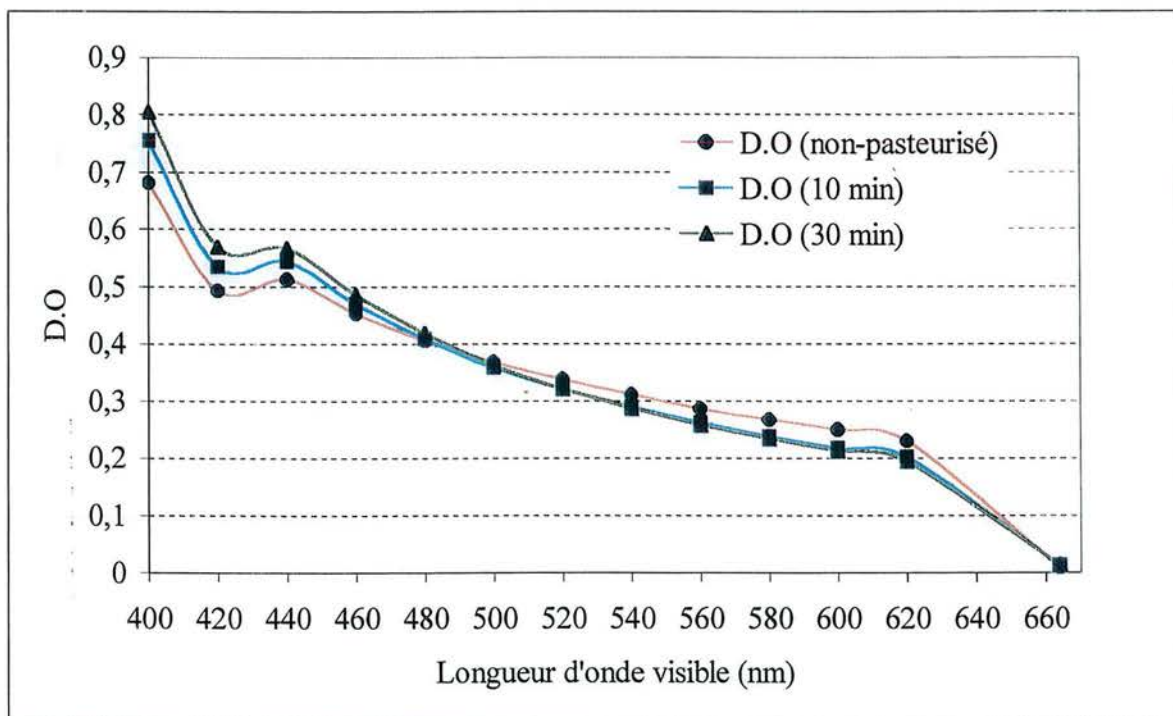


Figure 30 : Spectre d'absorption dans le visible du jus de Noni filtré pasteurisation ou non 10 min ou 30 min à 70°C.

IV.2.2.8 Etude la stabilité microbiologique des jus après pasteurisation

Les jus ont été pasteurisés dans des tubes à essais de 17,5 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre de 40 mL de volume utile fermés hermétiquement. Deux temps de pasteurisation 10 min et 30 min ont été testés. Les flores totales, les moisissures et les levures ont été analysées sur des tubes fermés et ouverts 15 min avant analyse afin de simuler l'ouverture chez le consommateur.

IV.2.2.8.1 Etude la stabilité microbiologique des échantillons bouchés pasteurisés

Trois tubes contenant 40 mL de jus sont pasteurisés à 70°C/10 min et 3 autres tubes sont pasteurisés à 70°C/ 30 min au bain marie. Les tubes sont ensuite laissés dans une étuve à 30°C. La flore totale est estimée sur milieu PCA après 48h d'incubation (Tableau 42).

Tous les 7 jours puis après 14 jours et 30 jours, la flore totale est quantifiée à partir des tubes pasteurisés à 70°C/10 min et 70°C/30 min.

Pour les conditions de pasteurisation de 70°C/10min, la flore totale obtenue après la première semaine est de 10 CFU/mL et de 20 CFU/mL la quatrième semaine. Le nombre de microorganismes reste donc stable au cours du temps à un niveau faible et acceptable.

A 70°C/30min, 15 CFU/mL se trouvent dans l'échantillon initial pasteurisé. Ces colonies ne sont plus retrouvées ensuite dans les échantillons analysés les deuxième et quatrième semaines. L'acidité du jus (pH = 3,7) est certainement responsable de la destruction des flores présentes.

La pasteurisation à 70°C/30 min est logiquement une méthode plus efficace que la pasteurisation à 70°C/10 min (Tableau 42). La faible quantité de flore totale trouvée après 30 jours de conservation (20 CFU/mL) ne devraient pas nuire à la qualité du jus embouteillé.

Durée de pasteurisation à 70°C	Flore totale hebdomadaire (CFU/mL)		
	1 ^{ère} Tube 1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} Tube 2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} Tube 4 ^{ème} semaine
10 min	10	0	20
30 min	15	0	0

Tableau 42 : Flore totale, moisissures et levures trouvées dans les jus bouchés conservés à 30 °C. Le pH des jus a toujours été mesuré à 3,7.

IV.2.2.8.2 Etude la stabilité microbiologique sur des échantillons ouverts ¼ heure avant analyse

Quatre tubes contenant 40 mL de jus sont pasteurisés à 70°C/10 min et 4 autres tubes sont pasteurisés à 70°C/ 30 min au bain marie. Les tubes sont ensuite laissés à l'étuve à 30°C. Ces tubes sont ouverts à l'air libre préalablement 15 min avant l'analyse de la flore totale. La flore totale est estimée sur milieu PCA après 48h d'incubation.

Tous les semaines pendant 1 mois, la flore totale est déterminée à partir des tubes pasteurisés à 70°C/10 min et 70°C/30 min.

Le pH du jus reste stable à 3,7 au cours du temps de conservation quelque soit les échantillons. Cela signifie qu'aucune fermentation n'a été observée dans les jus.

Le nombre des colonies après pasteurisation diminue logiquement avec le temps d'incubation (Tableau 43). A la température de 70°C/10 min, 350 CFU/mL sont trouvées. Le nombre de colonies diminue à 110 CFU/mL après quatre semaine de conservation. Le jus a donc un effet destructeur sur les flores vivantes que l'on pourrait attribuer en pH bas.

Il en est de même après pasteurisation à 70°C/30 min. Le nombre de colonies après la première semaine est de 460 CFU/mL et diminue à 60 CFU/mL à la quatrième semaine de conservation. Il y a certainement un effet du pH sur la destruction des bactéries au cours du temps de conservation.

La comparaison de ces résultats avec ceux du tableau 43 montre que l'ouverture des flacons ¼ d'heure avant analyse conduit à la contamination des échantillons par les microorganismes présents dans l'air. L'effet de la pasteurisation est également observé puisque les échantillons pasteurisés 30 min sont moins contaminés que les échantillons pasteurisés durant 10 min (Tableau 43).

Durée de pasteurisation à 70°C	1 ^{ère} Tube	2 ^{ème} Tube	3 ^{ème} Tube	4 ^{ème} Tube
	1 ^{ère} semaine	2 ^{ème} semaine	3 ^{ème} semaine	4 ^{ème} semaine
10 min	350	327	250	110
30 min	460	317	110	60

Tableau 43 : Flore Totale après conservation à 30 °C et ouverture des tubes ¼ d'heure avant la mesure de la flore totale. Le pH des jus a toujours été de 3,7.

IV.2.2.8.3 Etude la stabilité microbiologique des échantillons micro-filtrés pasteurisés conservés à 4 °C pendant une semaine

Après pasteurisation à 70°C/10 min, la flore totale dans le jus initial passe de 940 à 70 CFU/mL et la somme des moisissures et levures passe de 110 à 20 CFU/mL (Tableau 44). Le jus clarifié par micro-filtration sur membrane de 0,2 µm et concentré par osmose inverse à 1A° et pasteurisé ne contient pas de microorganismes.

Le jus clarifié et concentré est ensuite pasteurisé dans un pot hermétique. Le pot est débouché et laissé 15 min à l'aire libre. Le jus concentré pasteurisé non ouvert et le jus concentré pasteurisé débouché, conservé à 4°C pendant une semaine ne contiennent plus de micro-organismes.

Le processus de filtration à 0,2µm, la température de pasteurisation et la méthode de conditionnement joue un rôle important pour la destruction des microorganismes. La filtration sur membrane 0,2 µm et l'osmose inverse à 1A° peuvent aider également à éliminer les microorganismes. En comparaison avec les deux premières conditions de pasteurisation et de conditionnement précédents, la micro-filtration suivie d'une pasteurisation et d'une conservation des produits à 4°C est une méthode plus efficace qui permet d'éviter la contamination des jus par les microorganismes, même après ouverture (Tableau 44).

Echantillons de jus	Flore totale (CFU/mL)	Moisissures et levures (CFU/mL)
Jus initial avant pasteurisation	940	110
Jus initial après pasteurisation	70	20
Jus clarifié par MFT et pasteurisé	0	0
Jus clarifié et pasteurisé, débouché et gardé à 4°C	0	0
Jus clarifié, concentré par OI et pasteurisé	0	0
Jus clarifié, concentré et pasteurisé, débouché et gardé à 4°C	0	0

Tableau 44 : Flore totale, moisissures et levures lors de la conservation à 4°C pendant une semaine

IV.2.2.9 Etude de la composition de la graine de *Morinda Citrifolia*

La graine représente une part importante des sous-produits de la production du jus de Noni. 100 g de fruits frais donnent 17 +/- 0,5 g de graines sèches. Nous avons étudié sa composition afin d'essayer de la valoriser également.

IV.2.2.9.1 Extraction de l'huile de la graine de *Morinda Citrifolia*

La teneur en huile de la graine de Noni obtenue par Soxhlet à l'hexane est de 8%, ce qui est faible par rapport par exemple à celle des graines oléagineuses comme l'huile de tournesol qui est de 45-50% (Budin *et al.*, 1993), l'huile de soja avec 20,2% ou de palme 50,3% (Ali *et al.*, 1988) ou encore de l'huile de la noix du Brésil 65-70% (Samuel, 1987 ; Chunhieng *et al.*, 2003) et du Cambodge (Bandelier *et al.*, 2001). L'huile de la graine de *Morinda Citrifolia* contient plus de phosphore (18,5 ppm) que l'huile de palme (14,60 ppm) (Ho *et al.*, 2000) mais moins que celle de *Calendula officinalis* (590-680 ppm) (Janssens, 2000).

IV.2.2.9.2 Composition en acides gras de l'huile de la graine

L'huile de graine de *M. Citrifolia* a trois caractéristiques principales (Tableau 45). Elle contient des acides gras à chaîne moyenne de C8 à C14, ce qui n'est pas commun chez les huiles végétales. Elle contient une proportion assez importante d'acide palmitique (19,7%). L'huile de la graine est riche en acide oléique (34,7%) et linoléique (31,9%), ce qui lui confère un caractère insaturé avec 67,8% de ces acides gras ayant au moins une double liaison. L'huile de graine de *M. Citrifolia* peut être comparée à l'huile de la noix du Brésil qui contient les mêmes acides gras dans des proportions similaires (Chunhieng *et al.*, 2003), à l'exception du C12 qui est en quantité

plus importante dans l'huile de la noix du Brésil. Elle contient également les mêmes acides gras que l'huile d'olive mais a environ trois fois plus d'acide linoléique avec 31,9% contre 9,0% à l'huile d'olive. Cette particularité supplémentaire fait que cette huile a une composition vraiment intéressante en diététique.

Acides gras	Huile de graine de <i>M. Citrifolia</i>	Huile de noix du Brésil	Huile de noix du Cambodge <i>Irvingia malayana</i>	Huile d'olive	Huile de soja
C8:0	1,4	1,04	nd	nd	nd
C10:0	0,11	0,86	2,7	nd	nd
C12:0	0,8	7,84	42,5	nd	nd
C14:0	0,49	2,99	42,1	nd	0,12
C16:0	19,71	18,45	7,3	13,8	12,7
C16:1	0,36	0,08	nd	1,4	0,11
C18:0	8,4	9,14	1,6	2,8	3,96
C18:1 (n-9)	34,66	20,75	2,3	72	21,7
C18:1 (n-7)	0,23	nd	nd	nd	nd
C18:2 (n-6)	31,86	35,21	1,5	9,0	53,8
C18:2 (n-3)	0,64	nd	nd	nd	nd
C18:3	nd	3,25	nd	1,0	7,3
C20:0	1,34	0,28	nd	nd	0,27
C20:1	nd	0,11	nd	nd	0,04
Total	100	100	100	100	100
Insaturés (%)	67,8	59,4	3,8	83,4	83,0

Tableau 45 : Composition centésimale en acides gras de l'huile de la graine de *M. Citrifolia* du Cambodge comparée à celles des huiles de noix du Brésil (Chunhieng *et al.*, 2003), de la noix du Cambodge (Bandelier *et al.*, 2002), de l'huile d'olive (Kamal-Eldin et Andersson, 1997) et de la graine de soja (Jahaniaval *et al.*, 2000). nd = non détectable

Détermination de l'indice d'iode de l'huile de graine

L'indice d'iode de l'huile extraite de la graine de Noni, calculé à partir de la composition en acides gras insaturés, est de 86,25.

Cet indice d'iode est intéressant car il situe l'huile au niveau de l'indice diode de l'huile d'olive (81,3) (Kamal-Eldin et Andersson, 1997), de l'huile de la noix du Brésil (86,95) (Chunhieng *et al.*, 2003) ou de l'huile de tournesol (90,0) (Pérez-Galvez *et al.*, 2000).

L'indice est par contre plus élevé que celui du jus (72,32). Cette huile est donc intéressante d'un point de vue nutritionnel.

IV.2.2.9.3 Composition de l'huile de la graine en stérols

Les stérols végétaux qui sont connus sous le nom de phytostérols, se trouvent dans les huiles de fruits et de légumes. Bien qu'ils soient chimiquement semblables au cholestérol, il a été montré qu'ils exercent des effets biochimiques significatifs sur les animaux et les humains. Se liant aux fibres alimentaires il est difficile de les absorber lors du passage de la nourriture dans l'intestin, en particulier chez les individus dont la fonction digestive est altérée. Les phytostérols entrent en compétition avec le cholestérol lors de l'absorption des aliments et permettent d'abaisser dans le sérum et les tissus humains en bonne santé de 800 à 1000 fois la concentration en cholestérol.

Le β -sitostérol (BSS) est le phytostérol principal. Son glycoside, le β -sitostéroline (BSSG) possède des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques, antinéoplastiques, et immunostimulantes.

Les recherches sur les animaux ont permis de constater que dans la tolérance orale du glucose, un ajout de BSS et de BSSG protège les animaux contre une élévation excessive des niveaux du glucose dans le sérum. Ceci peut être attribuable au fait que ces phytostérols sont capables de stimuler la sécrétion d'insuline et d'élever de ce fait les niveaux de circulation d'insuline pour un meilleur contrôle du sucre dans le sang. L'effet hypoglycémique du BSS et du BSSG chez les animaux indique que ce pourrait être un outil thérapeutique efficace pour les humains diabétiques ou pré-diabétiques (Thorne, 2003).

La recherche actuelle montre que les phytostérols ont des effets sur plusieurs autres maladies comme la rhinite/sinusite, l'allergique chronique, l'asthme, et les infections par l'hépatite C.

Les huiles végétales ont des concentrations élevées en phytostérols, les noix et les graines en contiennent des concentrations modérées, et les fruits et les légumes ont généralement les plus basses concentrations en phytostérols (Thorne, 2003).

Il est normal de trouver des quantités de cholestérol très faible dans une huile végétale et le Noni ne fait pas exception avec 0,5% (Tableau 46). Cette quantité est voisine de celle de l'huile d'olive vierge (0,3 à 0,9%) (Frega *et al.*, 1993 ; Koutsaftakis *et al.*, 1999).

La teneur des différents stérols importants (campestérol 18% ; stigmastérol 22,3% ; β sitostérol 44,4% ; δ 5 avenastérol 13,8%) est assez équilibrée dans l'huile de graine de Noni.

Le β sitostérol est le stérol le plus important en quantité dans l'huile (44,4%) ou la suspension cellulaire de de Noni (46%) (Dyas *et al.*, 1994), comme c'est le cas également dans l'huile d'olive (78,4%) (Alonso *et al.*, 1997), l'huile de tournesol (59,5%), de palme (58,4%) ou l'huile de bourrache (21%) (Frega *et al.*, 1993).

La teneur en campestérol de l'huile (18%) ou des tissus (23%) est plus importante que celles trouvées dans l'huile de la noix du Niger (*Guizotia abyssinica* Cass) avec 13 % ou d'olive avec 2,4% (Dutta *et al.*, 1994).

La teneur en stigmastérol de l'huile de Noni (22,3%) ou de la suspension cellulaire de *M. Citrifolia* (15%) est plus élevée que celle de l'huile d'olive (0,8%) (Frega *et al.*, 1993).

L'huile de la graine de *M. Citrifolia* contient une teneur en δ 5 avenastérol (13,8%) similaire à celle d'olive (14,2%) (Frega *et al.*, 1993) mais beaucoup plus importante que celle de l'huile de tournesol (1,1%) (Frega *et al.*, 1993) ou de l'huile de noix du Niger (6,6%) (Dutta *et al.*, 1994).

Stérols	Huile de graine de <i>M. Citrifolia</i>	Suspension cellulaire de <i>M. Citrifolia</i>	Huile de Tournesol	Huile d'olive vierge	Huile de la Noix du Niger
24-Méthylène cholestérol	-	4			
Cholestérol	0,5	nd	0,1	0,9	0,4
Campestérol	18,0	23,0	5,7	2,4	13,1
Stigmastérol	22,3	15,0	8,3	0,8	14,2
δ 7 campestérol	0,2	nd	1,1		nd
β sitostérol	44,4	46,0	59,6	78,4	43,2
24-Méthylène cycloartanol		<1			
Autres		<1			18
δ 5 avenastérol	13,8	nd	1,1	14,2	6,6
δ 7 stigmastérol	0,7	nd	13,4	tr	nd

Tableau 46 : Composition en stérols de l'huile de graine de *M. Citrifolia* du Cambodge comparée avec celle de la suspension cellulaire de *M. Citrifolia* (Dyas *et al.*, 1994), de la noix du Niger (Dutta *et al.*, 1994), de l'huile de tournesol (Frega *et al.*, 1993) et d'olive (Frega *et al.*, 1993).

IV.2.2.9.4 Composition en tocophérols de l'huile de la graine de *M. Citrifolia*

Les tocophérols communément appelés vitamine E, sont connus pour leur propriétés anti oxydantes (Yoshida *et al.*, 1992). Ce sont les principaux antioxydants naturels alimentaires et ils jouent un rôle capital sur la stabilité des huiles végétales (Yoshida *et al.*, 1993 ; Mäkinen *et al.*, 2000).

Les 4 tocophérols α -tocophérol (α -T), β -tocophérol (β -T), γ -tocophérol (γ -T) et δ -tocophérol (δ -T) associés à 4 tocotriénols (α , β , γ , δ) constituent la vitamine E. Tous les tocophérols proviennent du règne végétal et sont tous actifs dans la prévention de l'oxydation des huiles en interrompant la formation de radicaux libres et en évitant ainsi le rancissement des huiles. L' α -tocophérol est le plus biologiquement actif et l'effet anti-oxydatif des tocophérols croient selon l'ordre suivant : α -T > β -T > γ -T > δ -T (Hashim, 1993).

La question que l'on peut se poser concerne le lien possible qui existe entre la teneur en tocophérols et le degré d'insaturation des huiles végétales qui sont la source principale d'acides gras insaturés (PUFA) et de vitamine E. Les α - et γ -tocophérols sont associés avec les acides gras poly-insaturés essentiellement pour conférer une protection contre l'autoxydation (Kamal-Eldin et Anderson, 1997).

Le γ -tocophérol est le tocophérol prépondérant dans l'huile de graine de Noni (Tableau 47). Sa teneur est très élevée (88,9%) et voisine de celle de l'huile de noix de Grenoble (88,0%) (Matthäus, 1996). L' α -tocophérol est contenu en faible quantité (4,4%) alors que ce tocophérol se trouve en grande quantité dans l'huile d'olive (84,2%) (Kamal-Eldin et Anderson, 1997).

Le δ -tocophérol est présent en quantité équivalente dans l'huile de graine de Noni (6,6%) et dans l'huile de noix (8,5%) alors qu'il est absent dans l'huile d'olive et présent en plus grande quantité dans l'huile de soja (29%).

La quantité élevée de γ -tocophérol dans l'huile de graine de *M.Citrifolia* du Cambodge peut expliquer la bonne stabilité de cette huile à l'oxydation et donc favoriser les possibilités de stockage du jus ou de l'huile sur une plus longue durée.

Tocophérols	Huile de la graine de <i>M.Citrifolia</i> (%)	Huile de soja (%)	Huile d'olive (%)	Huile de noix de Grenoble (%)
α -tocophérol	4,4	10	84,2	1,7
β -tocophérol	0,1	3	5,3	1,8
γ -tocophérol	88,9	58	10,5	88,0
δ -tocophérol	6,6	29	-	8,5

Tableau 47 : Composition en tocophérols de l'huile de graine de *M.Citrifolia* du Cambodge comparée avec celle de la noix de Grenoble (Matthäus, 1996) et de l'huile de soja et d'olive (Kamal-Eldin et Andersson, 1997)

IV.2.2.9.5 Composition de la graine en cellulose brute

La quantité de cellulose brute de la graine a été mesurée selon la procédure opérationnelle de Cirad-Amis/Paa (Code: PC0930B, 2001). La quantité de cellulose brute de la graine est de 69,7% +/- 0,1. Elle est plus importante que celle du tourteau (38,2% +/- 0,1) et du jus initial avant MFT de Noni (34,8% +/- 0,1) qui contient des hémicelluloses (12,7% +/- 0,1), de la cellulose (21,1% +/- 0,1) et de la lignine (0,9% +/- 0,1).

IV.2.2.10 Composition du tourteau obtenu après pressage du jus

Le tourteau est le résidu obtenu après pressage du fruit frais. Ce produit a été analysé afin d'estimer les possibilités de l'utiliser en alimentation animale.

IV.2.2.10.1 Comparaison de la composition en minéraux du culot fibreux, du jus et du tourteau de Noni

La quantité de matière sèche du tourteau est de 31,38 % (Tableau 48). Cette valeur en matière sèche est environ trois fois plus élevée que celle du jus brut initial (9,75%) et environ deux fois plus élevée que celle des culot fibreux (18,7%).

La quantité d'azote du tourteau est de 3,24 %. Cette valeur en azote est équivalente à celle du jus brut (3,64 %) et plus élevée en 2 fois que celle des culots fibreux (1,66%).

Les protéines se répartissent dans le tourteau (22,84%) et dans le jus initial (25,6%). La teneur en protéine du tourteau est équivalente à celle du tourteau de coprah (21%) (Waneissi, 1993), mais est inférieure à celle du tourteau de la graine de soja (45-50%) (Angokai, 1993) qui est le tourteau de référence en alimentation animale. Cette teneur en protéine peut permettre à ce tourteau de rentrer dans la composition d'un aliment pour animaux.

Les minéraux vont préférentiellement dans le jus et se trouvent donc en quantité moindre dans le tourteau et dans le culot fibreux (Tableau 48).

Les teneurs du tourteau en phosphore (0,12%), potassium (1,15%), calcium (0,4%), magnésium (0,14%) et sodium (0,07ppm) sont assez basses et peuvent être comparées à celles du grain de maïs : phosphore (0,32%), potassium (0,35%), calcium (0,035%), magnésium (0,17%) et sodium (0,009%) (Rakipov, 1987).

Parmi les minéraux, le sélénium et le sodium se trouvent en très petite quantité 0,072 et 0,6 ppm.

Autres fractions	Jus	N	P	K	Ca	Mg	Na (ppm)	S	Se (ppm)	MS (%)	Protéine Fact. = 7,05 (%)
	Jus initial	3,64	0,25	4,01	0,29	0,14	2193,8	0,30	0,9	9,75	25,6
Tourteaux		3,24	0,12	1,15	0,36	0,15	0,07	0,15	0,6	31,38	22,84
	Jus centri.	0,90	0,32	4,27	0,27	0,21	0,28 (%)	0,13	0,9	3,53	6,34
Culot Fibreux		1,66	0,11	2,33	0,66	0,22	1656,0	0,17	0,5	18,74	11,70
	Filtrat après MFT	0,73	0,17	3,04	0,09	0,10	1500,4	0,26	1,4	7,40	5,14
	Rétentât après MFT	0,98	0,25	4,39	0,17	0,14	2386,9	0,26	1,3	8,15	6,93
	Jus concentré par OI	0,68	0,28	4,77	0,14	0,17	2580,8	0,26	1,1	15,96	4,79

Tableau 48 : Composition en minéraux des fibres, du jus et du tourteau de Noni par rapport à la matière sèche (%).

Ms = matière sèche

IV.2.2.10.2 Composition du tourteau en cellulose brute et lipides totaux

Ces analyses visent à obtenir des informations sur la composition globale du tourteau obtenu après extraction du jus dans le but de valoriser ce produit en alimentation animale.

La quantité de cellulose brute du tourteau (38,2%) est plus élevée que celles des tourteaux de coprah (16%) et de soja (8%) (Vet-lyon, 2003) habituellement utilisées en alimentation animale. Cette teneur en cellulose permet d'orienter ce tourteau plutôt vers l'alimentation des ruminants.

La quantité des lipides totaux du tourteau (2,9%) peut être comparée à celles de tourteau de coprah (1,5%) et de soja (2,3%) (Vet-lyon, 2003).

Substances	Quantité (%)
Cellulose	38,23 +/- 0,1
Lipides totaux	2,9 +/- 0,05

Tableau 49 : Composition en cellulose brute et lipides totaux du tourteau (%).

IV.2.2.10.3 Composition en acides gras de l'huile du tourteau

L'huile du tourteau est extrêmement saturée puisqu'elle ne contient que des acides gras saturés : caprylique C8:0 (46,26%), caprique C10:0 (8,21%), palmitique C16:0 (17,97%) et stéarique C18:0 (27,56 %) (Tableau 50).

Elle est étrangement différente de celle du jus et de la graine. En effet, l'huile du tourteau ne contient que des acides gras saturés (100%) alors que celle du jus en contient (48,0%) et celle de la graine (32,25%).

Il est difficile d'expliquer ce phénomène. Il est possible que les acides gras saturés soient liés de façon plus forte aux fibres du tourteau et que les insaturés ont la possibilité d'être extraits plus facilement du tourteau lors du pressage du jus.

Cette composition en lipides saturés du tourteau n'est pas intéressante en terme de nutrition. Les lipides ne représentent en fait qu'une faible partie (2,9%) du tourteau. En cas d'utilisation en alimentation animale ou même humaine, il sera nécessaire d'équilibrer la composition en acides gras (Chen *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2000).

Acides gras	Huile de la graine	Huile du jus	Huile du tourteau
6:0	nd	6,40	nd
8:0	1,4	22,88	46,26
10:0	0,11	0,80	8,21
12:0	0,8	1,83	-
14:0	0,49	0,18	-
16:0	19,71	11,29	17,97
16:1	0,36	1,19	-
18:0	8,40	4,33	27,56
18:1 (n-9)	34,66	18,85	-
18:1 (n-7)	0,23	0,67	-
18:2 (n-6)	31,86	31,11	-
18:2 (n-3)	0,64	-	-
18:3 (n-3)	nd	0,34	-
20:0	1,34	0,33	-
Acides Monoinsaturés	35,25	20,71	0
Acides polyinsaturés	32,5	31,45	0
Acides insaturés	67,75	52,2	0

Tableau 50 : Comparaison de la composition centésimale en acides gras de la graine, du jus et du tourteau du fruit de *M. Citrifolia* cambodgien

IV.2.2.11 Récapitulatif sur les rendements

L'extraction a été réalisée à partir de 2 lots de jus brut de Noni du Cambodge.

Le rendement en jus brut extrait du fruit de Noni à la presse Sakaya est de 51,6% +/-0,8 (Figure 31). Les pertes sont donc de 13% +/- 3 en poids du fruit initial. 1 kg de fruit brut donne donc 0,52 kg de jus brut dont la matière sèche est de 9,75 % +/- 0,4. Le degré Brix est généralement lié directement à la teneur en matière sèche du jus.

Le rendement en jus filtré par MFT par rapport au fruit brut initial est de 28% +/-0,5.

1 kg de fruit brut donne donc 0,28 kg de jus filtré après micro-filtration tangentielle dont la matière sèche est de 7,40% +/- 0,3 du jus microfiltré.

Le rendement en jus concentré par osmose inverse par rapport au fruit initial est de 8 %. 1 kg de fruit brut donne donc 0,08 kg de jus filtré et concentré après MFT et osmose dont la matière sèche est de 15,96%.

L'osmose est une technique de concentration très élégante car elle permet de concentrer le jus sans utilisation de chaleur et permet de conserver en jus sa teneur en éléments importants (alcaloïdes, vitamines, phytostérols, tocophérols...), les rendements sont de plus satisfaisants.

Pour produire un jus clarifié par MFT, le jus de Noni a été filtré à la température de 60-66°C sur filtre à membrane de 0,2 micron avec une pression $\Delta P = 1$ bar et un débit de 75,51 L.h⁻¹.m⁻². Le rendement est de 55,9%. Dans le cas de la concentration du filtrat par osmose inverse à la température de 27°C, une pression de $\Delta P = 40$ bar donne un débit de 3,27 L. h⁻¹.m⁻² et un rendement de concentration de 28,9%. Le degré Brix passe de 7°Bx à 16°Bx, ce qui suppose que les matières sèches solubles du jus sont concentrées $16 / 7 = 2,3$ fois.

Pendant l'opération, le flux croît linéairement avec le temps, ce qui montre qu'il n'y a pas de colmatage dans le temps pour la quantité de produit traité. Les rendements obtenus sont satisfaisants.

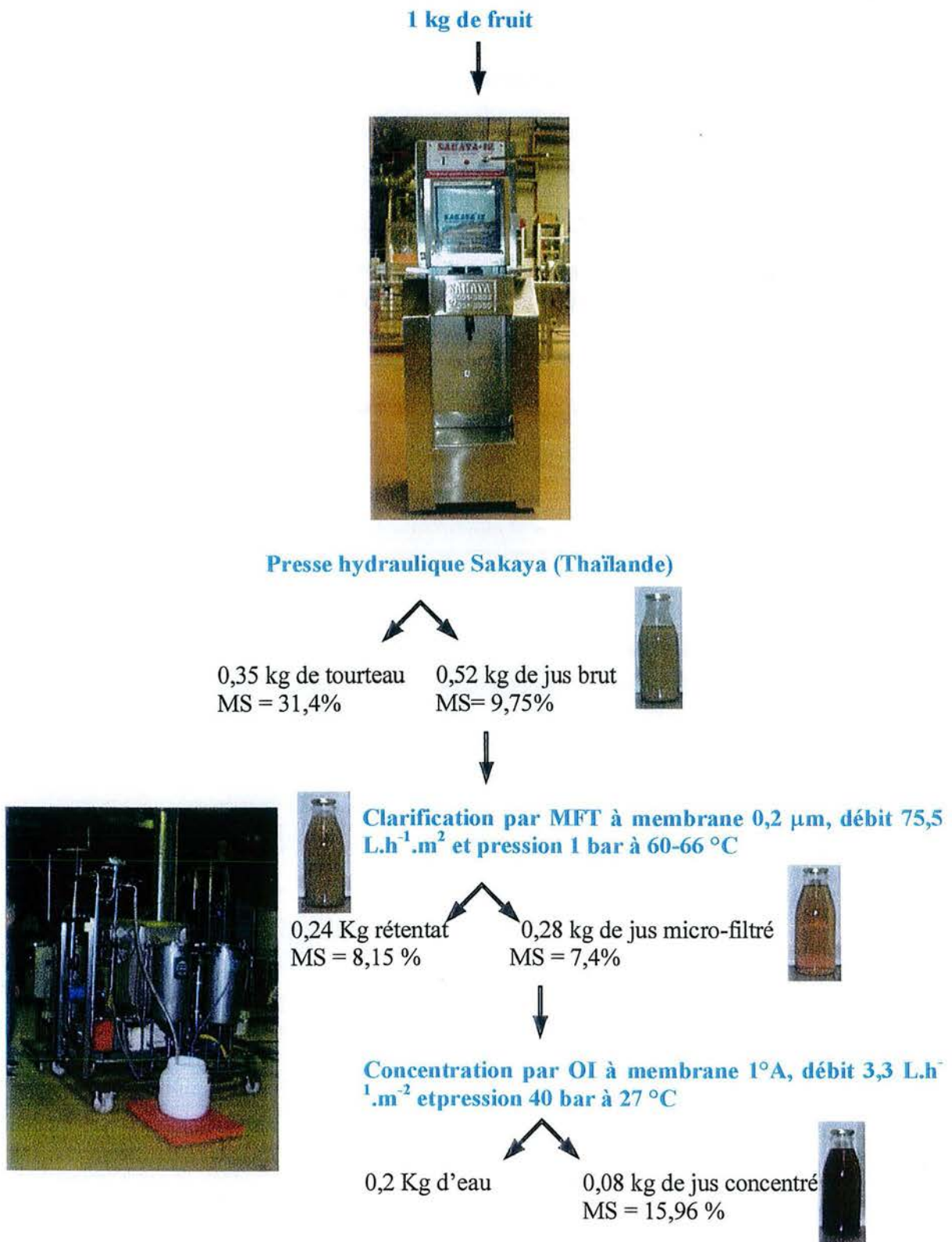


Figure 31 : Schéma récapitulatif de la production du jus de *Morinda Citrifolia*.

IV.2.3 Conclusions sur le Noni

La couleur verte du jus de Noni est due à sa richesse en chlorophylle (0,3%).

Le jus brut contient peu d'huile (1,5% p/p sec). Les principaux acides gras du jus de *Morinda Citrifolia* sont les acides oléique C18:1 (n-9), linoléique C18:2 (n-6) et linoléique C18:3. Cette huile contient une grande proportion d'acides gras insaturés (52,2%) dont 31,45% de polyinsaturés

Les sucres simples du jus sont composés principalement de glucose (12,16% p/p sec) et de fructose (8,42% p/p sec). Le jus contient seulement des traces de saccharose (<0,03% p/p sec). Cette importante quantité fait de ce jus un bon produit énergétique pour le corps humain (Potter, 1986 ; Frénot *et al.*, 1997).

Les anions inorganiques et organiques que l'on trouve en quantité importante (8,4% p/p sec) peuvent être responsable du goût caractéristique de ce jus tout comme les acides gras courts et en particulière le C 8:0 (22,9%).

La teneur en minéraux du jus est également importante (8,85% p/p sec). Tous les éléments minéraux qui sont très importants pour l'organisme se trouvent dans le jus et les fibres de Noni : P, K, Ca, Mg, Na, S et Se.

La teneur en phosphore du jus concentré et de ses dérivés est voisine de 0,2% (p/p sec). Le phosphore est présent sous forme de phosphate dans les os (associé au calcium) et dans le plasma. Il joue aussi un rôle important, sous forme organique, dans le métabolisme intermédiaire (Frénot *et al.*, 1997).

Le potassium qui est le cation majeur du milieu intracellulaire où il contribue à de nombreuses réactions métaboliques est présent dans le jus de Noni à hauteur de 3% (p/p sec). Le potassium maintient le potentiel des membranes au repos. Il active les enzymes de la synthèse du glycogène et favorise la protéosynthèse (Frénot *et al.*, 1997).

L'essentiel du calcium est immobilisé dans les os et les dents sous forme de cristaux d'hydroxyapatite (Frénot *et al.*, 1997). La teneur en Mg est de 0,10 et 0,17% (p/p sec) dans le jus micro-filtré et le jus concentré respectivement. Le jus de Tahiti contient un peu plus de magnésium 0,39 % (p/p sec). Le Mg^{2+} est le cofacteur de stabilisation de l'ATP et de l'ADP, molécules du métabolisme intermédiaire. Il est nécessaire à la contraction et à la relaxation du muscle strié et du muscle lisse. Il a en particulier une action myorelaxante sur l'utérus gravide et est anticonvulsif (Frénot *et al.*, 1997).

La teneur en sodium est de 1500 ppm (sur sec) dans le jus-microfiltré, 2580 ppm dans le jus concentré et 2830 ppm dans le jus de Tahiti. Le sodium est responsable avec le potassium de la polarisation des membranes grâce à la pompe à sodium/potassium ATP dépendante. Par ce mécanisme actif de pompage d'ions, le sodium co-transporte de nombreux substrats, comme le glucose et les acides aminés. Il gouverne en partie le déplacement des Cl^- et dirige le mouvement passif de l'eau (Grace, 2001).

La teneur en sélénium est de 0,9 à 1,4 ppm (sur sec) dans tous les jus. Le Se est un constituant essentiel de la glutathion peroxydase (Awasthi, Beutler et Srivastava, 1975). Cette enzyme des globules rouges et de nombreux autres tissus réduit de nombreux substrats au contact du glutathion GSH (Frénot *et al.*, 1997). Le Se est essentiel pour l'homme il prévient le cancer (Ip *et al.*, 1994). L'US National Research Council propose des doses journalières de 60-120 µg de Se (Food and Nutrition Board, 1976).

La teneur en soufre est de 0,26% (p/p sec) dans le filtrat; 0,26% dans le jus concentré et 0,18 % dans le jus de Tahiti. Le soufre a un rôle plastique dans la kératine (protéine soufrée de la peau et des cheveux) et dans le tissu conjonctif riche en mucopolysaccharides. Il joue un rôle important dans les réactions d'oxydoréduction et les réactions d'activation des acides gras (coenzyme A à groupe-SH) (Frénot *et al.*, 1997).

Le jus brut de Noni contient en moyenne 25,6 % (p/p sec) de protéine. La quantité de protéine dépend de la source du fruit et de la méthode de fabrication du jus.

Grâce à sa composition en acides gras insaturés oléique C18:1 (18,85%), linoléique C18:2 (31,11%) et linoléique C18:3 (0,34%), le jus de Noni peut jouer un rôle important comme aliment santé. Les acides gras mono-insaturés et les phytostérols protègent l'organisme de l'excès de cholestérol, responsable de l'athérosclérose et des complications cardiovasculaires. Les acides gras essentiels sont nécessaires à diverses fonctions comme la croissance, la cicatrisation de la peau, l'agrégation plaquettaire où leur effet serait plutôt indirect par l'intermédiaire de leurs métabolites : thromboxanes et prostaglandines (Frénot *et al.*, 1997).

Afin d'être commercialisé, le jus doit être stabilisé en terme de couleur, physiquement et microbiologiquement. Le changement de couleur du jus de *Morinda Citrifolia* est influencé par la température de pasteurisation et de conservation du jus. Ce changement de couleur peut être expliqué par un brunissement enzymatique et non enzymatique.

Le jus obtenu lors de notre étude est bien plus clair que le jus de Tahiti industriel qui est très foncé et dont la turbidité est très importante. Le jus filtré par micro-filtration tangentielle pasteurisé ou non est le plus clair.

L'étude de la contamination des jus bouchés hermétiquement a montré que tous les échantillons de jus de *Morinda citrifolia* ont un pH suffisamment bas (pH 3,7) qui évitent un chauffage trop important lors de la pasteurisation.

L'analyse de la graine de Noni devrait permettre sa valorisation en alimentation animale. Sa teneur en huile est faible 8,0 %. Elle contient peu de phosphore 18,5 ppm.

Comme toutes les huiles végétales, l'huile de graine de Noni contient peu de cholestérol (0,5 %) et beaucoup de stigmastérol et de β sitostérol 22,3 et 44,4 % respectivement. L'huile de graine de Noni contient une quantité élevée de γ -tocophérol (88,9 %). Les stérols végétaux seraient protecteurs car ils freinent l'absorption du cholestérol (Frénot *et al.*, 1997) et sont des inhibiteurs de l'oxydation des lipides (Randerath, 1962 ; Medina-Juarez *et al.*, 2000).

L'huile de la graine est riche en acide oléique C18:1 (34,66%) et linoléique C18:2 (31,86%). Cette huile présente un intérêt pour formuler des aliments pour la santé.

La graine a une haute teneur en cellulose brute (69,7% p/p sec). Le tourteau obtenu après extraction du jus contient 31,4 % de matière sèche incluant 22,8% de protéine; 38,23% de cellulose brute et 2,9% de lipides totaux et des minéraux (5,2%).

Les différentes fractions obtenues par pressage du jus de Noni peuvent donc sans trop de difficultés trouver des applications soit :

- en industrie pharmaceutique ou diététique pour le jus qui doit conserver ses propriétés traditionnelles après stabilisation. Ceci reste à prouver mais dépasse le cadre de cette thèse.
- En industrie de l'alimentation animale pour le tourteau résiduel et pour la graine dont les compositions sont assez voisines des tourteaux ou des graines habituellement utilisés dans ce secteur.

**CONCLUSION
GENERALE**

V Conclusion générale

L'étude de ces deux produits issus de l'agriculture traditionnelle a permis d'acquérir des connaissances jusqu'à présent non publiées. La noix du Brésil et le fruit de Noni ont en commun le fait qu'ils proviennent de la cueillette et ne sont pour l'instant pas produits industriellement. Cette thèse a permis de mettre en évidence que des produits aussi simples peuvent être valorisés dans les pays développés en mettant en évidence des propriétés connues par les populations locales.

La richesse en sélénium de la noix du Brésil *Bertholettia Excelsa* lui confère des propriétés anti-oxydantes potentielles qui font de ces produits une base pour la création d'aliments santé anti-radicalaire, qui sont d'ailleurs déjà utilisées par notre partenaire JBA agroconcept pour produire des aliments nutraceutiques. Il a été montré dans cette thèse que le sélénium se trouve lié à deux acides aminés particuliers peu courants dans la nature que sont la sélénocystéine et la sélénométhionine.

Un lait de noix du Brésil particulièrement riche en sélénium, pouvant être utilisé par les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques, a été produit par extraction directe sur les noix.

Malgré les nombreuses analyses pour la plupart inédites réalisées sur le fruit de Noni et ses dérivés, le jus de *Morinda Citrifolia* gardera ses secrets guérisseurs. Les analyses montrent que ce produit possède des molécules à propriétés anti-oxydantes indéniables qui peuvent avoir une action sur le corps humain mais les nombreux textes issus des populations autochtones, ainsi que les productions importantes de ce jus dans les pays tropicaux, font penser que le jus de Noni possède des molécules plus actives sur le plan médicinal comme peut être certains alcaloïdes de type xéronine souvent cités par certaines sociétés commerciales mais que nous n'avons pas pu ni isoler, ni identifier durant cette thèse.

Les expériences acquises sur ces produits d'un point de vue général et par la mise en oeuvre de nombreuses techniques analytiques fines vont nous permettre de proposer des valorisations pour d'autres produits tropicaux comme la noix du Cambodge par exemple.

Après de nombreuses années de guerre, la reconstruction économique du Cambodge est une priorité pour le peu de scientifiques existants et travaillant pour ce pays. Nous pensons que la paix et le développement durable ne pourront exister dans ce pays que si on s'attaque à la pauvreté de la classe paysanne, en commençant par la valorisation des produits agricoles. La création d'une entreprise d'aliment santé contribuera à améliorer les conditions de vie des paysans. C'est aussi un remède approprié contre l'exode rural et le surpeuplement des villes. Le Cambodge souffre en effet d'une insuffisance industrielle que l'on ressent plus particulièrement en agro-alimentaire.

Nous avons pu réaliser durant cette thèse la mise au point du jus de Noni et mettre en évidence certaines de ses propriétés non encore publiées par la communauté internationale.

La transformation de ces fruits aura une importance réelle pour le développement économique du Cambodge. Avec l'expérience acquise, de nouvelles petites unités industrielles pourront voir le jour comme c'est le cas pour la société Confirel, créée au Cambodge en 2001, à partir des résultats de cette thèse.

Outre les problèmes purement techniques liés aux procédés, de nombreux problèmes humains sont à résoudre dans ce pays. Le niveau de formation des techniciens est extrêmement bas et le plus difficile est de faire concevoir des produits à haute valeur ajoutée à des gens qui n'ont pas la connaissance et le concept de ces produits.

La réalisation de cette thèse très appliquée est un premier pas important pour le développement du Cambodge en terme de ressources humaines et de valorisation de ses produits agricoles.

Chaque action de ce type permettra de reconstruire peu à peu ce pays. Les filières agricoles se développeront sous la pression des industriels. Il faut savoir que le Cambodge malgré sa pauvreté est obligé d'importer les produits alimentaires des pays voisins car il ne possède pas le tissu industriel nécessaire à la transformation de ses produits agricoles.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acuña-Cueva, R., Hueso-Urena, F., Cabeza, N.A.I., Jiménez-Pulido, S.B., Moreno-Carretero, M.N., Martos, J.M.M. (2000). Quantitative structure capillary column Gas Chromatographic retention time relationships for natural sterols (trimethyl ethers) from Olive oil.
JAOCS, 77, 627-630.
- Adjanohoun, E.J., Aké Assi, L., Eyme, J., Gassita, J.N., Goudote, E., Gueho, J., Lackaria, F.S.L., Ip. D., Kalachand, S.K.K., Keita, A., Koudogbo, Land-Reau D., Owadally, A.W., Soopramanien, A. (1983). Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice (Iles Maurice et Rodrigues), Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, 214.
- Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A. (1998). Mesure de l'activité de l'eau. In : *Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires*, 33.
Londres, Paris and New York. 11, rue Lavoisier F75384 Paris cedex 08.
- Ajana, H., Hafidi, A. (1992). Evolution de la composition de la fraction phospholipidique isolée par dialyse, au cours du raffinage d'huiles végétales.
Revue Française des corps gras, 39 année, N°11/12, 333-338.
- Alais, C., Linden, G. (1994). Lait et produits laitiers.
In : *Biochimie Alimentaire*. Masson, 162-185.
- Alais, C., Linden, G. (1994). Lipides.
In : *Biochimie Alimentaire*. Masson, 55-68.
- Alais, C., Linden, G. (1994). Minéraux.
In : *Biochimie Alimentaire*. Masson, 95-98.
- Alais, C., Linden, G. (1994). Vitamines.
In : *Biochimie Alimentaire*. Masson, 110-116.
- Ali, R., Khan, M.N. (1998). Modified butirometric method for rapid determination of fat in seeds.
JAOCS, 65, 1951-1952.
- Alkio, M., Gonzalez, C., Jäntti, M., Aaltonen, O. (2000). Purification of polyunsaturated fatty acid esters from Tuna oil with supercritical fluid chromatography.
JAOCS, 77, 315-321.
- Aller, A.J., Bernal, J.L., del Nozal, J., Deban, L. (1990). Effects of selected trace elements on plant growth.
J. Sci. Food Agric., 51, 447-473.
- Almonor, G.O., Fenner, G.P., Wilson, R.F. (1998). Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality.
JAOCS, 75, 591-596.

- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Juárez, M. (1997). Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by Gas Chromatography. *JAOCs*, 74, 131-135.
- Ames, B.N. (1966). *Methods in Enzymology*, 8, 115.
- Ames, B. N. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radical Research Communications*, 7, 121-128.
- Ampe, C., Van Damme, J., De Castro, L.A.B., Sampaio, M.J.A.M., Van Montagu, M., Vandekerckhove, J. (1986). The amino-acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K). *Eur. J. Biochem.*, 159, 597-604.
- Angokai, M.A. (1993). Composition moyenne en protéines, cellulose et cendres des différents tourteaux (en p. 100 de MS). In : *Enrichissement en protéines du tourteau de coprah par Fermentation Solide*. Académie de Montpellier, Université de Montpellier II, 10.
- Antunes, A.J., Markakis, P. (1977). Protein supplementation of navy beans with Brazil nuts. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1096-1098.
- AQUA LAB. Water Activity Meter (2000). Theory: Water Activity in Products. In : *Operator's Manual Version 1.4 for series 3, 3T, 3TE, and low-block option models*. Decagon Devices, Inc. 950 NE Nelson Court. Pullman WA 99163. 2000 *Decagon Devices, Inc*, 53-61.
- Arcos, J.A., Garcia, H.S., Jr, G.H. (2000). Regioselective analysis of the fatty acid composition of triacylglycerols with Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *JAOCs*, 77, 507-512.
- Aursand, M., Mabon, F., Marlin, G.J. (2000). Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *JAOCs*, 77, 659-666.
- Awasthi, Y.C., Beutler, E., Srivastava, S.K. (1975). Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 250, 5144-5149
- Bafor, M.E., Osagie, A.U. (1988). Composition of polar lipids in developing oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit mesocarp, variety *dura*. *Oléagineux*, 43, 261-264.
- Bandarra, N.M., Campos, R.M., Batista, I. (1999). Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids. *JAOCs*, 76, 905-913.

- Bandelier, J. Chunhieng, T. Ollé, M., Montet, D. (2002). An original study of the biochemical and oil composition of Cambodian nut : *Irvingia malayana*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1478–1482.
- Baron, M., Champion, M. (2002). Contributions de la sélection des oléagineux aux attentes de l'alimentation animale. *Oléagineux Corps gras Lipides*, 9, 139-142.
- Baublis, A., Decker, E.A., Clydesdale, F.M. (2000). Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry*, 68, 1-6.
- Bauer-Plank, C., Steenhorst-Slikkerveer, L. (2000). Analysis of triacylglyceride hydroperoxides in vegetable oils by Non aqueous Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection. *JAOCS*, 77, 477-482.
- Bhatia, I.S., Kaur, N., Sukhija, P.S. (1978). Role of seed phosphatides as antioxidants for ghee (Butter fat). *J. Sci. Food Agric.*, 29, 747-752.
- Bhattacharya, S., Shylaja, M.H., Manjunath, M.S., Sankar, U. (1998). Rheology of lecithin dispersions. *JAOCS*, 75, 871-874.
- Boskou, D., Morton, I.D. (1976). Effect of plant sterols on the rate of deterioration of heated oils. *J. Sci. Food Agric.*, 27, 928-932.
- Bour, H. (1988). Relation Alimentation-Nutrition-Santé dans les pays en voie de développement. *Economie Rurale*, 188, 17-20.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Budin, J.T., Breene, W.M. (1993). Factors affecting the shelf stability of sunflower nuts. *JAOCS*, 70, 493-496.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. (1981). Autoxidation of biological molecules. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *JAOCS*, 103, 6472-6577.
- Carelli, A. A., Brevedan, M.I.V., Crapiste, G.H. (1997). Quantitative determination of phospholipids in Sunflower oil. *JAOCS*, 74, 511-514.

- Chen, Q., Huang, S. Ho, C.-T. (1992). Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity .
JAOCS, 69, 999-1002.
- Chen, T-C., Ju, Y.H. (2000). Enrichment of eicosapentaenic acid and docosahexaenoic acid in saponified Menhaden Oil.
JAOCS, 77, 425-428.
- Chen, Z.Y., Nawar, W.W. (1991). Prooxidative and antioxidative effects of phospholipids on milk fat.
JAOCS, 68, 938-940.
- Chen, Z.Y., Nawar, W.W. (1991). The role of amino acids in the autoxidation of milk fat.
JAOCS, 68, 47-50.
- Chevolleau, S., Mallet, J.F., Debal, A., Ucciani, E. (1993). Antioxidant activity of Mediterranean plant leaves: Occurrence and antioxidative importance of α -tocopherol.
JAOCS, 70, 807-809.
- Chopra, R.N., Nayar, S.L., Chopra, I.C. (1956). Glossary of Indian medicinal plants, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 330.
- Chunhieng T., Pétritis K., Elfakir C., Brochier J., Goli T., Montet D. (2003). Study of selenium distribution in the protein fractions of Brazil Nut *Bertholletia excelsa*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, soumis à publication 2003.
- Clark, P.K., Snyder, H.E. (1991). Effect of moisture and temperature on the phosphorus content of crude Soybean oil extracted from fine flour.
JAOCS, 68, 814-817.
- Clough, E.A. (1992). The determination of tocopherols in vegetable oils by Square-Wave Voltametry.
JAOCS, 69, 456-460.
- Combs, G.F., Combs, S.B. (1986).
In *The Role of Selenium in Nutrition*, Chap. 2, 15-40; Chap. 6, 206-249.
Academic Press, Orlando.
- Conseil Oleicole International, *Norme Commerciale Applicable à l'Huile d'Olive et à l'Huile de Grignons d'Olive*, Document COI/T.15/NC n° 2/Rév. 10, (2001), 1-17.
- Da Silva W.G., Cortesi N., Rovellini P. (1997). La nocciola brasiliana (*Bertholletia excelsa* H.B.K., Famiglia delle Lecythidaceae). Nota II. I lipidi – Studi sulla composizione chimica.
- Dastur, J.F. (1952). Medicinal plants of India and Pakistan. D. B. Taraporevala Sons & Co., Ltd., Bombay, India.

- De Blas, O.J., Gonzalez, A.V. (1996). Determination of sterols by Capillary Column Gas Chromatography. Differentiation among different types of Olive oil: virgin, refined, and solvent-extracted.
JAOCS, 73, 1685-1689.
- De Kanterewicz, R.J., Elizalde, B.E., Pilosof, A.M.R., Bartholamai, G.B. (1987). Water-Oil Absorption Index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins.
J. Food Sci., 52, 1381-1383.
- Decloux, M., Dornier, M., Gratius, I. 1996. Crossflow microfiltration of gum arabic solutions: comparison of the classical system with the co-current permeate flow system.
Food Science and Technology, 31, 153-166.
- Devittori, C., Gummy, D., Kusy, A., Colarow, L., Bertoli, C., Lambelet, P. (2000). Supercritical fluid extraction of oil from millet bran.
JAOCS, 77, 573-579.
- Dixon, A.R., McMillen, H., Etkin, N.L. (1999). Ferment this: The transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, *Rubiaceae*).
Economic Botany, 53, 51-68.
- Dolde, D., Vlahakis, C., Hazebroek, J. (1999). Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition and temperature during development.
JAOCS, 76, 349-355.
- Dornbos, D.L., Mullen, Jr.R.E., Hammond, E.G. (1989). Phospholipids of environmentally stressed soybean seeds.
JAOCS, 66, 1371-1373.
- Dornier, M., Gerbaudo, Y., Bennasar, M. 1993. Clarification et stabilisation du vin de palme par filtration tangentielle sur membranes minérales: étude des conditions opératoires. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 110 (1-2), 25-33.
- Dornier, M., Petermann, R., Decloux, M. 1995. Influence of start-up procedure on crossflow microfiltration of raw cane sugar.
J. of Food Engineering, 24, 213-224.
- Duh, Pin-Der. (1999). Antioxidant activity of water extract of four Harg Jur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) varieties in soybean oil emulsion.
Food Chemistry, 66, 471-476.
- Dutta, P.C. (1997). Studies on phytosterol oxides. II : Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils.
JAOCS, 74, 659-666.
- Dutta, P.C., Helmersson, S., Kebedu, E., Alemaw, G. (1994). Variation in lipid composition of Niger seed (*Guizotia abyssinica* Cass). Samples collected from different regions in Ethiopia.
JAOCS, 71, 839-843.

- Dyas, L., Threlfall, D.R., Goad, L.J. (1994). The sterols composition of five plant species grown as cell suspension cultures.
Phytochemistry, 35, 655-660.
- Edeling, M.E. (1968). The Dumas method for nitrogen in feeds.
JAOCS, 51, 766.
- El H. (1996). Formulation et fermentation de laits végétaux.
Rapport de stage UTC Compiègne/Cirad.
- El-Hamady, A.M., Abd El-Wahab, F.K., El-Nabawy, S.M., Abou Rawash, A., Hagagg, L. F. (1984). A comparison between Montakhab, Curtis and MoneyMaker pecan fruits at maturity.
Gartenbauwissenschaft, 49, 33.
- Etchessahar (2000). Optimizacion de la produccion de aceite de nueces de Brasil.
Mémoire d'ingénieur INSFA Rennes/Cirad.
- Farine, J.P., Legal, L., Moreteau, B., Le Quere, J. (1996). Volatile components of ripe fruits of *Morinda Citrifolia* and their effects on *Drosophila*.
Phytochemistry, 41, 433-438.
- Fedeli, E. (1977). Lipids of Olives.
Prog. Chem. Fats Other Lipids, 15, 57-74.
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Guarnieri, C., Caldarera, C.M., Albertini, A., Visioli, O. (1985). Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity.
J. Mol. Cell. Cardiol., 17, 937-945.
- Flohe, L., Beckman, R., Giertz, H., Loschen, G. (1985).
In: *Oxydative stress* (Seis, H., ed.) 405-437, Academic Press, New York, NY.
- Folch, J., Lees, M., Sloane, G.S.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue.
J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- Food and Nutrition Board (1976).
Nutr. Rev., 34, 347.
- Foote, C.S. (1976).
In : *Free radicals in biology* (Pryor, W., ed.), Vol. II, Academic Press, New York, 85-133.
- Fourie, C.P., Basson, D.S. (1990). Sugar content of almond, pecan, and macadamia nuts.
J. Agric. Food Chem., 38, 101-104.

- Frega, N., Bocci, F., Lercker, G. (1993). High Resolution GC of unsaponifiable matter and sterol fraction in vegetable oils.
Chromatographia, 36, 215-217.
- Frénot, M., Vierling, E. (1997). Les aliments minéraux .
In : *Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant*. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine.
- Gaydou, E.M., Blanchini, J.P., Rabariosa, I., Eavelojana, G. (1980). Plantes oléagineuses endémiques de Madagascar. Etude de la composition en acide gras et en stérols de quelques espèces de palmiers.
Oléagineux, 35, 413-415.
- Gey, L.F, Brubacher, G.B., Stahelin, H.B (1987). Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer.
Am. J. Clin. Nutr., 45, 1368-1377.
- Ghosh, S., Bhattacharyya, D.K. (1996). Isolation of tocopherol and sterol concentrate from Sunflower oil deodorizer distillate.
JAOCS, 73, 1271-1274.
- Goh, S.H., Hew, N.F., Ong, A.S.H., Choo, Y.M., Brumby, S. (1990). Tocotrienols from palm oil; electron spin resonance spectra of tocotrienoxyl radicals.
JAOCS, 67, 250-254.
- Gollnick, K. (1968).
In: *Advances in Photochemistry* (Noyes, W.A., Hammond, G.W., and Pitts, J.N., eds.), Vol. 6, Interscience Publishers, New York, 1.
- Gordon, M.H., Miller, L.A.D. (1997). Development of steryl ester analysis for the detection of admixtures of vegetable oils.
JAOCS, 74, 505-510.
- Grüneberg, W.J., Goffman, F.D., Velasco, L. (1999). Characterization of yam bean (*Pachyrhizus* spp.) seeds as potential sources of high palmitic acid oil.
JAOCS, 76, 1309-1312.
- Gunjal, B.B., Wankhede, D.B., Katake, R.S., Taur, A.T. (1986). Water vapour adsorption by corn and rice flours.
Food Science and Technology, 24, 38-40.
- Ganther H.E., Kraus R.J., Foster S.J. (1984). Identification of selenocysteine by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Methods in enzymology*. 107, 582-592.
- Guppy, H.B. (1917). Plants, seeds and currents in the west Indies and Azores. Williams & Norgate, Covent Garden, London.

- Guyot J.P., Loiseau G., Montet D. (2001). Produits liquides fermentés riches en céréales, procédés d'élaboration et utilisation comme boissons.
Brevet français N° FR 0013863.
- Hanras, C., Perrin, J.L. (1991). Gram-Scale Preparative HPLC of phospholipids from soybean lecithins.
JAOCS, 68, 804-808.
- Haraldsson, G.G., Thorarensen, A. (1999). Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase.
JAOCS, 76, 1143-1149.
- Hashim, I.B., Koehler, P.E., Eitenmiller, R.R. (1993). Tocopherols in runner and virginia peanut cultivars at various maturity stages.
JAOCS, 70, 633-635.
- Hayes, K.C., Pronczuk, A., Lindsey, S., Diersen-Schade, D. (1991). Dietary saturated fatty acids (12:0; 14:0; 16:0) differ in their impact plasma cholesterol and lipoproteins in nonhuman primates.
Am. J. Clin. Nutr., 53, 491-498.
- Heinonen, M., Haila, K., Lampi, A.M., Piironen, V. (1997). Inhibition of oxidation in 10% oil-in-water emulsions by β -Carotene with α - and γ -tocopherols.
JAOCS, 74, 1047-1052.
- Helrich, K. (1990). Official Methods of Analysis. Moisture in nuts and nut products.
In : *Association of Official Analytical Chemists*, 949. Volume Two. 15th Edition.
- Hernandez, N., Rodriguez, M. E., Gonzalez, F., Lopez-Munguia, A. (2000). Enzymatic treatment of rice bran to improve processing.
JAOCS, 77, 177-180.
- Hildebrand, D.H., Terao, J., Kito, M. (1984). Phospholipids plus tocopherols increase soybean oil stability.
JAOCS, 61, 552-555
- Ho, C.C., Chow, M.C. (2000). The effect of the refining process on the interfacial properties of Palm oil.
JAOCS, 77, 191-199.
- Hoffmann, P., Block, H.U., Betiz, J., Taube, Ch., Forster, W., Wortha, P., Singer, P., Naumann, E., Heine, E. (1986). Comparative study of the blood pressure effects of four different vegetable fats on young, spontaneously hypertensive rats.
Lipids, 21, 733-737.
- Hollo, J., Perédi, J., Ruzics, A., Jeranek, M., Erdély, A. (1993). Sunflower lecithin and possibilities for utilization.
JAOCS, 70, 997-1001.

- Hong, Y., Proctor, A., Shultz, J. (2000). Acid-treated soy hull carbon structure and adsorption performance.
JAOCS, 77, 785-790.
- Hu, S-P., Pan, B.S. (2000). Modification of Fish oil aroma using a macroalgal lipoxygenase.
JAOCS, 77, 343-348.
- Hudson, B.J.F., Ghavami, M. (1984). Phospholipids as antioxidant synergists for tocopherols in the autoxidation of edible oils.
Lebensm.-Wiss.u. Technolo., 17, 191-194
- Hudson, B.J.F., Mahgoub, S.E.O. (1981). Synergism between phospholipids and naturally occurring antioxidants in leaf lipids.
J. Sci. Food Agric., 32, 208-210.
- Hulse, J.H., Rachie, K.O., Billingsley, L.W. (1977). Nutritional standards and methods of evaluation for food legume breeders. Ottawa, IDRC, 78.
- Hwang, K.T., Maerker, G. (1993). Quantification of cholesterol oxidation products in unirradiated and irradiated meats.
JAOCS, 70, 371-375.
- Ingvarsdn, L., Michaelsen, S., Sorensen, H. (1994). Analysis of individual phospholipids by High-Performance Capillary Electrophoresis.
JAOCS, 71, 183-188.
- Inoue, K., Nayeshirot, H., Inouye, H., Zenk, M. (1981). Anthraquinones in cell suspension cultures of *Morinda Citrifolia*.
Phytochemistry, 20, 1693-1700.
- Ip, C., Lisk, D.J. (1994). Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance.
Nutrition and Cancer, 21, 203-212.
- Ismail, A.A., van de Voort, F.R., Emo, G., Sedman, J. (1993). Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy.
JAOCS, 70, 335-341.
- Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1974). Sterols and methylsterols in some tropical and subtropical vegetable oils.
Oléagineux, 5, 253-258.
- Ivan, S.P., Herr, A., Nelson, T. (1982). Toxicity of selenium in Brazil nuts to rats.
J. Food Sci., 47, 1595-1597.
- Jacobsohn, M.K., Esfahani, M., Jacobsohn, G.M. (1986). Correlation of side chain mobility with cholesterol retention by phospholipid vesicles.
Lipids, 21, 691-696.

- Jahaniaval, F., Kakuda, Y., Marcone, M.F. (2000). Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five *Amaranthus* accessions and their comparison to other oils.
JAOCS, 77, 847-852.
- Janero, D.R., Burghardt, B. (1989). Cardiac membrane vitamin E and malondialdehyde levels in heart muscle of normotensive and spontaneously-hypertensive rats.
Lipids, 24, 33-38.
- Janssens, R.J. (2000). *Calendula* oil: seed classification, oil processing and quality aspects.
Lipid Technology, 53-57.
- Jensen, C., Lauridsen, C., Bertelsen, G. (1998). Dietary vitamin E: Quality and storage stability of pork and poultry.
Trends in Food Science and Technology, 9, 62-72.
- Juneja, L.R., Yamane, T., Schimizu, S. (1989). Enzymatic method of increasing phosphatidylcholine content of lecithin.
JAOCS, 66, 714-717.
- Kaitaranta, J.K. (1992). Control of lipid oxidation in Fish oil with various antioxydative compound.
JAOCS, 69, 810-813.
- Kamal-Eldin, A., Andersson, R. (1997). A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils.
JAOCS, 74, 375-380.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A. (1994). Variation in the composition of sterols, tocopherols and lignans in seed oils from sesaum species.
JAOCS, 71, 149-156.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienol.
Lipids, 31, 671-701.
- Kamal-Eldin, A., Yousif, G., Appelqvist, L.A. (1991). Thin-Layer Chromatographic Separations of seed oil unsaponifiables from four *Sesamum species*.
JAOCS, 68, 844-847.
- Kashima, M., Cha, G.S., Isoda, Y., Hirano, J., Miyazawa, T. (1991). The antioxidant effects of phospholipids on Perilla oil.
JAOCS, 68, 119-122.
- Khantisophon N., Montet D., Loiseau G., Rakshit S.K., Stevens W.F. (2003). Formulation of nutritional cassava starch beverage.
Starch / starke, soumis à publication.

- Kilham, C. (2001). Noni (*Morinda citrifolia*) fruit and its uses. Penton. Copyright© 2001 Penton Media, Inc.,1-4.
- Kim Lai An Quan (1975). Une médecine humaine, 4554/74 BDVCH/PHBCN/ALP/TP, 120.
- King, M, F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W. (1992). Antioxydant properties of individual phospholipids in a Salmon oil model system. *JAOCS*, 69, 545-551.
- Koga, T., Terao, J. (1994). Antioxidant activity of a novel phosphatidyl derivative of vitamin E in lard and its model system. *JAOCS*, 42, 1291-1294.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E. (1999). Effect of extraction system, stage of ripeness, and kneading temperature on the sterol composition of virgin Olive oils. *JAOCS*, 76, 1477-1481.
- Krespine V.(1997). Mise au point d'une boisson amylacée fermentée. Mémoire d'ingénieur Agronome ENSAM Montpellier/Cirad.
- Kuck, J.C., Angelo, A.J.St., Ory, R.L. (1978). A single-phase system for TLC analysis of amino acids, lipoperoxides, and their reaction products. *Oléagineux*, 33, 507-512.
- Kulkarni, A.S., Khotpal, R.R., Bhakare, A.H., Bhakare, H.A. (1991). Phospholipids and glycolipids in the oil from tenera variety of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Indian oil palm journal*, 1, 7-11.
- La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, 74, 311-314.
- Lampi, A.M., Hopia, A., Piironen, V. (1997). Antioxidant activity of minor amounts of γ -tocopherol in natural triacylglycerols. *JAOCS*, 74, 549-555.
- Lampi, A.M., Kataja, L., Kamal-Eldin, A., Vieno, P. (1999). Antioxidant activities of α - and γ -tocopherols in the oxidant of Rapeseed oil triacylglycerols. *JAOCS*, 76, 749-755.
- Landry J. (1979). Extraction séquencée des protéines du grain d'orge. C.R. Acad. Sc. Paris. 288, série D – 907.
- Landry J., Moureaux T. (1970). Hétérogénéité des glutélines de maïs : extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. Bulletin de la société de chimie biologique. 52, 10, 1021-1037.
- Larkeson, B., Dutta, P.C., Hansson, I. (2000). Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. *JAOCS*. 77, 675-680.

- Lecerf, J.M., Borgiès, B. (2002). Effets de l'huile de soja sur les lipoprotéines plasmatiques et le risque cardiovasculaire chez l'homme et la femme. *OCL*, 9, 96-99.
- Lee, K-T., Foglia, T.A. (2000). Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *JAOCS*, 77, 1027-1034.
- Léonil J., Gagnaire V., Mollé D., Pezenec S., Bouhallab S. (2000) : Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derivated peptides. *Journal of Chromatography. A* 881, 1-21.
- Li, H., Voort, F.R., Ismaili, A.A., Cox, R. (2000). Determination of peroxide value by Fourier Transformation Near-Infrared Spectroscopy. *JAOCS*, 77, 137-142.
- Liang, J.H., Hwang, L.S. (2000). Fractionation of squid visceral oil ethyl esters by Short-Path distillation. *JAOCS*, 77, 773-777.
- Lin, C.S., Zayas, J.F. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: Fat binding capacity and water retention. *J. Food Sci.*, 52, 1308-1311.
- Linow, F., Mieth, G. (1976). Fat stabilizing action of phosphatides. Part 3. Synergistic action of various phosphatides]. *Nahrung*, 20, 19-24.
- Lioret S. (1996). Etude de la faisabilité de boissons végétales amylicées. Mémoire d'ingénieur Agronome. INA-PG Paris-Grignon/Cirad.
- List, G.R., Orthoefer, F., Taylor, N., Nelsen, T., Abidi, S.L. (1999). Characterization of phospholipids from glyphosate-tolerant soybeans. *JAOCS*, 76, 57-60.
- Lochman, R., Brown, R. (1997). Soybean-lecithin supplementation of practical diets for Juvenile goldfish (*Carassius auratus*). *JAOCS*, 74, 149-152.
- Loke, K.H. (1992). Summary of research findings on Palm oil nutrition appearing in nutrition research, April 1992 (Supplement). In: *Nutrition Research on Palm Oil : 1983-1992*. *Palm Oil Developments*, 17, 14-19.
- Lozano, Y. (1999). Application of membrane separative technics to tropical fruit transformation : some examples in developing countries P.E.D. : Dossier "Membranes". *Boissons bios conditionnement*, 30, 31-34.

- Lozano, Y.F., Mayer, C.D., Bannon, C., Gaydoub, E.M. (1993). Unsaponifiable matter, total sterol and tocopherol contents of Avocado oil varieties. *JAOCS*, 70, 561-565.
- Lubrano, C., Robin, J.R., Khaiat, A. (1994). Composition en acides gras, stérols et tocophérols d'huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. *Oléagineux*, 49, 59-65.
- Lugand C. (1997). Formulation d'un lait d'amande biologique. Mémoire d'ingénieur ISIM, Montpellier/Cirad.
- Machlin, L.J., Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1, 441-445.
- Maerker, G., Jones, K.C.(1992). Gamma-irradiation of individual cholesterol oxidation products. *JAOCS*, 69, 451- 455.
- Mäkinen, M., Kamal-Eldin, Afaf., Lampi, A.M., Hopia, A. (2000). Effects of α - and γ -tocopherols on formation of hydroperoxides and two decomposition products from methyl linoleate. *JAOCS*, 77, 801-806.
- Malcolmson, L.J., Przybylski, R., Daun, J.K. (2000). Storage stability of milled flaxseed. *JAOCS*, 77, 235-238.
- Matthäus, B.W. (1996). Determination of the oxidative stability of vegetable oils by Rancimat and Conductivity and Chemiluminescence measurements. *JAOCS*, 73, 1039-1043.
- McCord, J.M. (1994). Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. *Food Technology*, 48, 106-111.
- Medina-Juarez, L.A., Gamez-Meza, N., Ortega-Garcia, J., Noriega-Rodriguez, J. A., Angulo-Guerrero, O. (2000). *Trans* fatty acid composition and tocopherol content in vegetable oils produced in Mexico. *JAOCS*, 77, 721-724.
- Méthodes d'Analyse Unifiées Par La Section des Matières Grasses de L'I.U.P.A.C. 5^e Edition. 1965. Londres. Dosage de l'insaponifiable, 3F.
- Meydani, M., Macauley, J.B., Blumberg, J.B. (1986). Influence of dietary vitamin E, selenium and age on regional distribution of α -tocopherol in the rat brain. *Lipids*, 21, 786-791.

- Minguéz-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, M.L. (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin Olive oil by High-Performance Liquid Chromatography. *JAOCS*, 40, 60-63.
- Moh, M.H., Che Man, Y.B., van de Voort, F.R., Abdullah, W.J.W. (1999). Determination of peroxide value in thermally oxidized crude Palm oil by Near Infrared Spectroscopy. *JAOCS*, 76, 19-23.
- Morr, C.V. (1982). Recalculated nitrogen conversion factors for several soybean protein products. *J. Food Sci.*, 47, 1751-1752.
- Morton, J.F. (1992). The Ocean-Going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its "Colorful" relatives. *Economic Botany*, 46, 241-256.
- Nawar, W.W. (1985). Lipides. In : *Food Chemistry* (Fennema, O.R., ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, 139.
- Nesarethnam, K. (1992). Dietary fats and cancer with special reference to Palm oil. *Palm Oil Developments*, 17, 5-11.
- NG, T.K.W., Hayes, K.C., De Witt, G.F., Jegathesan, M., Satgunasingham, N., Ong, A.S.H., Tan, D.T.S. (1992). Palmitic and oleic acids exert similar effects on serum lipid profile in normocholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, 11, 383-390.
- Nwosu, C.V., Boyd, L.C., Sheldon, B. (1997). Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index. *JAOCS*, 74, 293-297.
- O'Keef, S.F., Wiley, V.A., Knauff, D.A. (1993). Comparison of oxidative stability of high-and normalic-oleic Peanut oils. *JAOCS*, 70, 489-492.
- Oderine, R.A. (1990). Chemical and technological characteristics of *Lagenaria Breviflora* seed: a lesser now cucurbit. *Seifen-Öle-Fette-Waachse-116. Jg.-Nr.*, 809-810.
- Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists 15 th Edition. Volume Two (1990).USA. Ash of flour. Direct method. In: *Cereal Foods*, 777.
- Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists 15 th Edition. Volume Two (1990).USA. Solids (Total) and moisture in flour. Air oven method, 777.

- Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists 15 th Edition. Volume Two (1990).USA. Specific gravity of oils. Pycnometer method. In: *Oils and Fats*, 951.
- Office of Dietary Supplements (2000). National Institutes of Health, 6100. Executive Blvd., Room 3B01, MSC 7517, Bethesda, MD 20892-7517, 1-8.
- Ohshima, T., Fujita, Y., Koizumi, C. (1993). Oxidative stability of sardine and mackerel lipids with reference to synergism between phospholipids and α -tocopherol. *Ibid.*, 70, 269-276
- Ohshima, T., Li, N., Koizumi, C. (1993). Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. *JAOCS*, 70, 595-599.
- Olcott, H. S., Van Veen, J. (1963). Role of individual phospholipids as antioxidants. *J. Food Sci.*, 28, 313-315.
- Olle, D.; Bron, A.; Lozano, Y. F.; Sznaper, C.; Baumes, R.; Bayonove, C.; Brillouet, J. M. (1997). Microfiltration and reverse osmosis affect recovery of mango puree flavor compounds. *J. Food Sci.*, 62, 1116-1119,
- Osada, K., Ravandi, A., kuksis, A. (1999). Rapid analysis of oxidized cholesterol derivatives by High-Performance Liquid Chromatography combined with Diode-Array Ultraviolet and Evaporative Laser Light-Scattering detection. *JAOCS*, 76, 863-871.
- Palmer, I.S., Herr, A., Nelson, T. (1982). Toxicity of selenium in Brazil nuts to rats. *J. Food Sci.*, 47, 1595-1597.
- Paz, I., Molero, M. (2000). Catalytic effect of solid metal on thermal stability of Olives oils. *JAOCS*, 77, 127-130.
- Pearce, B.C., Parker, R.A., Deason, M.E., Qureshi, A.A., Wright, J.J.K. (1992). Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. *J. Med. Chem.*, 35, 3595-3606.
- Peerzada, N., Renaud, S., Ryan, P. (1990). Vitamin C and elemental composition of some bushfruits. *J. Pl. Nutr.*, 13, 787-793.
- Pérez-Galvez, A., Garrido-Fernandez, J., Minguéz-Mosquera, I. M., Lozano-Ruiz, M., Montero-de-Espinosa, V. (1999). Fatty acid composition of two new pepper varieties (*Capsium annum* L. cv. Jaranda and Jariza). Effect of drying process and nutritional aspects. *JAOCS*, 76, 205-208.

- Pérez-Galvez, A., Garrido-Fernandez, J., Minguez-Mosquera, M.I. (2000). Effect of high-oleic sunflower seed on the carotenoid stability of ground pepper. *JAOCs*, 77, 79-83.
- Petelot, A. (1953). Plantes medicinales du Cambodge, du Laos et du Vietnam.#18. Centre de Rech.Sci. et Tech., Arch. des Rech. Agron. au Camb., au Laos et au Vietnam, Saigon.
- Petritis K., Chaimbault P., Elfakir C., Dreux M. (2000). Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A* 896, 253-263.
- Philips, R.D., Sternberg, M. (1979). Corn protein concentrate: Functional and nutritional properties. *J. Food Sci.*, 44, 1152.
- Piva, G., Santi, E., Ekpenyong, T. (1971). Nutritive value of cashewnut extraction meal. *J. Sci. Food Agric.*, 22, 22-23
- Pizzoferrato, L., Nicoli, S., Lintas, C. (1993). GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products. *Chromatographia*, 35, 269-274.
- Plank, C.B., Slikkerveer, L.S. (2000). Analysis of triacylglyceride hydroperoxides in vegetable oils by Nonaqueous Reversed-Phase High- Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection. *JAOCs*, 77, 477-482.
- Platon, J. F. (1997). Lipides et cosmétologie. *Oléagineux Corps gras Lipides*, 4, 275-280.
- Poiana M., Giuffré A.M., Postorino S., Tramontana A., Mincione B., Monastra F., Tamponi G., Militano L. (1996). Ricerche sulla frutta esotica Pecan (*Carya illinoensis*, Koch). Nota II Caratterizzazione della frazione lipidica. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 73, 29-36.
- Pokorny, J., Marcin, A., Davidek, J. (1982). Stability of phospholipid-enriched Sunflower seed oil against oxidative rancidity. *Scientific Papers of the Prague Institute of Chemical Technology*, 53, 7-23.
- Potter, N. N. (1986). Carbohydrates and organic acids. In: *Food Science*. Department of Food Science. Cornell University. Ithaca, New York.
- Procédure Opérationnelle. Analyse du Soufre Total. Cirad-Amis/Agronomie. Code: N° PP0909. In : *Analyse de Végétaux*, 5 (2002).
- Procédure Opérationnelle. Détermination de la cellulose brute Cirad-Amis/Paa. Code : PC0930B, 1-7 (2001).

- Procédure Opérationnelle. Détermination de l'acidité de l'huile. Cirad-Amis/Paa
Code : PC0916A, 1-6 (1999).
- Procédure Opérationnelle. Détermination de l'indice de peroxyde des huiles.
Cirad-Amis/Paa. Code : PC0917A, 1-8 (1999).
- Procédure Opérationnelle. Détermination de la matière minérale de l'huile des
tourteaux. Cirad-Amis/Agronomie. Code : N° PP0912.
In : *Analyse de Végétaux*, 3 (2002).
- Procédure Opérationnelle. Détermination de la teneur en azote total.
Cirad-Amis/Agronomie. Code: N°PS0931. In : *Analyse de Végétaux*, p.4 (2002).
- Procédure Opérationnelle. Détermination de la teneur en matière grasse.
Cirad-Amis/Paa .Code: PC0918A, 1-5 (2000).
- Procédure Opérationnelle. Dosages de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Se par spectrométrie
d'émission plasma I.C.P. Cirad-Amis/Agronomie. Code : I.L. ICP.
In : *Analyse de Végétaux*, 3 (2002).
- Procédure Opérationnelle. Dosage des anions organiques par chromatographie
ionique. Cirad-Amis/Paa .Code: PC0911B, 1-7 (2001).
- Procédure Opérationnelle. Dosage des mono et disaccharides par chromatographie
ionique DX600.
Cirad-Amis/Paa. Code : PC08A, 1-7 (2001).
- Procédure Opérationnelle. Extraction des sucres au reflux d'éthanol à 80 %.
Cirad-Amis/Paa. Code: PC 0901A, 1-6 (1999).
- Procédure Opérationnelle. Minéralisation par voie sèche et destruction de la silice par HF.
Cirad-Amis/Agronomie. Code : PP0904.
In : *Analyse de Végétaux*, 2 (2002).
- Procédure Opérationnelle. Préparation des Esters Méthyliques.
Cirad-Amis/Paa. Code: PC0919A, 1-6 (1999).
- Przbylski, R., Eskin, N.A.M. (1991). Phospholipid composition of Canola oils
during the early stages of processing as measured TLC with Flame ionization detector.
JAOCS, 68, 241-244.
- Qureshi, A.A., Burger, W.C., Peterson, D.M., Elson, C.E. (1986). The structure of an
inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley.
J. Biol. Chem., 261, 10544-10550.
- Rafidison, P., Baillet, A., Baylocq, D., Pellerin, F. (1987). Etude de l'huile des graines de
Voacanga africana.
Oléagineux, 42, 299-302.

- Rahmani, M., Csallany, S. (1998). Role of minor constituents in the photooxidation of virgin Olive oil.
JAOCS, 75, 837-843.
- Rakipov, N. (1987) Agrumès.
In: *Biochimie des Cultures Tropicales*, 313-331.
Moscou, Mir.
- Rakipov, N. (1987) Classification des protéines.
In: *Biochimie des Cultures Tropicales*, 38-39.
Moscou, Mir.
- Rakipov, N. (1987) Cultures fruitières.
In: *Biochimie des Cultures Tropicales*, 288-306.
Moscou, Mir.
- Rakipov, N. (1987). Cultures oléagineuses.
In: *Biochimie des Cultures Tropicales*, 248-263.
Moscou, Mir.
- Rakipov, N. (1987). Lipides.
In: *Biochimie des Cultures Tropicales*, 125-140.
Moscou, Mir.
- Rakipov, N. (1987). Plantes à tubercules.
In : *Biochimie des Cultures Tropicales*, 269-285.
Moscou, Mir.
- Rakipov, N. (1987). Protéines et acides aminés.
In: *Biochimie des Cultures Tropicales*, 23-29.
Moscou, Mir.
- Randerath, K. (1962). Chromatographie sur couches minces.
Institut de chimie organique de Darmstard (Allemagne).
- Reilly, C. (1998). Selenium: A new entrant into the functional food arena.
Trends in Food Science and Technology, 9, 114-118.
- Reverchon, E., Poletto, M., Osséo, L.S., Somma, M. (2000). Hexane elimination from Soybean oil by continuous packed tower processing with supercritical CO₂.
JAOCS, 77, 9-14.
- Rusia, K., Srivastava, S.K. (1989). A new anthraquinone from the roots of *Morinda Citrifolia* LINN.
Current Science, 58, 249-252.
- Saito, H., Takeuchi, M. (1989). A study on antioxidative substances in brown meal.
Agri. Biol. Chem., 53, 539-540.

- Saito, H., Ishihara, K. (1997). Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants.
JAOCS, 74, 1531-1536.
- Samuel, S.M., Leung, F.W., Tomic, J.C. (1987). Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) proteins: Fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein.
J. Agric. Food Chem., 35, 232-235.
- Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., Millan, F. (1998). Neutral lipids of chickpea flour and protein isolates.
JAOCS, 75, 851-855.
- Sant'Ana, L.S., Mancini-Filho, J. (2000). Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets.
Food Chemistry, 68, 175-178.
- Saura-Calixo, F., Canellas, J., Garcia-Raso, A. (1980). Gas chromatographic analysis of sugars and sugar-alcohols in the mesocarp, endocarp and kernel of almond fruit.
J. Agric. Food Chem., 32, 1018.
- Savage, G.P., McNeil, D.L., Dutta, P.C. (1997). Lipid composition and oxidative stability of oils in Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) grown in New Zealand.
JAOCS, 74, 755-759.
- Savage, G.P., Dutta, P.C., McNeil, D.L. (1999). Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of Walnut oils
JAOCS, 76, 1059-1063.
- Schmitt-Rozieres, M., Deyris, V., Comeau, L.C. (2000). Enrichment of polyunsaturated fatty acids from Sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification.
JAOCS, 77, 329-332.
- Schneider. (1989). Lecithines: Additifs et Aliments.
IAA, 735-737.
- Schmitt-Rozieres, M., Deyris, V., Comeau, L.C. (2000). Enrichment of polyunsaturated fatty acids from Sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification.
JAOCS, 77, 329-332.
- Scholfield, C.R., Szuhaj, B.F., Lind, G.R. (1985). Lecithins.
JAOCS, 1-20.
- Schuler, P. (1990).
In : *Food Antioxydant* (Hudson, B.J.F., ed.), Elsevier Applied Science, London and New York, 99-170.
- Segawa, T., Hara, S., Totani, Y. (1994). Antioxidative behavior of phospholipids for polyunsaturated fatty acids of fish oil.
II, *Yukagaku* (Jpn.) 43, 515-519.

- Sekhon, K.S., Gupta, S.K., Ahuja, K.L., Jaswal, S.V. (1980). Variability in fatty acid composition in semi-spreading peanut types. *Oléagineux*, 35, 409-411.
- Shahidi, F. (1997). Antioxidants from cereals and legumes. In: *Natural Antioxidants*. Department of Biochemistry Memorial University of Newfoundland St. John's, Newfoundland, Canada.
- Shahidi, F., Naczk, M. (1995). In : *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*, Technomic Publ. Co., Lancaster and Basel, 235-277.
- Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J. (1992). Phenolic antioxidants. *CRC. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 67-103.
- Shibata, S.S., Terao, J., Matsushita, S. (1986). Limitations of the method using peroxidase activity of hemoglobin for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 21, 792-795.
- Shih, F.F., Daigle, K.W. (2000). Preparation and characterization of rice protein isolates. *JAOCs*, 77, 885-889.
- Shimada, K., Muta, H., Nakamura, Y., Okada, H., Matsuo, K., Yoshioka, S., Matsudaira, T., Nakamura, T. (1997). Iron-binding property and antioxidative activity of xanthan on the autoxidation of soybean oil in emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1607-1611.
- Shimada, Y., Nakai, S., Suenaga, M., Sugihara, A., Kitano, M., Tominaga, Y. (2000). Facile purification of tocopherols from Soybean oil deodorizer distillate in high yield using lipase. *JAOCs*, 77, 1009-1013.
- Shin, T-S., Godber, J.S. (1993). Improved High-Performance Liquid Chromatography of vitamin E vitamers on Normal-Phase columns. *JAOCs*, 70, 1289-1291.
- Simon, P., Kolman, L., Niklova, I., Schmidt, S. (2000). Analysis of the induction period of oxidation of edible oils by Differential Scanning Calorimetry. *JAOCs*, 77, 639-642.
- Singleton, J.A., Stikeleather, L.F. (1999). A solvent extractor system for the rapid extraction of lipids and trace bioactive micronutrients in oil seeds. *JAOCs*, 76, 1461-1466.
- Singh, Y. N., Ikahihif, T., Paune, M., Slatter, C. (1984). Folk medicine in tonga. A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynaecological conditions and disorders. *J. Ethnopharmacol.*, 12, 305-329

- Singh, Y.N. (1986). Traditional medicine in Fiji: some herbal folk cures used by Fiji Indians.
J. Ethnopharmacol., 15, 57-88.
- Singleton, J.A. (1993). Enrichment of phospholipids from neutral lipids in Peanut oil by High-Performance Liquid Chromatography.
JAOCS, 70, 637-638.
- Singleton, J.A., Ruan, M., Sanford, J.H., Haney, C.A., Stikeleather, L.F.(1999). Separation and characterization of Peanut phospholipid molecular species using High-Performance Liquid Chromatography and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry.
JAOCS, 76, 49-56.
- Slade, L., Levine, F. (1991). Beyond water activity.
In: *recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety*.
Crit. Rev. Food Sci. Nut., 30, 115-360.
- Slater, T.F., Cheeseman, K.H., Davies, M.J., Proudfoot, K., Xin, W. (1987).
Proc. Nutr. Soc., 46, 1-12.
- Smiles, A., Kakuda, Y., MacDonald, B.E. (1988). Effect of degumming reagents on the recovery and nature of lecithins from crude Canola, Soybean and Sunflower oils.
JAOCS, 65,1151-1155.
- Smiles, A., Kakuda, Y., MacDonal, B.E. (1989). Effect of deguming reagents on the composition and emulsifying properties of Canola, Soybean and Sunflower acetone insolubles.
JAOCS, 66, 348-352.
- Smith, L. L. (1981).
In: *Cholesterol Autoxidation*, Plenum Press, New York.
- Smith, N.J.H., J.T. Williams, D.L. Pluckenett, Talbot J. P. (1992). Tropical forests and their crops. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press. 568.
- Stanley, J. (1999). Nutrition. Vitamin E - nutrient or pharmaceutical?
Lipid Technology, 36-39.
- Sun, S.S.M., Leung, W.F., Tomic, J.C. (1987). Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) proteins: Fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein.
J. Agric. Food Chem., 35, 232-235.
- Sun, S.S.M., Altenbach, S.B., Leung, W. (1987). Properties, biosynthesis and processing of a sulfur-rich protéine in Brazil nut (*Bertholletia* H.B.K.).
Eur. J. Biochem., 162, 477-483.
- Synder, M.J., King, J.W., Taylor, S.L., Neese, A.L. (1999). Concentration of phytosterols for analysis by supercritical fluid extraction.
JAOCS, 76, 717-721.

- Tamura, H., Shibamoto, T. (1991). Antioxydative activity measurement in lipid peroxidation systems with malonaldehyde and 4-hydroxy nonenal. *JAOCS*, 68, 941-943.
- Terra, G.J.A. (1966). Tropical vegetables: vegetable growing in the tropics and subtropics, especially of indigenous vegetables. (Comm. 54e). Royal Trop. Inst. of Neth., Org. for Int'l Assist., Amsterdam.
- Thomsen, M.K., Kristensen, D., Skibsted, L.H. (2000). Electron Spin Resonance Spectroscopy for determination of the oxidative stability of food lipids. *JAOCS*, 77, 725-730.
- Thorn, J., Robertson, J., Buss, D.H., Bunton, N.G. (1978). Trace nutrients. Selenium in British food. *Br. J. Nutr.*, 39, 391-396.
- Tian, K., Dasgupta, P.K., Shermer, W.D. (2000). Determination of oxidative stability of lipids in solid samples. *JAOCS*, 77, 217-222.
- Tompkins, C., Perkins, E.G. (2000). Frying performance of low-linolenic acid Soybean oil. *JAOCS*, 77, 223-229.
- Toro-Vazquez, J.F., Charo-Alonso, M.A., Pérez-Briceno, F. (1999). Fatty acid composition and its relationship with physicochemical properties of Pecan (*Carya illinoensis*) oil. *JAOCS*, 76, 957-965.
- Toschi T.G., Caboni M.F., Penazzi G., Lercker G., Capella P. (1993). A study on cashew nut oil composition. *JAOCS*, 70, 1017-1020.
- Trost, V.W. (1989). Characterization of Corn oil, Soybean oil and Sunflower oil nonpolar material. *JAOCS*, 66, 325-333.
- Tsuda, T., Osawa, T., Nakayama, T., Kawasaki, S., Ohshima, K. (1993) Antioxidant activity of pea bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract. *JAOCS*, 70, 909-913.
- Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée. Division Chimie Appliquée Section des Matières Grasses (1965). Détermination de l'insaponifiable. Méthode à l'oxyde d'éthyle. In : *Méthodes d'Analyse Unifiées Par la Section des Matières Grasses de L'I.U.P.A.C.*, 3F.II.D.5. 5^e Edition incorporant premier supplément jusqu'à 1965 incl. Londres.
- Vaillant, F., Millan, P., O'Brien, G.M., Dornier, M., Decloux, M., Reynes, M. (1999). Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *J. of Food Engineering*, 42, 215-224.

- Vaillant, F., Jeanton, E., Dornier, M., O'Brien, G.M., Reynes, M., Decloux, M. (2001). Concentration of passion fruit juice on an industrial pilot scale using osmotic evaporation. *J. of Food Engineering*, 47, 195-202.
- Villanueva A., Vioque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Bautista J., Millan F. (1999) : Production of an extensive protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo- proteases. *Grasas y aceites*, 50, 472-476.
- Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Millan, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *JAOCS*, 77, 447-450.
- Vonderheide, A.P., Wrobel, K., Kannamkumarath, S.S., B'Hymer, C., Montes-Bayon, M., M., de Leon, C. P., Caruso, J.A. (2002). Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5722-5728.
- Von Schler, A., Löschner, D. (1985). Natürliche Antioxidantien V, Antioxidantien und Synergisten aus antarktischen Krill. *Fette Seifen Anstrichm.*, 87, 454-457.
- Waneissi, J.E. (1993). Composition en acides aminés. In : *Enrichissement en Protéines et Probiotiques du Tourteau de Coprah*, 9. Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en coopération. Laboratoire de Biotechnologie " Physiologie et métabolisme cellulaire". 911, Avenue Agropolis. 34032 Montpellier Cedex 1.
- Wang, T., Hammond, E.G., Cornette, J.L., Ferh, W.R. (1999). Fractionation of soybean phospholipids by High-Performance Liquid Chromatography with an Evaporating Light-Scattering detector. *JAOCS*, 76, 1313-1321.
- Wang, M.Y., Su, C. (2001). Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 952, 161-162.
- Wang, T., Hammond, E.G., Ferh, W.R. (1997). Phospholipid fatty acid composition and stereospecific distribution of soybeans with a wide range of fatty acid composition. *JAOCS*, 74, 1587-1594.
- Wang, Y., Gordon, M.H. (1991). Effect of phospholipids on enzyme-catalyzed transesterification of oils. *JAOCS*, 68, 588-590.
- Warner, K., Mounts, T.L. (1990). Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with Evaporative Light-Scattering detection. *JAOCS*, 67, 827-830.

- Wäsche, A., Borcherdig, A., Luck, T. (1998). Production of plant protein isolates: Influence of extraction and precipitation parameters on overall yield and protein concentration. Communications presented at the conference on plant proteins from European Crops, 265-271.
- Wauchop, R.D. (1978). Selenium and arsenic levels in soybeans from different production regions of the united states.
J. Agric. Food Chem., 26, 226-228.
- Wennermark, B., Ahlmén, H., Jägerstad, M. (1994). Improved vitamin E retention by using freshly milled whole-meal wheat flour during drum-drying.
J. Agric. Food Chem., 42, 1348-1351.
- White, P.J., Xing, Y. (1996). Antioxidants from Cereals and Legumes.
In: *Natural Antioxidants*. Ed. Shahidi, F. 414 (25-60).
- WHO (1973). Trace elements in human nutrition. Report of a WHO expert committee.
Wld Hlth Org. Techn. Rep. Ser., 532, 1-65. Geneva.
- Wijesundera, R.C., Ackman, R.G., Abraham, V., de Man, J.M. (1988). Determination of sulfur contents of vegetable and marine oils by Ion Chromatography and Indirect Ultraviolet Photometry of their combustion products.
JAOCS, 65, 1526-1530.
- Williams, J. (1980). Progrès récents de la recherche sur les acides gras essentiels.
Oléagineux, 35, 457-459.
- Wood, B.W., McMeans, J.L. (1982). Carbohydrates and fatty acids in developing pecan fruit.
J. Am. Soc. Hortic. Sci., 107, 47.
- Xing, Y., White, P.J. (1997). Identification and function of antioxidants from Oat Groats and Hulls.
JAOCS, 74, 303-307.
- Xu, R.S., Matsuo, T., Danno, G., Wakiuchi, N., Fujii, S. (1992). Fate of minor free amino acids and phospholipids in crude Tallow during steam splitting.
JAOCS, 69, 1043-1045.
- Xu, X., Fomuso, L.B., Akoh, C.C. (2000). Modification of Menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: Optimization by response surface design in a packed bed reactor.
JAOCS, 77, 171-176.
- Yaghmur, A., Aserin, A., Mizrahi, Y., Nerd, A., Garti, N. (1999). Argan Oil-In-Water Emulsions: Preparation and stabilization.
JAOCS, 76, 15-18.

- Yamada, K., Terao, J., Matsushita, S. (1987). Electrochemical detection of phospholipid hydroperoxides in Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Lipids*, 22, 125-128.
- Yan, P.S., White, P.J. (1990). Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 250-254.
- Yoshida, H., Tatsumi, M., Kajimoto, G. (1992). Influence of fatty acids on the tocopherol stability in vegetable oils during microwave heating. *JAOCS*, 69, 119-124.
- Yoshida, H., Kajimoto, G., Emura, S. (1993). Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *JAOCS*, 70, 989-995.
- Yoshida, H., Takagi, S., Ienaga, H., Tsuchiya, C. (1998). Regional distribution of tocopherols and fatty acids within soybean seeds. *JAOCS*, 75, 767-774.
- Younos, C., Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, M-C., Misslin, R., Mortier, F. (1990). Analgesic and Behavioural Effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med.*, 56, 430-434.
- Zhang, A., Chen, Z.Y. (1997). Oxidative stability of conjugated linolenic acids relative to other polyunsaturated fatty Acids. *JAOCS*, 74, 1611-1613.
- Zweier, J. (1988). Measurement of superoxide-derived free radicals in the reper fused heart. *J. Biol. Chem.*, 263, 1353-1357.

Références internet

- Agr (2002). Agriculture et Agroalimentaire Canada. Aliments fonctionnels et nutraceutiques. <http://www.agr.gc.ca/aliments/nff/fnutrace.html>, 1-2.
- Allnaturalcentral (2001). Natural products. <http://allnaturalcentral.com/catnoni.html>, 1-3.
- Almondsarein (2003). L'amande de Californie. Une mine de constituants protecteurs précieux pour la santé. Tableaux de composition Regal-versions 1995-1996. Apports Nutritionnels. <http://fr.almondsarein.com/health/nutrients.htm>, 1-3.
- Amabilia (2002). L'équipe d'Amabilia.com. Les nutraceutiques. http://www.amabilia.com/contenu/bienmanger/sec04_32.html, 1-2.

- Aprifel (2003). Fruits, légumes et santé.
http://www.aprifel.com/produits_composa.../tableau_prod.php?nom=Chou-fleur&index=7, 1-2.
- Aromatiques.tropicales (2002). Noix du Brésil *Bertholettia excelsa*. Origine : Brésil.
<http://perso.wanadoo.fr/aromatiques.tropicales/cataloguehtml/noixdubresil.html>, 1.
- Atn (2002). Agriculture et Agroalimentaire Canada. Aliments fonctionnels et nutraceutiques : points forts et possibilités d'investissement au Canada.
<http://atn-riae.agr.ca/invest/business2a-f.htm>, 1-3.
- Cam (2001). Le Jus de Noni de Tahiti.
<http://www.cam.org/~gilray/noni/faq-f.html>, 1-3.
- Cam (2001). Le Jus de Noni de Tahiti. Bref historique du nectar de Noni de Tahiti.
<http://www.cam.org/~gilray/noni/produits-f.html>, 1-6.
- Christie. © W.w. (2002). Sterols and sterol esters. Structure, occurrence and analysis. Scottish Crop Research Institute (and Mylnefield Research Services Lipid Analysis Unit), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland.
<http://www.lipid.co.uk>, 1-5.
- Clark, L. (2000). The major functions of selenium in the body.
In: *Selenium Information Sheet*.
<http://www.selenium.arizona.edu/MainWeb/SeInformation.htm>, 1-2
- Codina (2002). Huile de noix d'Amazonie- *Bertholettia excelsa* ou noix du Para, noix du Brésil, Casthana do Para.
<http://www.codina.net/cnbresil.shtml>, 1-2.
- Codina (2002). Huile de noix du Brésil-*Bertholletia excelsa*. Les produits cosmétiques et diététiques naturels.
<http://www.codina.net/cnbresil.htm>, 1.
- G. R, De C. (2003). Composition minérale de quelques ingrédients d'alimentation généralement pour les porcs (données sur la base comme alimentée).
http://ourworld.compuserve.com/homepage/gr_frank/tab11102.htm, 1-5.
- Csdm (2002). Noix du Brésil décortiquées (*Bertholettia excelsa*).
http://www.csdm.qc.ca/cemis/panier/aliments/viandes_et_substituts/noix_de_bresil.hm, 1.
- Danone (2003). Le guide des eaux minérales naturelles.
http://www.danoneconseils.com/magazine/dossier_arch08.html, 1-2.
- Danone (2003). Nutrition.
http://www.danoneconseils.com/magazine/dossier_arch08.html, 1-2.

- Dietobio (2003).
<http://www.dietobio.com/aliments/fr/noix.html>, 1-2.
- Dupin, H., Abraham, J., Giachetti, I. (1992). Apports Nutritionnels Conseillés pour la population française. Tec&Doc Lavoisier.
http://www.lactel.fr/franc/nut/spemin_inf2.htm, 1-2.
- E-sante (2003).
http://www.e-sante.fr/français/article_2866_73.htm, 1-3.
- E-sante (2003). Les Nutriments.
<http://www.e-sante.fr/français/article.asp?idarticle=2353&idrubrique=110>, 1-2.
- Fr.almondsarein (2003).
<http://fr.almondsarein.com/health/nutrients.htm>, 1-3.
- Freeyellow (2001). Noni Juice-Noni Juice from Polynesia. History and tradition of Noni.
<http://juice9.freeyellow.com/>, 1-6.
- Gened.emc.maricopa (2001). Photosynthesis.
<http://gened.emc.maricopa.edu/bio/bio181/BIOBK/BioBookPS.html>, 1-23.
- Godshaer (2001). Organic Wheatgrass Juice (Chlorophyll). Godshaer Herbalist. The HerbKing. Ducking Stool Lane. Christchurch. Dorset. BH23 1DS. England.
<http://www.godshaer.co.uk/chlorophyll.htm>, 1-3.
- Grace, M. (2001). Green : The color of health.
<http://healthunlimitedministries.org/chlorophyll.html>, 1-3.
- Heinicke, R.M. (2001). Xeronine-Noni Juice Enzyme.
<http://juice9.freeyellow.com/page2.html>, 1-5.
- Heinicke, R.M. (2001). The pharmacologically active ingredient of Noni .
<http://allnaturalcentral.com/catnoni.html>, 1-4.
- Hennessey, T. (2001). La noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*).
<http://www.siu.edu/~ebl/>, 1-3.
- Hmt (2001). Canoe plants of ancient Hawaii: Noni.
<http://www.hmt.com/noni/canoe.html>, 1-3.
- Huile (2002). Huile de noix d'Amazonie.
<http://www.huile.com/noixamazonietechnique.htm>, p.1-2.
- Inde Guzman, M.S. (2002). Chlorophyll, 1-2.
<http://www.garynull.com/Documents/NutrientHighlights/chlorophyll.htm>.
- Infonutrition (2002). Anti-oxydants-Selenium.
<http://www.infonutrition.org/antioxydants/selenium.html>, 1-2.

- Junglephotos (2002). Amazon plants. Brazil nut tree.
<http://www.junglephotos.com/plants/trees/commtrees/brzlnut.html>, 1-2.
- Readysoft (2002) International Nut Council. Brazil nut.
(<http://www.readysoft.es/inc/prods/brazil.html>), 1-2.
- Lactelo (2003). Minéraux et Oligo-éléments.
http://www.lactelo.fr/franc/nut/spemin_inf2.htm, 1-2.
- Larson, H.O. (2003). Natural products.
<http://allnaturalcentral.com/catnoni.html>, 1-3.
- Levand, O. (2003). Natural products.
<http://allnaturalcentral.com/catnoni.html>, 1-3.
- Livernais-Saettel, L. (2003). La noix *Juglans regia*.
<http://www.dietobio.com/aliments/fr/noix.html>, 1-3.
- Naturalhub (2002). Noix du Brésil.
In : *Le guide normale de nourriture des écrous communs*.
http://www.naturalhub.com/natural_food_guide_nuts_common.htm, 1-11
- Naturamedic (2001). Comprendre le miracle. Une introduction à la science du Noni.
<http://www.naturamedic.com/noni-doc.htm>, 1-6.
- Neyrat, P. (2001). Guides pratiques. Conseils de base en diététique - Les apports journaliers.
http://www.e-sante.fr/français/article_2866_73.htm, 1-2.
- Noniusers (2002). Independent Distributor of Morinda.
TAHITI NONI ® Juice.
<http://www.noniusers.com/1214835>, 1-12.
- Oundle, J.H. (1996). How can I quantify chlorophyll in leaves.
<http://www.saps.plantsic.cam.ac.uk/records/rec1.htm>, 1.
- Pbi.nrc (2002). Conseil National de Recherches Canada. Que ton aliment soit ta seule médecine.
<http://www.pbi.nrc.ca/fr/media/advance3.htm>, 1-2.
- Plantsterols (2002). Comment les stérols végétaux aident-ils à abaisser le cholestérol.
In : *What are Plant Sterols?*
<http://www.plantsterols.ca>, 1-2.
- Quattro, J.D. (2000). New USDA study shows plant sterols lower cholesterol. In : *ARS News & Information*.
<http://www.ars.usda.gov/is/pr/2000/000418.htm>, 1-3.
- Readysoft (2002). International Nut Council. La noix du Brésil.
<http://www.readysoft.es/inc/prods/brazil.html>, 1-2.

- Scifun.chem.wisc (2001). Chemical of the Week – Chelates and Chlorophyll.
<http://scifun.chem.wisc.edu/CHEMWEEK/Chel&Chlor/Chel&Chlor.html>, 1-5.
- Sheabutter (2001). Alimentation.
<http://www.sheabutter.com/FrAmazonia/Alimentation.htm>, 1-2.
- Sheabutter (2002). Botanique.
<http://www.sheabutter.com/FrAmazonia/Botanique.htm>, 1-3.
- Sheabutter (2002). Composition des noix de Brésil.
<http://www.sheabutter.com/FrAmazonia/Botanique.htm> , 1-3.
- Sheabutter (2002). Caracteristiques physico-chimiques.
<http://www.sheabutter.com/FrAmazonia/Composition.htm>, 1-2.
- Sheabutter (2002). Fabrication.
<http://www.sheabutter.com/FrAmazonia/Obtention.htm>, 1-2.
- Sheabutter (2002). Historique.
<http://www.sheabutter.com/FrAmazonia/histoire.htm>, 1-2.
- Smith, J. (2001). Stérols végétaux approuvés pour l'usage dans les produits alimentaires.
In : *La Science et Technologie*.
<http://www.headlines.com.au/tech/2001/june/002.html-8k>, 1-3.
- Steer, J. (2001). Structure and reactions of chlorophyll.
<http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/sterr/chloro.htm>, 1-6.
- Supertoinette (2002). Fiche noix du Brésil.
http://supertoinette.com/fiche_noix_bresil.htm, 1.
- Svplait (2003). Apports Nutritionnels Conseillés en oligo-éléments.
http://www.svplait.com/sante_n3_fiche.asp?recherche=minéraux%20de%20lait&fiche_id=, 1.
- Thorne (2003). Stérols végétaux et stérolins.
<http://www.thorne.com/altmedrev/plant6-2html>, 1-5
- Tomlinson, A. (2002). Plant Sterols and Sterolins.
In : *Phyto stérols and Stérolines*.
<http://www.sportron.com/phytoplex/sterolins1/html>, 1-2.
- Vet-lyon (2003). Composition chimique moyenne de tourteau.
In : *Tourteau : composition chimique*.
<http://www.vet-lyon.fr/ens/nut/webBromato/cours/cmtourte/compotou.html>, 1-3.
- Voedings (2003). Alimentation et Santé.
<http://www.voedingsinfo.org/fra/gezondhB8.htm>, 1-3.

- Voedings (2003). Les minéraux.
<http://www.voedingsinfo.org/fra/gezondhB8.htm>, 1-3.
- Voedings (2003). Sucres.
<http://www.voedingsinfo.org/fra/gezondhB2.htm>, 1-4.
- Whfreeman (2001). Rôle de lumière.
<http://www.whfreeman.com/life/update/>, 1-4.
- Whistler, A.W. (1992). Polynesian herbal medicine. National botanical garden. Hong Kong, 174.
<http://allnaturalcentral.com/catnoni.html>, 1-3
- Wikipedia (2001). Chlorophyll.
<http://www.wikipedia.com/wiki/Chlorophyll>, 1-3.
- Woodlandnut (2003). Almond Oil.
<http://woodlandnut.com/almond.html>, 1-3.
- Woodlandnut (2003). Walnut Oil.
<http://woodlandnut.com/walnut.html>, 1-2.

ANNEXES

ANNEXES A

A.1 : Quantité de protéine obtenue à partir du mélange tourteau de noix du Brésil/eau (10g/150mL) à différents pH de solubilisation et à pH de précipitation.

pH de solubilisation	Protéines obtenues (%) à pH de précipitation						
	4	5	6	7	8	9	10
4	1,8	0,68	4,5	6	7	6	6
5	5,5	1	1	2	3	3	3
6	7	7	1	1	1	1	1
7	16	17,70	12	1	1	1	1
8	16	19	0,3	1	2	0,4	0,4
9	16,6	19	14,7	1	0,5	0,4	0,4
10	16	20,5	13,2	3	2	1	1
10		22,8 pH 5,5	6,0 pH 6,5				

A.2 : Quantité de protéines obtenue avec une réduction de la quantité d'eau de 150 à 90 mL à partir du mélange tourteau de noix du Brésil/eau à pH de solubilisation fixé à 10 et à pH de précipitation fixé à 4 ou 5.

Tourteau (g)	Eau (mL)	pH de solub.	Protéines extraites (%) à pH de précipitation 4	Protéines extraites (%) à pH de précipitation 5
10	150	10	16	20
10	130	10	20	20
10	110	10	19	19
10	90	10	17	17

A.3 : Quantité de protéine obtenue avec une augmentation du rapport tourteau de noix du Brésil/eau à 100g/1300mL et 1500 mL à pH de solubilisation fixé à 10 et à pH de précipitation fixé à 5.

Tourteau (g)	Eau (mL)	pH de solub.	pH de précip.	Protéine (%)
100	1500	10	5	25
100	1300	10	5	25

A.4 : Quantité de protéines obtenues à partir de 10g de tourteau de noix du Brésil en réduisant la quantité d'eau à pH de solubilisation fixé à 10 et pH de précipitation fixé à 4 ou 5.

Volume d'eau (mL)	pH de solubilisation	Quantité obtenue (%) pH de précip. 4	Quantité obtenue (%) pH de précip. 5
130	10	20,33	20,70
110	10	19,22	19,19
90	10	17,79	17,97

A.5 : Quantité de protéines obtenues à partir de 10g de tourteau de noix du Brésil en réduisant la quantité d'eau à pH de solubilisation fixé à 10 et pH de précipitation fixé à 5 ou 5,5.

Eau (mL)	Protéines extraites (%) à pH 5,0	Protéines extraites (%) à pH 5,5
150	20,5	23
170	23	25
190	31	22
210	26	22
230	29	22
250	28	22

A.6: Quantité de protéines obtenues à partir du rapport tourteau de noix du Brésil/quantité d'eau variable à pH de solubilisation fixé à 10 et pH de précipitation fixé à 5,5.

Tourteau (g)	Eau (mL)	Protéines (%)
10	100	21
20	200	19,95
30	300	19,64
40	400	20,35
50	500	19,68

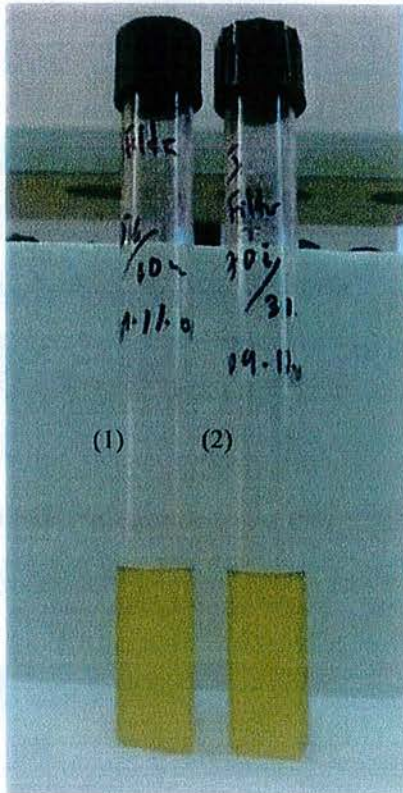


Photo 2 : Jus filtrés pasteurisés : (1) = 70°C/10 min, (2) = 70°C/30 min.

ANNEXES B



Photo 1 : Jus non pasteurisés : (1) jus initial non filtré, (2) retentât, (3) jus micro-filtré, (4) jus concentré par osmose inverse.

ANNEXE C

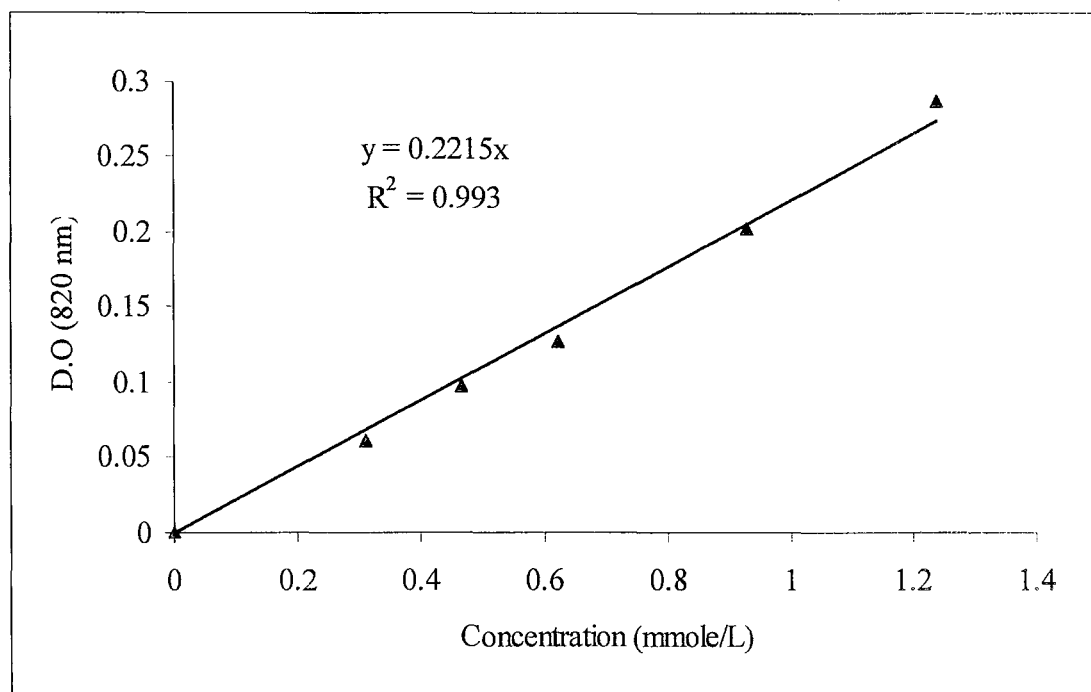


Figure 1 : Courbes standards des phospholipides.

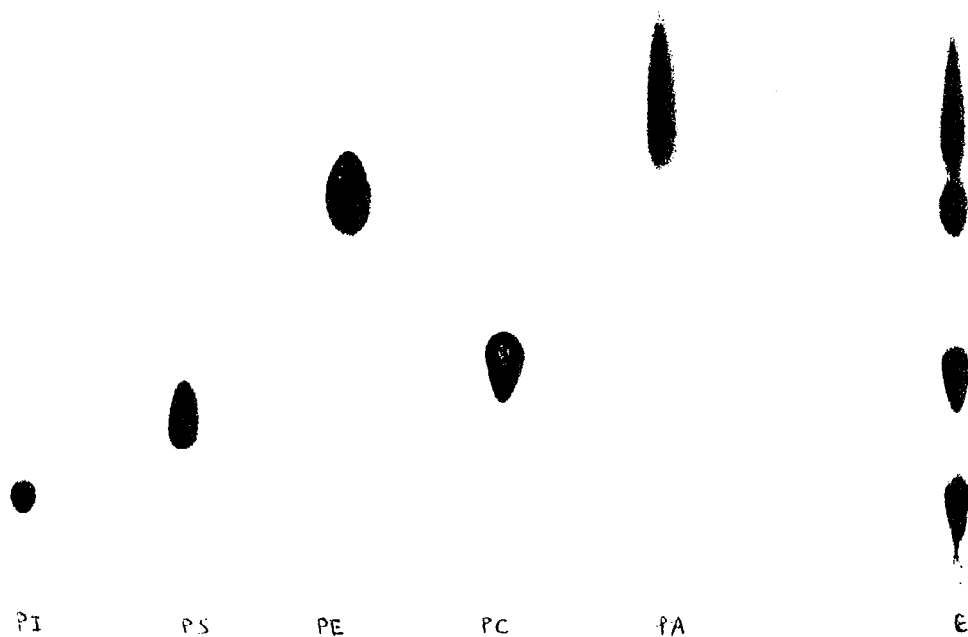


Figure 2 : Chromatogramme sur couche mince

- E : huile de noix du Brésil,
- PI : phosphatidylinositol,
- PS : phosphatidylsérine,
- PE : phosphatidyléthanolamine,
- PC : phosphatidylcholine,
- PA : acide phosphatidique.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Jean-Claude BACCOU, Professeur, LGBSA, Université de Montpellier

Monsieur Gérard VILAREM, Directeur CRT Catar, ENSIACET, Toulouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur CHUNHIENG Thavarith

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**" Développement de nouveaux aliments santé à partir de graines et fruits d'origine
tropicale : application à la noix du Brésil *Bertholettia excelsa* et au fruit du Cambodge
Morinda citrifolia "**

NANCY BRABOI
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAY
BOITE POSTALE
F - 54500
VANCEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 23 mai 2003

Le Président de l'I.N.P.

L. SCHUFFENECKER



JARL: Mille et une Feuilles

112 Faubourg Boutevin - 34000 Montpellier

Tel : 04.67.02.17.79. Fax : 04.67.61.10.67.

Email

RESUME

L'objectif de ce travail est de transformer deux produits de l'agriculture tropicale traditionnelle : la noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*) et le fruit de Noni (*Morinda citrifolia*) en aliments santé.

Ces produits naturels ont des teneurs importantes en molécules à propriétés médicinales, dont certaines comme les anti-oxydants, les lipides insaturés et les minéraux, ont été analysées.

L'huile de la noix du Brésil a été extraite et analysée finement (acides gras, stérols, tocophérols, phospholipides). Le tourteau issu de cette extraction est particulièrement riche en sélénium (126 ppm) qui est réputé pour ses pouvoirs anti-oxydatif et anti-radicalaire. Les protéines ont été séparées en 4 fractions. L'analyse par HPLC-SM de ces quatre fractions a prouvé que le sélénium est lié par une liaison covalente à deux acides aminés : la sélénométhionine et la séléncystéine. Le facteur de conversion azote/protéine a été recalculé à 6,97 en fonction de la composition en acides aminés de la protéine. Un lait de noix du Brésil particulièrement riche en sélénium a été produit par extraction directe sur les noix. La teneur élevée en sélénium de la noix du Brésil et de ses dérivés fait de ces produits une base pour la création d'aliments santé anti-radicalaires.

Un procédé d'extraction du jus de Noni a été optimisé à partir des fruits frais provenant du Cambodge. La composition biochimique et minérale des graines et du tourteau a été étudiée. Les acides gras, phospholipides, tocophérols et stérols ont été analysés dans toutes les fractions lipidiques. Le facteur de conversion azote/protéine a été recalculé à 7,05 en fonction de la composition en acides aminés de la protéine.

Le jus a été traité par microfiltration tangentielle et osmose inverse afin de le stabiliser au niveau microbiologique et physique. Le jus pasteurisé, de couleur jaune est stable durant au moins 4 semaines à température ambiante. La composition biochimique du jus, qui a montré la forte présence de molécules à propriétés anti-oxydantes, n'explique pas à elle seule les effets médicaux réputés du jus de Noni. Certaines de ces molécules et, en particulier, les alcaloïdes mériteraient d'être mieux étudiés.

Les travaux issus de cette thèse ont déjà permis à ces deux produits tropicaux de trouver des applications industrielles en para-pharmacie dans les pays développés.

SUMMARY

The objective of this study was to transform two products from traditional tropical agriculture: the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) and the fruit of Noni (*Morinda citrifolia*) into healthy food.

These natural products contain molecules with medicinal properties of which some like anti-oxidants, unsaturated lipids and minerals were analysed.

Brazil nut oil was extracted and analysed finely (fatty acids, sterols, tocopherols, phospholipids). The cake resulting from this extraction was particularly rich in selenium (126 ppm) which is famous for its anti-oxidative and anti-radicalising capacities. The proteins were split in 4 fractions. The analysis by HPLC-MS of these four fractions proved that selenium is covalently bound to selenomethionine and selenocysteine. The conversion factor nitrogen/protein was recomputed to 6,97 according to the composition in amino-acids of the protein. Brazil nut milk, particularly rich in selenium was produced by direct extraction on nuts. The high content in selenium of Brazil nut and its derivatives make these products a base for the formulation of anti-radicalising healthy food.

A process for the extraction of Noni juice was optimised starting from the fresh fruits coming from Cambodia. The biochemical and mineral compositions of seeds and cake were studied. The fatty acids, phospholipids, tocopherols and sterols were analysed in all lipidic fractions. The conversion factor nitrogen/protein was recomputed to 7,05 according to the composition in amino-acids of protein. Tangential microfiltration and reverse osmosis of the juice assessed microbial and physical status. The yellow colour of pasteurised juice was stable for at least 4 weeks at ambient temperature. The biochemical composition of the juice, which showed a high content of anti-oxidant molecules, is not sufficient to explain the famous medicinal effects of Noni juice. Some of them, an particularly alkaloids still have to be studied.

Results from this work have already made it possible to find industrial applications in para-pharmacy in developed countries for these two tropical products.