

# THESE

présentée pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**ECOLE DOCTORALE** : Sciences des Procédés

**SPECIALITE** : Sciences des Agroressources

par

**Marjorie BERGOIN épouse LEFORT**

---

**APPLICATION DU CONCEPT DE RAFFINAGE VEGETAL AU SAFRAN DU QUERCY  
(CROCUS SATIVUS) POUR LA VALORISATION INTEGREE DES POTENTIELS  
AROMATIQUES ET COLORANTS**

---

Soutenue le 25 Octobre 2005 devant le jury composé de :

<b>Mme Carole PROST</b> Professeur à l'ENITIAA, Nantes	<b>Rapporteurs</b>
<b>Mme Catherine VIEILLESZES</b> Professeur à l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse	
<b>Mme Andrée BOUNIOLS</b> Directeur de Recherche INRA, INP, Toulouse	<b>Présidente</b>
<b>Mme Christine RAYNAUD*</b> Ingénieur R&D CRITT Agroressources, INP, Toulouse	<b>Membres</b>
<b>M. Christian SALLES</b> Chargé de Recherche INRA, UMR FLAVIC, Dijon	
<b>M. Gérard VILAREM*</b> Ingénieur de Recherche à l'INP, Toulouse Directeur du CRITT Agroressources, Toulouse	
<b>M. José-Antonio FERNANDEZ</b> Professeur à l'Université de Castilla-La Mancha, Albacete, Espagne	<b>Invités</b>
<b>M. Alain FILIPOWICZ</b> Directeur adjoint de l'ENSICA, Toulouse	
<b>M. Thierry TALOU</b> Ingénieur de Recherche à l'INP, Toulouse	

\* Directeurs de thèse



*A ma famille  
Qui m'a permis de prendre les voies  
Que je désirais  
Dans ma vie*

*A mon mari  
Qui m'a été d'un soutien quotidien  
Et à notre futur Bébé*

*Mademoiselle Elisabeth BORREDON et Monsieur Antoine GASET, je vous remercie pour votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire de recherche.*

*Christine, merci pour votre disponibilité tout au long de ma thèse et pour tout ce que vous m'avez appris, notamment sur les techniques analytiques et les traitements statistiques. Vous m'avez guidé pendant ces trois années et éclairé sur les voies les plus intéressantes à prendre. De plus, la découverte de l'analyse sensorielle restera pour moi un souvenir inoubliable.*

*Gérard, je tiens à vous remercier pour votre écoute, lorsque cela était nécessaire, et de m'avoir orienté sur la partie colorante de mes recherches.*

*Thierry, merci de m'avoir fait autant voyager durant ces trois années, Autriche, Espagne, Allemagne, Grèce et Danemark et de m'avoir fait participer à des congrès internationaux. Cela m'a permis de rencontrer des personnes compétentes dans les domaines du safran et des arômes mais également de valoriser et d'échanger sur mes travaux de recherche.*

*Madame Andrée BOUNIOLS, je tiens à vous remercier d'avoir présidé mon jury de thèse et de vous être intéressée à cette plante qu'est le *Crocus sativus*.*

*Madame Carole PROST, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit et d'avoir été rapporteur de ma thèse. Vos remarques ont été judicieuses et m'ont permis d'avoir une réflexion plus approfondie sur certains points.*

*Madame Catherine VIEILLES CAZES, je vous suis également très reconnaissante d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit, qui est assez conséquent. Votre point de vue sur l'aspect historique et colorant a été très intéressant.*

*Monsieur Christian SALLES, je vous remercie d'avoir participé à mon jury de thèse et pour vos remarques avisées sur la partie olfactométrique.*

*Monsieur José-Antonio FERNANDEZ, je suis flattée que vous ayez accepté de venir d'Espagne jusqu'à Toulouse afin de participer à mon jury de thèse, bien que l'aspect biotechnologique n'ait pas été traité au cours de mes trois années de recherche.*

*Monsieur Alain FILIPOWICZ, je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, bien que mon sujet soit très éloigné de vos domaines de compétences.*

*A tous les safraniers du Quercy, merci de m'avoir fait partager votre passion pour la culture du safran. Je remercie tout particulièrement Pascal Herin qui a été mon interlocuteur au nom des safraniers et sans qui je n'aurais pas pu avoir les différentes matières premières nécessaires à mon étude.*

*Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur convivialité et Thérèse CATARELLI, Mireille JUAN, Isabelle NOEL, Karine TREMAUVILLE, Marie-Christine TALOU, Didier DANGLA et Michel LE GAL, pour leur disponibilité.*

*Un grand merci également à Anne LUNG et Didier DANGLA pour leur aide précieuse et leurs conseils avisés au pilote. Je n'oublierai pas les heures passées avec vous devant le réacteur de 300 L !*

*Merci à Géraldine GIACINTI pour sa patience et ses conseils concernant la partie analytique.*

*Merci à toutes les personnes qui ont participé au projet safran sans lesquelles ce travail n'aurait pu être aussi complet. Danièle, Laurent, Anna-Maria, Anne, Dafinka, Anna et notamment, Amandine et Laure, merci de vous être investis comme vous l'avez fait sur ce sujet. J'ai été très heureuse de vous encadrer durant vos stages et projets.*

*Je voudrais remercier également toutes les personnes qui se sont portées volontaires pour participer aux panels CPG/O et sensoriel. Sans vous, une partie importante du travail sur les stigmates n'aurait pu avoir lieu : Amandine, Aude, Almudena, Cristina, Valentina, Laure, Yao, Aurélie, Philippe, Eric, Mikaël, Colin, Delphine, Virginie, Cathy, Jérôme, Antoine, Anne et Brigitte.*

*Trois ans sur le sujet du safran, c'est long et en même temps trop court pour exploiter toutes les voies de recherche. En tout cas, cette épice aura pour moi un goût particulier !*

*J'ai rencontré au laboratoire des gens formidables qui resteront gravés dans ma mémoire : Un grand merci au bureau des « gars » (Jérôme, Eric, Antoine et Philippe) mais surtout à Julien B. et à Laure pour avoir toujours répondu à mes nombreuses interrogations et à mes appels au secours pour les questions d'ordre pratiques !*

*Céline V., nous avons découvert le laboratoire ensemble puis pris des chemins divergents, mais je me rappellerai de ton soutien pendant toute ma première année de thèse.*

*Almudena, nous avons partagé des moments difficiles mais également joyeux pendant deux ans. J'espère que ton retour sur Toulouse nous permettra de nous voir plus souvent.*

*A Céline G. et Aurélie, merci les filles pour toutes ces discussions, pour tout votre soutien et surtout de m'avoir toujours écouté râler (le yoga n'y a rien changé) ! Heureusement qu'il y a eu ce voyage en Autriche et un peu d'analytique qui nous ont permis de nous découvrir ! J'espère que notre amitié perdurera au-delà de ces trois années de thèse.*

*Aux autres doctorants du sous-sol, bon courage pour la suite ! ...*

*Merci également pour la bonne ambiance de la cafétéria pour un bon moment de détente et de « piallage » entre 12h et 14h.*

*M. Lapeyre, merci de m'avoir fait découvrir la « vraie » chimie. Vos cours passionnants en classes préparatoires m'ont permis d'acquérir les bases essentielles dans ce domaine et de transmettre à mon tour mes connaissances et mon savoir-faire par des vacances effectuées au cours de ces trois ans.*

*Merci à mes parents et à ma sœur, Solenne, pour leur soutien moral et les bons moments de détente en Dordogne ou à Ensues-la-Redonne.*

*Mais, je tiens surtout à remercier Matthieu, qui est la personne la plus importante à mes yeux, de m'avoir soutenu et patiemment écouté pendant ces trois années, qui ne pourront que rester inoubliables pour nous.*

# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I Etude bibliographique .....</b>	<b>7</b>
<b>I.1. <u>PRESENTATION DU CROCUS SATIVUS .....</u></b>	<b>9</b>
<b>I.1.1. Historique.....</b>	<b>9</b>
<b>I.1.2. Caractère botanique.....</b>	<b>11</b>
<b>I.1.3. Culture du safran .....</b>	<b>13</b>
I.1.3.1. Développement de la plante .....	13
I.1.3.2. Procédés d'obtention du safran .....	15
<b>I.2. <u>LES STIGMATES .....</u></b>	<b>16</b>
<b>I.2.1. Caractérisation de la matière végétale et des métabolites secondaires         majoritaires.....</b>	<b>16</b>
I.2.1.1. Matière végétale .....	16
I.2.1.2. Métabolites secondaires .....	17
<b>I.2.2. Qualité du safran.....</b>	<b>21</b>
I.2.2.1. Séchage et conservation .....	22
I.2.2.2. Adultérations .....	24
I.2.2.3. Contrôle qualité .....	24
I.2.2.4. Conclusions .....	27
<b>I.2.3. Arôme du safran.....</b>	<b>27</b>
I.2.3.1. Composition chimique de la fraction volatile .....	27
I.2.3.2. Composés clefs de l'arôme du safran.....	37
I.2.3.3. Précurseurs glycosidiques des composés volatils .....	39
<b>I.2.4. Applications du safran .....</b>	<b>42</b>
I.2.4.1. Pouvoirs colorants .....	42
I.2.4.2. Activités biologiques du safran .....	43
I.2.4.3. Conclusions sur les applications du safran.....	44
<b>I.2.5. Conclusions sur l'étude des stigmates .....</b>	<b>44</b>
<b>I.3. <u>LES AUTRES ORGANES DE LA PLANTE : CARACTERISATION ET APPLICATIONS .....</u></b>	<b>45</b>
<b>I.3.1. La fleur .....</b>	<b>45</b>
I.3.1.1. L'arôme .....	45
I.3.1.2. Les pigments .....	45
I.3.1.3. L'activité biologique .....	47
I.3.1.4. Conclusions .....	47
<b>I.3.2. La feuille.....</b>	<b>48</b>
I.3.2.1. Caractérisations .....	48
I.3.2.2. Applications .....	48
<b>I.3.3. Le bulbe.....</b>	<b>48</b>
I.3.3.1. Caractérisations .....	48
I.3.3.2. Applications .....	50
I.3.3.3. Conclusions .....	51

**Chapitre II Caractérisation des métabolites secondaires et des composés volatils du safran du Quercy ..... 61**

<b>II.1. <u>ETUDE DE LA TENEUR EN EAU ET EN METABOLITES SECONDAIRES.....</u></b>	<b>63</b>
II.1.1. Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr) .....	64
II.1.2. Teneur en picrocrocine .....	65
II.1.3. Teneur en safranal .....	66
II.1.4. Teneur en crocine .....	66
II.1.5. Classification selon la norme ISO/TS 3632 .....	67
II.1.6. Les métabolites secondaires en fonction du taux d'humidité (Hr) .....	68
II.1.7. Conclusions .....	70
<b>II.2. <u>CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS DU SAFRAN DU QUERCY .....</u></b>	<b>71</b>
II.2.1. Etude des stigmates frais par HD/CPG-SM .....	71
II.2.2. Etude des stigmates secs par HD/CPG-SM.....	74
II.2.3. Comparaison des profils des composés volatils des safrans frais et secs.....	77
II.2.4. Etude des stigmates secs par SPME/CPG-SM .....	80
II.2.5. Conclusions .....	95
<b>II.3. <u>ETUDE DES MOLECULES DU SAFRAN DU QUERCY PRESENTANT UNE ACTIVITE ODORANTE PAR SPME/CPG-SM/ODP .....</u></b>	<b>96</b>
II.3.1. Profils aromatiques .....	96
II.3.2. Identification des odeurs perçues.....	98
II.3.3. Empreinte aromatique du safran en fonction du taux d'humidité (Hr) ...	100
II.3.4. Conclusions .....	101
<b>II.4. <u>PROFIL SENSORIEL DU SAFRAN.....</u></b>	<b>101</b>
II.4.1. Analyse sensorielle du safran du Quercy .....	102
II.4.2. Influence du taux d'humidité sur le profil sensoriel du safran du Quercy	108
II.4.3. Conclusions .....	109
<b>II.5. <u>CORRELATION DES DONNEES INSTRUMENTALES ET SENSORIELLES ET DISCUSSIONS .</u></b>	<b>110</b>
II.5.1. Corrélation des données obtenues par SPME/CPG-SM/ODP et par analyse sensorielle avec les métabolites secondaires évalués selon la norme ISO/TS 3632.....	110
II.5.2. Corrélation des données analytiques, olfactives et sensorielles.....	119

**Chapitre III Caractérisation des fleurs, des feuilles et des bulbes de *Crocus sativus* ..... 127**

<b>III.1. <u>CARACTERISATION DE LA MATIERE VEGETALE.....</u></b>	<b>129</b>
III.1.1. Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr).....	129
III.1.2. Composition pariétale et composés hydrosolubles .....	130
III.1.3. Autres caractérisations des bulbes.....	130
III.1.3.1. Amidon.....	131
III.1.3.2. Lipides .....	132
III.1.3.3. Sucres .....	133
III.1.3.4. Protéines .....	134
III.1.4. Conclusions .....	134
<b>III.2. <u>CARACTERISATION DE LA FRACTION VOLATILE DES BULBES, DES FLEURS ET DES FEUILLES DE CROCUS SATIVUS .....</u></b>	<b>135</b>
III.2.1. Composés volatils des bulbes.....	135

<b>III.2.2. Composés volatils des fleurs</b> .....	<b>137</b>
III.2.2.1. Fraction volatile libérée par la fleur .....	137
III.2.2.2. Composés volatils présents dans la fleur.....	141
III.2.2.3. Conclusions de l'étude des composés volatils des fleurs.....	149
<b>III.2.3. Composés volatils des feuilles</b> .....	<b>150</b>
III.2.3.1. Huile essentielle et eaux florales.....	150
III.2.3.2. Composés volatils extraits par Likens-Nickerson (éther et pentane).....	155
III.2.3.3. Concrète de feuilles .....	158
III.2.3.4. Conclusions de l'étude des composés volatils des feuilles .....	163
<b>III.2.4. Conclusions de l'étude de caractérisation des fractions volatiles</b> .....	<b>164</b>
<b>III.3. CARACTERISATION DES COLORANTS LIPOSOLUBLES, DES FLEURS ET DES FEUILLES,</b> <b>DE TYPE CAROTENOÏDES</b> .....	<b>165</b>
<b>III.3.1. Extraction des caroténoïdes</b> .....	<b>165</b>
<b>III.3.2. Caractérisation des caroténoïdes</b> .....	<b>165</b>
III.3.2.1. Profil analytique .....	166
III.3.2.2. Spectre de masse .....	170
III.3.2.3. Masse exacte et dosage .....	172
<b>III.3.3. Conclusions</b> .....	<b>173</b>
<b>Chapitre IV Valorisation des fractions aromatiques et colorantes des</b> <b>fleurs et des feuilles de <i>Crocus sativus</i></b> .....	<b>179</b>
<b>IV.1. ETUDE PRELIMINAIRE A L'ECHELLE LABORATOIRE</b> .....	<b>181</b>
<b>IV.1.1. Macération dans l'hexane à froid</b> .....	<b>181</b>
IV.1.1.1. Les fleurs .....	181
IV.1.1.2. Les feuilles .....	187
<b>IV.1.2. Comparaison avec une extraction dans du cyclohexane à chaud</b> .....	<b>191</b>
IV.1.2.1. Les fleurs .....	192
IV.1.2.2. Les feuilles .....	194
<b>IV.1.3. Conclusions</b> .....	<b>196</b>
<b>IV.2. MACERATION A L'ECHELLE PILOTE</b> .....	<b>196</b>
<b>IV.2.1. Procédés d'extraction</b> .....	<b>197</b>
IV.2.1.1. Les fleurs .....	198
IV.2.1.2. Les feuilles .....	200
IV.2.1.3. Conclusions .....	201
<b>IV.2.2. Caractérisation aromatique et colorante des extraits</b> .....	<b>202</b>
IV.2.2.1. Fraction volatile.....	202
IV.2.2.2. Molécules colorantes liposolubles de type caroténoïde .....	207
<b>IV.2.3. Fixation par voie thermique des molécules colorantes et étude de la</b> <b>photodégradation des néo-pigments à base de safran</b> .....	<b>215</b>
IV.2.3.1. Mise au point du protocole de fixation des pigments sur l'argile .....	215
IV.2.3.2. Etude colorimétrique et résistance à la lumière .....	216
IV.2.3.3. Conclusions .....	221
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>225</b>

---

<b>Chapitre V</b>	<b>Partie Expérimentale.....</b>	<b>231</b>
<b>V.1.</b>	<b>REACTIFS ET SOLVANTS.....</b>	<b>235</b>
V.1.1.	Solvants d'extraction.....	235
V.1.2.	Solvants analytiques.....	235
V.1.3.	Etalons.....	235
<b>V.2.</b>	<b>CARACTERISATION DES STIGMATES.....</b>	<b>236</b>
V.2.1.	Echantillonnage.....	236
V.2.2.	Séchage des stigmates.....	236
V.2.3.	Détermination de la teneur en humidité et en métabolites secondaires selon la norme ISO/TS 3632 (Hr).....	237
V.2.3.1.	Humidité et matières volatiles.....	237
V.2.3.2.	Métabolites secondaires.....	237
V.2.4.	Extraction et analyse des composés volatils des stigmates frais et secs par HD/CPG-SM.....	239
V.2.4.1.	Stigmates frais.....	239
V.2.4.2.	Stigmates secs.....	239
V.2.5.	Extraction et analyse des composés volatils des stigmates frais et secs par Likens-Nickerson et CPG-SM.....	239
V.2.5.1.	Evaluation de la teneur en eau et en composés volatils selon la norme ISO/TS 3632 (Hr).....	239
V.2.5.2.	Séchage des stigmates.....	239
V.2.5.3.	Extraction des composés volatils des stigmates frais et secs.....	240
V.2.5.4.	Analyse des composés volatils des stigmates frais et secs.....	240
V.2.6.	Extraction et analyse des composés volatils des stigmates secs par SPME/CPG-SM/ODP.....	241
V.2.6.1.	Choix de la fibre SPME.....	241
V.2.6.2.	Extraction et analyse des composés volatils.....	241
V.2.6.3.	Analyse olfactométrique.....	242
V.2.7.	Analyse sensorielle du safran.....	245
V.2.7.1.	La préparation des échantillons.....	245
V.2.7.2.	Les juges.....	245
V.2.7.3.	L'analyse.....	246
<b>V.3.</b>	<b>CARACTERISATION DES FEUILLES, DES FLEURS ET DES BULBES.....</b>	<b>251</b>
V.3.1.	Échantillonnage.....	251
V.3.2.	Composition de la matière végétale.....	251
V.3.2.1.	Détermination de la matière sèche (MS).....	251
V.3.2.2.	Détermination de la matière minérale (MM).....	251
V.3.2.3.	Dosage des éléments pariétaux.....	252
V.3.2.4.	Détermination de la teneur en hydrosolubles.....	253
V.3.2.5.	Détermination de la teneur en amidon.....	254
V.3.2.6.	Détermination de la teneur en lipides.....	254
V.3.2.7.	Détermination de la teneur en protéines.....	255
V.3.2.8.	Détermination de la teneur en sucres.....	256
V.3.3.	Caractérisation des composés volatils des fleurs, des feuilles et des bulbes.....	257
V.3.3.1.	Etude des composés volatils libérés par la fleur (SPME et HD).....	257
V.3.3.2.	Hydrodistillation.....	258
V.3.3.3.	Likens-Nickerson.....	260
V.3.3.4.	Macération dans l'éther diéthylique et dans l'hexane.....	262

V.3.3.5. Extraction à chaud au soxhlet.....	266
<b>V.3.4. Caractérisation des colorants liposolubles de type caroténoïde.....</b>	<b>268</b>
V.3.4.1. Extraction sélective des caroténoïdes.....	268
V.3.4.2. Analyse des extraits.....	269
<b>V.4. MACERATION A L'ECHELLE PILOTE .....</b>	<b>272</b>
<b>V.4.1. Extraction .....</b>	<b>272</b>
<b>V.4.2. Analyse par CPG-SM de la fraction volatile .....</b>	<b>272</b>
<b>V.4.3. Analyse de la fraction colorante.....</b>	<b>272</b>
V.4.3.1. Par CLHP .....	272
V.4.3.2. Par CLHP-SM .....	272
V.4.3.3. Par TOF.....	273
<b>V.4.4. Valorisation de la fraction colorante : les néo-pigments .....</b>	<b>273</b>
V.4.4.1. Fixation des molécules colorantes sur support argileux par voie thermique . .....	273
V.4.4.2. Analyse par spectrocolorimétrie.....	273
V.4.4.3. Photodégradation accélérée.....	275
<b>Annexes.....</b>	<b>277</b>
<b>Annexe I : Caractérisation d'une plante .....</b>	<b>279</b>
<b>Annexe II : Matrices de données.....</b>	<b>311</b>
<b>Annexe III : Schéma du procédé d'extraction à l'échelle pilote .....</b>	<b>313</b>
<b>Annexe IV : Références bibliographique .....</b>	<b>315</b>
<b>Annexe V : Publications et participations aux congrès .....</b>	<b>329</b>

**Application du concept de raffinage végétal au Safran du Quercy (*Crocus sativus*)  
pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants**

---

### **Abréviations utilisées dans ce manuscrit**

A. : Aire  
ACP : Analyse en Composantes Principales  
ADF : réactif visant à doser les éléments pariétaux des végétaux (Acid Detergent Fiber)  
AEDA : analyse par dilution des extraits aromatiques (Aromatic Extraction Dilution Analysis)  
APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)  
ANOVA : Analyse de variance (Analysis Of Variance)  
ASE : Accelerated Solvent Extractor  
C : Crocine  
CAR : Carboxen  
CCM : Chromatographie sur Couche Mince  
CHARM : Combined Hedonic Analysis Response Measurement  
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance  
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse  
C.V. : Coefficient de Variation  
CW : Carbowax  
D : Débit  
DAD : Détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector)  
DVB : Divinylbenzène  
 $\Delta E$  : Ecart de couleur  
DIF : Détecteur à Ionisation de Flamme  
DP : Degré de Polymérisation  
DT : Desorption Thermique  
EDS : Extraction Distillation Simultanée  
ED : Extraction Directe  
E.T. : Ecart Type  
FD : Facteur de Dilution  
HD : Headspace Dynamique  
Hr : Humidité relative ou résiduelle  
IR : Infra-Rouge  
IR : Indice de Rétention  
NDF : réactif visant à doser les éléments pariétaux des végétaux (Neutral Detergent Fiber)  
ODP : sortie de detection olfactive (Olfactory Detection Port)  
OID : bouton poussoir indiquant l'intensité de l'odeur (Olfactory Intensity Device)  
O : Olfactométrie  
P : Picrocrocine  
P : Pression  
PDMS : Polydiméthylsiloxane  
PLS : méthode de régression des moindres carrées (Partial Least Square)  
P.M. : Pic Majoritaire  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
S : Safranal  
SM : Spectrométrie de Masse  
SMRI : Spectrométrie de Masse et de Rapport Isotopique  
SPME : microextraction sur phase solide (Solid Phase MicroExtraction)

**Application du concept de raffinage végétal au Safran du Quercy (*Crocus sativus*)  
pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants**

---

T°C : Température

T<sub>éb</sub> : Température d'ébullition

TOF : Temps de vol (Time Of Flight)

UV : Ultra-Violet

# Introduction



L'histoire du safran, épice tirée du *Crocus sativus* L., remonte à l'Antiquité. Son apparition dans les hautes vallées du Cachemire et les plateaux de Perses, date de plus de 5000 ans. La France est marquée au XII<sup>e</sup> siècle par l'arrivée du safran, liée essentiellement aux retours de croisades et aux échanges commerciaux avec l'orient. Cependant, les conditions climatiques, les mutations économiques, la découverte de couleurs artificielles (mauvéine, premier colorant découvert en 1856 par Perkin, (Brusatin, 1986)) et l'évolution des usages alimentaires (réduction du nombre d'épices), amorcent le déclin de la culture de cette épice en France à partir de la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, (Algrech, 2001).

En 2004, le pays producteur majoritaire est l'Iran avec 160 t/an, suivi par la Grèce (6t/an), le Maroc (3t/an) et l'Espagne (1t/an). La réapparition du safran en France s'inscrit dans la redécouverte du passé des régions productrices comme celle du Quercy.

Autrefois, le safran était employé pour ses vertus thérapeutiques et son pouvoir colorant. Depuis l'Antiquité, des pouvoirs : antispasmodique, sédatif nerveux et gingival, stomachique et stimulant, ont été attribués à cette épice, (Sampathu et al., 1984). Des études récentes ont démontré qu'elle possède des propriétés antitumorale et anticancérogène, (Salomi et al., 1991; Abdullaev, 2001). Le safran était également utilisé pour sa couleur « jaune or », hautement symbolique, dans la peinture, (Barkeshli et Ataie, 2002) et dans la teinture des textiles, (Mougin, 1999). Il a été remplacé au cours du XX<sup>e</sup> siècle par des colorants de synthèse comme la tartrazine, (Orfanou et Tsimidou, 1995).

En gastronomie, le safran est employé pour sa couleur mais aussi pour sa saveur et son arôme caractéristique, (Mehta et al., 2002). Appelé « or rouge », il est le produit alimentaire le plus cher du monde devant la truffe blanche et le caviar. Son prix va de 2€ à 25€/g et peut atteindre 35€/g dans de petites safranières comme celles du Quercy. Sa qualité varie selon sa pureté (il fait l'objet de nombreuses adultérations), sa couleur, son arôme et sa saveur, ces trois derniers étant développés lors de la torréfaction. Actuellement, elle est évaluée par une norme internationale, (ISO/TS, 2003).

Depuis 1976, le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de l'ENSIACET s'intéresse à la valorisation non alimentaire de la biomasse et notamment des co-produits et sous-produits de l'agriculture et de la forêt. Le concept de raffinage végétal a, entre autres, été appliqué au tournesol dans le cadre de précédents travaux de recherche, (Vandenbossche Maréchal, 1998), afin de valoriser tiges et capitules, considérés comme des déchets agricoles.

Il peut être intéressant d'appliquer ce concept au *Crocus sativus* qui est actuellement cultivé uniquement pour ses stigmates issus de la fleur. En effet, pour obtenir 1kg de safran sec, 160 000 fleurs sont émondées, (Kubo et Kinst-Hori, 1999), ce qui représente 300 kg de

matière végétale à l'odeur miellée très intense. Les bulbes de ces fleurs produisent, entre octobre et mai, environ 1,5 t de feuilles. Ces deux co-produits, fleurs et feuilles, sont actuellement inutilisés et ont été très peu étudiés. De la fleur, seuls les pigments hydrosolubles et quelques molécules biologiquement actives ont été extraits et identifiés, (Norbek et Kondo, 1998; Hosseinzadeh et Younesi Hani, 2002; Li et al., 2004). Les feuilles étaient utilisées autrefois en tant que fourrage pour les animaux, (Algrech, 2001). Actuellement, seule une étude des composés phénoliques a été réalisée sur cet organe de la plante, (Bate-Smith, 1968; Williams et al., 1986). Les bulbes, quant à eux, sont arrachés tous les trois ans. Les plus vigoureux sont replantés, les autres sont vendus dans des pépinières, soit environ 140 000 par an à 0,30 €/le bulbe. Lors de période de famine, les bulbes étaient consommés par les animaux mais aussi par les hommes. De nouvelles recherches tendent à valoriser cette partie de la plante en vue d'applications biologiques, (Fernandez et al., 2000; Vurdu, 2003).

Le but de ces travaux de recherche est de contribuer à une meilleure connaissance des potentiels moléculaires des co-produits issus de la culture du safran : fleur, feuille et bulbe, afin de proposer de nouvelles valorisations, en particulier dans le domaine des arômes et des colorants.

Dans le premier chapitre de ce mémoire sera présenté le *Crocus sativus* : ses stigmates et ses autres organes, fleur, feuille et bulbe. Les différentes méthodes de caractérisation de la plante seront développées et appliquées à l'étude de la matière végétale, des composés volatils, des colorants et du profil sensoriel. Enfin, des traitements statistiques nécessaires à l'interprétation de données obtenues seront proposés.

Le deuxième chapitre permettra d'aborder la caractérisation du safran du Quercy selon la norme internationale, mais également par une étude plus complète des composés volatils et odorants émanant de l'épice, ainsi que par la détermination de son profil sensoriel.

Le troisième chapitre sera consacré à la caractérisation des autres parties de la plante à travers l'étude de la matière végétale et de sa constitution, mais aussi des composés volatils émis et des colorants liposolubles présents dans les feuilles et les fleurs.

Dans le quatrième chapitre sera présentée l'étude préliminaire à l'échelle laboratoire de l'extraction des molécules aromatiques et colorantes des fleurs et des feuilles à l'aide d'un solvant compatible avec un procédé industriel. Le passage à l'échelle pilote de ce procédé en vue d'une valorisation des extraits a été réalisé. Des premiers essais d'applications colorantes seront également évoqués dans cette partie.

## **Références bibliographiques**

- Abdullaev F. I. (2001). "Saffron (*Crocus sativus* L.) and its possible role in the prevention of cancer." *Phytochemistry and Pharmacology II*, 8: 70-82.
- Algrech C. (2001). "Le safran du Quercy." *Revue Quercy recherche*, 97 et 98 (1-2-4): 20-27;9-16;18-26.
- Barkeshli M. et Ataie G. H. (2002). "pH stability of saffron used in verdigris as an inhibitor in Persian miniature paintings." *Restaurator*, 23 (3): 154-164.
- Bate-Smith E. C. (1968). "Phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. II. Monocotyledons." *J. Linn. Soc. Lond., Bot.*, 60 (383): 325-356.
- Brusatin M. (1986). "Histoire des couleurs". Champs Flammarion.
- Fernandez J. A., Escribano J., Piqueras A. et Medina J. (2000). "A glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and affects in vitro cell viability." *J. Exp. Bot.*, 51 (345): 731-737.
- Hosseinzadeh H. et Younesi Hani M. (2002). "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice." *BMC pharmacology*, 2 (1): 7.
- ISO/TS (2003). "Safran (*Crocus sativus* L.)- Partie 1 : spécifications, Partie 2 : Méthodes d'essai." *Norme Européenne ISO/TS 3632-1 3632-2*.
- Kubo I. et Kinst-Hori I. (1999). "Flavonols from Saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism." *J. Agric. Food Chem.*, 47 (10): 4121-4125.
- Li C.-Y., Lee E. J. et Wu T.-S. (2004). "Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*." *J. Nat. Products*, 67 (3): 437-440.
- Mehta B. M., Borkhatriya V. N. et Boghra V. R. (2002). "Saffron : the colouring and flavouring agent in dairy and food industry." *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 24 (4): 1038-1049.
- Mougin I. (1999). "Le safran *Crocus sativus* L. Iridacees". Faculté de médecine et de pharmacie. Besançon.
- Norbek R. et Kondo T. (1998). "Anthocyanins from flowers of *Crocus* (Iridaceae)." *Phytochem.*, 47 (5): 861-864.
- Orfanou O. et Tsimidou M. (1995). "Influence of selected additives on the stability of saffron pigments in aqueous extracts." *Dev. Food Sci.*, 37A: 881-894.
- Salomi M. J., Nair S. C. et Panikkar K. R. (1991). "Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice." *Nutr. Cancer*, 16 (1): 67-72.
- Sampathu S. R., Shivashankar S. et Lewis Y. S. (1984). "Saffron (*Crocus sativus* Linn.) cultivation, processing, chemistry and standardization." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 20 (2): 123-157.
- Vandenbossche Maréchal V. (1998). "Fractionnement des tiges et capitules de tournesol. Hydrodistillation d'une huile essentielle odorante, extraction et modification chimique des pectines, et mise en forme d'agromatériaux biodégradables". INPT. Sciences des Agroressources. Toulouse.
- Vurdu H. (2003). "Room table : agronomical and biotechnological approches for Saffron improvement". *I<sup>st</sup> International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, Albacete, Spain, Acta Hort. 285-290.

## Introduction

---

Williams C. A., Harborne J. B. et Goldblatt P. (1986). "Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family iridaceae." *Phytochem.*, 25 (9): 2135-2154.

# Chapitre I

## Etude bibliographique

# Chapitre I Etude bibliographique ..... 9

## I.1. PRESENTATION DU *CROCUS SATIVUS*..... 9

I.1.1. Historique.....	9
I.1.2. Caractère botanique.....	11
I.1.3. Culture du Safran.....	13
I.1.3.1. Développement de la plante .....	13
I.1.3.2. Procédés d'obtention du safran .....	15

## I.2. LES STIGMATES ..... 16

I.2.1. Caractérisation de la matière végétale et des métabolites secondaires majoritaires.....	16
I.2.1.1. Matière végétale .....	16
I.2.1.2. Métabolites secondaires .....	17
I.2.2. Qualité du safran.....	21
I.2.2.1. Séchage et conservation .....	22
I.2.2.2. Adultération.....	24
I.2.2.3. Contrôle qualité .....	24
I.2.2.4. Conclusions .....	27
I.2.3. Arôme du safran.....	27
I.2.3.1. Composition chimique de la fraction volatile .....	27
I.2.3.2. Composés clefs de l'arôme du safran.....	37
I.2.3.3. Précurseurs glycosidiques des composés volatils .....	39
I.2.4. Applications du safran .....	42
I.2.4.1. Pouvoir colorant .....	42
I.2.4.2. Activités biologiques du safran .....	43
I.2.4.3. Conclusions sur les applications du safran.....	44
I.2.5. Conclusions sur l'étude des stigmates .....	44

## I.3. LES AUTRES ORGANES DE LA PLANTE : CARACTERISATION ET APPLICATIONS..... 45

I.3.1. La fleur .....	45
I.3.1.1. L'arôme .....	45
I.3.1.2. Les pigments .....	45
I.3.1.3. L'activité biologique .....	47
I.3.1.4. Conclusions .....	47
I.3.2. La feuille.....	48
I.3.2.1. Caractérisations .....	48
I.3.2.2. Applications .....	48
I.3.3. Le bulbe.....	48
I.3.3.1. Caractérisations .....	48
I.3.3.2. Applications .....	50
I.3.3.3. Conclusions .....	51

## Chapitre I Etude bibliographique

### I.1. PRESENTATION DU *CROCUS SATIVUS*

#### I.1.1. Historique

L'histoire du safran, épice tirée de la fleur de *Crocus sativus*, remonte à la plus haute Antiquité. Les auteurs anciens, tels que Homère, Salomon, Pline ou Virgile, mentionnent dans leur récit cette fleur, considérée alors comme divine. La plus ancienne représentation date de 1600-1700 ans avant J-C et a été trouvée sur une fresque du palais de Minos en Crète, représentant des personnages cueillant du safran, (Algrech, 2001).

Le nom "safran" est dérivé du latin *safranum*, lui-même inspiré de l'arabe "zaferân" dont la racine est porteuse d'une notion essentielle, la couleur jaune. En ce qui concerne le nom du genre, *crocus*, il vient du grec Krokos, qui veut dire "fil, filament", par allusion aux stigmates de la plante. Le terme de "Krokos" est lié à une légende de la mythologie grecque : Crocos, ami de Mercure se trouvant avec lui pour jouer au disque, fût blessé mortellement au front par un coup malheureux, son sang s'écoulant fût bu par la terre. Il ressurgit plus tard sous la forme de stigmates rouges sang de la fleur de safran. Krokos est également le nom du village grec près de Kozani où le safran est toujours cultivé aujourd'hui, (Algrech, 2001). Le terme "*sativus*", quand à lui, signifie "cultivé", car le *Crocus sativus*, par sa reproduction végétative, ne peut se multiplier sans la main de l'homme, (Dupont, 2001).

Le safran est une des plus vieilles épices dont on peut dater l'apparition à plus de 5000 ans, dans les hautes vallées du Cachemire et les plateaux de Perse. Sa valeur marchande le destinait à voyager. Utilisé par les égyptiens et les hébreux pour aromatiser et colorer les aliments dans les fêtes religieuses, le safran a ensuite été transmis aux grecs et aux romains, qui en ont fait différents usages : dans l'art culinaire, en parfumerie, en teinture (Cardon, 2003), en pharmacopée, et dans certains rites religieux. Il en a été de même en Inde où il est encore utilisé aujourd'hui. En Sicile et en Italie, la culture du safran date des romains. Les arabes, au IX<sup>e</sup> siècle, l'introduisirent en Afrique du Nord puis en Espagne musulmane. Elle était localisée au début du XX<sup>e</sup> siècle dans les provinces de Valence, Alicante et Carthagène, (Pierlot, 1925). La culture du safran est encore présente au Maroc, dans la région de Taliouine dans le Haut-Atlas. L'acclimatation du safran en France date du XII<sup>e</sup> siècle, liée essentiellement aux retours des croisades auxquelles s'ajoutèrent les échanges commerciaux avec l'Orient. Il s'est répandu de la Provence en Albigeois et du Quercy et de l'Angoumois au Gâtinais. Des productions plus modestes s'implantèrent dans le Rouennois, le Forez, le

Beaujoley, le Lyonnais, l'Auvergne, le Viveret, le Gévaudan. Cet engouement touche même le sud de l'Angleterre au XV<sup>e</sup> siècle. La France considère alors le safran comme un héritage de l'Antiquité et reçoit une forme de légitimité culturelle. Ainsi, la reine Elisabeth, femme du roi Charles IX, au retour de son sacre le 29 mars 1571, est accueillie lors de son entrée solennelle aux barrières de Paris par un tableau "représentant un homme foulant aux pieds des tiges de safran qui n'en fleurissaient que mieux" au-dessous duquel on lisait un quatrain de Ronsard, composé pour la circonstance :

*« Tant plus on foule au pied la fleur  
Du safran, plus elle est florissante,  
Ainsi de France la grandeur :  
Plus on la foule et plus augmente »*

Jusqu'au XVIII<sup>e</sup> siècle, le Quercy et le Rouergue vont devenir deux des plus grandes régions productrices de Safran. Mais à ce siècle charnière correspond une transformation fondamentale de la perception du safran. D'une part dans l'art culinaire français, les caractéristiques principales tendent vers la réduction du nombre et de la quantité d'épices utilisées, l'antinomie salé et sucré ainsi que l'utilisation du beurre et de sauces grasses. D'autre part dans l'usage thérapeutique, les critiques s'élèvent contre un safran "pernicieux" et "mortel" à forte dose. De plus, au XIX<sup>e</sup> siècle les mutations économiques amorcent clairement la disparition progressive de la culture française du safran. La découverte des couleurs artificielles, les transformations des usages alimentaires, l'industrialisation et l'exode rural provoquent une diminution du safran en Europe et en France, (Dupont, 2001). A la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle, la production du safran dans le Quercy chute brutalement. Il pourrait s'agir de conditions climatiques particulièrement rudes, comme le long et rigoureux hiver de 1879-1880 qui a détruit une grande quantité de bulbes de la région du Gâtinais. Même si les cultivateurs ne se découragent pas et replantent les bulbes n'ayant pas souffert du froid, l'hiver de 1890-1891 porte un coup décisif à la culture du safran, (Ursat, 1913), qui s'éteint peu à peu dans cette région après la première guerre mondiale.

Depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, période à laquelle s'est arrêtée la production de safran dans le Quercy, et jusqu'au début du XX<sup>e</sup> siècle, l'épice est restée dans les jardins et dans la gastronomie locale. Aujourd'hui, seuls quelques jardins en possèdent encore et la multiplication a même recommencé depuis quelques années. L'inventaire réalisé en 1997 par la commission de travail "Les safraniers du Quercy" de l'association ASPEC a permis de

recenser sur plus de 20 sites conservatoires environ 500000 bulbes issus de cultures anciennes dans le pays de Cajar. La réapparition du safran s'inscrit dans la redécouverte du passé des régions productrices, (Algrech, 2001). Dès 1988, la création du musée du safran de Boynes fait resurgir l'histoire des safraniers du Gâtinais. Neuf ans plus tard, un colloque à Beaune montre toute la diversité et la richesse des trois stigmates du *Crocus sativus*. La culture actuelle du safran, dans le Gâtinais, le Quercy, la Touraine, l'Aquitaine ou encore le Rouergue, participe à une reterritorialisation ainsi qu'à une redécouverte culturelle et culturelle du local, (Dupont, 2001).

Actuellement, le pays producteur majoritaire de safran est l'Iran (150 à 170 t/an), suivi par la Grèce (5 à 7 t/an), le Maroc et le Kashmir (2 à 3 t/an) puis l'Espagne (1 t/an) et enfin l'Italie (100 kg/an). Les petites productions françaises et suisses, avec le safran du Gâtinais et du Quercy (6 kg/an) ou du Mund (1,5 à 3 kg/an), représentent peu face au marché mondial mais sont réputées pour leur qualité, (San Mames, 2001).

### **I.1.2. Caractère botanique**

Le caractère botanique du *Crocus* en France a été décrit par de nombreux auteurs, (Ursat, 1913; Pierlot, 1925; Priy, 1994).

Le *Crocus sativus* Linnaeus, représenté sur la Figure 1, appartient à la famille des iridées (synonyme : irideae, iridaceae, iridacées) et à la tribu des croceae, (Heywood Vernon, 1996). La classification taxonomique de cette plante est donnée par Wintherhalter, (Winterhalter et Straubinger, 2000).

Division :	Spermatophyte
Sous-division :	Angiosperme
Classe :	Monocotylédone
Sous-classe :	Liliidae
Ordre :	Liliales
Famille :	Iridaceae
Genre :	Crocus

Elle est une petite plante herbacée, vivace, à bulbe et acaule.

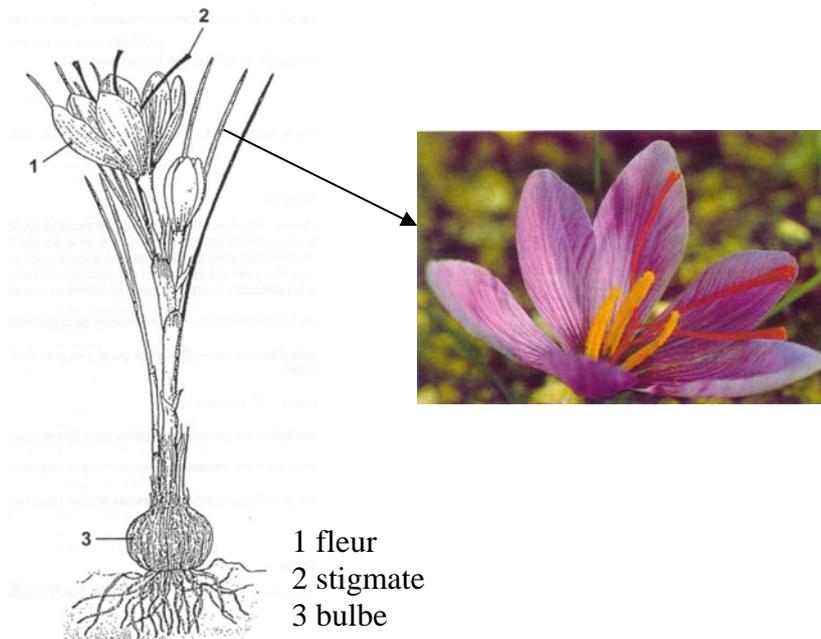


Figure 1. *Le Crocus sativus* Linn, (ISO/TS, 2003).

Le bulbe appelé vulgairement "oignon" est dit solide. Il mesure ordinairement 30 mm de diamètre, sur 20 à 25 mm de hauteur. Il est arrondi en dessus, avec une dépression au centre et aplati dessous. Plusieurs tuniques minces et scarieuses l'enveloppent. La plus externe, d'un brun jaunâtre, porte le nom de tunique ou robe de l'oignon et ressemble à un amas de filasse. Les prolongations de ces enveloppes vers la surface enrobent les tiges en prenant le nom de spathes, traversées lors de la croissance par les feuilles et les fleurs. Une fois planté, le bulbe produit à sa base de nombreuses racines blanches non ramifiées. Du sommet arrondi du bulbe partent des feuilles, la plupart aériennes, d'un vert sombre, au nombre de 6 ou 7, au limbe long et étroit, terminé en pointe et divisé dans le sens longitudinal par une ligne argentée. Elles mesurent de 20 à 60 cm. De l'aisselle des tuniques ou de la partie supérieure de l'oignon naissent ordinairement 2 ou 3 pédoncules floraux mais leur nombre peut aller jusqu'à 18 sur le même bulbe. La fleur, de couleur violette, est hermaphrodite, régulière, avec un périanthe tubulaire allongé comprenant 6 pièces disposées en verticilles trimères. Les pièces du verticille extérieur (sépalés) alternent avec celles du verticille intérieur (pétales). L'androcée est composée de trois étamines de 22 mm de long, de couleur jaune, superposées chacune à un sépale. Leur filet s'insère vers la gorge formée par le périanthe et porte une anthère biloculaire s'ouvrant sur deux fentes longitudinales extrorsives. Le gynécée comprend un ovaire à trois loges, surmonté d'un style, de couleur jaune, blanc, grêle et très

allongé qui se divise en trois stigmates ou flèches. Mesurant entre 20 et 40 mm, ils ont la forme d'un cornet très étroit, évasé sur la partie supérieure qui est crénelée ou dentelée et légèrement fendue. D'un rouge vif brillant et velouté, les stigmates sont très odorants. Ils constituent le safran du commerce après avoir été desséchés. L'ovaire est rarement fécondé. Il se présente sous forme de capsule allongée, trigone, loculicide, renfermant plusieurs graines presque rondes qui mûrissent rarement de façon parfaite.

### **I.1.3. Culture du Safran**

#### **I.1.3.1. Développement de la plante**

Le *Crocus sativus* est un hybride triploïde ( $2n=24$ ) qui a été sélectionné pour ses très longs stigmates. Sa reproduction est végétative et souterraine, par division du bulbe-père en bulbes-fils.

La culture du crocus suit des critères particuliers en fonction du développement de la plante (Tableau 1) et de la région. Les modes de culture du safran du Gâtinais et du Quercy ont été décrits dans la littérature, (Ursat, 1913 ; Algrech, 2001).

**Tableau 1. Calendrier de la culture du Crocus.**

Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mar.	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août
-	Récolte safran/fleurs			Croissance des feuilles				Récolte feuilles	Récolte bulbes	Plantation bulbes	-

Le lieu de culture est très important. Le crocus préfère les sols légers et très bien drainés, ceux de nature silico-calcaire ou argilo-calcaire, fertiles et assez profonds. Le sol doit être sain, sans fumier frais ni herbes fraîchement enfouies. Les principaux ennemis du safran sont l'eau en excès et un terrain imperméable. Le terrain doit être exposé sud, sud-est sans ombre d'arbres à feuilles persistantes ou de bâtiment car cette plante a besoin de lumière pour se développer. Le sol enrichi doit être propre, meuble et souple.

Les bulbes, conservés en tas à l'extrémité du champ et recouverts de paille ou en couche mince dans un grenier, sont débarrassés, avant leur plantation, de leur filasse et de l'ancien bulbe desséché, il s'agit de l'"épluchage". Ce travail permet de rejeter les caïeux (nouveaux bulbes) altérés ou trop petits. Les oignons choisis sont d'une grosseur moyenne et d'une forme régulière. La plantation a lieu de juillet à début septembre, les plantations tardives produisant moins de fleurs. Les bulbes sont plantés à la main, la partie aplatie vers le bas à 15 cm de profondeur et sont espacés dans le sillon de 1 à 2 cm dans le Gâtinais et de 8 à 10 cm dans le Quercy, soit en ligne, soit en quinconce. Il faut laisser 20 cm entre chaque

rangée et prévoir toutes les 4 rangées une allée de 50 cm pour le passage. Dans le Quercy, les champs de crocus sont constitués de 50 à 70 bulbes au m<sup>2</sup>. Il est indispensable de placer les bulbes à une profondeur d'au moins 15 cm car, les oignons s'élevant en terre d'au moins 2 cm par an, suite à la formation de nouveaux bulbes, pourraient souffrir de gelées pendant les hivers suivants. De plus, la formation d'une racine allant chercher en profondeur les éléments indispensables au développement du crocus (azote et autres composés) épuiserait la plante. La safranière doit être désherbée, protégée des animaux et le sol ameubli.

La maladie la plus terrible est le rhizoctone violet qui s'attaque aux bulbes de la plante. Pour la prévenir, il faut laisser sécher les bulbes arrachés au soleil, choisir un sol drainant et non humide et pratiquer la rotation des terres en évitant asperges et luzerne comme précédentes cultures.

La récolte des fleurs débute vers le 25 septembre, mais a lieu principalement en octobre. Le "plein de la fleur", selon les safraniers, se produit généralement la première semaine du mois d'octobre. Toutefois, si l'automne est froid et humide, la récolte peut se prolonger jusqu'au début du mois de novembre. Les meilleurs rendements en fleurs ont toujours été obtenus lorsqu'un automne brumeux succède à un été sec. La température optimale pour la mise en fleurs se situe entre 10 et 15°C. La vie de la fleur est éphémère : 48 heures maximum.

Les feuilles apparaissent lors de la floraison et poussent jusqu'au mois de mai. Elles tapissent le sol pendant tout l'hiver et nourrissent les bulbes-fils. Selon Algrech (Algrech, 2001), autrefois, les agriculteurs, les arrachait et les laissait faner sur le champ avant de les mettre en botte. Désormais, la feuille est laissée sur pied où elle sèche pour disparaître ensuite totalement. A partir du mois d'avril et pendant la période d'été, la plante entre en dormance.

Dans le Quercy et dans le Gâtinais, les agriculteurs pratiquent l'assolement triennal, car la quantité de fleurs produite par le crocus dans ces régions augmente pour se stabiliser la 3<sup>ème</sup> année. Le mois de juin de la 4<sup>ème</sup> année, correspond à l'arrachage des oignons qui se trouvent alors sous la forme d'une touffe de 15 à 20 bulbes à la place de l'unique bulbe planté la 1<sup>ère</sup> année. Les oignons sont séchés au soleil, puis replantés en juillet ou conservés dans un grenier. Dans le Quercy, les plus petits bulbes sont placés dans des pépinières afin qu'ils puissent grossir et donner des fleurs l'année suivante.

Dans le Gâtinais, (Ursat, 1913), l'assolement biennal avait été proposé dans les années 1891 par Paul Chappelier car il pouvait représenter de nombreux avantages. La récolte était pleine et entière tous les ans sans interruption alors qu'avec l'assolement triennal il n'y a que très peu de fleurs la première année, les bulbes étant épuisés en fin de troisième année. Il y

avait production, même pendant les années défavorables, d'oignons sains, beaux et fleureux en quantité pour replanter une étendue au moins égale à celle arrachée. Il permettait de réaliser une économie de main d'œuvre. Les terres sortant de l'assolement biennal étaient moins épuisées. Enfin, il entraînait la disparition de la maladie "la mort" qui se développe entre la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> année. Cette méthode a été appliquée par quelques agriculteurs dans le Gâtinais mais elle reste très peu utilisée.

Les rotations de culture ne sont pas semblables dans tous les pays producteurs. Les différences de climat et de terrain ont abouti à des périodes d'assolement plus ou moins longues. Les oignons devant être replantés lorsqu'il y a surpeuplement et donc appauvrissement en nutriments et en eau et une diminution du rendement en épice. Les différentes pratiques des pays producteurs ont été rapportées par certains auteurs, (Douglas, 1993; Negbi, 1999). En Italie, l'assolement est annuel. En Espagne, les oignons sont replantés tous les 4 ans tandis qu'en Grèce tous les 5-7 ans, au Maroc tous les 5-12 ans et en Inde tous les 10-15 ans.

### **I.1.3.2. Procédés d'obtention du safran**

Pour obtenir le safran, différentes étapes sont nécessaires : la récolte, l'émondage et le séchage. Les deux premières étant similaires dans tous les pays producteurs, elles ont été décrites pour les safrans étrangers et pour le safran du Quercy et du Gâtinais, (Algrech, 2001; Ursat, 1913).

La vie de la fleur étant très brève, il faut récolter quotidiennement les fleurs et de préférence le matin, à la rosée alors qu'elles sont encore fermées. Chaque fleur est cueillie en l'enveloppant dans la main et en coupant avec l'ongle le tube ou en le pliant pour le rompre aussi bas que possible. La récolte se fait dans des paniers très propres, en évitant tout tassement qui amènerait une fermentation indésirable.

L'émondage consiste à séparer les stigmates du reste de la fleur et doit s'effectuer dans les 24 heures suivant la cueillette. Chaque fleur est prise individuellement à la main. Les trois stigmates sont réunis en les plaçant entre le pouce et l'index de l'autre main et sont coupés par un coup d'ongle à la limite du style, ni trop haut, ni trop bas, évitant ainsi une perte ou une trop grande proportion des filets jaunes nuisibles à la qualité de l'épice. Les stigmates ainsi séparés constituent le safran vert.

Le séchage constitue l'étape la plus délicate puisqu'elle assure la conservation de l'épice par déshydratation, ce qui empêche le développement des moisissures, mais développe également l'odeur caractéristique du safran. Cette opération est très importante car c'est d'elle

dont dépendra la bonne qualité de l'épice. Il existe de nombreuses méthodes de séchage dont les éléments déterminants sont le temps, la température de séchage et l'appareillage utilisé. Le safran doit perdre environ les 4/5 de son poids et le taux d'humidité restant doit être au maximum de 12% selon la norme internationale ISO/TS, (ISO/TS, 2003). Le safran, après séchage, est au toucher ni trop sec, ni trop mou mais moelleux et sa couleur est rouge foncée uniforme (sang de bœuf) et ne doit pas être marron. Le safran étant très hygroscopique, il faut le conserver, après séchage, dans un endroit sec et à l'abri de l'air car à l'humidité il perd son arôme et noircit.

La production peut varier d'une année à l'autre, selon les conditions climatiques, l'âge des safranières, la nature et la qualité des terres sur lesquelles elles sont établies. Lorsque l'assolement est pluriannuel, le rendement augmente les premières années pour ensuite se stabiliser. Il est calculé par rapport au nombre de fleurs fraîches récoltées par hectare et à la quantité de safran sec obtenu, sachant qu'il faut de 100 000 à 140 000 fleurs pour obtenir 1 kg de stigmates secs. Dans le Gâtinais, les rendements sont de 3 kg/ha la première année et de 16 kg/ha la deuxième et la troisième année, (Ursat, 1913). La production serait supérieure dans le Quercy, avec 10 à 15 kg/ha la première année puis 20 à 25 kg/ha la deuxième et 10 à 15 kg/ha la troisième, (Algrech, 2001). L'Italie produit en moyenne 10-16 kg/ha, l'Espagne 6-29 kg/ha, le Maroc 2-6 kg/ha, la Grèce 4-7 kg/ha et l'Inde 1,8-6,8 kg/ha, (Negbi, 1999).

Actuellement, la production des pays occidentaux est limitée par la main d'œuvre nécessaire à la récolte et l'émondage du safran, ces étapes étant difficile à mécaniser, (Negbi, 1999).

## **I.2. LES STIGMATES**

### **I.2.1. Caractérisation de la matière végétale et des métabolites secondaires majoritaires**

#### **I.2.1.1. Matière végétale**

La détermination de la composition chimique du safran est délicate car elle suppose une identification botanique correcte, des stigmates non adultérés et sans déchets floraux. Des données moyennes de l'analyse chimique du safran, indiquées dans le tableau 2, ont été citées dans la littérature, (Basker, 1999).

**Tableau 2. Analyse chimique approximative des stigmates commerciaux (% massique).**

Humidité	10
Matière hydrosoluble	53
dont les sucres	14
Gommes	10
Pentosanes	8
Pectine	6
Amidon	6
$\alpha$ -crocine	2
Autres caroténoïdes	1
Protéine (Nx6,25)	12
Matière inorganique (cendres)	6
dont les cendres insolubles dans HCl	0,5
Huiles non volatiles	6
Huiles volatiles	1
Fibres brutes	5

Certaines analyses plus précises avaient été décrites par Sampathu, (Sampathu et al., 1984), concernant les éléments minéraux, les vitamines et les lipides. Les minéraux présents dans les cendres sont indiqués dans le Tableau 3.

**Tableau 3. Principales traces d'éléments minéraux dans les cendres.**

Eléments minéraux	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SO <sub>3</sub>	Cl
Teneur dans les cendres (%)	34,46	8,56	10,01	7,12	2,89

Le bore est également présent. Des images de résidus de calcination ont montré la présence de cristaux d'oxalate de calcium. Les vitamines contenues dans le safran sont la vitamine B2 ou riboflavine (56,4 à 138,0  $\mu\text{g/g}$ ) et la vitamine B1 ou thiamine (4,0 à 0,9  $\mu\text{g/g}$ ) et les lipides, le campestérol, le stigmastérol et le  $\beta$ -sitostérol. Plusieurs acides gras ont été identifiés dans les stigmates, (Mougin, 1999). Il s'agit des acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique. La teneur en huile essentielle du safran varie de 0,3 à 2,0%, (Pinanelli, 1967).

### **I.2.1.2. Métabolites secondaires**

Les métabolites majoritaires du safran sont à l'origine de la couleur, de la saveur et de l'arôme du safran.

#### **I.2.1.2.1. Colorants**

Les crocines, [39465-00-4], famille de C<sub>20</sub>-caroténoïdes estérifiées, rouges et solubles dans l'eau, sont les métabolites biologiquement actifs du safran.

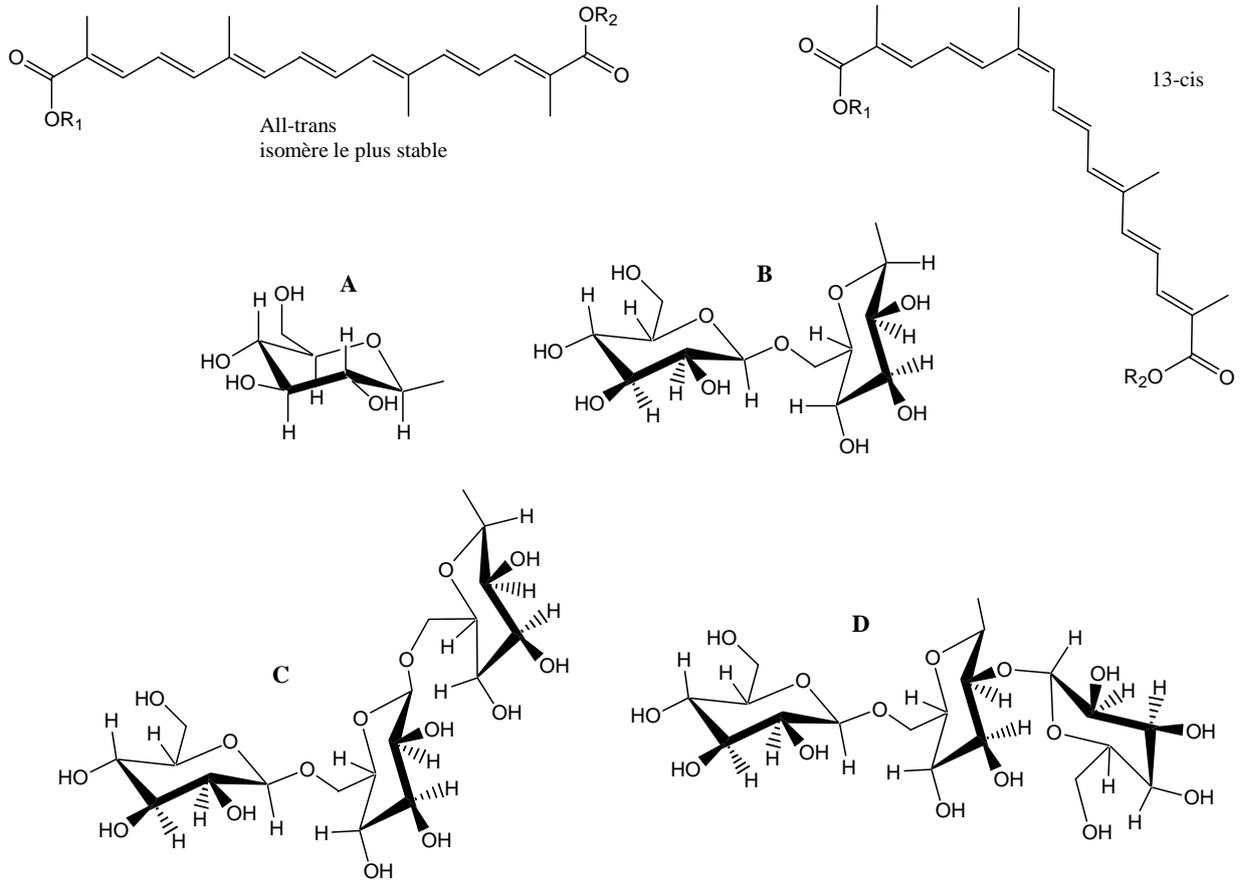
Elles sont issues d'un diacide, la crocétine [27876-94-4] plus ou moins estérifiée par des sucres de types glucosyle (A), gentiobiosyle (B), 3- $\beta$ -D-glucosyle (C), néapolitanosyle (D) qui sont présentées sur la Figure 2. Le composé majoritaire est la crocine 4 (ou  $\alpha$ -crocine), digentiobiose ester de crocétine.

Dhingra, (Dhingra et al., 1975), Tarantilis, (Tarantilis et al., 1994 ; Tarantilis et al., 1995), et Pfister, (Pfister et al., 1996), ont déterminé 6 structures de crocine. Elles sont naturellement présentes sous forme *trans*, la plus stable, mais un léger chauffage entraîne une isomérisation vers le composé de forme *cis*, moins coloré, (Tarantilis et al., 1994).

Selon Côté, (Côté et al., 2000), et Rubio Moraga, (Rubio Moraga et al., 2004), la synthèse de la crocine provient de l'action d'une enzyme, la glucosyltransférase, sur la fonction carboxylique de la crocétine et un groupement hydroxyle du sucre pour former la liaison ester ; son activité est optimale à 40°C.

Selon Pfander, (Pfander et Schurtenberger, 1982), sont présents dans le safran des métabolites secondaires type C<sub>40</sub>-caroténoïdes, mais en quantité minime : phytoène, phytofluène, tétrahydro-lycopène,  $\beta$ -carotène et zéaxanthine. Deux voies ont été considérées pour la biosynthèse de la crocétine : la dégradation oxydative de la zéaxanthine, et la dimérisation de deux composés en C<sub>10</sub>, des géranylpyrophosphates, suivie de réactions de déshydrogénation et d'oxydation. Cependant, l'absence de précurseurs de la crocétine de type hydrocarbures en C<sub>20</sub> dans le safran écarte la deuxième possibilité.

Selon Rödel, (Rodel et Petrzika, 1991), le clivage des doubles liaisons adjacentes aux cycles de la zéaxanthine entraîne la formation d'une molécule de crocétine et de deux molécules de microcrocine (Figure 3). Cette hypothèse a été confirmée par une étude antérieure menée par Buchecker, (Buchecker et Eugster, 1973), selon laquelle la stéréochimie du carbone portant la fonction hydroxyle de la microcrocine est la même que celle de la zéaxanthine (4R). Cependant, la preuve expérimentale de l'action d'une 7,8-caroténase sur la zéaxanthine est toujours manquante, (Winterhalter et Straubinger, 2000).



crocine 1 :  $R_1=D$   $R_2=B$  (Pfister et al., 1996)  
 crocine 2 :  $R_1=C$   $R_2=B$  (Tarantilis et al., 1995)  
 crocine 3 :  $R_1=A$   $R_2=B$   
 crocine 4 :  $R_1=B$   $R_2=B$   
 crocine 5 :  $R_1=A$   $R_2=A$   
 crocine 6 :  $R_1=H$   $R_2=A$   
 crocine 7 :  $R_1=H$   $R_2=H$   
 (crocétine)

diméthylcrocétine :  $R_1=R_2=Me$   
 Les structures sont *trans* ou *cis*

(Pfander et al. 1982; Tarantilis et al. 1994, 1995; Pfister et al., 1996)

A = glucosyle  
 B = gentiobiosyle  
 C = 3-β-glucosyle  
 D = néapolitanosyle

Figure 2. Structure des crocines.

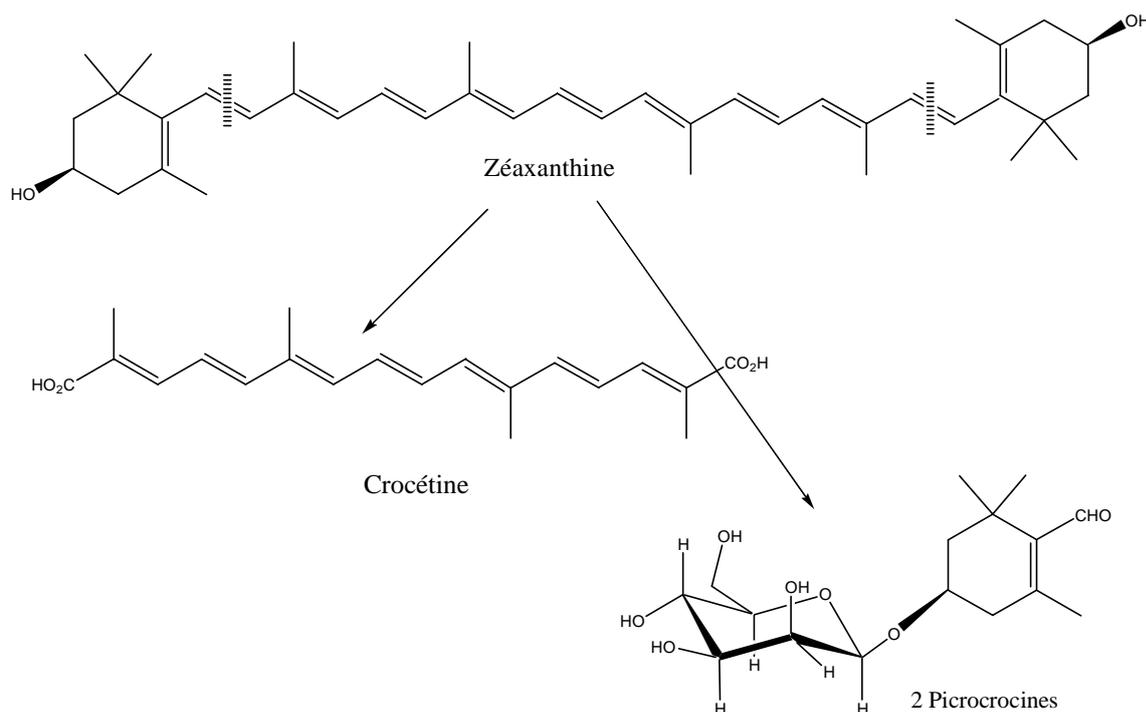


Figure 3. Formation de la crocétine et de la picrocrocine à partir de la zéaxanthine.

#### 1.2.1.2.2. Saveur et arôme

La picrocrocine [138-55-6] ( $C_{16}H_{26}O_7$ ), glycoside inodore et incolore de l'HTCC (4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène), est responsable de la saveur amère du safran. Elle constitue également le précurseur du safranal [116-26-7] (2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-diène), (Buchecker et Eugster, 1973), composé majoritaire de la fraction volatile du safran, (Zarghami et Heinz, 1971b), et développé lors du procédé de torréfaction (Figure 4). Selon Rödel, (Rödel et Petrzika, 1991), la formation du safranal s'accompagne d'une baisse du taux de picrocrocine. Dans des conditions douces, le safranal est généré par voie chimique, d'hydrolyse, ou enzymatique, grâce à la  $\beta$ -glucosidase, à partir d'un intermédiaire l'HTCC. Selon Himeno, (Himeno et Sano, 1987), lors d'un traitement plus dur, à haute température, en milieu acide ou basique, la picrocrocine donne directement, par déshydratation, le safranal.

Le safranal n'étant peu ou pas présent dans les stigmates frais, sa concentration dépend des conditions de séchage et de conservation du safran, éléments déterminants dans la qualité de l'épice.

Le safranal a été synthétisé par Kuhn en 1936, (Kuhn, 1994).

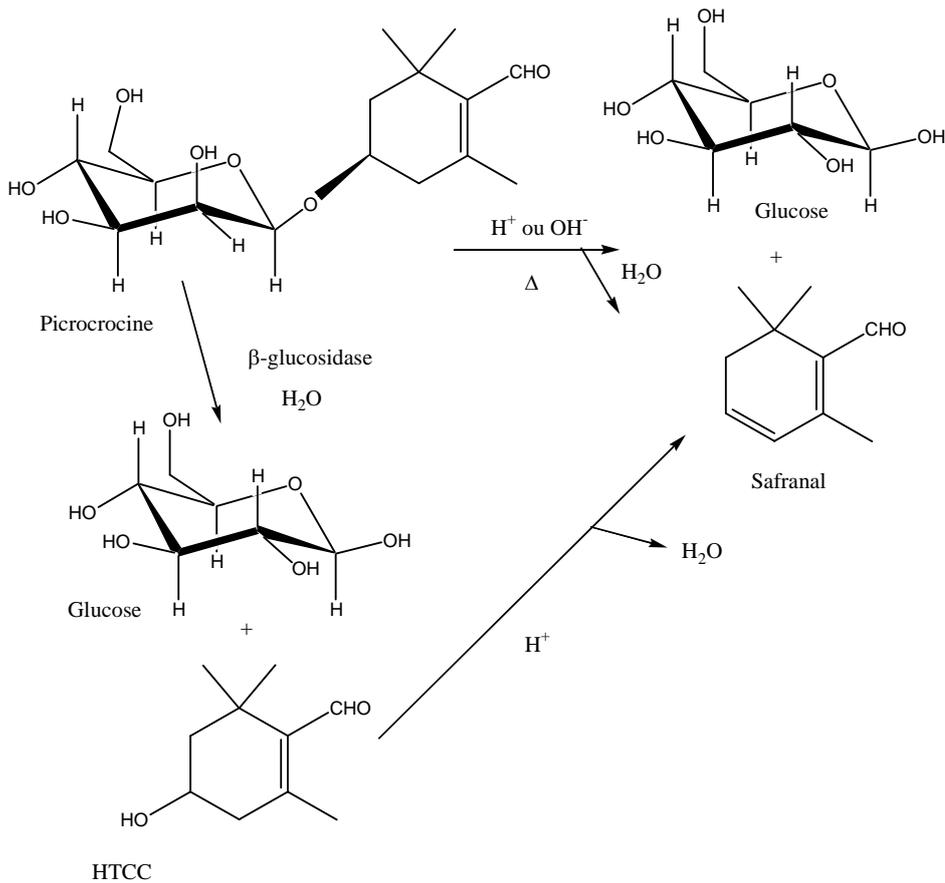


Figure 4. Formation du safranal à partir de la picrocrocine.

### I.2.2. Qualité du safran

Le safran ou "or rouge", est le produit alimentaire le plus cher du monde, son prix variant de 2€ à 25€g dans le commerce et pouvant atteindre 35€g dans de petites safranières. Sa variabilité est due à l'origine de l'épice et à sa qualité, (Algrech, 2001). Celle-ci peut être évaluée par l'aspect visuel et olfactif de l'épice : la couleur rouge, l'odeur intense et légèrement piquante, les stigmates longs et larges avec une consistance souple, la pureté, l'absence du style jaune, d'étamines ou de débris de pétales. Sa réelle détermination s'effectue par l'analyse de la composition chimique du safran et notamment sa teneur en métabolites secondaires. De nombreux facteurs influencent la formation et la rétention de ces métabolites dans le safran : le terroir, le climat, le mode de culture, de récolte, de préparation et de stockage. La période de récolte, la plus propice, selon Morimoto, (Morimoto et al., 1994), et Raina, (Raina et al., 1996), se situe lorsque la fleur est entièrement sortie, sa teneur en crocines et picrocrocine étant maximale. La qualité du safran est assurée essentiellement par son séchage et sa conservation.

### I.2.2.1. Séchage et conservation

Le séchage est l'étape clef dans la préparation du safran car il permet d'exprimer l'arôme de l'épice. Les méthodes sont différentes selon les régions et les pays producteurs, ce qui entraîne des variations dans la qualité du safran. Les différents types de séchage sont indiqués dans le Tableau 4.

*Tableau 4. Types de séchage selon le lieu de culture.*

Lieu de culture	Méthode de séchage	Références bibliographiques
France Gâtinais	- 500g de stigmates. - Sur un tamis de crin (30-35 cm) au-dessus d'un réchaud ou d'un brasier de bois. - Retournés au bout de 30 min, durée totale 40-45 min.	(Ursat, 1913)
France Quercy	- Posés sur un tamis dans un four à pollen ou électrique. - A 60°C pendant 20-30 min.	(Algrech, 2001)
Espagne	- 2-3 cm de stigmates.	(Berset et al., 1997)
Italie	- Sur un tamis de crin à 15 cm au-dessus d'un brasero.	(Negbi, 1999)
Grèce	- 4-5 mm de stigmates. - Sur des claies, carrés d'étoffe tendus sur des cadres de bois, dans une pièce noire chauffée par un feu de bois à 20°C puis à 30-35°C pendant 12h.	(Negbi, 1999)
Inde Kashmir	- Stigmates libres ou en bottes. - Au soleil pendant 4-5 jours. - Fleurs et stigmates séchés au soleil, les stigmates retirés une fois secs.	(Sampathu et al., 1984)
Maroc	- Posés en couche mince au soleil pendant 2h ou à l'ombre pendant 7-10 jours.	(Negbi, 1999)

Une étude a été réalisée par Berset, (Berset et al., 1997), sur des safrans d'origines différentes, Espagne, Grèce, Iran et Inde, afin d'évaluer leur teneur en pigments totaux et en composés volatils. Les résultats montrent que la teneur en pigments totaux varie de manière similaire à la teneur en composés volatils, les échantillons les plus riches provenant d'Espagne et d'Iran et les plus pauvres d'Inde. Le séchage au-dessus d'un brasero apparaît comme étant optimal par rapport à un séchage en petites bottes au soleil.

Raina, (Raina et al., 1996), et Pardo, (Pardo et al., 2002), ont testé l'influence de différents types de séchage sur les propriétés sensorielles, aromatiques et colorantes du safran afin de déterminer les conditions optimales de déshydratation de l'épice. Raina a utilisé un séchage à l'ombre (4-18°C) et au soleil (12-21°C), de type solaire (49°C), par un déshydratant (40°C), dans un four sous vide (40 mmHg, 40°C, 50°C, 65°C), dans un four ventilé (20°C, 40°C, 50°C) et dans un four électrique (40°C, 50°C, 65°C, 80°C). Pardo a séché les stigmates à température ambiante 72 h (Humidité résiduelle, Hr = 7,3 %), sur des tamis au-dessus d'un

poêle électrique 30 min à 57°C (Hr = 7,7 %) et par air chaud 70°C/240s (Hr = 7,3 %), 90°C/180s (Hr = 5,6 %), 110°C/120s (Hr = 4,4 %). Selon Raina, une température trop douce, 30°C, entraîne un temps de séchage très long (27-53 h) ce qui provoque la biodégradation de la crocine et ne permet pas la dégradation de la picrocrocine en safranal. L'intermédiaire de cette réaction reste majoritaire et dénature l'odeur du safran. Un séchage bref, de 2 h à 4 h, à 60°C a pour conséquence une dégradation thermique des pigments. La température optimale se situe entre 35 et 45°C pour un temps de séchage de 5-6 h. La teneur en crocine est alors maximale (15 à 17 %). Seuls le four électrique et le séchage solaire conviennent pour obtenir un safran de qualité donnant des notes "florale", "douce", "épicée" et peu de notes "âcres". Les résultats de Pardo confirment qu'en appliquant un séchage à basse température (température ambiante), le safran perd en couleur, en arôme et en saveur.

Le séchage est une étape importante pour l'obtention d'un safran de qualité, mais une mauvaise conservation de l'épice peut en altérer considérablement les propriétés colorantes, aromatiques et gustatives. Le safran est très hygroscopique et doit être conservé dans un endroit sec car à l'humidité il perd son arôme et noircit, (Pierlot, 1925). Plusieurs études ont été menées par Alonso, (Alonso et al., 1990 ; Alonso et al., 1993), et Tsimidou, (Tsimidou et Biliaderis, 1997), dans le but de déterminer l'influence de l'humidité relative de l'air et de la température sur la conservation du safran. Une auto-oxydation dans le temps d'ordre 1 de la crocine et d'ordre 2 de la picrocrocine est observée pour des températures supérieures ou égales à 25°C et des humidités relatives supérieures ou égales à 23 % (taux d'humidité des stigmates de 4-10 %). Dans le cas de la crocine, cette dégradation est expliquée par la fonction protectrice des caroténoïdes au sein des cellules. Ils génèrent de l'oxygène sous forme singulet initiant ainsi le processus d'auto-oxydation. De plus, la solubilité de la crocine dans l'eau, contrairement à la plupart des caroténoïdes, favorise son contact avec l'oxygène. La stabilité de la crocine et de la picrocrocine est nettement améliorée par une réduction de l'humidité relative plus que par une diminution de la température. En dessous de 0°C ou sous azote, (Morimoto et al., 1994), aucune dégradation de ces deux métabolites secondaires n'a été constatée. Cependant, comme le soulève Raina, (Raina et al., 1996), dans des conditions habituelles de stockage, une humidité de 12 % des stigmates, taux admis par la norme, (ISO/TS, 2003), semble suffisante pour hydrolyser la crocine. L'évolution du safranal a été étudiée par Tsimidou, (Tsimidou et Biliaderis, 1997). Une humidité relative ( $a_w$ ) intermédiaire,  $0,43 \leq a_w \leq 0,53$  dégrade la crocine et la picrocrocine mais permet le développement de l'arôme du safran, le safranal étant un produit d'hydrolyse de la

picrocrocine. Les mécanismes de développement de l'arôme lors du séchage et les cinétiques de dégradation des métabolites secondaires, lors du stockage du safran, sont complexes et peu connus.

### **I.2.2.2. Adultération**

Le safran, épice très onéreuse, a toujours été sujet aux adultérations. Le safran "pur" et de bonne qualité est rare. Les fraudes résident dans l'adjonction de végétaux, de minéraux, de matières colorantes, et autres matières afin d'augmenter le poids de la marchandise. Ces fraudes ont été répertoriées par Semiond, (Semiond et al., 1996), et sont indiquées dans le Tableau 5.

*Tableau 5. Fraudes du safran.*

---

<b>Fraudes végétales</b>
Fraudes de même forme que le safran, recolorées artificiellement sur de la poudre ou sur l'épice en filaments
Les fleurons de carthame ( <i>Cartamus tinctorius</i> )
Les demi-fleurons de souci ( <i>Calandula officinalis</i> )
Les fleurons de l'arnica ( <i>Arnica montana</i> )
Les fleurs du safran du Cap ( <i>Lyperia crocea</i> )
Les fleurs de cynarées ( <i>Cynara cardunculus</i> )
Les stigmates du safran printanier ( <i>Crocus vernus</i> )
Les styles de fleurs de maïs ( <i>Zea mays</i> )
Fraudes végétales sur de la poudre de même couleur que le safran
Les piments des jardins (genre <i>Capsidium</i> )
Le curcuma ( <i>Curcuma monga L.</i> )
Les bois colorés
Fraudes végétales par d'autres parties de la fleur de <i>Crocus sativus</i> (>10%,) (ISO/TS, 2003)
Les styles
Les étamines
<b>Safran imprégné ou enrobé</b>
L'eau
Le miel et le sucre
L'huile
Substance minérale colorée au préalable : borax, alun, craie, sulfate de sodium et de magnesium, sulfate de baryum, nitrate de sodium et de potassium et tartroborate de potassium
Safran épuisé et recoloré
<b>Fraudes diverses</b>
Grenaille de plomb, sable, fibre de chair musculaire, gros fil, pelotes de pollen, brique pilée

---

### **I.2.2.3. Contrôle qualité**

La qualité du safran est déterminée par sa pureté et ses propriétés colorantes mais aussi aromatiques et gustatives. Les pays producteurs désignaient la qualité du safran par des

dénominations. Pour l'Espagne, il s'agit de "Mancha", "Rio" et "Sierra", (Oberdieck, 1975), et pour l'Inde, "Mongra" et "Lachcha", (Sampathu et al., 1984). Désormais elle est réglementée par une norme internationale réactualisée tous les trois ans. En 1993, (ISO 3632-1, 1993) le safran était classé en quatre catégories, en 2003, (ISO/TS 3632-1, 2003), il n'existe plus que trois classes, imposant ainsi une meilleure qualité de safran. Les spécifications chimiques du safran sont données dans le Tableau 6.

Tableau 6. Spécifications chimiques du safran selon la norme ISO/TS 3632

Caractéristiques	Spécifications		
	Catégories		
	I	II	III
Humidité et teneur en matières volatiles (fraction massique), %, max.			
Safran en filament	12	12	12
Safran en poudre	10	10	10
Cendres totales (masse) sur matière sèche, %, max.	8	8	8
Cendres insolubles dans l'acide (fraction massique), %, sur matière sèche, max.	1,0	1,0	1,0
Extrait soluble dans l'eau froide, (fraction massique), %, sur matière sèche, max.	65	65	65
Saveur amère, $E^{1\%}_{1\text{cm}} 257\text{nm}$ , sur matière sèche, min. (à cette longueur d'onde, l'absorbance de la picrocrocine est maximale)	70	55	40
Safranal, $E^{1\%}_{1\text{cm}} 330\text{nm}$ , sur matière sèche : min. max. (à cette longueur d'onde, l'absorbance du safranal est maximale)	20 50	20 50	20 50
Pouvoir colorant, $E^{1\%}_{1\text{cm}} 440\text{nm}$ , sur matière sèche, min. (à cette longueur d'onde, l'absorbance de la crocine est maximale)	190	150	100
Colorants acides artificiels hydrosolubles	absence	absence	absence

La mesure de l'arôme, de la saveur et de la couleur s'effectue par extraction en phase aqueuse du safran puis par évaluation de l'absorbance de ses métabolites secondaires par spectrophotométrie dans le domaine UV-Visible. Selon Alonso, (Alonso et Salinas, 1998), le pourcentage en crocine présent dans l'extrait est relié à la valeur donnée par  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  selon la formule :  $\% \text{ crocine} = 4,9 \cdot 10^{-2} \times E^{1\%}_{440}$ . La méthode analytique, imposée par la norme, est rapide et facile à mettre en œuvre, cependant elle dénote certaines limites. Elle ne permet pas de quantifier réellement le safranal et la picrocrocine. Certaines crocines absorbent aux mêmes longueurs d'ondes,  $\lambda = 256 \text{ nm}$  pour les liaisons glycosyles et  $323 \text{ nm}$  pour les systèmes conjugués *cis* des doubles liaisons, (Tarantilis et al., 1994), et le safranal, molécule

non polaire, est peu soluble dans l'eau, (Alonso et al., 1996; Alonso et al., 2001). De plus, l'arôme du safran n'est évalué que de façon réductrice, par sa teneur en safranal.

Des techniques analytiques alternatives ont été proposées afin d'avoir une meilleure connaissance de la couleur, de l'arôme et de la pureté du safran. Ont été utilisés : la CLHP, la CPG, la CPG-O, l'analyse sensorielle, (Narasimhan et al., 1992), l'analyse multivariée, (Marini et Balestrieri, 1992 ; Zougagh et al., 2005), le nez électronique, (Martinez et al., 2002), la CPG-SMRI, (Bigois et al., 1994 ; Semiond et al., 1996), la colorimétrie, (Pardo et al., 2002 ; Alonso et al., 2003), et la spectrophotométrie, (Orfanou et Tsimidou, 1996).

La CLHP a été appliquée avec succès afin de quantifier les crocines, la crocétine, la picrocrocine, l'HTCC et le safranal, (Pfander et Rychener, 1982 ; Solinas et Cichelli, 1988 ; Iborra et al., 1992 ; Castellar et al., 1993 ; Tarantilis et al., 1994 ; Corti et al., 1996 ; Li N. et al., 1999 ; Lozano et al., 1999 ; Lozano et al., 2000 ; Alonso et al., 2001). Les extraits de safran ont généralement été réalisés dans un mélange méthanol/eau (Tarantilis et al., 1994; Tarantilis et al., 1995), ou éthanol/eau, (Sujata et al., 1992). Le dioxyde de carbone supercritique a été utilisé par Lozano, (Lozano et al., 2000), afin d'extraire le safranal de manière non-destructrice. Sujata, (Sujata et al., 1992), a comparé trois techniques afin de déterminer la qualité du safran : la CCM, la CLHP et la CPG. Les deux premières donnent des résultats comparables pour les crocines, la crocétine, la picrocrocine et le safranal. La CPG n'est adaptée que pour la détermination du safranal. La CLHP, étant sensible et universelle, constitue la meilleure méthode pour évaluer la qualité du safran et y déceler des adultérations, notamment lors de l'addition d'un colorant.

La CPG permet de déterminer la qualité aromatique de l'épice et son authenticité. Giampaoli, (Giampaoli et al., 1993), a appliqué la CPG sur des extraits à froid (éther /pentane) de safran de diverses origines. Une variation de la composition aromatique a été mise en évidence. Raina, (Raina et al., 1996), a utilisé la même technique en vue de déterminer la qualité du safran après séchage. Alonso, (Alonso et al., 1996), a piégé la fraction volatile sur un adsorbant afin de connaître l'arôme qui se dégage du safran, sans modification chimique lors de l'extraction. Il s'agit d'une désorption thermique (DT) des composés volatils, couplée à la CPG-SM. L'analyse de 252 safrans a démontré qu'une partie du chromatogramme est similaire à tous les échantillons, la présence de *Carthamus tinctorius* (Tableau 5) ou l'addition de safranal synthétique modifiant cette empreinte chromatographique. De plus, l'analyse de safran par DT/CPG-SM et par spectrophotométrie ne montre aucune corrélation dans la quantification du safranal par la norme, (ISO/TS, 2003). L'analyse sensorielle est une méthode qui a permis de mettre en évidence la différence de qualité de safrans. Pardo, (Pardo

et al., 2002), a réalisé des tests hédoniques sur la couleur, l'arôme et la saveur du safran et Narasimhan, (Narasimhan et al., 1992), a étudié le profil sensoriel donné par l'arôme du safran. L'épice a été décrite comme étant "sucrée", "florale", "épicée", "grasse", "verte", "âcre/âpre", et ayant des notes d'"écorce d'arbre", les safrans de faibles qualités étant plutôt "vert", "âcre/âpre", avec des notes d'"écorce d'arbre" importantes.

### **I.2.2.4. Conclusions**

La qualité du safran dépend de sa pureté mais également de sa composition chimique. Parmi les nombreux facteurs influençant cette dernière, le séchage et le mode de conservation sont déterminants. Cependant, les réactions mises en jeu sont complexes et encore peu connues. La torréfaction doit être ni trop douce, induisant la biodégradation de la crocine, ni trop intense, les pigments étant alors dégradés thermiquement. Le safran doit être conservé dans un lieu sec et à basse température. Les réactions de dégradation de la crocine et de la picrocrocine débutent à un taux d'humidité résiduelle et une température peu élevés ( $H_r < 12\%$ ,  $25^\circ\text{C}$ ), ces conditions favorisant, au contraire, le développement du safranal. Ces paramètres n'ont été que partiellement étudiés. Le contrôle qualité du safran, réglementé par la norme internationale ISO/TS 3632, classe le safran en trois catégories selon la teneur en crocine, picrocrocine et safranal, déterminés par spectrophotométrie. Cependant, il peut être réalisé par d'autres méthodes donnant des informations supplémentaires sur l'arôme, la saveur et la couleur de l'épice. Les techniques analytiques les plus couramment employées sont la CLHP pour étudier les molécules colorantes et déceler des additions de colorant ainsi que la CPG pour caractériser la fraction volatile du safran et évaluer son arôme.

### **I.2.3. Arôme du safran**

L'arôme du safran est complexe et l'étude de sa composition chimique et des constituants aromatiques clefs a permis de mieux connaître cette épice dont l'odeur safranée est caractéristique.

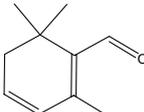
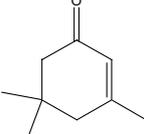
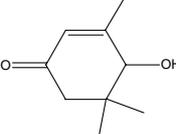
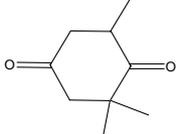
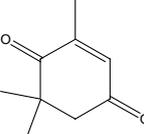
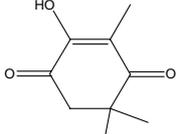
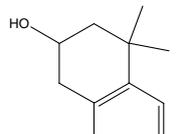
#### **I.2.3.1. Composition chimique de la fraction volatile**

L'arôme du safran est composé majoritairement de safranal qui constitue, selon Rödel, (Rodel et Petrzika, 1991), et Alonso, (Alonso et al., 1998), environ 60% de la fraction volatile. L'ensemble des composés volatils du safran, cités dans la littérature, a été répertorié dans le Tableau 7.

Les premiers travaux portant sur les composés volatils présents dans le safran ont été réalisés par Zarghami, (Zarghami et Heinz, 1971a). Des extraits de safran à l'éther diéthylique

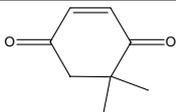
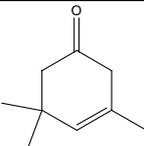
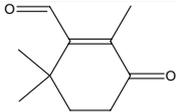
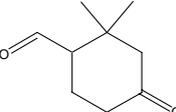
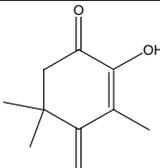
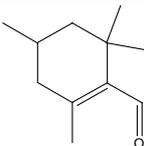
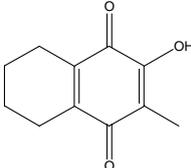
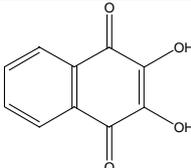
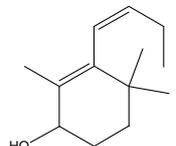
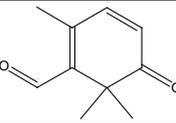
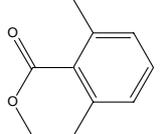
ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse. Huit composés volatils, de (1) à (8) dans le Tableau 7, ont été identifiés, dont le safranal (1) qui constitue 47% de l'aire totale des pics. Dans une étude complémentaire, (Zarghami et Heinz, 1971b), de nouveaux composés, (9) à (13), ont été répertoriés ainsi que le 2-phényléthanol, le naphthalène et la 2-[3H]-furanone, de (14) à (16). Zarghami a émis l'hypothèse que les composés dérivant de l'isophorone (2) sont formés par oxydation et décarboxylation du safranal suivie d'une oxydation et d'une isomérisation du composé (3). La présence de ces composés à la fois sous forme oxydée et réduite implique que leur formation pourrait être enzymatique.

Tableau 7. Composés volatils extraits du safran

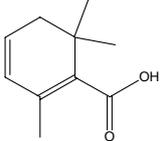
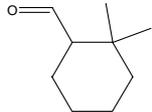
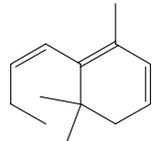
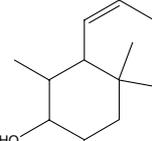
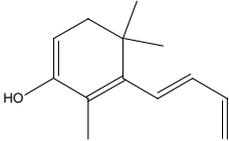
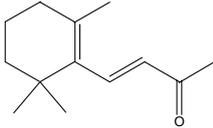
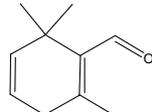
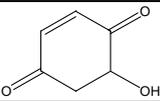
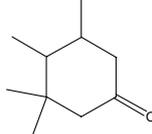
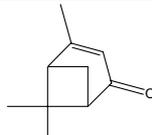
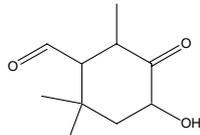
N°	Nom CAS, Extraction <sup>a</sup> , Indice de Rétention <sup>b</sup>	Structure	Référence Bibliographique
1	2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-diène <i>safranal</i> [116-26-7], (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j) IR= 1210 (DB-5ms), 1131 (HP-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Winterhalter et Straubinger, 2000)
2	3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1-one <i>α-isophorone</i> [78-59-1], (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j) IR= 1129 (DB-5ms), 1058 (HP-5ms)		(Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004) (D'Auria et al., 2004)
3	4-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1-one [14203-59-9], (a), (b), (e), (f), (j)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Winterhalter et Straubinger, 2000) (D'Auria et al., 2004)
4	2,2,6-triméthylcyclohexane-1,4-dione <i>dihydroxophorone</i> [20547-99-3], (a), (b), (c), (d), (f), (g), (h), (i), (j) IR= 1179 (DB-5ms), 1104 (HP-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Winterhalter et Straubinger, 2000)
5	2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione <i>cétoisophorone</i> [1125-21-9], (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j) IR= 1148 (DB-5ms), 1080 (HP-5m)		(Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004) (D'Auria et al., 2004)
6	2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione [35692-98-9], (a), (b), (f), (g), (h), (j) IR= 1240 (DB-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Winterhalter et Straubinger, 2000) (Cadwallader et al., 1997) (D'Auria et al., 2004)
7	4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène <i>hydroxy-β-cyclocitral</i> <i>4-hydroxysafranal, HTCC</i> [35692-94-5], (a), (b), (f), (g), (c), (i) IR= 1327 (HP-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Winterhalter et Straubinger, 2000) (Kanakis et al., 2004)

8	4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexa-1,4-dièneal [35692-95-6], (a), (b), (c), (f), (i), (j) IR= 1298 (HP-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Winterhalter et Straubinger, 2000) (Kanakis et al., 2004) (D'Auria et al., 2004)
9	2,3-époxy-4-(hydroxyméthylène)-3,5,5-triméthylcyclohexanone [33399-11-0], (a), (f)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Winterhalter et Straubinger, 2000)
10	3-hydroxy-2,6,6-triméthyl-4-oxocyclohex-2-èneal [33399-08-5], (a)		(Zarghami et Heinz, 1971b)
11	2-méthylène-6,6-diméthylcyclohex-3-èneal ou 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-èneal [33399-07-4], (a), (b), (g), (h), (i), (j) IR= 1112 (DB-5ms), 1004 (HP-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004) (D'Auria et al., 2004)
12	3,5,5-triméthyl-4-méthylène-cyclohex-2-ène-1-one [20548-00-9], (a), (b), (c), (d), (e) IR= 1218 (DB-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997)
13	2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexa-1,4-dièneal [33399-09-6], (a), (b), (g), (h) IR= 1312 (DB-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Cadwallader et al., 1997)
14	2-phényléthanol [60-12-8], (a), (b), (c), (d), (g), (h), (i) IR= 1121 (DB-5ms), 1058 (HP-5ms)		(Zarghami et Heinz, 1971b) (Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004)
15	naphtalène [91-20-3], (a) IR= 1186 (DB5)		(Zarghami et Heinz, 1971b)
16	2-[3H]-furanone <i>γ-crotonolactone</i> [20825-71-2], (a)		(Zarghami et Heinz, 1971b)
17	2-hydroxy-4,4,6-triméthylcyclohexa-2,5-diène-1-one <i>lanièrone</i> [28750-52-9], (b), (e), (g), (h), (c), (i) IR= 1163 (DB-5ms), 1098 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Winterhalter et Straubinger, 2000) (Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004)
18	2,4,6-triméthylbenzaldéhyde [487-68-3], (b), (g), (h) IR= 1321 (DB-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Cadwallader et al., 1997)
19	4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-èneal [141891-14-7], (b), (g), (h), (c), (i) IR= 1346 (DB-5ms), 1258 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004)

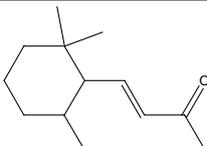
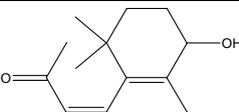
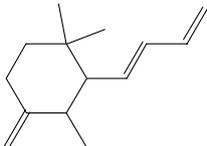
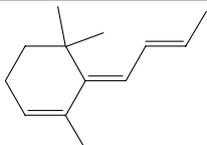
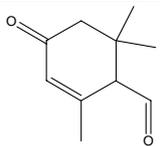
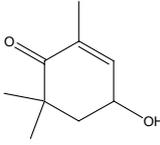
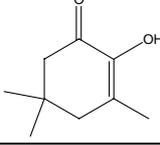
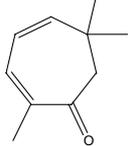
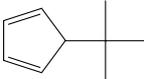
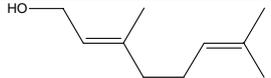
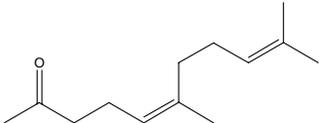
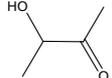
## Chapitre I : Etude bibliographique

20	5,5-diméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione [45731-99-5], (b), (e)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997)
21	3,5,5-triméthylcyclohex-3-èn-1-one <i>β-isophorone</i> [471-01-2], (b), (c), (g), (i), (j) IR= 1044 (DB-5ms), 1237 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004) (D'Auria et al., 2004)
22	2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-èneal [18378-66-0], (b), (e), (g), (h), (i) IR= 1226 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004)
23	3,3-diméthylcyclohex-1-ène [695-28-3], (b)		(Rodel et Petrzika, 1991)
24	2,2-diméthyl-4-oxocyclohexanal [141891-09-0], (b), (e)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997)
25	2-hydroxy-3,5,5-triméthyl-4-méthylèncyclohex-2-èn-1-one [141891-10-3], (b), (c) IR= 1246 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Kanakis et al., 2004)
26	2,4,6,6-tétraméthylcyclohex-1-èneal <i>4-méthyl-β-cyclocitral</i> [31236-40-5], (b) IR= 1313 (DB-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Cadwallader et al., 1997)
27	2-hydroxy-3-méthyl-5,6,7,8-tétrahydro-1,4-quinone [141891-11-4], (b)		(Rodel et Petrzika, 1991)
28	2,3-dihydroxy-1,4-quinone [605-37-8], (b), (c) IR= 1241 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Kanakis et al., 2004)
29	3-(but-1-ènyl)-2,4,4-triméthylcyclohex-2-èn-1-ol [141891-12-5], (b), (c) IR= 1337 (HP-5ms)		
30	2,6,6-triméthyl-5-oxocyclohexa-1,3-dièneal [141891-13-6], (b), (g), (h) IR= 1369 (DB-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Cadwallader et al., 1997)
31	2,6-diméthylbenzoate de méthyle [14920-81-1], (b)		(Rodel et Petrzika, 1991)

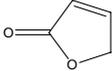
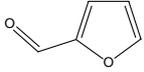
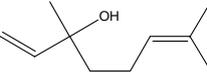
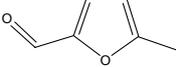
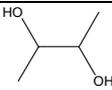
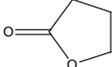
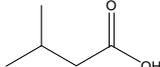
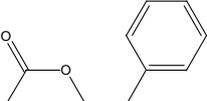
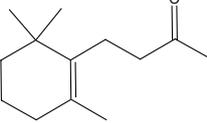
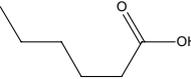
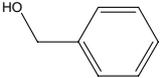
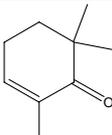
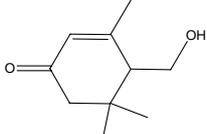
## Chapitre I : Etude bibliographique

32	acide-2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-diénoïque <i>acide β-safranique</i> [4430-99-3], (b), (e)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997)
33	2,2-diméthylcyclohexanal [13155-56-1], (b), (c), (i) IR= 1005 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Kanakis et al., 2004)
34	1-(but-1-ènyl)-2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-diène isomères [141891-15-8], (b)		(Rodel et Petrzika, 1991)
35	3-(but-1-ènyl)-2,4,4-triméthylcyclohexan-1-ol [141891-16-0], (b), (c) IR= 1342 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Kanakis et al., 2004)
36	5-(buta-1,3-diènyl)-4,4,6-triméthylcyclohexa-1,5-dièn-1-ol [141891-18-1], (b), (g), (h), (c) IR= 1501 (DB-5ms), 1382 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004)
37	1,3,3-triméthyl-2-(3-oxobut-1-ènyl)cyclohex-1-ène <i>β-ionone</i> [14901-07-6], (b), (c), (j) IR= 1484 (DB-5ms), 1375 (HP-5ms)		(Rodel et Petrzika, 1991) (Tarantilis et Polissiou, 1997) (Kanakis et al., 2004) (D'Auria et al., 2004)
38	2,4,4-triméthyl-3-(3-oxobut-1-ènyl)cyclohexan-1-ol 2 isomères [141891-16-9], (b)		(Rodel et Petrzika, 1991)
39	3,7-diméthyl-1,6-diène <i>β-citronellène</i> [2436-90-0], (c) IR= 950 (DB-5ms)		(Tarantilis et Polissiou, 1997)
40	2,6,6-triméthylcyclohexa-1,4-diènal [162376-82-1], (c), (d), (e), (i) IR= 1042 (HP-5ms)		(Tarantilis et Polissiou, 1997) (Kanakis et al., 2004)
41	2-hydroxycyclohex-5-ène-1,4-dione [184375-39-1], (e)		(Tarantilis et Polissiou, 1997)
42	3,3,4,5-tétraméthylcyclohexan-1-one [90974-64-4], (c) IR= 1085 (HP-5ms)		(Tarantilis et Polissiou, 1997) (Kanakis et al., 2004)
43	4,6,6-triméthylbicyclo-[3,1,1]hept-3-èn-2-one <i>verbénone</i> [80-57-9], (c), (d) IR= 1205 (DB-5ms)		(Tarantilis et Polissiou, 1997)
44	4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexanal [184375-40-4], (e)		(Tarantilis et Polissiou, 1997)

## Chapitre I : Etude bibliographique

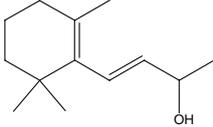
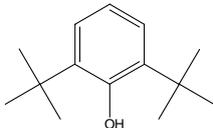
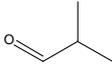
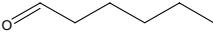
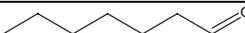
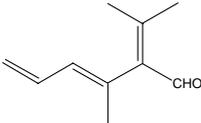
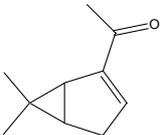
45	2,2,6-triméthyl-1-(3-oxobut-1- -enyl)cyclohexane, [98633-46-6], (c) IR= 1320 (HP-5ms)		(Tarantilis et Polissiou, 1997) (Kanakis et al., 2004)
46	2,4,4-triméthyl-3-(3-oxo-1- -butenyl)cyclohex-2-èn-1-ol [15401-34-0], (e)		(Tarantilis et Polissiou, 1997)
47	2-(buta-1,3-diènyl)-1,1,3-triméthyl- -4-méthylèncyclohexane isomères, (g) IR= 1262 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997)
48	6-(but-2-ènylidène)-1,5,5- -triméthylcyclohexène isomères [71186-25-9], [51468-85-0], [71186-24-8], [51468-86-1], (g), (c), (j), IR= 1323, 1363, 1365 (DB-5ms), 1273 (HP- 5ms)		(Cadwallader et al., 1997) (Kanakis et al., 2004) (D'Auria et al., 2004)
49	2,6,6-triméthyl-4-oxocyclohex-2- -ènal [79163-18-1], (g), (h),		(Cadwallader et al., 1997)
50	4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex- -2-èn-1-one <i>crocusatin A</i> [64809-50-3], (g), (h) IR= 1258 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997)
51	2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex- -2-èn-1-one [4883-60-7], (g), (h), (j) IR= 1152 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997) (D'Auria et al., 2004)
52	2,6,6-triméthylcyclohepta-2,4-dièn- -1-one <i>eucarvone</i> [503-93-5], (g), (h) IR= 1229 (DB-5ms)		
53	5-tertiobutylcyclopenta-1,3-diène [35059-40-6], (g), (h) IR= 884 (DB-5ms)		
54	3,7-diméthyl-octa-2,6-dièn-1-ol <i>géranol</i> [106-24-1], (h) IR= 1849 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997)
55	6,10-diméthylundeca-5,9-dièn-2-one <i>géranylactéone</i> [689-67-8], (g), (h) IR= 1449 (DB5)		
56	buta-2,3-dione [431-03-8], (g), (h) IR= 593 (DB5), 614 (DB-5ms)		
57	3-hydroxybutan-2-one <i>acétoine</i> [513-86-0], (h) IR= 711 (DB-5ms)		

## Chapitre I : Etude bibliographique

58	2-[5H]-furanone [497-23-4], (h), (j) IR= 912 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997) (D'Auria et al., 2004)
59	acide acétique [64-19-7], (h), (j) IR= 660 (DB5), <700 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997) (D'Auria et al., 2004)
60	furfural [98-01-1], (g) IR= 852 (DB5), 832 (DB-5ms)		
61	3,7-diméthyl-1,6-èn-3-ol <i>linalool</i> [78-70-6], (g), (h) IR= 1101 (DB5), 1104 (DB-5ms)		
62	acide 2-méthylpropanoïque <i>acide isobutyrique</i> [79-31-2], (h)		
63	5-méthylfurfural [620-02-0], (g) IR= 965 (DB5)		
64	buta-2,3-diol [513-85-9], (h) IR=782 (DB5), 794 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997)
65	sulfinylbisméthane [67-68-5], (h) IR= 844 (DB-5ms)		
66	dihydro-2-[3H]-furanone <i>butyrolactone</i> [96-48-0], (g), (h)		
67	acide 3-méthylbutanoïque <i>acide isovalérique</i> [503-74-2], (h) IR= 843 (DB5), 869 (DB-5ms)		
68	acétate de 2-phényléthyle [103-45-7], (g), (h) IR= 1258 (DB-5ms), 1233 (DB-5ms)		
69	1,3,3-triméthyl-2-(3-oxobut-1- -èn-yl)cyclohexane <i>dihydro-β-ionone</i> [17283-81-7], (g), (h), (j) IR= 1433 (DB5)		(Cadwallader et al., 1997) (D'Auria et al., 2004)
70	acide hexanoïque [142-62-1], (h) IR= 970 (DB5)		
71	2-phénylméthanol [100-51-6], (g), (h) IR= 1033 (DB5), 1043 (DB-5ms)		(Cadwallader et al., 1997)
72	sulfonylbisméthane [67-71-0], (h) IR= 1903 (DB-5ms)		
73	2,6,6-triméthylcyclohex-2-èn-1-one [20013-73-4], (f)		
74	4-hydroxyméthyl-3,5,5- -triméthylcyclohex-2-èn-1-one [23069-00-3], (f)		(Winterhalter et Straubinger, 2000)

## Chapitre I : Etude bibliographique

75	3,5,5-triméthyl-4-(3-hydroxy-1-butényl)cyclohex-1-ène-1-ol, [309757-87-7], (f)		(Winterhalter et Straubinger, 2000)
76	4-méthylène-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1-one [20548-00-9], (c), (i) IR= 1218 (DB-5ms), 1151 (HP-5ms)		
77	3,5,5-triméthyl-4-(1-oxobut-2-ényl)cyclohex-3-ène-1-ol [5915-02-7], (i) IR= 1379 (HP-5ms)		
78	1,2-époxy-2-(3-oxobut-1-ényl)-1,3,3-triméthylcyclohexane [23267-57-4], (i) IR= 1382 (HP-5ms)		
79	3,5,5-triméthyl-(3-hydroxybut-1-ényl)cyclohex-3-ène-1-ol [33759-63-6], (i) IR= 1490 (HP-5ms)		
80	4-(2,6,6-triméthylcyclohex-2,4-ényl)but-3-ène-2-ol [13215-85-9], (i) IR= 1503 (HP-5ms)		(Kanakis et al., 2004)
81	3,5,5-triméthyl-4-(2-hydroxybut-3-ényl)cyclohex-3-ène-1,2-di-ol [97039-06-0], (i) IR= 1518 (HP-5ms)		
82	2-furanyléthane-1-one [15022-16-9], (c), (i) IR= 873 (HP-5ms)		
83	7-méthyl-3-méthylénocta-1,6-diène <i>β</i> -myrcène [123-35-3], (c) IR= 939 (HP-5ms)		
84	1-méthyl-4-(1-méthyléthényl)cyclohex-1-ène <i>limonène</i> [7705-14-8], (c) IR= 1031 (DB5), 1029 (DB-5ms), 971 (HP-5ms)		
85	3,7-diméthyl-octa-1,6-èn-3,8-ol <i>8-hydroxylinalool</i> [64142-78-5], (i) IR= 1294 (HP-5ms)		
86	2,7,7-triméthyl-2,4-cycloheptadien-1-one [37459-89-5], (j)		(D'Auria et al., 2004)
87	5,5-diméthylcyclohexa-1,3-dièneal [68483-47-6], (j)		

88	4-(2,6,6-triméthylcyclohexènyl)but-3-èn-2-ol <i>ionol</i> [220-29-76], (j)		
89	2,6-di-t-butylphenol [128-39-2], (j)		
90	hexadecane [544-76-3], (j) IR= 1600		
91	heptadecane [629-78-7], (j) IR= 1700		
92	2-méthylpropanal [78-84-2], (j) IR= 552 (DB5)		
93	hexanal [66-25-1], (j) IR= 799 (DB5)		(D'Auria et al., 2004)
94	heptanal [111-71-7], (j) IR= 900 (DB5)		
95	nonanal [124-19-6], (j) IR= 1104 (DB5)		
96	2,4-diméthylhexa-2,4,6-trièn-3-al [691012-59-6], (j)		
97	1-(6,6-diméthyl-bicyclo[3.1.0]hex-2-èn-2-yl)éthanone [24555-40-6], (j)		

<sup>a</sup> (a) extraction à l'éther diéthylique, à froid

(b) extraction distillation simultanée éther diéthylique/pentane 2 : 1

(c) microextraction distillation simultanée à l'éther diéthylique

(d) headspace sous vide

(e) entraînement à la vapeur

(f) soxhlet à l'éther de pétrole, à l'éther diéthylique et au méthanol

(g) extraction distillation simultanée au dichlorométhane

(h) extraction directe au dichlorométhane

(i) extraction par solvant à l'eau/éther diéthylique (1 : 1), assistée par ultrasons

(j) microextraction sur phase solide

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur des colonnes de type DB5 (Kondjoyan et Berdague, 1996), DB-5ms (Cadwallader et al., 1997; Adams, 2001) et HP-5ms (Kanakakis et al., 2004)

Rödel, (Rodel et Petrzika, 1991), a extrait les composés volatils par extraction-distillation simultanée (EDS) à l'aide d'un mélange d'éther diéthylique et de pentane (2 : 1). Le safranal, avec 60% de l'aire totale des pics, est le composé majoritaire. 36 composés ont été décelés dans ces extraits. L'identification des volatils de (17) à (38), (Tableau 7), a été réalisée en CPG-SM par comparaison à une librairie et par étude de leur fragmentation. La plupart de ces composés ont une structure proche du safranal et selon Zarghami, (Zarghami et

Heinz, 1971b), leur formation provient de l'oxydation de ce dernier. Selon Rödel, (Rodel et Petrzika, 1991), les composés, comportant une chaîne en C<sub>4</sub> insaturée en position 1, sont formés par clivage de doubles liaisons le long de la chaîne polyénique de la zéaxanthine, libérant ainsi le cycle de la ionone. D'après les résultats CPG-O de cet auteur, le safranal est le composé aromatique clef du safran bien que des composés volatils mineurs y contribuent.

Tarantilis, (Tarantilis et Polissiou, 1997), a utilisé trois techniques d'isolement des composés volatils. L'entraînement à la vapeur donne 16 composés, la microextraction-distillation simultanée à l'aide d'éther diéthylique en extrait 13 et l'headspace sous vide, 8. Huit nouveaux composés ont été identifiés, de (39) à (46). Les extraits obtenus par entraînement à la vapeur d'eau, méthode la plus drastique, comportent des composés à haut point d'ébullition. Ces molécules sont probablement générées pendant l'extraction par oxydation : du safranal pour l'acide  $\beta$ -safranique (32) et de caroténoïdes pour le 3,7-diméthyl-octa-1,6-diène (39). Le safranal représente 70% de l'aire totale des pics, suivi par l'isophorone (2, ~14%), la  $\beta$ -isophorone (21, ~5%), la cétoisophorone (5, ~4%) et le 2,6,6-triméthylcyclohexa-1,4-diène (40, ~3%).

Cadawaller, (Cadwallader et al., 1997), a comparé deux méthodes, l'extraction-distillation simultanée et l'extraction directe par solvant (ED) à l'aide de dichlorométhane. 46 composés volatils ont été identifiés, dont 30 sont communs aux deux types d'extraction, les composés (1), (2) et (5) étant les plus abondants. Les extraits par ED contiennent plus d'acides, acide acétique (59), acide 2-méthylpropanoïque (62), acide 3-méthylbutanoïque (67) et acide hexanoïque (70), tandis que le taux de composés volatils est plus important dans les extraits par extraction-distillation simultanée. Ces volatils sont générés par hydrolyse thermique des précurseurs glycosidiques et des sucres, ce qui explique la présence du furfural (60) et du 5-méthylfurfural (63).

Winterhalter, (Winterhalter et Straubinger, 2000), a extrait les composés volatils du safran par soxhlet avec de l'éther diéthylique puis a procédé à leur identification par CPG-SM. Les composés détectés étaient pour la plupart connus ((1) à (9) et 17), mis à part 3 nouvelles molécules (73, 74, 75).

Kanakis, (Kanakis et al., 2004), a utilisé deux techniques d'isolement des composés volatils, la microextraction-distillation simultanée avec de l'éther diéthylique et l'extraction par solvant eau/éther diéthylique (1/1) assistée par ultrasons, sur du safran séché de manière traditionnelle et lyophilisé. Dix nouveaux composés ont été identifiés par CPG-SM, les molécules de (76) à (81) ainsi que le 2-furanyléthanone (82), le  $\beta$ -myrcène (83), le limonène

(84) et le 8-hydroxylinalool (85). La lyophilisation peut être appliquée au safran car aucune perte en composés volatils majeurs n'a été constatée. Les extraits réalisés par EDS sont plus riches en safranal tandis que le composé majoritaire de ceux assistés par ultrasons est l'HTCC. La température appliquée lors de l'EDS est assez élevée pour convertir l'HTCC en safranal alors que l'extraction assistée par ultrasons est, quant à elle, trop douce pour obtenir le safranal, la teneur en HTCC correspondant à celle présente initialement dans les stigmates.

D'Auria, (D'Auria et al., 2004), a caractérisé la fraction volatile se dégageant de safrans italien et iranien en les piégeant par microextraction sur phase solide (SPME, fibre de type PDMS) et en les analysant par CPG-SM. Douze volatils supplémentaires ont pu être identifiés, (86) à (97).

En 35 ans, plus de 90 composés volatils ont été identifiés. Ils proviennent essentiellement de dégradations thermiques de caroténoïdes et de l'hydrolyse de précurseurs glycosidiques, (Kanasawud et Crouzet, 1990b; a; Crouzet et Kanasawud, 1992). Dans chaque étude les auteurs ont cherché à isoler fidèlement les composés volatils présents dans le safran, les extractions chimiques entraînant des dégradations et étant synonymes d'artéfacts. Parmi ces molécules, une minorité participe à l'arôme caractéristique du safran (cf. I.2.3.2).

### **I.2.3.2. Composés clefs de l'arôme du safran**

Une étude par CPG-O et CPG-SM a été menée par Cadwaller, (Cadwallader et al., 1997), sur des extraits de safran espagnol, obtenus par extraction distillation simultanée (EDS) et par extraction directe (ED) au dichlorométhane. Une analyse par dilution de ces extraits a mis en évidence les composés aromatiques prédominants. Les facteurs de dilution (FD) sont indiqués dans le Tableau 8. Quatre composés ont été détectés à la fois en CPG-O et en CPG-SM : la buta-2,3-dione, l'acide acétique, le linalool et l'acide 3-méthylbutanoïque. Cette étude a permis d'identifier de nouveaux composés par leur indice de rétention et leur odeur caractéristique. Ils sont indiqués dans le Tableau 8 par un astérisque.

**Tableau 8. Composés aromatiques présents dans le safran « Mancha Supérieur » (Cadwallader et al., 1997).**

N°	Composés	IR <sup>1</sup>	Notes aromatiques <sup>2</sup>	Moyenne	
				Log <sub>3</sub> (facteur FD) <sup>3</sup>	
				EDS <sup>4</sup>	ED <sup>5</sup>
<b>sucrée</b>					
56	buta-2,3-dione*	614	beurré, fromage blanc	<1	<1
98	4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone* [3658-77-3]	1060	barbe à papa, framboise	nd <sup>6</sup>	<1
<b>florale</b>					
21	3,5,5-triméthylcyclohex-3-èn-1-one	1042	safran, florale, paille	1,33	<1
61	linalool*	1096	florale, miellée	1,67	<1
14	2-phényléthanol	1115	florale, rose	<1	1,33

## Chapitre I : Etude bibliographique

	indéterminé		florale, rose, safran	3,17	<1
<b>épicee</b>					
1	indéterminé		safran, paille séchée	2	1,17
	2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-dièneal (safranal)	1203	safran, thé	5,33	4
17	indéterminé		safran, paille séchée	2,17	4,5
	2-hydroxy-4,4,6-triméthylcyclohexa-2,5-diène-1-one	1159	safran, paille séchée, plate	5,5	5,5
<b>grasse</b>					
99	(E,Z) nona-2,6-dièneal* [26370-28-5]	1152	sucrée, concombre	1	<1
	indéterminé		plate, savonneuse	nd	<1
100	(E,E) déca-2,4-dièneal* [2363-88-4]	1312	grasse, huile frite	1	1
<b>verte</b>					
101	oct-1-ène-3-one* [4312-99-6]	978	champignon, terreuse	2	1,17
	indéterminé	866	riz cuit, pain cuit	3,5	2
67	acide-3-méthylbutanoïque*	840	pourrie, acide, fruit sec	2	1,67
	indéterminé		fruité, plate	<1	1,33
<b>âpre/acre</b>					
	indéterminée	775	plastique de bouteille d'eau	<1	nd
59	acide acétique*	605	vinaigre, acide	nd	<1
<b>écorce d'arbre</b>					
	indéterminé		plate, amer, paille séchée	1,33	<1
	indéterminé		plate, amer	1,33	nd
<b>autres</b>					
	indéterminé	605	acide, chocolat noir	<1	<1
102	2-acétyl-1-pyrroline* [85213-22-5]	921	noisette, popcorn	2,83	<1
103	3-(méthylthio)propanal* [3268-49-3]	906	patate cuite	1,67	nd
	indéterminé		oignon vert	1,83	1,33

<sup>1</sup> Indices de Rétention expérimentaux sur une colonne DB-5ms

<sup>2</sup> descripteurs aromatiques définis pendant la CPG-O.

<sup>3</sup> moyenne log<sub>3</sub>FD facteur (n=6).

<sup>4</sup> EDS, Extraction Distillation Simultanée à pression atmosphérique.

<sup>5</sup> ED, Extraction Directe.

<sup>6</sup> nd, non détecté pendant la CPG-O.

\* composés non détectés jusqu'à présent.

Les deux extraits de safran possèdent des notes distinctes. L'extrait ED donne des notes "sucrée", "épicee", "florale" tandis que des notes "noisette", "riz cuit" et "foin" ont été décelées dans l'extrait EDS. Au total, 25 composés odorants ont été détectés dans les deux extraits, l'extrait EDS comportant 23 composés contre 22 dans le second, 18 étant communs aux deux. Ces molécules peuvent être regroupées en catégories, selon le vocabulaire développé pendant l'étude sensorielle de Narasimhan, (Narasimhan et al., 1992), "sucrée", "florale", "épicee", "grasse", "verte", "âpre/acre" et notes d'"écorce d'arbre". Le composé (17) possède le plus grand facteur de dilution dans les deux extraits (5,50) suivi par le safranal (5,33 et 4,00). Alors que les études précédentes désignaient le safranal comme le seul composé déterminant de l'arôme du safran, cette étude montre que le composé (17), malgré sa faible teneur au sein de la fraction volatile (environ 10 à 20 fois inférieure à celle du safranal)

participe aussi activement, sinon plus, que le safranal à l'odeur caractéristique de l'épice. Ce composé, peu présent à l'état naturel, est synthétisé à partir de l' $\alpha$ -isophorone dans l'industrie agroalimentaire afin d'aromatiser la nourriture et le tabac, (De Buyck et al., 1985). Plusieurs composés ont un facteur de dilution élevé : 2 composés inconnus, d'odeurs respectivement "safranée", "florale", "rose", et "riz cuit", "pain cuit" ainsi que le safranal, donnant des notes "safranée" et de "thé". D'autres composés participent à l'arôme global du safran. Le linalool, le benzeneméthanol et le 2-phényléthanol, proviennent de précurseurs glycosidique, le 2-acétyl-1-pyrroline, la buta-2,3-dione, le 3-(méthylthio)propanal et l'acide 3-méthylbutanoïque, de la réaction de Maillard et le oct-1-èn-3-one, le nona-2,6-diènal et le déca-2,4-diènal, de l'oxydation des lipides

Knapp, (Knapp et al., 1999), a isolé les composés volatils de safran grec par EDS et ED réalisées dans un mélange pentane : éther diéthylique (1:1). L'analyse par dilution de ces extraits confirme que les plus hauts facteurs de dilution appartiennent au safranal et à la 2-hydroxy-4,4,6-triméthylcyclohexa-2,5-dièn-1-one (17), mais aussi au linalool et à l'isophorone (21). Deux composés non-identifiés ont révélé des notes "noisette" et "melon".

Lors de ces études, 25 composés odorants ont été mis en évidence dont deux majoritaires, la 2-hydroxy-4,4,6-triméthylcyclohexa-2,5-dièn-1-one (17) et le safranal. Les molécules participant activement à l'arôme du safran sont souvent à l'état de traces et ne sont pas détectées en CPG-SM. Elles proviennent principalement de la dégradation de précurseurs aromatiques glucosidiques, de réactions de Maillard lors du séchage et de l'oxydation des lipides, (Cadwallader, 2002).

### **I.2.3.3. Précurseurs glycosidiques des composés volatils**

Des études récentes, conduites par Winterhalter, (Winterhalter et Straubinger, 2000), ont montré que la picrocrocine n'est pas le seul précurseur aromatique glycosidique dans le safran (Figure 5) et qu'il existe un grand nombre de ces composés qui, extraits par solvant puis incubés dans une préparation méthanolique commerciale de glucosidase, libèrent des composés volatils. Les glycosides ont été isolés par chromatographie multicouches à contre courant et CLHP et analysés par des techniques spectroscopiques. Initialement, 4 composés glycosilés, présentés sur la Figure 5, ont été reportés par Straubinger, (Straubinger et al., 1997b) : le (4R)-4-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-èn-1-one O- $\beta$ -D-glucopyranoside (1a), le (4S)-4-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-èn-1-one O- $\beta$ -D-glucopyranoside (2a), le (4S)-(4-hydroxyméthyl)-3,5,5-triméthylcyclohex-2-èn-1-one O- $\beta$ -D-glucopyranoside (3a) et le  $\beta$ -D-gentiobiosyl ester de l'acide 2-méthyl-6-oxohepta-2,4-diénoïque (4a).

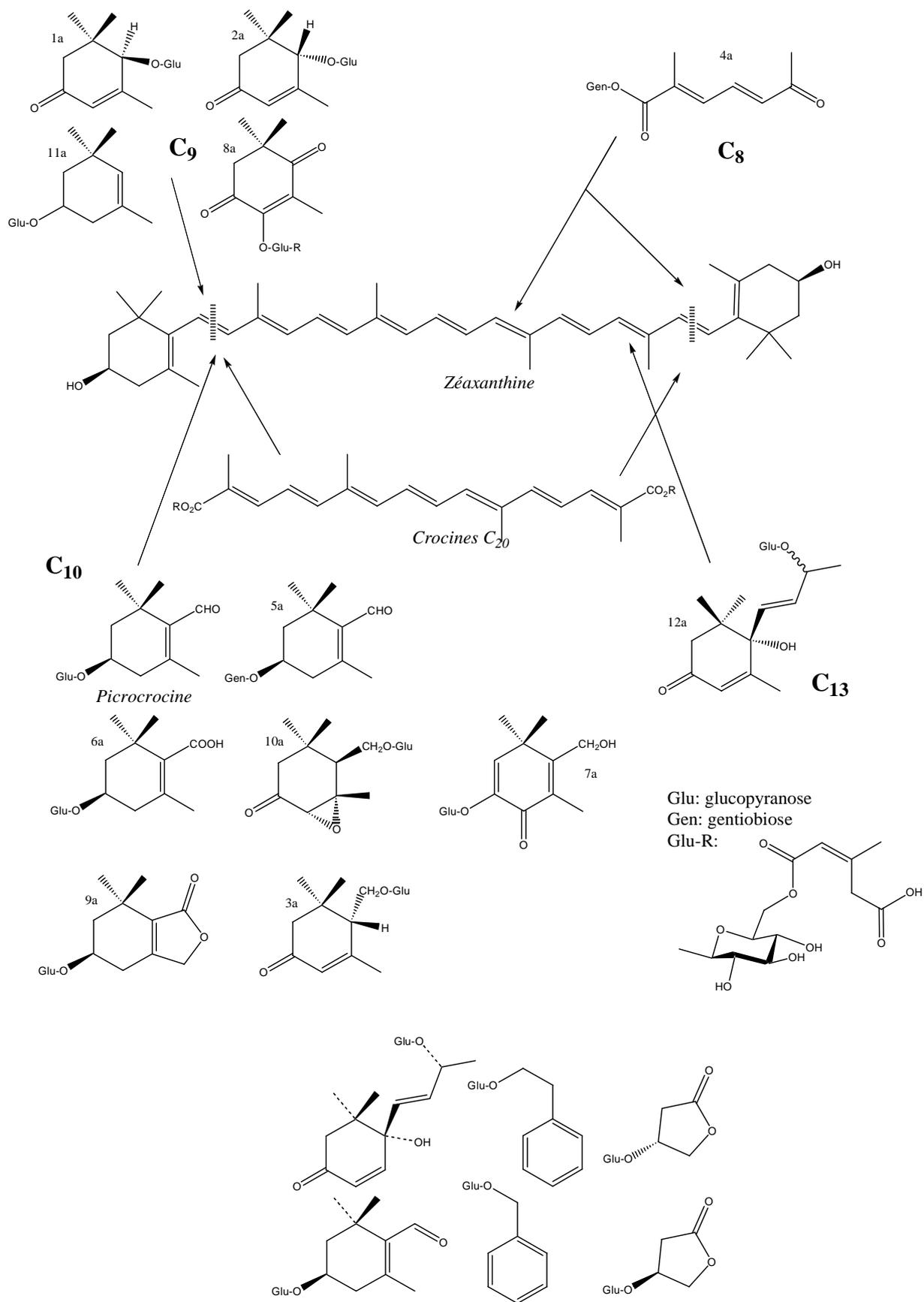


Figure 5. Structure des composés glycosylés pouvant provenir de la dégradation de la zéaxanthine.

De nouveaux glycosides ont été isolés et identifiés en 1998, (Straubinger et al., 1997a; Straubinger et al., 1998; Knapp et al., 1999): le (4R)-4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexenal O-β-D-gentiobioside (5a), l'acide (4R)-4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohexenoïque O-β-D-glucopyranoside (6a), 6-hydroxy-3-(hydroxyméthyl)-2,4,4-triméthylcyclohexa-2,5-diène 6-O-β-D-glucopyranoside (7a), le 1-[1-(2,4,4-triméthyl-3,6-dioxocyclohexenyloxy)-O-β-D-glucopyranosid-6-yl] ester de l'acide (2Z)-3-méthylpent-2-énoïque (8a), le (5S)-5-hydroxy-7,7-diméthyl-4,5,6,7-tétrahydro-3H-isobenzofuranone O-β-D-glucopyranoside (9a), le (1S,5S,6R)-5-(hydroxyméthyl)-4,4,6-triméthyl-7-oxabicyclo-[4,1,0]-heptan-2-one O-β-D-glucopyranoside (10a), le (1R)-3,5,5-triméthylcyclohex-3-énol O-β-D-glucopyranoside (11a) et le roséoside (12a).

Ces composés proviennent de la dégradation de la zéaxanthine par clivage enzymatique ou par des réactions d'oxydation et peuvent facilement conduire, lors d'un traitement thermique, à des composés volatils connus dans le safran. Les glucosides 1a, 3a et 6a donnent les volatils (1), (4), (12) et (29), répertoriés dans le Tableau 7.

Cinq autres glycosides ont été identifiés, (Winterhalter et Straubinger, 2000) : les glucosides du 4-hydroxydihydrofuran-2-one, du 2-phényléthanol et du phénylméthanol, source de la 2-[3H]-furanone et du 2-phényléthanol détectés pour la première fois par Zargahmi, (Zarghami et Heinz, 1971b). La formation du lanièrone, composé clef de l'arôme de safran, restant jusqu'à présent inexplicée, Knapp, (Knapp et al., 2002), ont synthétisé le 2-glucopyranosyloxy-4,4,6-triméthyl-2,5-cyclohexadien-1-one, précurseur présumé du lanièrone. Une analyse par CLHP-SM-SM a permis de conclure que ce glycoside est à l'origine du composé odorant.

19 précurseurs glycosidiques ont été mis en évidence au cours de ces dernières années. Le mécanisme de libération des composés volatils a été peu étudié jusqu'à présent.

#### **I.2.4. Applications du safran**

Le safran est employé essentiellement pour son pouvoir colorant et pour ses principes actifs (caroténoïdes, etc...).

##### **I.2.4.1. Pouvoir colorant**

La couleur jaune d'or du safran est utilisée dans la peinture, les textiles, et l'agro-alimentaire.

Une étude effectuée par Barkeshli, (Barkeshli et Ataie, 2002), sur la stabilité pH du safran en tant qu'inhibiteur du vert-de-gris dans les peintures miniatures persanes, a montré que cette épice a un effet préventif contre la corrosion causée par les pigments vert-de-gris sur les peintures et permet d'obtenir différents types de verts. Les solutions de safran restent stables dans une large mesure en milieu alcalin et acide. Cette propriété est due au pKa de la crocine, aux acides dicarboxyliques, aux esters et aux composés azotés. Les solutions tampons de safran, empêchant la réduction du cuivre, réduisent l'oxydation de la cellulose. Une étude de la dégradation thermique et photochimique du jaune « safran » sur les peintures a été réalisée par Vickacktaite, (Vickackaite et al., 2004). La lumière induit une isomérisation de la crocine de la forme *trans* vers la *cis* et la température entraîne la rupture de la liaison glycosidique au sein de cette molécule.

Le safran continue à teindre les habits des moines bouddhistes, la soie, les laines et les tapis d'Orient. Les colorants naturels ayant une meilleure biodégradabilité et compatibilité avec l'environnement, une toxicité plus faible et étant moins allergisants que les colorants de synthèse, Tsatsaroni, (Tsatsaroni et Eleftheriadis, 1994), a étudié le pouvoir colorant d'extraits aqueux de safran sur le coton et la laine et leur résistance au lavage et à la lumière. Cette dernière étant de qualité moyenne, elle est améliorée par un prétraitement avec des sels métalliques (sulfate d'aluminium, chlorure de zinc et tartrate de sodium et de potassium), qui assombrissent, cependant, la couleur jaune ou avec des enzymes de type  $\alpha$ -amylase, amyloglycosidase et trypsine, (Tsatsaroni et al., 1998).

Le safran est utilisé pour son arôme, sa couleur et son goût dans des plats indiens (Mehta et al., 2002), ou européens tels que la paella, le risotto, la bouillabaisse, des infusions, des thés et des boissons. Le puissant pouvoir tinctorial du safran a été employé de longue date afin de colorer le beurre, les pâtes, les fromages et les oléomargarines, simulant ainsi la présence d'œuf, (Mougin, 1999). Actuellement, l'effet néfaste des colorants alimentaires synthétiques sur la santé entraîne leur interdiction dans certains pays, comme le Japon, la Norvège et la Finlande, et le retour vers des colorants naturels. La très grande solubilité de la

crocine dans l'eau, représente un grand avantage pour l'industrie agro-alimentaire. Plusieurs études ont été menées sur la stabilité du safran en solution aqueuse. Selon Tsimidou, (Tsimidou et Tsatsaroni, 1993), la dégradation des pigments est du première ordre quelles que soient les conditions expérimentales et est favorisée par des températures élevées, un pH bas et par l'action de la lumière. Les caroténoïdes, de part leur structure polyénique, sont sujets à des réactions d'isomérisation et d'oxydation accélérées par la lumière, et à des dégradations thermiques et enzymatiques. Lorsqu'ils sont polaires, ils sont sensibles au pH. Selon Orfanou, (Orfanou et Tsimidou, 1995), l'ajout d'antioxydant et de conservateurs est efficace sur la stabilité de la crocine. L' $\alpha$ -crocine, produite *in vitro* afin de limiter son coût, pourrait être un bon remplaçant de la tartrazine. Comparativement à d'autres colorants naturels alimentaires comme le  $\beta$ -carotène ou le paprika, le safran a une tenue excellente à la chaleur et à la lumière (Greaves, 2002).

### **I.2.4.2. Activités biologiques du safran**

Depuis l'Antiquité, des vertus thérapeutiques ont été attribuées au safran : antispasmodique, eupeptique, sédatif nerveux et gingival, carminatif, diaphorétique, stomacal, emménagogue et stimulant, (Sampathu et al., 1984). Trop onéreuse, cette épice a été remplacée par des produits de synthèse. En homéopathie, le safran est toujours prescrit pour soigner les troubles circulatoires, les dysménorrhées ou règles douloureuses chez la femme.

Des études récentes ont montré que le safran aurait un intérêt pharmacologique dans plusieurs domaines : cancérologie, maladie neurodégénérative et rétinopathie, (Abdullaev, 2001). Le cancer étant la deuxième cause de mortalité dans le monde, l'activité de constituants alimentaires a été évaluée. L'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocophérol, l' $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène et la vitamine A ont des activités biologiques reconnues contre cette maladie, (Abdullaev et Frenkel, 1992a). De nombreuses études ont démontré que les extraits de safran ont un effet anticarcinogène, (Salomi et al., 1991), et antitumoral *in vivo* et *in vitro*, (Abdullaev et Frenkel, 1992b; Tarantilis et al., 1992; Escribano et al., 1996). Dans les extraits de safran, les caroténoïdes sont les constituants biologiquement actifs. Plusieurs mécanismes ont été proposés, (Abdullaev, 2001) :

- l'effet inhibiteur du safran sur la synthèse d'acide nucléique
- l'effet inhibiteur sur les réactions en chaîne des radicaux libres : les caroténoïdes liposolubles agissent comme une protection active contre les radicaux libres
- la conversion métabolique naturelle des caroténoïdes en rétinoïdes

- les propriétés antioxydantes du safran

La médecine traditionnelle chinoise indique que le safran était utilisé pour soigner des troubles du système nerveux central. Actuellement, des chercheurs japonais, (Abe et Saito, 2000), étudient l'effet d'extraits de safran et de ses constituants sur l'apprentissage et la mémoire chez la souris. La crocine est la molécule la plus active. Le safran pourrait être utilisé dans le traitement de maladies neurodégénératives accompagnées de perte de mémoire.

Le safran a une activité sur les fonctions sanguines et rétiniennes. Les résultats de plusieurs études montrent qu'il pourrait être utilisé afin de soigner les troubles sanguins, (Liakopoulou-Kyriakides et Kyriakidis, 2002) et oculaires telles que la rétinopathie et la dégénérescence de la macula, (Abdullaev, 2001).

Le safran possède donc de nombreuses activités thérapeutiques. Les chercheurs se basent actuellement sur les vertus attribuées au safran dans l'Antiquité afin de découvrir les molécules actives de cette épice.

### **I.2.4.3. Conclusions sur les applications du safran**

Le safran est essentiellement employé pour son pouvoir colorant et ses propriétés thérapeutiques, dues aux caroténoïdes et notamment à la crocine. Le safran étant très onéreux, d'autres sources de crocine ont été recherchées. Le *Gardenia jasminoides* Ellis est une plante riche en crocine. Elle appartient à la famille des Rubiaceae et est originaire du sud de l'Asie, de Chine, du Japon et d'Inde. Ses fruits sont utilisés en tant que colorants dans l'industrie textile et alimentaire, (Pfister et al., 1996). Une deuxième approche se développe actuellement, (Himeno et Sano, 1987) : la culture *in vitro* du safran, source de crocine, picrocrocine et safranal.

### **I.2.5. Conclusions sur l'étude des stigmates**

Le safran, issu du *Crocus sativus* Linn., est une épice qui remonte à la plus haute Antiquité et qui a toujours été très onéreuse, sa culture nécessitant une main d'œuvre importante, les essais de mécanisation étant peu concluants. L'obtention du safran à partir des trois stigmates est un procédé très délicat, le séchage des stigmates étant garant de sa qualité. Les métabolites secondaires majoritaires sont les crocines, molécules colorantes, la picrocrocine, saveur amère du safran et le safranal, composé volatil majoritaire. L'arôme du safran est très complexe. Plus de 90 molécules ont été identifiées, pourtant, les deux applications principales du safran concernent sa couleur "jaune or" et plus récemment ses propriétés anticancerigènes et antitumorales, provenant essentiellement de la crocine. La

culture *in vitro* des stigmates se développe afin d'assurer une production de crocine à faible coût.

### **I.3. LES AUTRES ORGANES DE LA PLANTE : CARACTERISATION ET APPLICATIONS**

Les stigmates ne représentent qu'une très faible partie de la plante. Pourtant, la fleur, la feuille et le bulbe n'ont été que très peu étudiés.

#### **I.3.1. La fleur**

Différents aspects de la fleur ont été étudiés : son arôme, ses pigments et l'activité biologique de certaines de ses molécules.

##### **I.3.1.1. L'arôme**

Les fleurs de safran, après en avoir retiré l'épice, dégagent une odeur "florale" agréable de "rose miellée" forte et enivrante.

Les laboratoires Monique Rémy (Parc industriel des Bois de Grasse, 06130 Grasse) ont effectués des essais d'extraction, en vue d'une valorisation en cosmétique ou dans la parfumerie, dans une unité d'extraction en Lozère, la « SADEV » (La chazotte, 48130 Aumont-Aubrac).

Le rendement de l'extraction à l'hexane est de 0,196% et celui de l'absolue de 0,102%. Les notes obtenues sont "florale épicée", "chaude", "miellée", très fixées et très soutenues. Les principaux constituants de l'absolue sont : le 2-phényléthanol, l'acétate et l'acide phénylacétique, l'acétate de linalyle et les acides gras de C<sub>10</sub> à C<sub>30</sub> avec leurs esters principalement méthyliques et éthyliques. Le safranal est présent sous forme de traces, (Algrech, 2001).

##### **I.3.1.2. Les pigments**

Saitô, (Saitô et al., 1960), a mis en évidence la présence de deux anthocyanines violettes dans les fleurs de safran. La structure générale de ces pigments hydrosolubles est basée sur le cation 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavylium, la cyanidine, représentée sur la Figure 6. Une CCM de l'extrait méthanolique de pétale révèle un diglucoside de delphinidine et un glycoside de pétunidine en proportion 4/1.

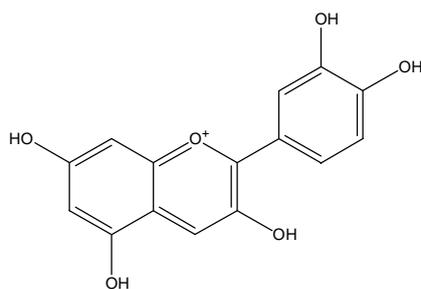


Figure 6. L'ion cyanidine.

Garrido, (Garrido et al., 1987), a identifié dans un extrait aqueux de pétales trois flavonols : les aglycones de myricétine, de quercétine et de kaempférol. La structure générale de ces pigments jaunes ou co-pigments des anthocyanines est présentée sur la Figure 7.

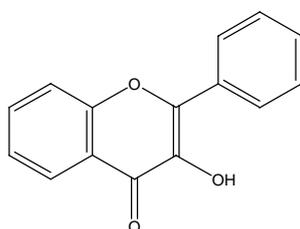


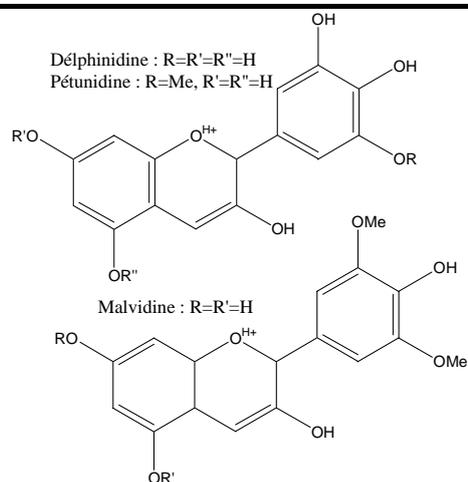
Figure 7. Structure générale du flavonol.

Selon Ebrahimzadeh, (Ebrahimzadeh et Radjabian, 1998), les extraits alcooliques et aqueux des pétales de crocus ne contiennent pas de caroténoïdes. Norbek, (Norbek et Kondo, 1998), dans le but de classer les espèces de crocus (taxonomique), a effectué une étude plus poussée en extrayant et en identifiant les anthocyanines et les flavonoïdes présents dans les pétales de crocus (Tableau 9). Les anthocyanines donnent la couleur violette aux pétales tandis que les flavonoïdes sont des co-pigments induisant un effet bathochrome et interagissant avec les sucres des anthocyanines.

Tableau 9. Anthocyanines et flavonoïdes identifiés dans les fleurs de crocus.

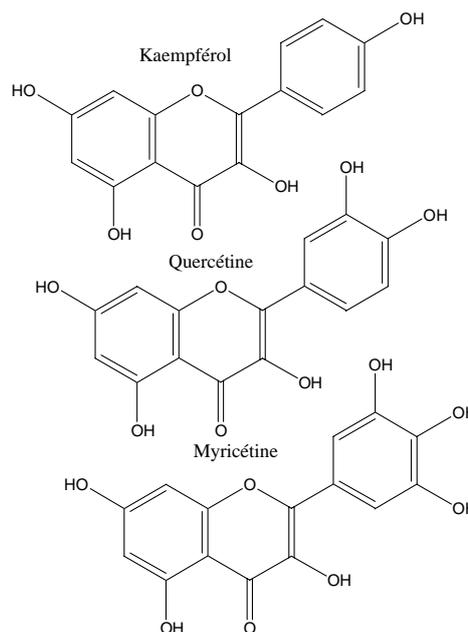
**Anthocyanines (%)\***

Delphinidine-3,5-di-O-β-glucoside (>30%)
Pétunidine-3,5-di-O-β-glucoside (>10%)
Delphinidine-3-O-β-rutinoside (>10%)
Pétunidine-3-O-β-rutinoside (<5%)
Delphinidine-3-O-β-glucoside-5-O-β-(6-O-malonyl) glucoside (<5%)
Pétunidine-3,7-di-O-β-(6-O-malonyl) glucoside (>10%)
Malvidine-3,7-di-O-β-(6-O-malonyl) glucoside (<5%)



**Flavonoïdes (%)\***

Quercétine-3-O-β-sophoroside (>40%)  
 Kaempférol-3-O-β-sophoroside (>20%)  
 Myricétine-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-glucoside  
 Quercétine-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-glucoside  
 Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-glucoside  
 Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-(6-O-malonyl) glucoside  
 Kaempférol-3-O-α-(2,3-di-O-b-glucosyl) rhamnoside  
 Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside-7-O-β-(6-O-acétyl) glucoside  
 Kaempférol-3-O-α-(2-O-β-glucosyl)-rhamnoside



\* numéros cas (délphinidine [528-53-0], kaempférol [520-18-3], quercétine [117-39-5] et myricétine [529-44-2])

**I.3.1.3. L'activité biologique**

Les extraits aqueux de pétales de crocus possèdent plusieurs activités. Selon Kubo, (Kubo et Kinst-Hori, 1999), les composés phénoliques sont les composés biologiquement actifs dans les pétales. Le kaempférol, isolé des pétales de fleurs fraîches permet d'inhiber l'oxydation de la L-3,4-dihydrophénylanine (L-DOPA). Son activité provient de sa capacité à chélater le cuivre dans l'enzyme. La tyrosinase catalyse deux réactions de synthèse de la mélanine et est connue comme étant une polyphénol oxydase, ce qui provoque le brunissement des produits alimentaires. Son inhibition aurait une application dans le domaine alimentaire, médical et cosmétique. Li, (Li Chia-Ying et al., 2004), a isolé d'autres composés ayant cette même activité dans les pétales : le 4,5-dihydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène, le 3-hydroxy-2,6,6-triméthyl-4-oxocyclohexènylméthanol, le 4-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène, l'acide protocatéchique et le 7-O-β-D-glucopyranoside kaempférol. Hosseinzadeh, (Hosseinzadeh et Younesi Hani, 2002), a mis en évidence l'activité antinociceptive\* et anti-inflammatoire des extraits alcoolique et aqueux des pétales chez la souris.

**I.3.1.4. Conclusions**

La fleur de crocus étant éphémère, difficile à conserver et présente sur une courte période de l'année, n'a été que très peu caractérisée. L'étude aromatique révèle un intérêt olfactif non négligeable. Seul les pigments hydrosolubles ont été isolés et certains d'entre eux possèdent une activité biologique.

\*qui se rapporte à tout stimulus produisant une sensation douloureuse, aux récepteurs qui captent de telles sensations, ou aux réactions provoquées par ce type de stimulus.

### **I.3.2. La feuille**

Le *Crocus sativus* produit une importante quantité de feuilles d'octobre à mai. La production d'1 kg de safran est accompagnée par la croissance de 1,5 t de feuilles pouvant dépasser un mètre de long. Pourtant, peu d'études ont été menées sur cet organe.

#### **I.3.2.1. Caractérisations**

Les composés phénoliques des feuilles de crocus (Tableau 10) ont été étudiés par Bate-Smith, (Bate-Smith, 1968), et Williams, (Williams et al., 1986), en vue de démontrer leur signification en taxonomie.

*Tableau 10. Composés phénoliques identifiés dans les feuilles de crocus.*

<b>Composés</b>	<b>Références bibliographiques</b>
Kaempférol	(Williams et al., 1986) (Bate-Smith, 1968)
Acide caféique	
Acide p-coumarique	(Bate-Smith, 1968)
Acide ferulique	
Glycoflavones	

#### **I.3.2.2. Applications**

Autrefois, les feuilles de crocus étaient utilisées en tant que fourrage pour les animaux. Les vaches laitières appréciaient cette herbe et le lait était de couleur jaune plus intense, (Algrech, 2001). Une étude a été réalisée, (Valizadeh, 2000), sur la digestibilité de la matière sèche et organique des feuilles de crocus par des moutons et des chèvres. Il en résulte que les feuilles sont de qualité moyenne pour la nutrition des ruminants. Un apport alimentaire supplémentaire est nécessaire pour une bonne utilisation.

Les feuilles, et notamment leur pouvoir colorant, ont été peu étudiés et n'ont pas d'utilisation spécifique de nos jours.

### **I.3.3. Le bulbe**

La reproduction du crocus étant végétative, les bulbes, après épuisement du sol, sont déterrés en juin. Seuls les plus beaux sont replantés en juillet-août.

#### **I.3.3.1. Caractérisations**

Les premières études menées sur les bulbes ont été réalisées par Hirose, (Hirose et al., 1962), puis par Loukis, (Loukis et al., 1983). Ils ont étudiés les sucres, le mucilage, les acides aminés, les saponines, les acides triterpéniques, les matières grasses et l'amidon. L'amidon se trouve sous forme de grains striés, simples (3 à 18  $\mu\text{m}$ ) et composés (20 à 28  $\mu\text{m}$ ), sphériques, ellipsoïdes ou polyédriques. Il a été étudié plus amplement par Craig, (Craig et al., 1985),

dans des bulbes de crocus indien (Tableau 11). Selon la méthode de dosage colorimétrique décrite par Dubois, (Dubois et al., 1956), le taux d'amylose est de 27,4% ce qui est supérieur au taux de nombreuses céréales et pomme de terre.

*Tableau 11. Constituants des bulbes de crocus.*

<b>Sucres</b>	
(Hirose et al., 1962)	Glucose
(Loukis et al., 1983)	Galactose Saccharose Fructose
<b>Mucilage</b>	
(Loukis et al., 1983)	-
<b>Acides aminés</b>	
(Hirose et al., 1962)	Acide aspartique
(Loukis et al., 1983)	Acide glutamique
(Hirose et al., 1962)	Cystine Serine Glycine Thréonine Tyrosine
(Hirose et al., 1962)	Alanine
(Loukis et al., 1983)	Arginine Histidine Lysine Proline Phénylalanine
(Hirose et al., 1962)	Leucine
(Loukis et al., 1983)	Valine Méthionine
<b>Saponines</b>	
(Hirose et al., 1962)	Glucoside d'acide oléanolique Stéroïdique non identifiée
<b>Acides triterpéniques</b>	
(Loukis et al., 1983)	Acide ursolique Acide oléanolique
<b>Matières grasses / Acide gras</b>	
(Loukis et al., 1983)	Palmitique Palmitoléique Oléique Linoléique Linoléinique
<b>/ Stérols</b>	
(Loukis et al., 1983)	Campestérol Stigmastérol
(Loukis et al., 1983)	$\beta$ -sitostérol
<b>Amidon</b>	
(Loukis et al., 1983)	-

Chrungoo, (Chrungoo et Farooq, 1985; Chrungoo et al., 1986; Chrungoo et Farooq, 1988; 1993), a étudié l'évolution des taux d'amidon, de sucres totaux, d'azote total, de protéines solubles, de protéines sous forme de granules (albumine, globuline, prolamine, glutéline), indiqués dans le Tableau 12, des composés phénoliques (acide pyrogallique, kaempférol, acide p-coumarique et acide gallique) et des enzymes telles que l'amylase et la phosphorylase agissant sur l'amidon au cours du développement du bulbe de mai à octobre. Ces enzymes diminuent la quantité d'amidon et augmentent celle des sucres totaux avant la floraison, (Farooq et Kaul, 1983).

*Tableau 12. Taux d'amidon, de sucres totaux, de protéines et d'azote dans le bulbe.*

<b>Teneur en constituants (%)</b>	<b>Mai</b>	<b>Octobre</b>
% d'amidon par rapport au poids sec	50%	4%
% de sucres totaux par rapport au poids sec	6%	14%
% de protéines solubles par rapport à la matière humide	0,2%	1,2%
% de protéines sous formes de granules par rapport à la matière humide	0,04%	0,09%
% d'azote total (dosé par Kjeldahl) par rapport à la matière humide	0,2%	0,38%

### **I.3.3.2. Applications**

#### **I.3.3.2.1. Alimentaires**

Autrefois, les bulbes étaient consommés par les animaux mais aussi par les hommes pendant les périodes de famines. Ils étaient broyés et rajoutés au pain dans la région de Caussade. Les jeunes bulbes sont consommés aujourd'hui au Tibet et au Cachemire, comme des radis. Les oignons de safran auraient également servi après fermentation à la fabrication d'alcool.

#### **I.3.3.2.2. Biologiques**

Des études biologiques ont été menées par Escribano et Frenandez, (Escribano et al., 1999a; Escribano et al., 1999b ; Escribano et al., 2000a; Fernandez et al., 2000), sur l'effet antitumoral d'un protéoglycane présent dans le bulbe de safran. Il est constitué à 94,5% de polysaccharide dont le composé majeur est à 36,4% du rhamnose, les 5,5% restant étant une protéine composée d'acide aspartique, asparagine, alanine, acide glutamique, glutamine, glycine et serine (Escribano et al., 1999c). Lors de l'extraction du protéoglycane, Escribano, (Escribano et al., 2000b), a isolé une lectine représentant 30% du taux total de protéines et étant liée à un mannane. Quatre autres lectines, du même type, ont été identifiées par Oda, (Oda et Tatsumi, 1993). Les lectines extraites de plante sont très utilisées pour des

applications biologiques et industrielles, notamment lorsqu'elles sont liées spécifiquement à un glucide.

### **I.3.3.2.3. Production de safran**

Des techniques de biotechnologies se développent actuellement, afin de produire, *in vitro*, du safran à partir de cellules de bulbes de crocus, (Vurdu, 2003). La quantité de picrocrocine produite est supérieure à celle présente dans les stigmates tandis que le taux de safranal est similaire et la quantité de crocine inférieure, (Visvanath et al., 1990).

### **I.3.3.3. Conclusions**

Les bulbes de crocus ont été peu étudiés. De nouvelles recherches tendent à les valoriser en vue d'applications biologiques directes ou par la production de l'épice *in vitro*. Les caroténoïdes majoritaires, ainsi produits seraient utilisés pour leurs activités biologiques. Actuellement, le seul débouché économiquement rentable, surtout pour des petits producteurs, est la commercialisation des bulbes, obtenus après multiplication, dans des pépinières. Dans le Quercy, 140 000 bulbes sont vendus par an à 0,30€/bulbe.



Actuellement, le *Crocus sativus* Linn. est cultivé essentiellement pour ses stigmates, source de safran. Le procédé d'obtention de l'épice, dont en dépendra la qualité, est constitué des étapes de cueillette, d'émondage et de séchage, opérations très délicates et peu mécanisables, nécessitant un savoir-faire.

Le safran a été cultivé en France, dans la région du Quercy, jusqu'au XVIII<sup>e</sup> siècle. La réapparition de l'épice s'inscrit dans la redécouverte du passé et la production de safran reste, actuellement, très faible. Afin que cette activité soit économiquement rentable, la qualité du produit doit être supérieure à celles des safrans provenant des productions massives des pays étrangers. Une étude de la qualité du safran quercynois par la caractérisation des composés volatils présents dans les stigmates ainsi que l'étude du séchage de l'épice permettrait de promouvoir et de valoriser ce produit. Différents types d'extractions sélectives de la fraction volatile ainsi que des techniques analytiques et sensorielles pourraient être mises en œuvre. De plus, une attention particulière doit être portée sur les composés volatils des stigmates frais qui n'ont jamais été étudiés auparavant.

Les fleurs et les feuilles, considérées actuellement comme des déchets, sont des co-produits peu étudiés et peu exploités. Des essais préliminaires avaient été effectués sur

l'extraction d'arôme de fleurs, dégageant une odeur fortement "miellée" lors de la cueillette et sur les colorants hydrosolubles isolés et identifiés. Bien que les agriculteurs aient constaté une affection particulière des animaux pour les feuilles de crocus et une coloration jaune du lait de vache, seuls les composés phénoliques ont été répertoriés en vue d'une classification taxonomique du crocus. L'exploitation de ces parties ne peut être réalisée sans la caractérisation chimique de la matière végétale, en ce qui concerne les feuilles, et l'étude des composés volatils, aromatiques et colorants liposolubles pour les deux sous parties de la plante. Plusieurs techniques d'extraction peuvent être utilisées : l'headspace dynamique et statique ainsi que l'appareillage de type Likens-Nickerson en vue d'une caractérisation de la fraction volatile mais aussi l'hydrodistillation et la macération afin d'obtenir un extrait végétal valorisable dont l'obtention est extrapolable à l'échelle pilote. Les bulbes, dont le seul débouché économique est la vente en pépinière, doivent être caractérisés, notamment la fraction lipidique mais également l'amidon, les sucres totaux et les protéines constitutionnelles, en vue d'applications dans des domaines à forte valeur ajoutée.

Ces différentes caractérisations permettront d'envisager une valorisation à plus grande échelle en vue de futures applications.

## Références bibliographiques

- Abdullaev F. I. (2001). "Saffron (*Crocus sativus* L.) and its possible role in the prevention of cancer." *Phytochemistry and Pharmacology II*, 8: 70-82.
- Abdullaev F. I. et Frenkel G. D. (1992a). "Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis." *BioFactors (Oxf.)*, 3 (3): 201-204.
- Abdullaev F. I. et Frenkel G. D. (1992b). "The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells." *BioFactors (Oxf.)*, 4 (1): 43-45.
- Abe K. et Saito H. (2000). "Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation." *Phytother. Res.*, 14: 149-152.
- Adams R. (2001). "Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy". Ed. Adams R. Allured Publishing Corporation. Illinois.
- Algrech C. (2001). "Le safran du Quercy." *Revue Quercy recherche*, 97 et 98 (1-2-4): 20-27;9-16;18-26.
- Alonso G. L. et Salinas M. R. (1998). "Crocin as colouring in the food industry." *Recent Res. Devel. In Agricultural & Food Chem.*, 2 (1): 141-154.
- Alonso G. L., Salinas M. R., Esteban-Infantes F. J. et Sanchez-Fernandez M. A. (1996). "Determination of safranal from Saffron (*Crocus sativus* L.) by thermal desorption-gas chromatography." *J. Agric. Food Chem.*, 44: 185-188.
- Alonso G. L., Salinas M. R. et Garijo J. (1998). "Method to determine the authenticity of aroma of Saffron." *J. Food Protection*, 61 (11): 1525-1528.
- Alonso G. L., Salinas M. R., Garijo J. et Sanchez-Fernandez M. A. (2001). "Composition of crocins and picrocrocin from spanish saffron (*Crocus sativus* L.)." *J. Food Qual.*, 24: 219-233.
- Alonso G. L., Sanchez-Fernandez M. A., Saez J. R., Zalacain A. et Salinas M. R. (2003). "Evaluation of the color of spanish saffron using tristimulus colorimetry." *Ital. J. Food Sci.*, 15 (2): 249-258.
- Alonso G. L., Varon R., Gomez R., Navarro F. et Salinas M. R. (1990). "Auto-oxidation in saffron at 40°C and 75% Relative Humidity." *J. Food Sci.*, 55 (2): 595-596.
- Alonso G. L., Varon R., Salinas M. R. et Navarro F. (1993). "Auto-oxidation of crocin and picrocrocin in saffron under different storage conditions." *Boll. Chim. Farmaceutico*, 132 (4): 116-120.
- Barkeshli M. et Ataie G. H. (2002). "pH stability of saffron used in verdigris as an inhibitor in Persian miniature paintings." *Restaurator*, 23 (3): 154-164.
- Basker D. (1999). "Saffron chemistry." *Medicinal and Aromatic Plants : Industrial Profiles*, 8: 45-52.
- Bate-Smith E. C. (1968). "Phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. II. Monocotyledons." *J. Linn. Soc. Lond., Bot.*, 60 (383): 325-356.
- Berset C., Giampaoli P. et Richard H. (1997). "Histoire de safran : arômes et pigments du safran". *Colloque de Beaune de Rolande*, France, ENSIA laboratoire de chimie des substances naturelles. 89-98.

- Bigois M., Casabianca H., Graff J. B., Philit B., Jame P. et Perrucchiotti C. (1994). "Authentification d'arômes naturels par chromatographie chirale et mesures de rapports isotopiques." *Spectra anal.*, 23 (181): 19-22.
- Buchecker R. et Eugster C. H. (1973). "Absolute configuration of picrocrocin." *Hel. Chim. Acta*, 56 (3): 1121-1124.
- Cadwallader K. R. (2002). "Flavor chemistry of saffron". *Carotenoid-derived aroma compounds*. Winterhalter P. et Rouseff R. L. ACS Symposium Series. San Francisco, 802. 220-239.
- Cadwallader K. R., Baek H. H. et Cai M. (1997). "Characterization of saffron flavor by aroma extract dilution analysis". *Spices : Flavor Chemistry and Antioxydant Properties*. Risch S. J. et Ho C. T. ACS Symposium Series. Washington, 660. 66-79.
- Cardon D. (2003). "Le monde des teintures naturelles". Belin. Paris.
- Castellar M. R., Montijano H., Manjon A. et Iborra J. L. (1993). "Preparative high-performance liquid chromatographic purification of saffron secondary metabolites." *J. Chromatogr.*, 648 (1): 187-190.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1985). "Correlative changes in carbohydrate content and starch hydrolyzing enzymes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 180 (1): 55-61.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1988). "Correlative changes in nitrogen fractions, proteins, protease activity and nucleic acids in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Acta Physiol. Plant.*, 10 (3): 247-255.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1993). "Partial purification and physico-chemical properties of starch phosphorylase from corms of saffron crocus (*Crocus sativus*)." *Plant Physiol. Biochem.*, 20 (1): 19-23.
- Chrungoo N. K., Koul K. K. et Farooq S. (1986). "Phenolic compounds in Corms of saffron Crocus (*Crocus sativus* L.) during bud development." *Plant Physiol. Biochem.*, 13 (2): 78-81.
- Corti P., Mazzei E., Ferri S., Franchi G. G. et Dreassi E. (1996). "High-performance thin-layer chromatographic quantitative analysis of picrocrocin and crocetin, active principles of saffron (*Crocus sativus* L.-Iridaceae): a new method." *Phytochem. Anal.*, 7 (4): 201-203.
- Côté F., Cormier F., Dufresne C. et Willemot C. (2000). "Properties of a glucosyltransferase involved in crocin synthesis." *Plant Sci.*, 153 (1): 55-63.
- Craig S. A. S., Stark J. R., Dhar D. N. et Tiwari U. K. (1985). "Studies on starch from indian crocus." *Starch/Stärke*, 37 (7): 220-224.
- Crouzet J. et Kanasawud P. (1992). "Formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids." *Methods Enzymol.*, 213 (A): 54-62.
- D'Auria M., Mauriello G. et Rana G. L. (2004). "Volatile organic compounds from saffron." *Flavour Fragr. J.*, 19 (1): 17-23.
- De Buyck L., Yao Z. P., Verhe R., De Kimpe N. et Schamp N. (1985). "Improved synthesis of 2-hydroxy-4,4,6-trimethyl-2,5-cyclohexadienone, useful as a flavoring additive." *Bulletin des sociétés chimiques belges*, 94 (1): 75-80.
- Dhingra V. K., Seshadri T. R. et Mukerjee S. K. (1975). "Minor carotenoid glycosides from Saffron (*Crocus sativus*)." *Indian J. Chem.*, 13 (4): 339-341.

- Douglas M. (1993). "Saffron-*Crocus sativus*", Crop and Food Research.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. et Smith F. (1956). "Colorimetric method for the determination of sugars and related substances." *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Dupont J. (2001). "Dimensions culturelles et culturelles du safran en France." *Empan*, 41: 34-38.
- Ebrahimzadeh H. et Radjabian T. (1998). "Comparative analysis of pigments in petals and stigmata of *Crocus almezensis* C. Brickell and *B. Mathew* and *Crocus sativus* L." *J. Sci. Islam. Repub. Iran*, 9 (2): 127-135.
- Escribano J., Alonso G. L., Coca-Prados M. et Fernandez J. A. (1996). "Crocine, safranal and picrocrocine from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro." *Cancer Lett.*, 100: 23-30.
- Escribano J., Diaz Guerra M. J. M., Riese H. H., Alvarez A., Proenza R. et Fernandez J. A. (2000a). "The cytolytic effect of a glycoconjugate extracted from corms of saffron plant (*Crocus sativus*) on human cell lines in culture." *Planta Med.*, 66 (2): 157-162.
- Escribano J., Diaz-Guerra M. J. M., Riese H. H., Ontano J., Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D. C., Rubio A. et Fernandez J. A. (1999a). "In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L." *Cancer Lett.*, 144 (1): 107-114.
- Escribano J., Piqueras A., Medina J., Rubio A., Alvarez-Orti M. et Fernandez J. A. (1999b). "Production of a cytotoxic proteoglycan using callus culture of saffron corms (*Crocus sativus* L.)." *J. Biotechnol.*, 73 (1): 53-59.
- Escribano J., Rios A. et Fernandez J. A. (1999c). "Isolation and cytotoxic properties of a novel glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.)." *Biochim. Biophys. Acta*, 1426: 217-222.
- Escribano J., Rubio A., Alvarez-Orti M., Molina A. et Fernandez J. A. (2000b). "Purification and characterization of a mannan-binding lectin specifically expressed in corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.)." *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2): 457-463.
- Farooq S. et Kaul K. K. (1983). "Changes in gibberellin-like activity in corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 178 (8): 685-9.
- Fernandez J. A., Escribano J., Piqueras A. et Medina J. (2000). "A glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and affects in vitro cell viability." *J. Exp. Bot.*, 51 (345): 731-737.
- Garrido J. L., Diez de Bethencourt C. et Revilla E. (1987). "Flavonoid composition of hydrolyzed tepal extracts of *Crocus sativus* L." *An. Bromatol.*, 39 (1): 69-80.
- Giampaoli P., Petrov M., Thiercelin J. M. et Richard H. (1993). "Etude de la fraction aromatique de safrans de diverses origines". *11<sup>èmes</sup> journées internationales des huiles essentielles*, Digne. 615-621.
- Greaves J. (2002). "Colorants for cereal and snack foods." *Cereal Foods World*, 47 (8): 374, 376-377.
- Heywood Vernon H. (1996). "Les plantes à fleurs". Nathan.
- Himeno H. et Sano K. (1987). "Synthesis of crocine, picrocrocine and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro." *Agric. Biol. Chem.*, 51 (9): 2395-400.
- Hirose Y., Hayashi S., Eto S., Kawagishi E., Hori T., Nomura Y. et Matsuoka C. (1962). "The utilization of plant products. II. *Crocus* 1." *Kumamoto Pharm. Bull.*, 5: 7-15.

- Hosseinzadeh H. et Younesi Hani M. (2002). "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice." *BMC pharmacology*, 2 (1): 7.
- Iborra J. L., Castellar M. R., Canovas M. et Manjon A. (1992). "TLC preparative purification of picrocrocine, HTCC and crocin from saffron." *J. Food Sci.*, 57 (3): 714-716.
- ISO/TS (2003). "Safran (*Crocus sativus* L.)- Partie 1 : spécifications, Partie 2 : Méthodes d'essai." *Norme Européenne ISO/TS 3632-1 3632-2*.
- Kanakis C. D., Daferera D. J., Tarantilis P. A. et Polissiou M. G. (2004). "Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron." *J. Agric. Food Chem.*, 52 (14): 4515-4521.
- Kanasawud P. et Crouzet J. (1990a). "Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1  $\beta$ -carotene." *J. Agric. Food Chem.*, 38: 237-243.
- Kanasawud P. et Crouzet J. (1990b). "Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 2 lycopene." *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1238-1242.
- Knapp H., Straubinger M., Stingl C. et Winterhalter P. (2002). "Analysis of norisoprenoid aroma precursors." *ACS Symposium Series*, 802 (Carotenoid-Derived Aroma Compounds): 20-35.
- Knapp H., Straubinger M., Witte A. et Winterhalter P. (1999). "Aroma formation in saffron". *Frontiers of Flavour Science, 9th, proceedings of the Weurman Flavour Research Symposium*, Freising, Germany. 440-444.
- Kondjoyan N. et Berdague J.-L. (1996). "A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds". Edition du Laboratoire Flaveur.
- Kubo I. et Kinst-Hori I. (1999). "Flavonols from Saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism." *J. Agric. Food Chem.*, 47 (10): 4121-4125.
- Kuhn R. (1994). "Über das flavonol-glykosid aus crocus-pollen." *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft abteilung B : abhandlungen*, 77: 196-203.
- Li C.-Y., Lee E. J. et Wu T.-S. (2004). "Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*." *J. Nat. Products*, 67 (3): 437-440.
- Li N., Lin G., Kwan Y.-W. et Min Z.-D. (1999). "Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A*, 849 (2): 349-355.
- Liakopoulou-Kyriakides M. et Kyriakidis D. A. (2002). "Crocus sativus-biologically active constituents." *Studies in Natural Products Chemistry*, 26 (Bioactive Natural Products, (Part G)): 293-312.
- Loukis A., Al-Kofahi A. et Philianos S. (1983). "Etude des constituants des bulbes de *Crocus sativus* L." *Plant. méd. phytothér.*, 17 (2): 89-91.
- Lozano P., Castellar M. R., Simancas M. J. et Iborra J. L. (1999). "A quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products." *Journal of Chromatography A*, 830 (2): 477-483.
- Lozano P., Delgado D., Omez D., Rubio M. et Iborra J. L. (2000). "A non-destructive method to determine the safranal content of saffron (*Crocus sativus* L.) by supercritical carbon dioxide extraction combined with high-

performance liquid chromatography and gas chromatography." *J. Biochem. Biophys. Methods*, 43 (1-3): 367-378.

Marini D. et Balestrieri F. (1992). "Analytical evaluation of powdered saffron application of multivariate analysis." *Ind. Aliment.*, 31 (301): 123-130.

Martinez J., Pioggia G., Rodriguez-Mendez M. L. et De Saja J. A. (2002). "A dedicated Saffron (*Crocus sativus* L.) odour quality measurement system". *The 9<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Electronic Nose*, Rome, Technical Digest. 210-211.

Mehta B. M., Borkhatriya V. N. et Boghra V. R. (2002). "Saffron : the colouring and flavouring agent in dairy and food industry." *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 24 (4): 1038-1049.

Morimoto S., Umezaki Y., Shoyama Y., Saito H., Nishi K. et Irino N. (1994). "Post-harvest degradation of carotenoid glucose esters in saffron." *Planta Med.*, 60: 438-440.

Mougin I. (1999). "Le safran *Crocus sativus* L. Iridacees". Faculté de médecine et de pharmacie. Besançon.

Narasimhan S., Chand N. et Rajalakshmi D. (1992). "Saffron : quality evaluation by sensory profile and gas chromatography." *J. Food Qual.*, 15: 303-314.

Negbi M. (1999). "Saffron. *Crocus sativus* L.". Harwood Academic Publishers. Amsterdam.

Norbek R. et Kondo T. (1998). "Anthocyanins from flowers of *Crocus* (Iridaceae)." *Phytochem.*, 47 (5): 861-864.

Oberdieck R. (1975). "Die aromastoffe der natürlichen würzessenzen aus gewürzen, kräutern und drogen Teil IV." *Alkohol-Ind.*, 88 (17): 397-401.

Oda Y. et Tatsumi Y. (1993). "News lectins from bulbs of *Crocus sativum*." *Pharmaceutical society of Japan*, 16: 978-981.

Orfanou O. et Tsimidou M. (1995). "Influence of selected additives on the stability of saffron pigments in aqueous extracts." *Dev. Food Sci.*, 37A: 881-894.

Orfanou O. et Tsimidou M. (1996). "Evaluation of the colouring strength of saffron spice by UV-Vis spectrometry." *Food Chem.*, 57 (3): 463-469.

Pardo J. E., Zalacain A., Carmona M., Lopez E., Alvarruiz A. et Alonso G. L. (2002). "Influence of the type of dehydration process on the sensory properties of Saffron spice." *Ital. J. Food Sci.*, 14 (4): 413-421.

Pfander H. et Rychener M. (1982). "Separation of carotenoids by HPLC. Part 2. Separation of crocetin glycosyl esters by high-performance liquid chromatography." *J. Chromatogr.*, 234 (2): 443-7.

Pfander H. et Schurtenberger H. (1982). "Biosynthesis of C<sub>20</sub>-carotenoids in *Crocus sativus*." *Phytochem.*, 21 (5): 1039-1042.

Pfister S., Meyer P., Steck A. et Pfander H. (1996). "Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in Gardenia Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne)." *J. Agric. Food Chem.*, 44 (9): 2612-2615.

Pierlot G. (1925). "Le safran." *Chim. Ind.*, 14 (6): 1-12.

Pinanelli V. (1967). "Le safran, une culture à développer dans le sud-ouest. Les constituants volatils et leurs analyse par CPG dans différents organes". Bordeaux II. Palerme.

Priy J. (1994). "Le safran *Crocus sativus*." *Iris et Bulbeuses* (110-111-112).

Raina B. L., Agarwal S. G., Bhatia A. K. et Gaur G. S. (1996). "Changes in pigments and volatiles of Saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage." *J. Sci. Food Agric.*, 71: 27-32.

Rodel W. et Petrzika M. (1991). "Analysis of the volatile components of Saffron." *J. High Resolution Chromatogr.*, 14 (11): 771-774.

Rubio Moraga A., Fernandez Nohales P., Fernandez Perez J. A. et Gomez-Gomez L. (2004). "Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas." *Planta*, 219 (6): 955-966.

Saitô N., Mitsui S. et Hayashi K. (1960). "Delphin, the anthocyanin of medicinal saffron and its identity with hyacin as shown by paper chromatography of partial hydrolysates." *Bot. Mag. Tokyo*, 36: 340-345.

Salomi M. J., Nair S. C. et Panikkar K. R. (1991). "Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice." *Nutr. Cancer*, 16 (1): 67-72.

Sampathu S. R., Shivashankar S. et Lewis Y. S. (1984). "Saffron (*Crocus sativus* Linn.) cultivation, processing, chemistry and standardization." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 20 (2): 123-157.

San Mames J. J. (2001). "Vanilla, Saffron Imports".

Semiond D., Dautraix S., Desage M., Majdalani R., Casabianca H. et Brazier J. L. (1996). "Identification and isotopic analysis of safranal from supercritical fluid extraction and alcoholic extracts of saffron." *Anal. Lett.*, 29 (6): 1027-1039.

Solinas M. et Cichelli A. (1988). "HPLC analysis of color and flavor components of saffron." *Ind. Aliment.*, 27 (262): 634-639, 648.

Straubinger M., Bau B., Eckstein S., Fink M. et Winterhalter P. (1998). "Identification of novel glycosidic aroma precursors in Saffron (*Crocus sativus* L.)." *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3238-3243.

Straubinger M., Bau B., Eckstein S., Jezussek M. et Winterhalter P. (1997a). "Isolation of new saffron constituents using counter-current chromatography". *Natural Product Analysis: Chromatography, Spectroscopy, Biological Testing*, Wuerzburg, Germany. 27-34.

Straubinger M., Jezussek M., Waibel R. et Winterhalter P. (1997b). "Novel glycosidic constituents from Saffron." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (5): 1678-1681.

Sujata V., Ravishankar G. A. et Venkataraman L. V. (1992). "Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetins, picrocrocin and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography." *J. Chromatogr.*, 624: 497-502.

Tarantilis P. A. et Polissiou M. G. (1997). "Isolation and identification of the aroma components from Saffron (*Crocus sativus*)." *J. Agric. Food Chem.*, 45: 459-462.

Tarantilis P. A., Polissiou M. G. et Manfait M. (1994). "Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection." *Journal of Chromatography A*, 664: 55-61.

Tarantilis P. A., Polissiou M. G., Morjani H., Avot P., Bel Jebbar A. et Manfait M. (1992). "Anticancer activity and structure of retinoic acid and carotenoids of *Crocus sativus* L. on HL60 cells". *The 4th international conference of anticancer research*, Crete, Greece. 1889.

Tarantilis P. A., Tsoupra G. et Polissiou M. G. (1995). "Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 699: 107-118.

Tsatsaroni E. G. et Eleftheriadis I. C. (1994). "The color and fastness of natural saffron." *J. Soc. Dyers Colour.*, 110 (10): 313-315.

Tsatsaroni E. G., Liakopoulou-Kyriakides M. et Eleftheriadis I. C. (1998). "Comparative study of dyeing properties of two yellow natural pigments. Effect of enzymes and proteins." *Dyes Pigm.*, 37 (4): 307-315.

Tsimidou M. et Biliaderis C. G. (1997). "Kinetic studies of Saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (8): 2890-2898.

Tsimidou M. et Tsatsaroni E. (1993). "Stability of saffron pigments in aqueous extracts." *J. Food Sci.*, 58 (5): 1073-1075.

Ursat J. (1913). "Le safran du Gatinais". Ed. Gauthier L.

Valizadeh R. (2000). "Utilization of saffron leaves as an animal feedstuff." *Agricultural sciences and technology*, 14 (1): 3-9.

Vickackaite V., Romani A., Pannacci D. et Favaro G. (2004). "Photochemical and thermal degradation of a naturally occurring dye used in artistic painting. A chromatographic, spectrophotometric and fluorimetric study on saffron." *International Journal of Photoenergy*, 6: 175-183.

Visvanath S., Ravishankar G. A. et Venkataraman L. V. (1990). "Induction of crocin, crocetin, picrocrocin, and safranal synthesis in callus cultures of saffron-*Crocus sativus* L." *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12 (3): 336-340.

Vurdu H. (2003). "Room table : agronomical and biotechnological approaches for Saffron improvement". *1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, Albacete, Spain, Acta Hort. 285-290.

Williams C. A., Harborne J. B. et Goldblatt P. (1986). "Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family iridaceae." *Phytochem.*, 25 (9): 2135-2154.

Winterhalter P. et Straubinger M. (2000). "Saffron-renewed interest in an ancient spice." *Food Rev. Int.*, 16 (1): 39-59.

Zarghami N. S. et Heinz D. E. (1971a). "Monoterpene aldehydes and isophorone-related compounds of saffron." *Phytochem.*, 10: 2755-2761.

Zarghami N. S. et Heinz D. E. (1971b). "The volatile constituents of Saffron." *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 4 (2): 43-45.

Zougagh M., Rios A. et Valcarcel M. (2005). "An automates screening method for the fast, simple discrimination between natural and artificial colorants in commercial saffron products." *Analytica Chimica Acta*, 535: 133-138.



## Chapitre II

# Caractérisation des métabolites secondaires et des composés volatils du safran du Quercy

## **Chapitre II Caractérisation des métabolites secondaires et des composés volatils du safran du Quercy ..... 63**

### **II.1. ETUDE DE LA TENEUR EN EAU ET EN METABOLITES SECONDAIRES ..... 63**

II.1.1.	Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr).....	64
II.1.2.	Teneur en picrocrocine .....	65
II.1.3.	Teneur en safranal .....	66
II.1.4.	Teneur en crocine .....	66
II.1.5.	Classification selon la norme ISO/TS 3632 .....	67
II.1.6.	Les métabolites secondaires en fonction du taux d'humidité (Hr) .....	68
II.1.7.	Conclusions .....	70

### **II.2. CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS DU SAFRAN DU QUERCY . ..... 71**

II.2.1.	Etude des stigmates frais par HD/CPG-SM .....	71
II.2.2.	Etude des stigmates secs par HD/CPG-SM.....	74
II.2.3.	Comparaison des profils des composés volatils des safrans frais et secs... 77	
II.2.4.	Etude des stigmates secs par SPME/CPG-SM .....	80
II.2.5.	Conclusions .....	95

### **II.3. ETUDE DES MOLECULES DU SAFRAN DU QUERCY PRESENTANT UNE ACTIVITE ODORANTE PAR SPME/CPG-SM/ODP ..... 96**

II.3.1.	Profils aromatiques .....	96
II.3.2.	Identification des odeurs perçues.....	98
II.3.3.	Empreinte aromatique du safran en fonction du taux d'humidité (Hr) . 100	
II.3.4.	Conclusions .....	101

### **II.4. PROFIL SENSORIEL DU SAFRAN ..... 101**

II.4.1.	Analyse Sensorielle du safran du Quercy .....	102
II.4.2.	Influence du taux d'humidité sur le profil sensoriel du safran du Quercy... .....	108
II.4.3.	Conclusions .....	109

### **II.5. CORRELATIONS DES DONNEES INSTRUMENTALES ET SENSORIELLES ET DISCUSSIONS ..... 110**

II.5.1.	Corrélation des données obtenues par SPME/CPG-SM/ODP et par analyse sensorielle avec les métabolites secondaires évalués selon la norme ISO/TS 3632 .....	110
II.5.2.	Corrélation des données analytiques, olfactives et sensorielles.....	119

## Chapitre II Caractérisation des métabolites secondaires et des composés volatils du safran du Quercy

L'évaluation de la qualité du safran, non adultéré, est réalisée par la détermination de la teneur en eau et en métabolites secondaires connus, safranal, picrocrocine et crocine, selon la norme internationale (ISO/TS, 2003). Cependant, cette norme fait appel à une méthode spectrophotométrique d'extraits aqueux de safran qui présente certaines limites. Elle ne permet pas de quantifier réellement le safranal. Les *cis* crocines absorbent à la même longueur d'onde ( $\lambda=323\text{nm}$ ) et le safranal, molécule non polaire, est peu soluble dans l'eau (Alonso et al., 2001). De plus, l'arôme de safran, riche en composés volatils, est évalué de façon réductrice par sa seule teneur en safranal. Les extractions par headspace dynamique (piégeage sur Tenax TA) et pseudo-statique (SPME) des effluves dégagées par le safran frais et sec, suivie d'une analyse en CPG-SM, permettent une évaluation et une caractérisation plus complète de l'arôme. Un aspect typicité du safran quercynois a été abordé à travers quelques safrans étrangers acquis auprès de M. Algrech (conservatoire du safran "Le Safranario"). Les composés volatils ayant une activité odorante ont été identifiés par CPG couplée à l'olfactométrie et à la spectrométrie de masse. Le profil sensoriel global du safran du Quercy a été évalué par Analyse Descriptive Quantitative.

### **II.1. ETUDE DE LA TENEUR EN EAU ET EN METABOLITES SECONDAIRES**

L'étude de la teneur en eau et en métabolites secondaires permet d'apprécier de manière globale la qualité aromatique, gustative et colorante du safran. Elle a été menée sur 25 échantillons de safran issus des productions des années 2002 et 2003, indiqués dans le Tableau 1. Quatre types de séchage, effectués en laboratoire (L) ou chez les producteurs (P), ont été réalisés sur des stigmates issus de quatre safranières (A), (B), (C), (D) : dans un four électrique ventilé (L), dans un déshydrateur électrique (A), dans un four classique à chaleur tournante (B) et sur une grille dans un four ventilé classique (C). Les deux premiers chiffres indiquent le jour de récolte du mois d'octobre, la première lettre, le type de séchage et la safranière d'origine et la deuxième (pour les échantillons de 2002 exclusivement) si le séchage a été effectué en laboratoire ou chez le producteur. Les conditions opératoires ont été détaillées dans la partie expérimentale (cf. V.2.2).

*Tableau 1. Echantillons de safrans.*

2002														
Prod.	C										D			
Séch.	Laboratoire					Séchage C					Laboratoire			
Ech. <sup>a</sup>	14CL	17CL	21CL	24CL	28CL	30CL	14CP	17CP	21CP	24CP	28CP	24DL	28DL	
2003														
Prod.	A							B						
Séch.	Séchage A							Séchage B						
Ech. <sup>a</sup>	21A	22A	23A	24A	25A	26A	21B	23B	24B	26B	28B	30B		

<sup>a</sup>Le nom de l'échantillon est composé du jour de récolte en octobre, du type de séchage et de la safranière d'origine et, pour les échantillons de 2002, du lieu de séchage (producteur (P) ou laboratoire (L)).

La détermination de la teneur en eau et en métabolites secondaires a été réalisée selon la norme internationale, (ISO/TS, 2003) : la teneur en eau permet d'évaluer le séchage des stigmates et leur bonne conservation, la picrocrocine, la saveur amère, le safranal, l'odeur caractéristique de l'épice et la crocine, sa couleur rouge sang. Le safran est classé en trois catégories (Tableau 2).

*Tableau 2. Classifications des safrans selon la norme ISO/TS 3632.*

Caractéristiques	Spécifications		
	Catégories		
	I	II	III
Humidité et teneur en matières volatiles (fraction massique), Hr(%), %, max.			
Safran en filament	12	12	12
Safran en poudre	10	10	10
Saveur amère, $E^{1\%}_{1\text{cm}} 257\text{nm}$ , sur matière sèche, min. (à cette longueur d'onde, l'absorbance de la picrocrocine est maximale)	70	55	40
Safranal, $E^{1\%}_{1\text{cm}} 330\text{nm}$ , sur matière sèche : min. max.	20 50	20 50	20 50
(à cette longueur d'onde, l'absorbance du safranal est maximale)			
Pouvoir colorant, $E^{1\%}_{1\text{cm}} 440\text{nm}$ , sur matière sèche, min. (à cette longueur d'onde, l'absorbance de la crocine est maximale)	190	150	100

### **II.1.1. Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr)**

Les résultats de la teneur en humidité et en matières volatiles, déterminée selon la norme internationale (cf. V.2.3.1), sont indiqués dans le Tableau 3.

Tableau 3. Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr).

2002													
Prod.	C											D	
Séch.	Laboratoire						Séchage C					Laboratoire	
Ech. <sup>a</sup>	14CL	17CL	21CL	24CL	28CL	30CL	14CP	17CP	21CP	24CP	28CP	24DL	28DL
Hr(%)	13,2	16,8	13,9	13,2	31,7	34,7	25,0	12,0	33,7	27,3	22,0	7,9	31,0
C.V. <sup>b</sup> (%)	-	-	-	-	0,5	-	2,1	-	0,9	0,8	7,1	-	-
Cat. <sup>c</sup>	HN						DN		HN			DN	HN

2003													
Prod.	A						B						
Séch.	Séchage A						Séchage B						
Ech. <sup>a</sup>	21A	22A	23A	24A	25A	26A	21B	23B	24B	26B	28B	30B	
Hr(%)	6,5	8,6	7,4	6,4	8,9	7,5	7,1	6,5	18,0	13,6	19,1	9,3	
C.V. <sup>b</sup> (%)	3,2	1,7	1,1	0,5	0,3	2,4	2,4	0,8	0,6	2,3	2,4	1,6	
Cat. <sup>c</sup>	DN						HN					DN	

<sup>a</sup>le nom de l'échantillon est composé du jour de récolte en octobre, du type de séchage et de la safranière d'origine et, pour les échantillons de 2002, du lieu de séchage (producteur (P) ou laboratoire (L)).

<sup>b</sup>au vue des quantités fournies, de simples duplicats ont parfois été réalisés. Dans ce cas, le coefficient de variation (C.V.) n'a pas pu être évalué.

<sup>c</sup>DN (Dans la Norme), HN (Hors Norme).

Le taux d'humidité et de matières volatiles est plus élevé pour les échantillons récoltés en 2002 que pour ceux de 2003. En 2002, seulement deux échantillons sur 13 répondent à la norme ( $Hr \leq 12\%$ ) tandis qu'en 2003, ce nombre est plus élevé, 9 sur 12. Les conditions climatiques peuvent expliquer cette différence. Lors de la cueillette des fleurs en 2002, le temps était pluvieux, entraînant un taux d'humidité élevé des stigmates qui étaient alors plus difficiles à sécher. Le déshydrateur électrique (A) est plus répétable que le four classique à chaleur tournante (B),  $7,6 \pm 1,1\%$ , contre  $12,3 \pm 5,5\%$ .

### II.1.2. Teneur en picrocrocine

La teneur en picrocrocine (P), responsable de la saveur amère, a été déterminée selon la norme internationale (cf. V.2.3.2). Les résultats sont indiqués dans le Tableau 4.

Tableau 4. Teneur en picrocrocine (P),  $E^{1\%}_{1cm}$ .

2002													
Prod.	C											D	
Séch.	Laboratoire						Séchage C					Laboratoire	
Ech. <sup>a</sup>	14CL	17CL	21CL	24CL	28CL	30CL	14CP	17CP	21CP	24CP	28CP	24DL	28DL
P E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>	104	94	95	96	97	99	97	100	91	102	100	85	90
Cat. <sup>b</sup>	I												

2003													
Prod.	A						B						
Séch.	Séchage A						Séchage B						
Ech. <sup>a</sup>	21A	22A	23A	24A	25A	26A	21B	23B	24B	26B	28B	30B	
P E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>	115	107	105	94	105	102	94	97	84	95	82	95	
Cat. <sup>b</sup>	I												

<sup>a</sup>le nom de l'échantillon est composé du jour de récolte en octobre, du type de séchage et de la safranière d'origine et, pour les échantillons de 2002, du lieu de séchage (producteur (P) ou laboratoire (L)).

<sup>b</sup>catégories définies par la norme (I, II, III), (Tableau 2).

La teneur en picrocrocine doit être supérieure à 70 pour satisfaire la norme. Tous les échantillons, issus des productions de 2002 et 2003 y répondent, la valeur la plus faible étant 82 et la plus élevée 115. En moyenne les échantillons du Quercy possèdent un taux de picrocrocine de  $97 \pm 7$ , soit de  $96 \pm 5$  pour 2002 et de  $98 \pm 9$  pour 2003. La valeur moyenne est légèrement supérieure pour 2003.

### II.1.3. Teneur en safranal

Les résultats de la teneur en safranal (S), molécule caractéristique de l'odeur de l'épice, sont indiqués dans le Tableau 5. Les valeurs ont été déterminées selon le mode opératoire donné par la norme internationale (cf. V.2.3.2).

Tableau 5. Teneur en safranal (S),  $E^{1\%}_{1cm}$ .

2002													
Prod.	C											D	
Séch.	Laboratoire						Séchage C					Laboratoire	
Ech. <sup>a</sup>	14CL	17CL	21CL	24CL	28CL	30CL	14CP	17CP	21CP	24CP	28CP	24DL	28DL
S E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>	36	44	38	41	41	44	47	27	39	47	44	34	44
Cat. <sup>b</sup>	DN												

2003													
Prod.	A							B					
Séch.	Séchage A						Séchage B						
Ech. <sup>a</sup>	21A	22A	23A	24A	25A	26A	21B	23B	24B	26B	28B	30B	
S E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>	27	31	25	12	26	23	26	25	27	28	33	28	
Cat. <sup>b</sup>	DN			HN	DN								

<sup>a</sup>Le nom de l'échantillon est composé du jour de récolte en octobre, du type de séchage et de la safranière d'origine et, pour les échantillons de 2002, du lieu de séchage (producteur (P) ou laboratoire (L)).

<sup>b</sup>DN (Dans la Norme), HN (Hors Norme).

La teneur en safranal doit être comprise entre 20 et 70. Tous les échantillons satisfont la norme excepté le 24A. Aux vues des faibles quantités reçues pour cet échantillon, la norme n'a pu être appliquée sur la quantité requise de stigmates ( $m_{\text{poudre}} < 500\text{mg}$  soit 480mg). Ce résultat pourrait être écarté. Les safrans de 2002 ont en moyenne une teneur en safranal plus élevée que ceux de 2003 (respectivement,  $40 \pm 6$  et  $27 \pm 3$ , mis à part 24A).

Les séchages "laboratoire" et "C" étant réalisés dans un four ventilé classique, il semble que ce système de séchage induise un taux de safranal plus élevé. Cependant, les séchages sont difficilement comparables sur les années 2002 et 2003, les conditions climatiques ayant induit des taux d'humidité des stigmates très hauts en 2002.

### II.1.4. Teneur en crocine

Les résultats de la teneur en crocine (C), pouvoir colorant déterminé selon la norme internationale (cf. V.2.3.2), sont indiqués dans le Tableau 6.

Tableau 6. Teneur en crocine (C),  $E^{1\%}_{1cm}$ .

2002													
Prod.	C											D	
Séch.	Laboratoire						Producteur C					Laboratoire	
Ech. <sup>a</sup>	14CL	17CL	21CL	24CL	28CL	30CL	14CP	17CP	21CP	24CP	28CP	24DL	28DL
C E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>	249	105	194	121	18	12	97	275	24	85	159	201	12
Cat. <sup>b</sup>	I	III	I	III	HN	HN	HN	I	HN	HN	II	I	HN

2003													
Prod.	A						B						
Séch.	Producteur A						Producteur B						
Ech. <sup>a</sup>	21A	22A	23A	24A	25A	26A	21B	23B	24B	26B	28B	30B	
C E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub>	274	257	255	271	255	243	219	236	129	222	85	254	
Cat. <sup>b</sup>	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	HN	I	

<sup>a</sup>le nom de l'échantillon est composé du jour de récolte en octobre, du type de séchage et de la safranrière d'origine et, pour les échantillons de 2002, du lieu de séchage (producteur (P) ou laboratoire (L)).

<sup>b</sup>catégories définies par la norme (I, II, III), (Tableau 2). HN (Hors Norme).

Six échantillons de 2002 sont hors norme car leur taux de crocine est inférieur à 100, deux sont en catégories III, un en II et quatre en I. Seul un échantillon de 2003 est hors norme, un en catégorie III et dix en I. Les safrans de 2002 ont une faible teneur en crocine,  $119 \pm 91$ , en comparaison avec ceux de 2003,  $225 \pm 58$ . Les safrans utilisant le séchage A sont tous en catégorie I. Le séchage par un déshydrateur électrique semble induire un taux de crocine élevé,  $259 \pm 11$ .

### II.1.5. Classification selon la norme ISO/TS 3632

Le classement des safrans selon les catégories imposées par la norme est indiqué dans le Tableau 7.

Tableau 7. Classement des safrans selon la norme internationale.

2002													
Prod.	C											D	
Séch.	Laboratoire						Séchage C					Laboratoire	
Ech. <sup>a</sup>	14CL	17CL	21CL	24CL	28CL	30CL	14CP	17CP	21CP	24CP	28CP	24DL	28DL
Cat. Hr <sup>b</sup>	HN							DN	HN			DN	HN
Cat. P <sup>b</sup>	I												
Cat. S <sup>b</sup>	DN												
Cat. C <sup>b</sup>	I	III	I	III	HN	HN	HN	I	HN	HN	II	I	HN
Cat. <sup>b,c</sup>	HN	HN	HN	HN	HN	HN	HN	I	HN	HN	HN	I	HN

2003														
Prod.	A						B							
Séch.	Séchage A						Séchage B							
Ech. <sup>a</sup>	21A	22A	23A	24A	25A	26A	21B	23B	24B	26B	28B	30B		
Cat. Hr <sup>b</sup>	DN						HN					DN		
Cat. P <sup>b</sup>	I													
Cat. S <sup>b</sup>	DN			HN	DN									
Cat. C <sup>b</sup>	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	HN	I		
Cat. <sup>b,c</sup>	I	I	I	HN	I	I	I	I	HN	HN	HN	I		

<sup>a</sup>le nom de l'échantillon est composé du jour de récolte en octobre, du type de séchage et de la safranrière d'origine et, pour les échantillons de 2002, du lieu de séchage (producteur (P) ou laboratoire (L)).

<sup>b</sup>catégories définies par la norme (I, II, III), (Tableau 2). DN (Dans la Norme), HN (Hors Norme).

<sup>c</sup>catégorie finale.

Deux safrans de 2002 sont en catégorie I, les autres étant hors norme, contre neuf en 2003. Des safrans dont le taux d'humidité est hors norme peuvent être convenablement classés en ce qui concerne leur teneur en métabolites secondaires, 14CL (I), 21CL (I), 26B (I), 28CP (2), 17CL (III), 24CL (III), 24B (III). Une étude des métabolites secondaires a donc été réalisée en fonction du taux d'humidité présent dans les stigmates afin d'évaluer l'impact de ce dernier sur l'arôme, la saveur et la couleur des safrans.

### II.1.6. Les métabolites secondaires en fonction du taux d'humidité (Hr)

Les teneurs en métabolites secondaires en fonction du taux d'humidité et des matières volatiles sont représentées sur la Figure 1.

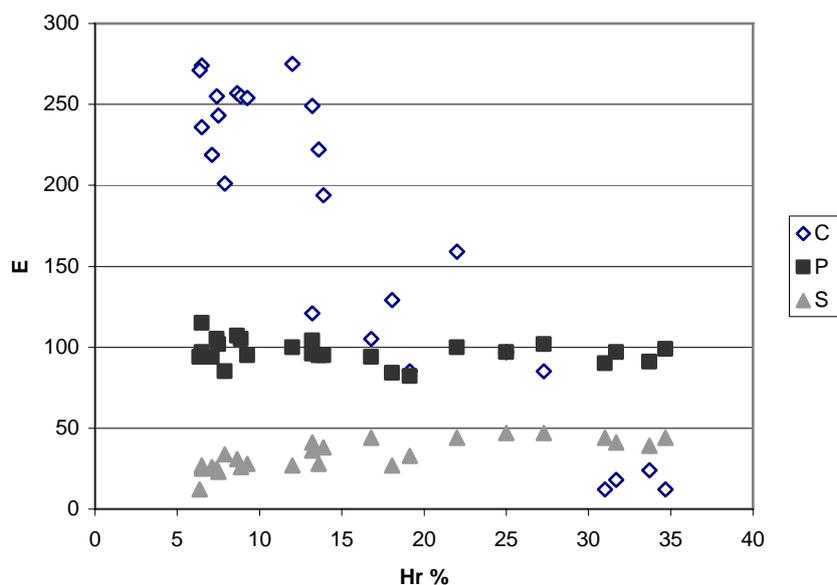


Figure 1. Métabolites secondaires (C, crocine, P, picrocrocine et S, safranal),  $E^{1\%}_{1cm}$ , en fonction du taux d'humidité et des matières volatiles (Hr %).

La teneur en crocine diminue considérablement avec l'augmentation de Hr, observations également réalisées sur les courbes d'absorbances (Figure 2).

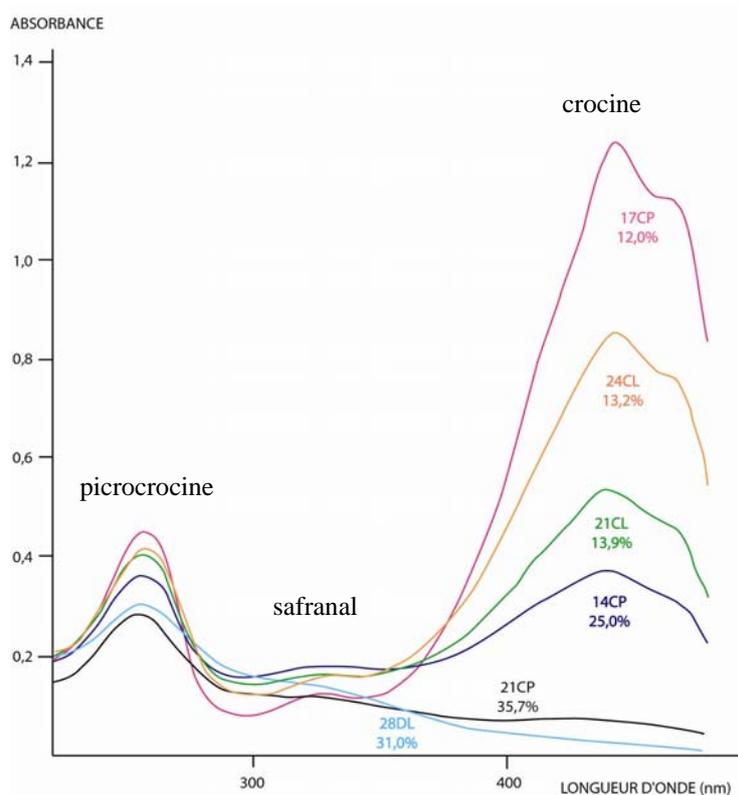


Figure 2. Courbes d'absorbance des safrans (Hr, de 12,0% à 31,0%) en milieu aqueux.

Selon Alonso, (Alonso et al., 1993), la dégradation de la crocine est expliquée par la fonction protectrice des caroténoïdes au sein des cellules. Générant de l'oxygène sous forme singulet, ils initient le processus d'auto-oxydation. De plus, la solubilité de la crocine dans l'eau, contrairement à la plupart des caroténoïdes, favorise son contact avec l'oxygène. La crocine s'hydrolyserait en crocétine (incolore) au sein des stigmates (Figure 3).

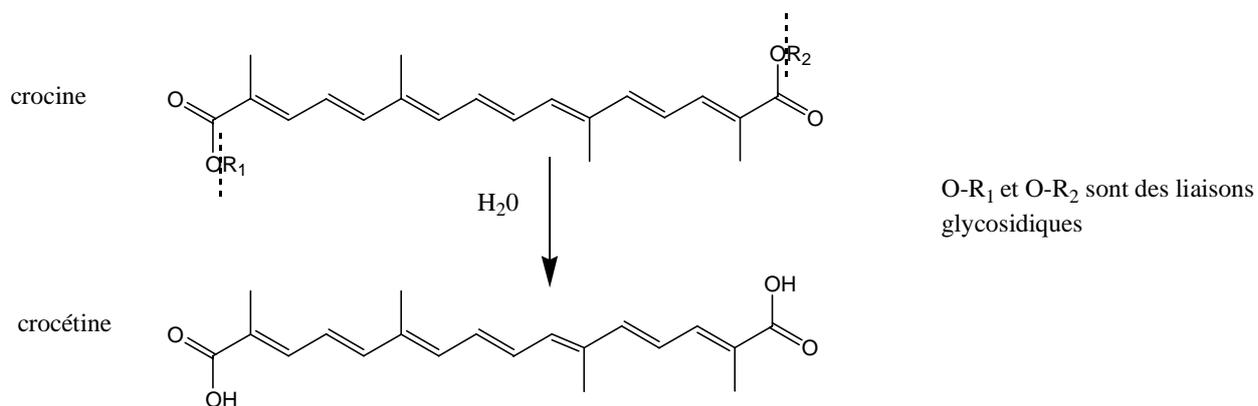


Figure 3. Schéma d'hydrolyse de la crocine en crocétine en milieu aqueux.

La teneur en picrocrocine diminue légèrement alors que celle en safranal augmente faiblement (Figure 1). Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Tsimidou, (Tsimidou et Biliaderis, 1997), selon laquelle, un taux d'humidité élevé entraîne une dégradation de la crocine et de la picrocrocine mais permet le développement de l'arôme du safran, le safranal étant un produit d'hydrolyse de la picrocrocine (cf. I.2.1.2.2, Figure 4).

Cependant, les mécanismes de développement de l'arôme lors du séchage et les cinétiques de dégradation des métabolites secondaires, lors du stockage du safran, restent complexes et peu connues.

### **II.1.7. Conclusions**

Lors de cette étude deux facteurs sont à prendre en compte : les différentes conditions de séchage des safrans ainsi que le taux d'humidité résiduelle de l'épice lors de sa conservation. Ces deux paramètres ont un impact sur la teneur en métabolites secondaires.

Le séchage est plus important et répétable avec le déshydrateur électrique ce qui induit un taux de crocine plus élevée et celui de safranal plus faible. L'augmentation du taux d'humidité entraîne une chute rapide du taux de crocine tandis que celui de la picrocrocine diminue légèrement et celui du safranal augmente faiblement.

La classification de la norme semble insuffisante car elle est non efficace quand à l'évaluation du pouvoir colorant du safran et les variations de la picrocrocine (82 à 115) et du safranal (44 à 25) n'ont aucun impact sur la catégorie finale du safran.

La méthode de mesure spectrophotométrique d'extraits aqueux de safran est inappropriée pour quantifier le safranal. Les *cis* crocines absorbant à la même longueur d'onde que le safranal et ce dernier étant peu soluble dans l'eau (molécule apolaire), seule une partie de ce composé est quantifiée par cette technique. Enfin, l'arôme de safran n'est pas évalué de façon représentative, sa qualité n'étant déterminée que par sa teneur en safranal.

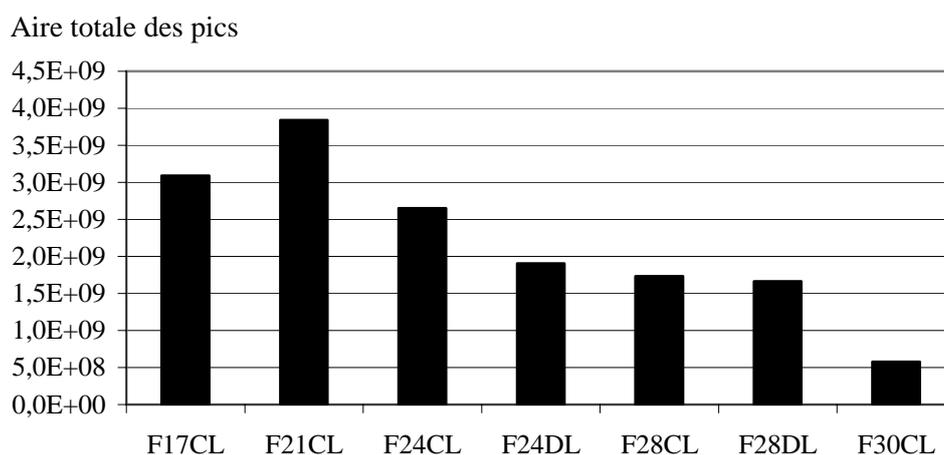
## II.2. CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS DU SAFRAN DU QUERCY

Afin d'évaluer et de caractériser l'arôme que génère le safran du Quercy de manière plus exhaustive, les composés volatils de l'épice fraîche puis séchée ont été extraits par headspace dynamique, (Macleod et Ames, 1986), et statique, (Pawliszyn, 1997) et analysés par CPG-SM (cf. V.2.4). Une étude comparative a été réalisée sur des stigmates frais et secs.

### II.2.1. Etude des stigmates frais par HD/CPG-SM

Aucun article scientifique ne fait état, à ce jour, de l'étude des composés volatils émis par les stigmates frais. Afin d'en caractériser les effluves, sept échantillons issus de la production de 2002, dont cinq du producteur C et deux du D, ont été inclus dans cette étude. Les safrans ont été nommés comme dans le Tableau 1 (cf. II.1), "F" signifiant Frais. Les modes opératoires de piégeage par headspace dynamique et d'analyse des composés volatils par CPG-SM ont été décrits dans la partie expérimentale (cf. V.2.4.1).

La puissance aromatique de l'échantillon de safran étant variable selon le jour de récolte et tendant à diminuer au cours de la saison (Figure 4), les constituants des fractions volatiles ont été évalués quantitativement en calculant la proportion de chacun d'eux par rapport à la somme totale des aires des pics obtenues sur le chromatogramme Figure 5, en considérant comme identiques tous les coefficients de réponses (Figure 6).



*Le nom de l'échantillon est composé de l'état du safran (Frais, F), du jour de récolte en octobre, du type de séchage, de la safranrière d'origine et du lieu de séchage (Laboratoire, L).*

**Figure 4. Puissance aromatique des safrans frais donnée par l'aire totale des pics obtenue par CPG-SM.**

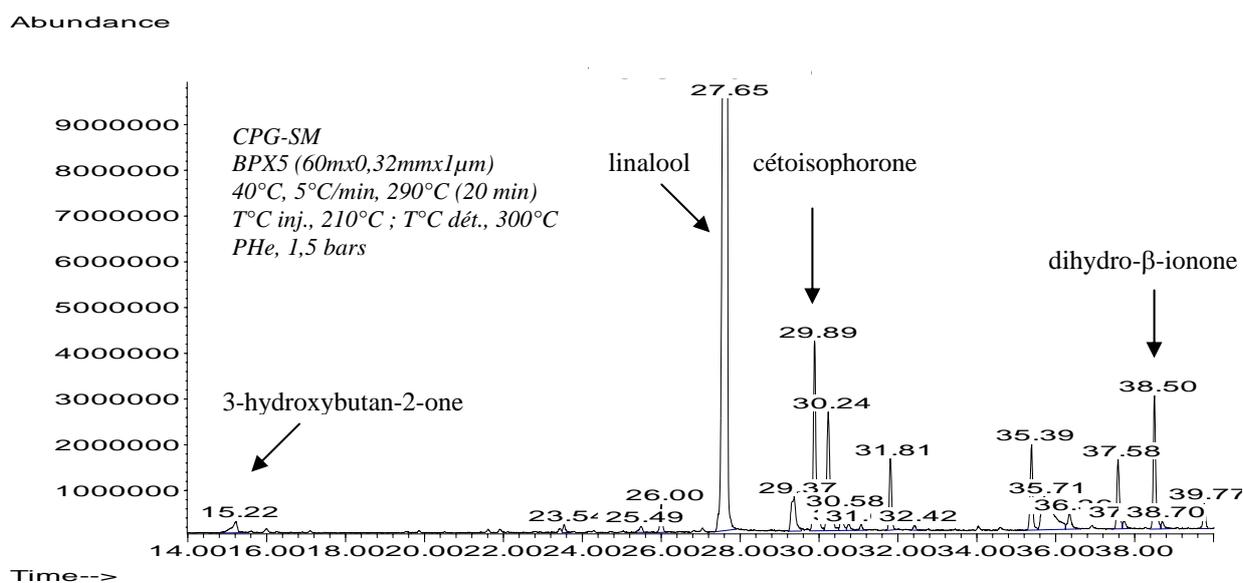


Figure 5. Chromatogramme CPG-SM des composés volatils d'un safran frais extraits par headspace dynamique.

31 volatils ont été extraits et 27 ont été identifiés. Le composé majoritaire émis par les stigmates frais est le linalool présent en moyenne à 59,1% de l'aire totale des composés (de 39,0 à 73,6%). Bien que les sept safrans étudiés présentent des profils similaires (Figure 6), de très grands écarts de valeurs de pourcentage sont constatés sur les composés minoritaires (nonane (Coefficient de Variation (C.V.) = 265), heptanoate d'éthyle (C.V. = 265), undécane (C.V. = 265), 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-ène (C.V. = 180), décane (C.V. = 265), tridécanne (C.V. = 265), β-cyclocitral (C.V. = 265), non-identifié (IR = 1452, C.V. = 265) et dihydro-β-ionol (C.V. = 265)). Huit composés sont présents dans chaque safran : le β-isophorone (aire moyenne : 1,1%), le linalool (59,1%), l'α-isophorone (2,2%), la cétoisophorone (9,4%), le lanièrone (5,5%), le safranal (2,5%), la dihydro-β-ionone (2,2%) et un composé non-identifié (IR = 1376, 6,5%).

Bien que le safranal se développe lors de la torréfaction des stigmates, les résultats de cette étude montrent qu'il est déjà présent en faible quantité dans le safran frais. Ceci confirme qu'en milieu humide, la picrocrocine s'hydrolyse légèrement pour générer ce composé caractéristique. Douze composés supplémentaires ont été identifiés comparativement au safran sec, dont des alcanes - nonane, décane, undécane, dodécane, tridécanne - et d'autres composés tels que l'heptanoate d'éthyle, la 6-hydroxy-2,4,4-triméthylcyclohex-2-ène-1-one, le décane, le β-cyclocitral, la dihydro-β-ionone, le junipène et le dihydro-β-ionol.

Le nom de l'échantillon est composé de l'état du safran (Frais, F), du jour de récolte en octobre, du type de séchage, de la safranière d'origine et du lieu de séchage (Laboratoire, L).

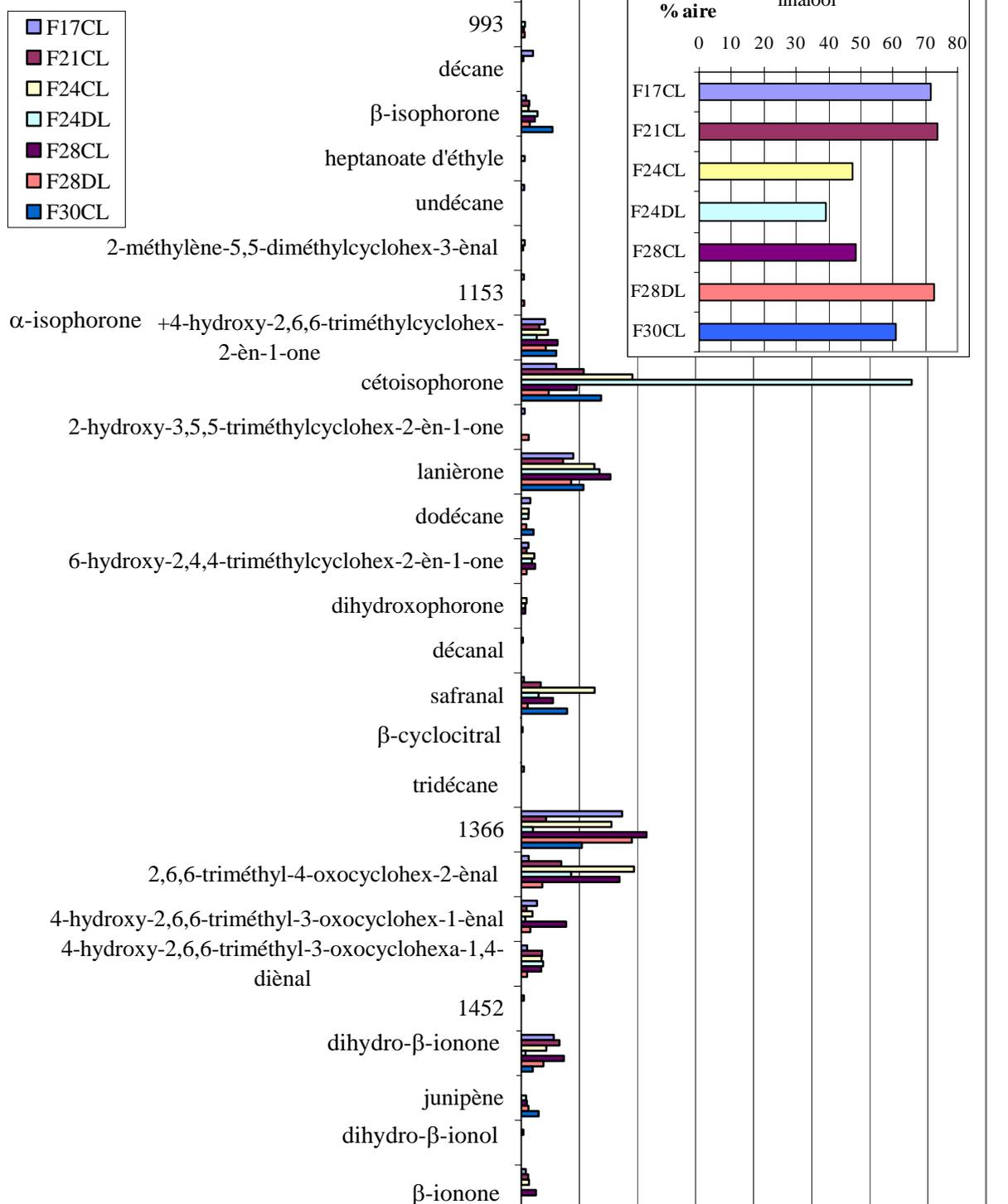


Figure 6. Profils des composés volatils de sept safrans frais obtenus par HD/CPG-SM. (Identification réalisée par les indices de rétention, les librairies (NIST 98, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature, (Tarantilis et Polissiou, 1997), (Zarghami et Heinz, 1971), (Cadwallader et al., 1997)).

### II.2.2. Etude des stigmates secs par HD/CPG-SM

Les composés volatils ont été extraits du safran sec, par la méthode d'headspace dynamique (piégeage sur Tenax TA), et analysés en CPG-SM (Figure 7). Douze safrans issus de la production de 2002 sont inclus dans cette étude, sept ont été séchés par le laboratoire (L) dans un four électrique ventilé dont six provenaient de la safranière (C) et un de la (D) et cinq par le producteur (P) selon la méthode de séchage (C), sur une grille dans un four ventilé. Six échantillons de safrans frais précédemment étudiés (cf. II.2.1) et séchés en laboratoire (L) participent à cette caractérisation. Les safrans ont été nommés comme dans le Tableau 1 (cf. II.1), "S" signifiant Sec. Les modes opératoires ont été détaillés dans la partie expérimentale (cf. V.2.4.2).

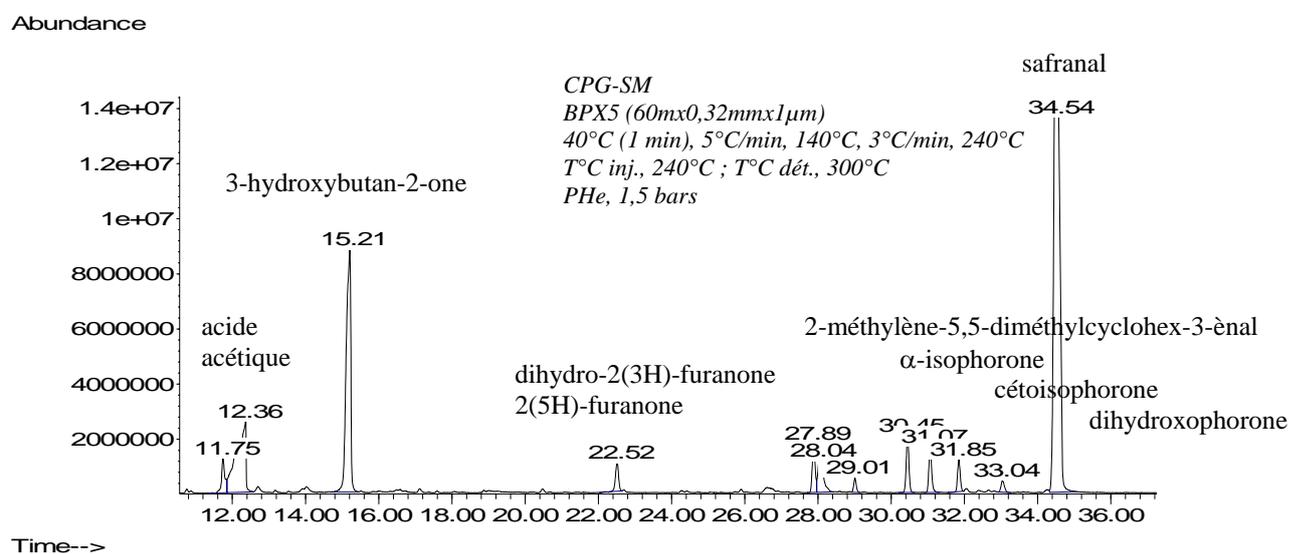
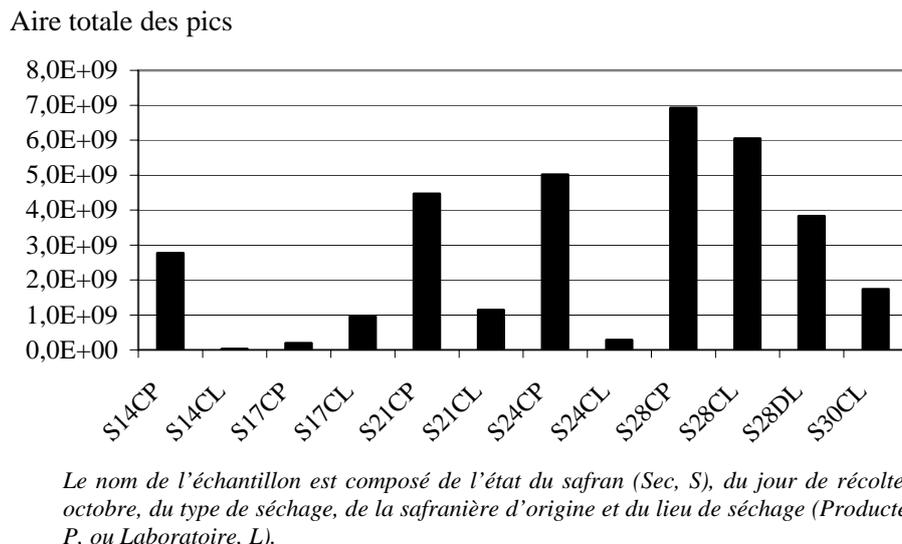


Figure 7. Chromatogramme CPG-SM des composés volatils d'un safran sec extraits par headspace dynamique.

Comme observé précédemment, la puissance aromatique est variable en fonction du jour de récolte et du type de séchage (Figure 8).



**Figure 8. Puissance aromatique des safrans secs donnée par l'aire totale des pics obtenue par CPG-SM.**

26 volatils ont été extraits et 22 ont été identifiés (Figure 9). Le composé majoritaire est le safranal, présent en moyenne à 62 % par rapport à l'aire totale (de 42 à 85 %), valeur similaire aux données bibliographiques, 47 % pour Zarghami, (Zarghami et Heinz, 1971), 60 % pour Rödel, (Rödel et Petrzika, 1991) et 70 % pour Tarantilis, (Tarantilis et Polissiou, 1997). La 3-hydroxybutan-2-one, lorsqu'elle est détectée dans les échantillons, est présente à un taux élevé, en moyenne 9,3 % (de 4,2 à 30,8 %) contre 6,3 % pour l' $\alpha$ -isphorone. Ces valeurs, par rapport aux études antérieures, sont élevées pour la 3-hydroxybutan-2-one et faibles pour l' $\alpha$ -isphorone qui représentait 14 % des composés volatils extraits par Tarantilis, (Tarantilis et Polissiou, 1997).

Le profil général des échantillons est composé du 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-ène (2,0%), de l' $\alpha$ -isphorone (6,3%), de la cétoisophorone (2,9%), de la dihydrophorone (3,3%) et du safranal (62,0%). Le linalool est présent dans certains échantillons à un taux très faible, 0,3% en moyenne. Le safranal, majoritaire, a été développé pendant la torréfaction tandis que le pourcentage de linalool diminue considérablement. L'arôme des six échantillons analysés avant et après séchage est composé en moyenne de 2,5% de safranal et de 62,5% de linalool à l'état frais contre 58,4% de safranal et 0,26% de linalool lorsqu'ils sont secs. Cependant, le rapport linalool/safranal, pour chaque échantillon, ne montre aucune corrélation avec le taux d'humidité résiduelle (Hr) après séchage.

Cinq composés supplémentaires ont été identifiés par rapport à la littérature: le 3-méthylbutanal, le 2-méthylbutanal, la 5-méthyl-dihydro-2(3H)-furanone, la 6,6-diméthylcyclohex-2-ène-1-one et l'heptanoate d'éthyle.

Le nom de l'échantillon est composé de l'état du safran (Sec, S), du jour de récolte en octobre, du type de séchage, de la safranière d'origine et du lieu de séchage (Producteur, P, ou Laboratoire, L).

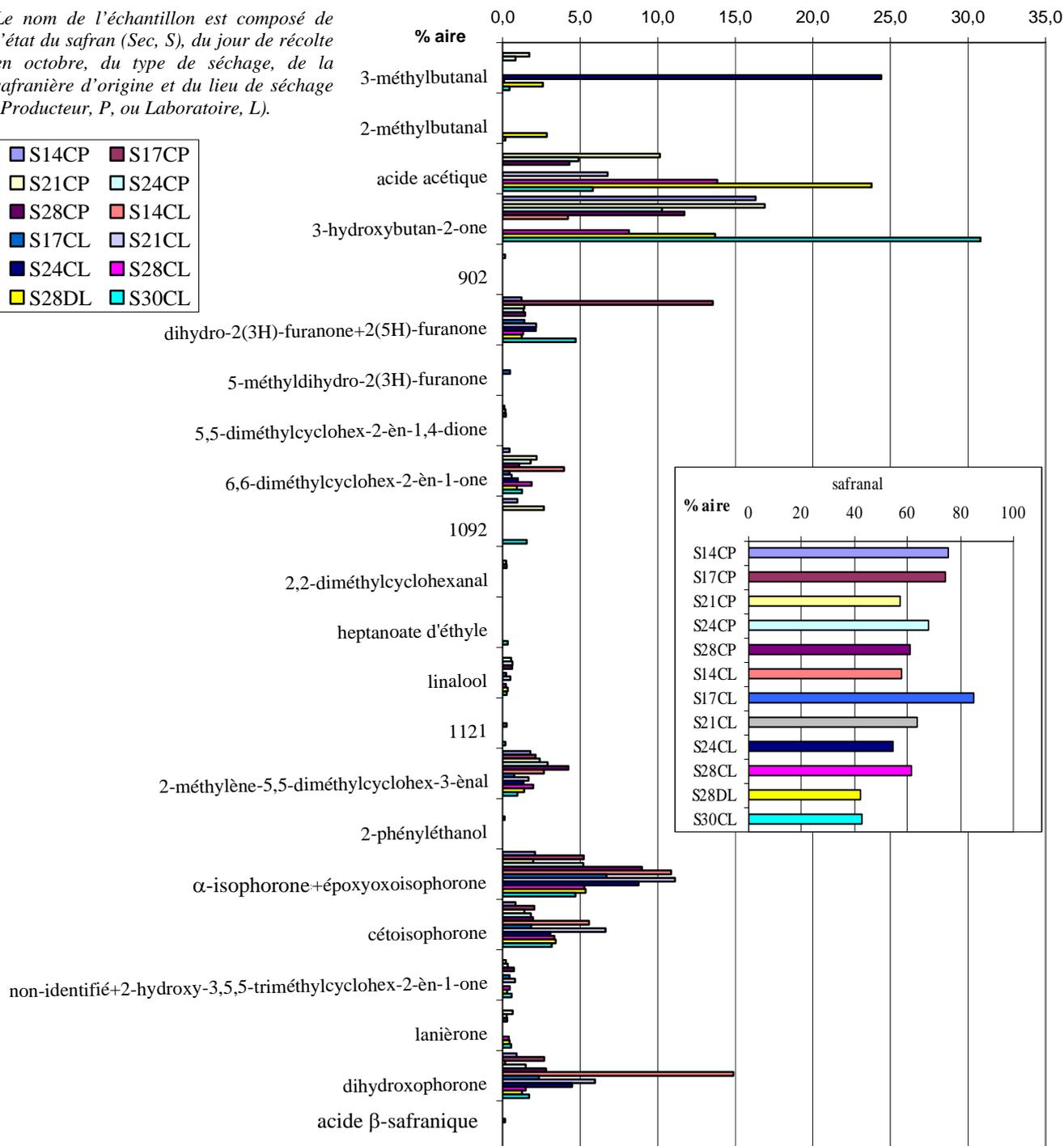
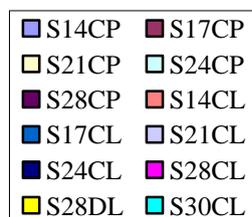


Figure 9. Profils des composés volatils de 12 safrans secs obtenus par HD/CPG-SM. (Identification réalisée par les indices de rétention, les bibliothèques (NIST 98, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature, (Tarantilis et Polissiou, 1997), (Zarghami et Heinz, 1971), (Cadwallader et al., 1997)).

### II.2.3. Comparaison des profils des composés volatils des safrans frais et secs

Les safrans frais et sec n'exaltent pas le même arôme. Le composé majoritairement émis par le safran frais est le linalool à 59,1 % en moyenne, qui donne des notes "fraîche", "florale" et "citronnée" tandis que celui émis par le safran sec, le safranal à 62,0 %, donne une note "safranée" caractéristique de l'épice. Le safran frais possède des composés volatils plus lourds que les stigmates séchés (les indices de rétention expérimentaux allant respectivement jusqu'à 1528 et 1359) et est plus riche en composés, 31 contre 26 dans le safran sec (Tableau 8). Le séchage des stigmates peut entraîner la perte de composés volatils légers mais aussi des réactions de dégradations thermiques formant des molécules plus faibles en poids moléculaires pouvant expliquer ce phénomène. Les stigmates ont en commun 10 composés volatils, présents dans des proportions différentes : la 3-hydroxybutan-2-one, l'heptanoate d'éthyle, le linalool, le 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-ène, l' $\alpha$ -isophorone, la cétoisophorone, la 2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1-one, le lanièrone, la dihydroxophorone et le safranal. Une diminution du lanièrone est observée entre les stigmates frais et secs (de 5,5 à 0,2%) bien que celui-ci participe activement à l'arôme du safran selon Cadwallader, (Cadwallader et al., 1997).

Tableau 8. Composés volatils de safrans frais et secs obtenus par HD /CPG-SM.

Composés	IR <sup>a</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	% A. frais <sup>c</sup>	E.T. <sup>b</sup>	% A. sec <sup>c</sup>	E.T. <sup>b</sup>
3-méthylbutanal [590-86-3]	671	44(100),41(80),58(50),71(30),86(3)	-	-	2,51	6,95
2-méthylbutanal [96-17-3]	679	57(100),41(90),58(70),29(50),82(10),71(5)	-	-	0,25	0,82
acide acétique [64-19-7]	693	45(100),43(90),60(70)	-	-	5,80	7,26
3-hydroxybutan-2-one [513-86-0]	765	45(100),43(85),29(23),88(16),42(12),73(5),55(3)	2,28	3,40	9,34	9,39
nonane [111-84-2]	895	43(100),57(95),41(90),29(80),85(40),71(30),128(10)	0,06	0,15	-	-
902	902	55(100),67(50),110(48),39(30)	-	-	0,01	0,05
dihydro-2-[3H]-furanone [96-48-0] + 2(5H)-furanone[497-23-4]	953	55(100),42(80),84(73),41(48),86(40),110(30),109(24)	-	-	2,67	3,60
5-méthyl-dihydro-2-[3H]-furanone [108-29-2]	990	56(100),85(70),41(70),41(30),100(10)	-	-	0,04	0,14
993	993	57(100),56(80),41(79),43(75),69(30),99(20),108(10)	0,12	0,16	-	-
décane [124-18-5]	998	43(100),57(95),41(90),71(50),85(40),142(15),98(10)	0,17	0,37	-	-
5,5-diméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione [45731-99-5]	1038	95(100),70(90),110(40),138(38),67(35),82(20)	-	-	0,04	0,08
$\beta$ -isophorone [471-01-2]	1068	81(100),96(96),95(90),138(87),123(78),42(50),67(45)	1,10	0,78	-	-
6,6-diméthylcyclohex-2-ène-1-one [6553-64-6]	1087	107(100),125(35),81(33),55(30),91(28),140(28),122(15)	-	-	1,30	1,06
1092	1092	112(100),71(65),43(55),42(30),98(20),113(18),107(18)	-	-	0,43	0,87
2,2-diméthylcyclohexanal [13155-56-1]	1096	121(100),105(60),91(55),107(35),150(33),79(30),151(5)	-	-	0,04	0,10
heptanoate d'éthyle [106-30-9]	1097	88(100),43(98),57(60),113(40),70(38)	0,04	0,11	0,03	0,10
undécane [1120-21-4]	1098	43(100),57(90),41(60),71(50),85(30),156(10)	0,04	0,09	-	-

<b>linalool [78-70-6]</b>	1114	71(100),43(85),41(80),93(75),55(55),121(20),136(8)	<b>59,15</b>	<b>14,13</b>	<b>0,28</b>	<b>0,25</b>
1121	1121	82(100),57(80),95(40),138(38),70(35),152(20)	-	-	0,04	0,09
2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-ènal [33399-07-4]	1149	121(100),91(60),107(50),79(40),135(20),150(10)	0,07	0,12	2,02	0,95
1153	1153	43(100),69(80),112(50),97(40),56(38),154(5),139(4)	0,07	0,12	-	-
2-phényléthanol [60-12-8]	1155	91(100),92(50),122(30),65(10)	-	-	0,01	0,04
α-isophorone [78-59-1] + 4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex- -2-èn-1-one [64809-50-3] + époxyoxoisophorone	1167	82(100),138(30),125(10),153(10),168(2)	2,21	0,67	6,35	3,03
cétoisophorone [1125-21-9]	1182	68(100),96(95),152(48),109(15),137(13),153(5),81(4)	9,36	10,95	2,93	1,70
non-identifié + 2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-èn- -1-one [4883-60-7]	1185	154(100),70(70),139(50),98(40),83(30),111(28),125(10)	0,13	0,25	0,33	0,29
lanièrone [28750-52-9]	1193	109(100),124(50),152(35),137(33),123(25),91(23),110(20)	5,48	1,46	0,22	0,25
dodécane [112-40-3]	1197	57(100),43(80),71(60),85(40),109(20),124(10),170(9)	0,50	0,39	-	-
6-hydroxy-2,4,4-triméthylcyclohex- -2-èn-1-one [4883-60-7]	1205	110(100),67(75),95(60),109(28),154(10),137(8)	0,68	0,43	-	-
dihydroxophorone [20547-99-3]	1210	56(100),139(90),42(88),69(70),154(69),83(20),111(10)	0,16	0,21	3,35	3,96
décanal [112-31-2]	1223	41(100),29(90),57(80),82(50),95(40),112(30),121(10)	0,02	0,05	-	-
<b>safranal [116-26-7]</b>	1245	107(100),91(80),121(50),150(45),105(40),79(25),135(10)	<b>2,42</b>	<b>2,13</b>	<b>61,98</b>	<b>12,58</b>
β-cyclocitral [432-25-7]	1267	152(100),137(98),109(70),123(68),67(50),81(48)	0,02	0,05	-	-
tridécane [629-50-5]	1300	57(100),43(90),71(70),85(50),98(10),184(9),281(8)	0,03	0,09	-	-
acide β-safranique [4430-99-3]	1359	166(100),121(80),93(79),137(60),149(58),109(30)	-	-	0,01	0,05
1366	1366	29(100),112(99),83(80),98(75),55(50), 125(20),135(5)	6,44	3,75	-	-
2,6,6-triméthyl-4-oxocyclohex-2-ènal [79163-18-1]	1379	82(100),110(45),123(30),153(28),166(20),138(20),207(10)	4,05	3,76	-	-
4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxo- -cyclohex-1-ènal [141891-14-7]	1399	153(100),125(75),29(60),43(20),111(18),182(10),154(9)	1,11	1,29	-	-
4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxo- -cyclohexa-1,4-diènal [35692-95-6]	1444	29(100),109(99),137(97),180(80),152(79),123(50),165(30)	1,17	0,79	-	-
1452	1452	121(100),161(80),179(50),93(49),136(40)	0,03	0,08	-	-
dihydro-β-ionone [17283-81-7]	1479	43(100),121(65),161(35),93(30),136(25),176(20),194(10)	2,17	1,20	-	-
junipène [475-20-5]	1482	91(100),161(90),105(70),189(50),204(48)	0,43	0,54	-	-
dihydro-β-ionol [3293-47-8]	1487	123(100),163(70),196(40),95(38),107(10)	0,03	0,07	-	-
β-ionone [14901-07-6]	1528	177(100),43(45),91(28),135(18),178(16),192(5)	0,42	0,47	-	-

<sup>a</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>b</sup>écart type sur les pourcentages.

<sup>c</sup>pourcentage moyen.

Deux hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer le taux élevé de linalool piégé par headspace dynamique dans le safran frais, le safran sec n'en contenant que très peu :

- Le safran frais contient une quantité importante de linalool intrinsèque.
- Le safran frais contient peu de linalool mais génère cette molécule en grande quantité par action enzymatique, (Cseke et al., 1998).

Afin de confirmer l'une de ces hypothèses, les composés volatils présents dans les safrans frais (Hr = 76,0 %) et sec (Hr = 2,8%), issus de la récolte de 2003 ont été extraits à l'aide d'un appareil de type Lickens-Nickerson, dans de l'éther diéthylique avec ajout d'un étalon interne, le carvacrol (cf. V.2.5).

**Tableau 9. Composés volatils de safrans frais et sec extraits par Likens-Nickerson et analysés par CPG-SM.**

Composés	IR <sup>a</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	% A. frais <sup>b</sup>	% A. sec <sup>b</sup>	m (µg/g) frais <sup>c</sup>	m (µg/g) sec <sup>c</sup>
β-isophorone [471-01-2]	1081	96(100),81(93),138(83),123(76),95(73),41(50),67(45)	7,9%	2,6%	340	230
linalool [78-70-6]	1123	71(100)43(85)41(83)93(80)55(70)69(50)80(20)	2,0%	-	80	
2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-ène [33399-07-4]	1162	121(100),107(35),79(33),91(30),135(5)	-	0,2%	-	20
4-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1-one* [14203-59-9]	1169	112(100)98(80)97(60)69(40)83(30)110(20)	2,5%	0,7%	110	60
α-isophorone [78-59-1]	1179	82(100),138(25),54(10),39(8),95(5)	2,7%	1,3%	120	110
cétoisophorone [1125-21-9] + 2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1-one [4883-60-7]	1199	96(100),68(95),40(50),39(48),152(40),41(30)	2,7%	1,6%	130	150
lanièrone [28750-52-9]	1207	109(100),124(45),152(38),137(35),39(33),79(25),91(10)	3,0%	1,2%	130	100
dihydroxophorone [20547-99-3]	1227	42(100),56(98),139(60),154(50),70(35),83(20),95(5)	-	0,8%	-	70
<b>safranal [116-26-7]</b>	1259	107(100),91(80),121(70),150(65),105(40)135(10)151(5)	<b>67,8%</b>	<b>85,5%</b>	<b>2940</b>	<b>7770</b>
étalon (carvacrol [499-75-2])	1353	135(100),150(40),91(10),115(8),107(7),15(2)	6,0%	2,1%	260	190
6-(but-2-énylidène)-1,5,5-triméthylcyclohexène* [71186-25-9]	1404	105(100),176(85),119(80),161(75),91(74),133(50),148(30)	-	0,4%	-	40
4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxo-cyclohex-1-ène [141891-14-7]	1417	153(100),125(60),43(50),111(20),182(10)	4,0%	0,6%	180	50
4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxo-cyclohexa-1,4-diène [35692-95-6]	1462	109(100)137(95)180(80)152(78)123(65)91(45)165(35)	1,2%	3,0%	50	270

<sup>a</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>b</sup>pourcentage moyen.

<sup>c</sup>masse en µg de composés dans l'extrait par g de matière sèche de stigmates.

\*nouveaux composés extraits et identifiés par SM.

L'analyse par CPG-SM montre que le linalool est présent en faible quantité dans l'extrait de safran frais, 2,0 %, soit 80 µg/g de matière sèche et est absent du sec, confirmant le fait que le safran frais dégagerait spécifiquement du linalool. Le taux élevé de safranal dans les deux extraits, avant et après torréfaction (67,8 et 85,5 %), laisse penser que les composés volatils, soumis à des températures comprises entre 30 et 80°C au cours de l'extraction, pourraient évoluer thermiquement (dégradation, synthèse), comme la picrocrocine vers le safranal. De plus, les profils de la fraction volatile sont différents de ceux obtenus par

headspace dynamique. Cependant, d'un point de vue quantitatif, la nette augmentation de la masse de safranal après torréfaction (de 2940 à 7770 µg/g de matière sèche) montre que ce dernier est essentiellement produit au cours de l'étape de séchage.

Le linalool, généré dans les plantes par action enzymatique, (Cseke et al., 1998), serait libéré par la plante fraîche au cours du temps. L'extraction par Likens-Nickerson à des températures supérieures à 30°C, arrêterait toute action enzymatique et donnerait la quantité de linalool émise à un instant t. Au contraire, l'extraction par headspace dynamique, étant non destructrice, permettrait de piéger sur 15 min, le linalool relargué par la plante. L'action enzymatique pourrait être déclenchée lors de l'émondage des fleurs (séparation fleurs/stigmates frais), (Holopainen, 2004), le taux de linalool, libéré par la plante sur pied et piégé par headspace (SPME), étant beaucoup plus faible (10,0%, cf. III.2.2.1.2, Tableau 6) que celui du safran frais (59,0%).

Les rendements en composés volatils sont de 0,41 % pour les stigmates frais et de 0,89% pour les secs. Lors de l'extraction des composés volatils, deux phénomènes peuvent entrer en compétition : l'évaporation des composés volatils et la formation de composés volatils par action thermique ou d'hydrolyse. Aux vues des résultats, le deuxième phénomène semble être le plus important.

Les extraits de safran frais et sec ne dégagent pas la même odeur et ne possèdent pas le même profil de fraction volatile.

#### **II.2.4. Etude des stigmates secs par SPME/CPG-SM**

Les composés volatils du safran ont été extraits par headspace dynamique dans l'étude précédente. Cependant, cette méthode étant difficile à mettre en œuvre (préparation des pièges, désorption sous azote, contaminations...) et le safran étant reçu sur une courte période, une autre technique de caractérisation a été utilisée. La SPME, inventée par Pawliszyn, (Pawliszyn et Belardi, 1989), est une méthode simple qui comme l'extraction par headspace, est non destructrice. Elle permet d'extraire puis d'analyser rapidement les échantillons. Ces deux techniques d'extraction ont donc été comparées. L'optimisation de l'extraction par SPME passe par le choix de la fibre, le temps de piégeage, la masse d'échantillon nécessaire et le temps de désorption. Dans cette étude, les 12 échantillons de safran du Quercy, issus de la production de 2003, ont été caractérisés (cf. II.1, Tableau 1). Leur nom est composé du jour de récolte en octobre, du type de séchage et de la safranière d'origine A ou B. Les composés volatils de quatre échantillons étrangers ont également été

analysés, Espagne, Maroc, Grèce et Iran, provenant du conservatoire du safran ("Le Safranario") et comparés à ceux du Quercy (cf. V.2.6.1 et V.2.6.2).

#### II.2.4.1. Optimisation de la technique d'extraction par SPME

Plusieurs fibres, indiquées dans le Tableau 10, ont été testées. Un safran riche en composés volatils, l'échantillon 28CP de 2002, (cf. II.1, Tableau 1) a été sélectionné d'après les analyses réalisées en headspace dynamique afin de déterminer les conditions optimales de piégeage et d'analyse.

Tableau 10. *Fibres SPME.*

Fibre	Polymère	Type	Polarité
100µm PDMS	Polydiméthylsiloxane	Absorbant	Apolaire
75µm CAR-PDMS	Carboxen-PDMS	Adsorbant	Bipolaire
65µm PDMS-DVB	Divinylbenzene	Adsorbant	Bipolaire
65µm CW-DVB	Carbowax	Adsorbant	Polaire

Chaque fibre, après avoir été conditionnée, a été testée en fonction du temps de piégeage afin d'évaluer son efficacité pour extraire les composés aromatiques (aire totale et nombre de pics) et le temps optimal de piégeage. La quantité d'échantillon fournie étant très faible, le paramètre masse d'échantillon n'a pas pu être étudié.

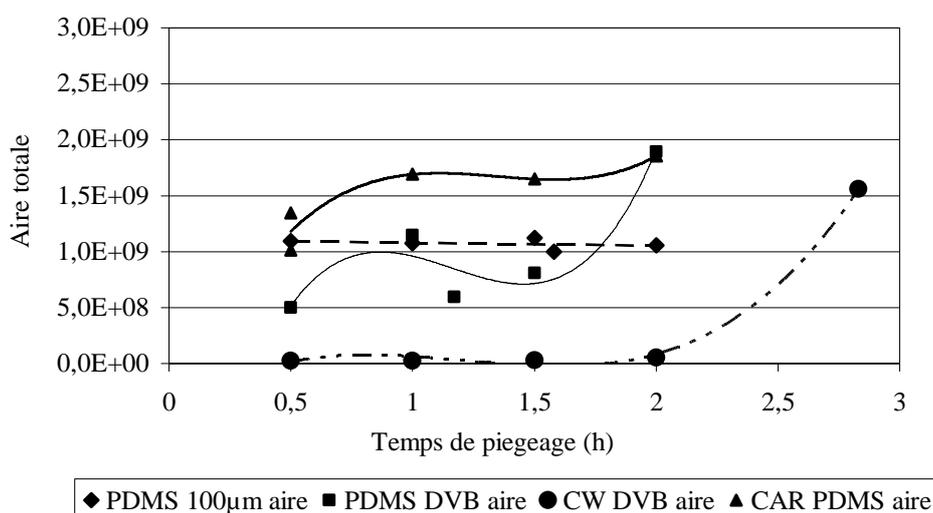
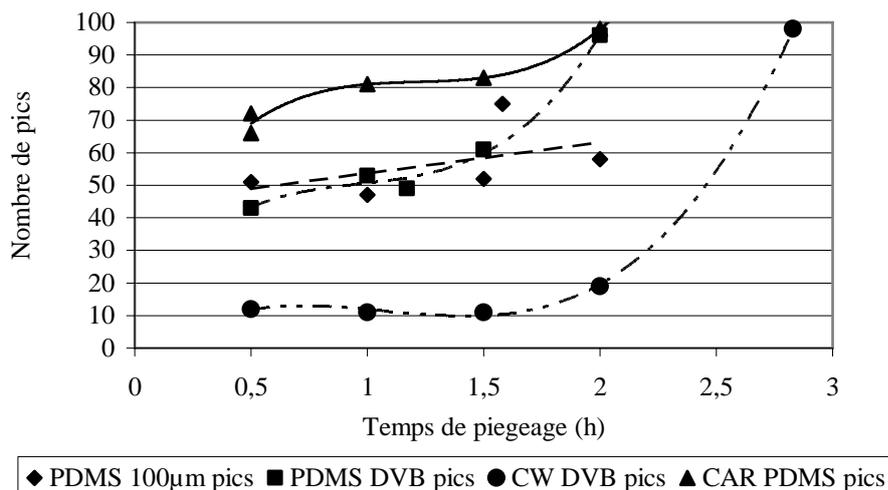


Figure 10. *Etude de l'aire totale des composés volatils extraits en fonction du temps de piégeage pour les 4 fibres testées.*



**Figure 11.** Etude du nombre de pics, en fonction du temps de piégeage pour les 4 fibres testées, obtenus par CPG-SM.

L'aire totale et le nombre de pics, indiqués sur la Figure 10 et la Figure 11, évoluent quasiment de façon identique selon le type de fibre et le temps de piégeage. La fibre CW-DVB paraît être la moins favorable pour piéger les composés aromatiques du safran puisque pour des temps de piégeage inférieurs ou égaux à deux heures, l'aire totale et le nombre de pics piégés ont des valeurs plus faibles que pour les autres fibres. La fibre PDMS extrait de façon quasiment constante en fonction du temps de piégeage et donne un nombre de pics moyen par rapport aux autres fibres. La PDMS-DVB tend à extraire les composés volatils efficacement à partir d'un temps de piégeage relativement long (2h00). La fibre CAR-PDMS semble être la plus favorable pour extraire les composés volatils du safran sec puisque les valeurs de l'aire totale et du nombre de pics extraits sont bien supérieures à celles données par les autres fibres, indépendamment du temps de piégeage. De plus, cette fibre permet de piéger les composés polaires.

Les fibres SPME permettent de piéger les composés volatils du safran sec. La fibre CAR-PDMS paraît être la plus appropriée. Un temps de piégeage d'une heure a été fixé, permettant ainsi d'effectuer un plus grand nombre de répétitions sur chaque échantillon, le pourcentage de chaque composé donné par extraction SPME étant peu reproductible.

### II.2.4.2. Profils des composés volatils extraits des stigmates secs du Quercy

Les composés volatils de 12 échantillons du Quercy ont été extraits par SPME puis analysés par CPG-SM (Figure 12).

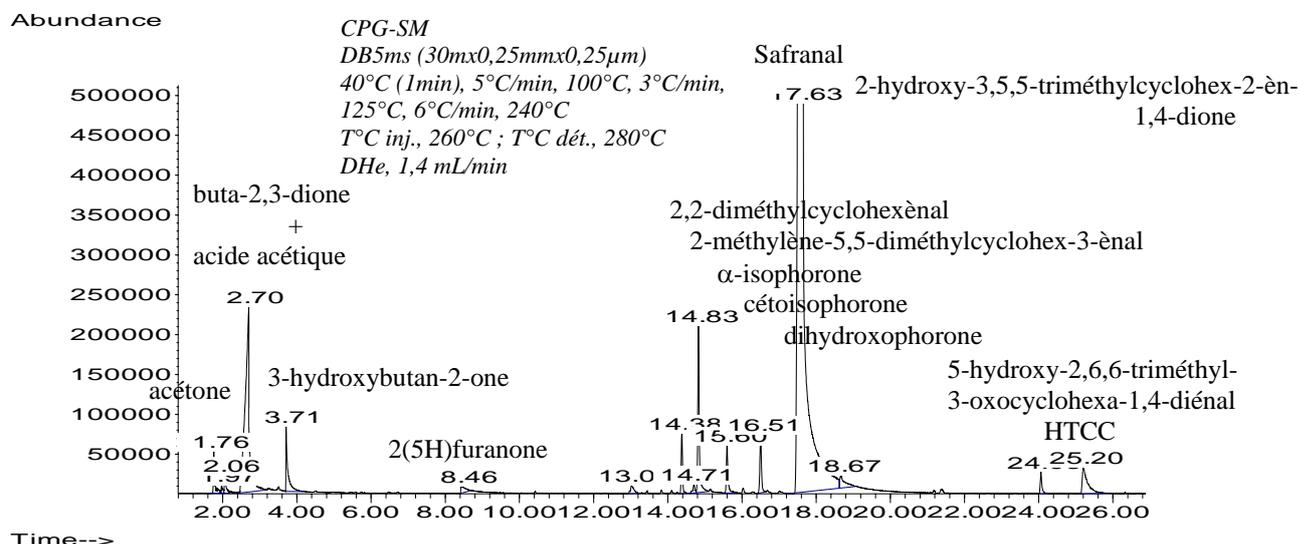


Figure 12. Chromatogramme CPG-SM des composés volatils d'un safran sec extraits par SPME.

Le profil général du safran est donné par les composés présents dans tous les échantillons (Figure 13) : acétone (0,5 %), buta-2,3-dione et acide acétique (8,6 %, l'acide acétique étant majoritaire), 2,2-diméthylcyclohexanal (0,2 %), nonanal (0,2 %), 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-énal (1,1 %), α-isophorone (3,1 %), cétoisophorone (1,4 %), dihydroxophorone (2,2 %), éthylbenzaldéhyde (0,2 %) et safranal (76,8 %).

Sur 35 volatils extraits du safran sec, 32 ont été identifiés (Figure 13). Le composé majoritaire est le safranal avec en moyenne 76,8 % en aire (de 61,8 à 84,5%). Cette valeur est supérieure à celle obtenue lors de l'extraction par headspace dynamique (62,0%) et à celles données dans la littérature par piégeage sur SPME type PDMS de quatre échantillons, (D'Auria et al., 2004), de 41,1 à 72,5 %. Le safranal est coélué avec trois composés présents à l'état de traces : la verbénone, l'eucarvone et la 2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-èn-1,4-dione. La buta-2,3-dione et l'acide acétique sont les deux composés majoritaires, après le safranal, 8,6% en moyenne avec un taux très variable (de 1,2 à 16,1%). L'α-isophorone est présente à 3,1 % (de 0,7 à 6,6 %), valeur inférieure à celle donnée par l'extraction headspace 6,3 % et par la littérature, 5,3% par extraction SPME type PDMS effectuée sur quatre échantillons de safran, (D'Auria et al., 2004).

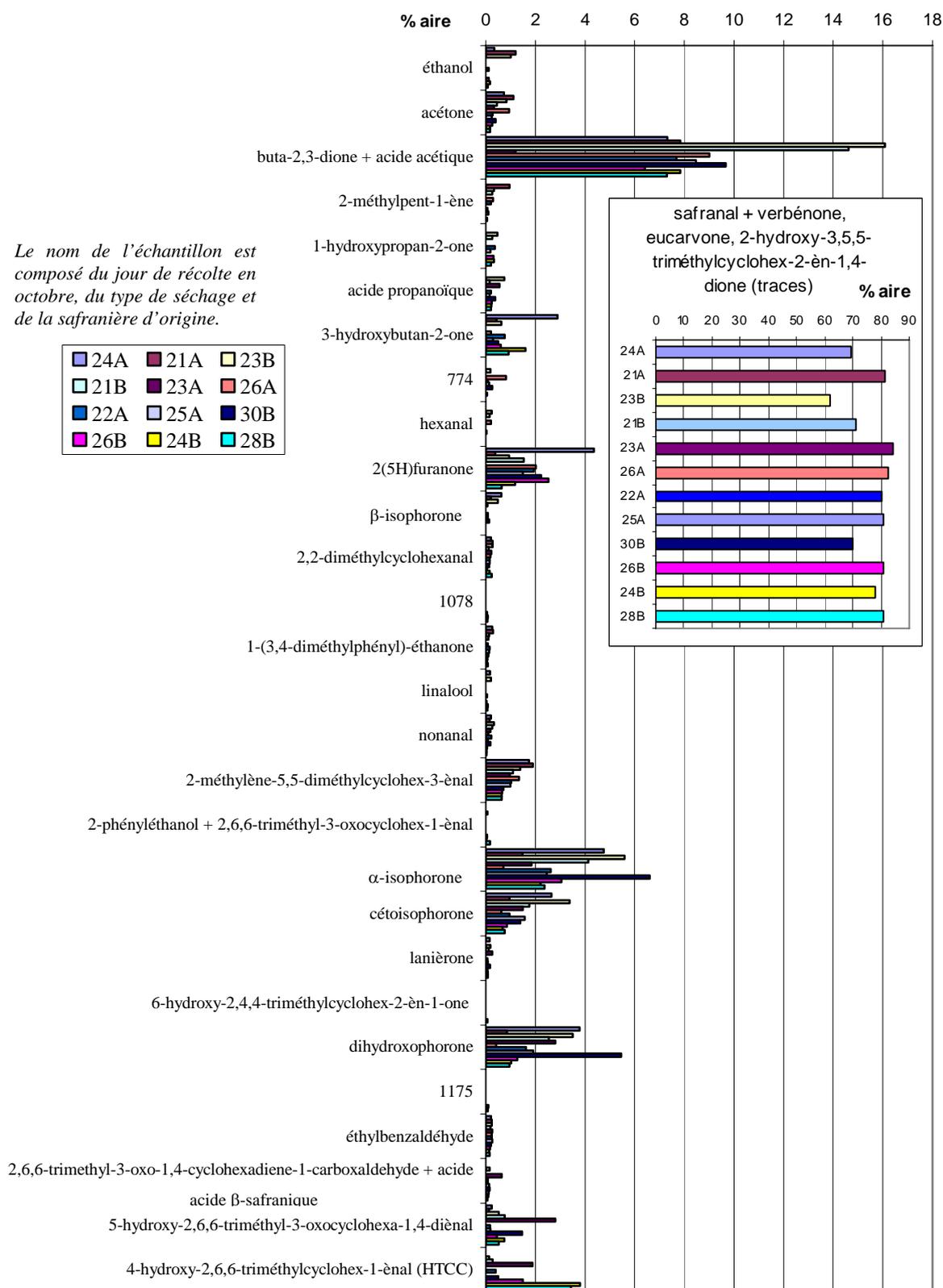


Figure 13. Profils des composés volatils de 12 safrans secs du Quercy extraits par SPME et analysés par CPG-SM. (Identification réalisée par les indices de rétention, les librairies (NIST 98, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature, (Tarantilis et Polissiou, 1997), (Zarghami et Heinz, 1971), (Cadwallader et al., 1997)).

Neuf nouveaux composés ont été identifiés par rapport à la littérature : l'éthanol, l'acétone, le 2-méthylpent-1-ène, la 1-hydroxypropan-2-one, l'acide propanoïque, la 1-(3,4-diméthylphényl)-éthanone, la 6-hydroxy-2,4,4-triméthylcyclohex-2-èn-1-one, l'éthylbenzaldehyde et le 5-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexa-1,4-diénel.

### II.2.4.3. Comparaison des extractions par headspace dynamique et par SPME et interprétations des données

Ces extractions ont été réalisées sur des safrans secs de productions différentes, de 2002 pour l'headspace dynamique et de 2003 pour la SPME. Néanmoins, il semble que la SPME permette d'extraire un nombre plus important de composés volatils, 35 contre 26 par headspace dynamique (Tableau 11).

*Tableau 11. Composés volatils (obtenus par CPG-SM) de safrans secs extraits par headspace dynamique et par SPME.*

Composés	IR <sup>a</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	% A. HD <sup>b</sup>	E.T. <sup>c</sup>	% A. SPME <sup>b</sup>	E.T. <sup>c</sup>
éthanol [64-17-5]	496	45(100),46(50),43(30),42(15),41(2)	-	-	0,26	0,41
acétone [67-64-1]	506	43(100),58(30),42(10),45(7),41(5),44(1)	-	-	0,50	0,33
buta-2,3-dione [431-03-8]	601	43(100),86(20),42(8),45(4),41(3)	<b>5,80</b>	7,26	<b>8,62</b>	3,79
acide acétique [64-19-7]	621	43(100),45(88),60(80),28(35),42(15),44(8)				
2-méthylpent-1-ène [763-29-1]	658	41(100),44(98),58(80),71(30),57(25),42(15)	-	-	0,19	0,27
1-hydroxypropan-2-one [116-09-4]	667	43(100),74(20),56(10),42(8),44(2)	-	-	0,18	0,17
<b>3-méthylbutanal</b> [590-86-3]	671	44(100),41(80),58(50),71(30),86(3)	<b>2,51</b>	6,95	-	-
2-méthylbutanal [96-17-3]	679	57(100),41(90),58(70),29(50),82(10),71(5)	0,25	0,82	-	-
acide propanoïque [79-09-4]	701	74(100),45(98),73(70),57(50),60(45),55(30)	-	-	0,24	0,23
<b>3-hydroxybutan-2-one</b> [513-86-0]	709	45(100),43(85),29(23),88(16),42(12),73(5),55(3)	<b>9,34</b>	9,39	0,74	0,80
774	774	55(100),84(90),40(60),42(10),60(5),44(2)	-	-	0,13	0,24
hexanal [66-25-1]	802	44(100),56(99),41(90),57(85),43(60),72(30),82(25),55(10)	-	-	0,05	0,09
902	902	55(100),67(50),110(48),39(30)	0,01	0,05	-	-
dihydro-2-[3H]-furanone [96-48-0]	912	55(100),42(80),84(73),41(48),86(40),110(30),109(24)	<b>2,67</b>	3,6	<b>1,60</b>	1,16
<b>2-[5H]-furanone</b> [497-23-4]						
5-méthylidihydro-2(3H)-furanone [108-29-2]	972	56(100),85(70),41(70),41(30),100(10)	0,04	0,14	-	-
5,5-diméthylcyclohex-2-èn-1,4-dione [45731-99-5]	1020	95(100),70(90),110(40),138(38),67(35),82(20)	0,04	0,08	-	-
β-isophorone [471-01-2]	1040	81(100),96(96),95(90),138(87),123(78),42(50),67(45)	-	-	0,14	0,21
<b>6,6-diméthylcyclohex-2-èn-1-one</b> [6553-64-6]	1057	107(100),125(35),81(33),55(30),91(28),140(28),122(15)	<b>1,30</b>	1,06	-	-
1062	1062	112(100),71(65),43(55),42(30),98(20),113(18),107(18)	0,43	0,87	-	-
2,2-diméthylcyclohexanal [13155-56-1]	1063	121(100),105(60),91(55),107(35),150(33),79(30),151(5)	0,04	0,1	0,18	0,07
heptanoate d'éthyle [106-30-9]	1097	88(100),43(98),57(60),113(40),70(38)	0,03	0,1	-	-
1098	1098	111(100),43(70),86(30),71(20),91(15),55(10),107(10)	-	-	0,02	0,03
1-(3,4-diméthylphényl)-éthanone	1099	133(100),105(80),148(75),77(35),91(30),103(29),119(20)	-	-	0,12	0,08

[3637-01-2]							
linalool [78-70-6]	1100	71(100),43(85),41(80),93(75),55(55),121(20),136(8)	0,28	0,25	0,05	0,07	
1102	1102	82(100),57(80),95(40),138(38),70(35),152(20)	0,04	0,09	-	-	
nonanal [124-19-6]	1104	57(100),41(95),43(93),55(70),56(60),69(50),81(40),98(38)	-	-	0,16	0,10	
<b>2-méthylène-5,5-diméthyl- -cyclohex-3-ènal</b> [33399-07-4]	1108	121(100),91(60),107(50),79(40),135(20),150(10)	<b>2,02</b>	0,95	<b>1,09</b>	0,42	
2-phényléthanol [60-12-8]							
2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-ènal [18378-66-0]	1115	91(100),92(50),122(30),65(10) 123(100),166(20),108(10),105(8),95(5),138(3)	0,01	0,04	0,03	0,05	
<b>α-isophorone</b> [78-59-1]							
4-hydroxy-2,6,6-triméthyl- -cyclohex-2-èn-1-one [64809-50-3]	1121	82(100),138(30),125(10),153(10),168(2)	<b>6,35</b>	3,03	<b>3,15</b>	1,76	
époxyoxoisophorone							
<b>cétoisophorone</b> [1125-21-9]	1143	68(100),96(95),152(48),109(15),137(13),153(5),81(4)	<b>2,93</b>	1,7	<b>1,42</b>	0,85	
non-identifié +							
2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex- -2-èn-1-one [4883-60-7]	1150	154(100),70(70),139(50),98(40),83(30),111(28),125(10)	0,33	0,29	-	-	
lanièreone [28750-52-9]	1156	109(100),124(50),152(35),137(33),123(25),91(23),110(20)	0,22	0,25	0,11	0,08	
6-hydroxy-2,4,4-triméthylcyclohex- -2-èn-1-one [4883-60-7]	1164	110(100),67(75),95(60),109(28),154(10),137(8)	-	-	0,01	0,02	
<b>dihydroxophorone</b> [20547-99-3]	1171	56(100),139(90),42(88),69(70),154(69),83(20),111(10)	<b>3,35</b>	3,96	<b>2,18</b>	1,49	
1175	1175	137(100),95(80),133(75),105(60),77(55),91(53)	-	-	0,02	0,04	
éthylbenzaldéhyde [53951-50-1]	1185	134(100),133(99),105(75),77(30),91(20),103(10)	-	-	0,22	0,04	
<b>safranal</b> [116-26-7]							
verbénone, eucarvone,							
2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex- -2-èn-1,4-dione (traces)	1199	107(100),91(80),121(50),150(45),105(40),79(25),135(10)	<b>61,98</b>	12,58	<b>76,83</b>	7,01	
2,6,6-triméthyl-3-oxo-1,4- -cyclohexadienal [133399-09-6] +	1306	166(100),121(80),93(79),137(60),149(58),109(30)	0,01	0,05	0,13	0,17	
acide β-safranique [4430-99-3]							
5-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3- -oxocyclohexa-1,4-diènal	1387	109(100),137(95),180(80),152(78),123(65),91(45),165(35)	-	-	0,67	0,78	
<b>4-hydroxy-2,6,6-triméthyl- -cyclohex-1-ènal (HTCC)</b>	1426	107(100),135(95),91(70),121(68),168(30),150(20),153(18)	-	-	<b>1,00</b>	1,37	
[35692-94-5]							

<sup>a</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>b</sup>pourcentage obtenu par extraction headspace dynamique et SPME.

<sup>c</sup>écart type sur les pourcentages.

Les profils en composés volatils majoritaires sont similaires dans les deux types d'extraits (HD/SPME) avec la présence d'acide acétique (5,8 / 8,6 %), de 2-[5H]-furanone (2,7 / 1,6 %), de 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-ènal (2,0 / 1,1 %), d'α-isophorone (6,4 / 3,2 %), de cétoisophorone (2,9 / 1,4 %), de dihydroxophorone (3,4 / 2,2 %) et de safranal (62,0 / 76,8 %). L'headspace dynamique extrait trois composés supplémentaires en quantité importante (% A. ≥ 1 %) : le 3-méthylbutanal, la 3-hydroxybutan-2-one et le 6,6-diméthylcyclohex-2-èn-1-one. La SPME permet également d'extraire l'HTCC, composé intermédiaire dans la synthèse du safranal.

Les deux types d'extraits comportent une forte teneur en acide acétique (5,8% HD / 8,6% SPME) qui pourrait provenir d'une fermentation alcoolique. Les sucres libres ou polymérisés sous forme d'amidon présents dans le safran à un taux de 20%, (Berset et al., 1997), seraient converti en éthanol (extrait par SPME à 0,3 %) et en sous-produits tel que l'acide acétique (extrait en moyenne à 0,01 / 0,13 % par HD / SPME). La présence d'acide  $\beta$ -safranique résulterait de l'oxydation du safranal dans les échantillons les plus humides (Tarantilis et Polissiou, 1997). L'HTCC est un composé intermédiaire dans la synthèse du safranal (IR = 1426) dont le pourcentage est assez variable au sein des échantillons (de 0,0 % à 3,8 %) et tend à augmenter avec le taux d'humidité notamment pour les échantillons dont Hr est supérieure à 12 % (Figure 14).

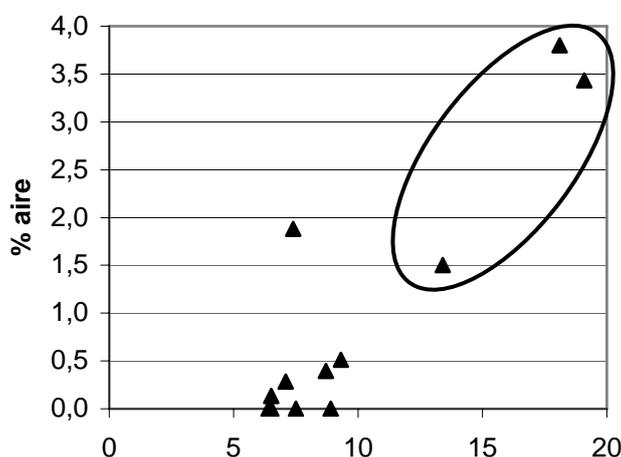


Figure 14. Taux d'HTCC (% aire) en fonction du taux d'humidité des safrans.

Cependant, le taux de safranal ne paraît pas en être affecté puisque aucune baisse du pourcentage de safranal n'a été constatée pour des taux élevés d'humidité. Il semble même plus élevé (Hr < 12%, 75,8% en moyenne, Hr > 12%, 80,0%), ce qui est en accord avec les résultats déterminés par l'application de la norme (cf. II.1.6). A l'inverse, la picrocrocine semble moins élevée dans les échantillons les plus humides (cf. II.1.6). Lors du séchage, le safranal est synthétisé directement à partir de la picrocrocine, (Himeno et Sano, 1987) mais lors du stockage d'échantillons plus humides, elle pourrait s'hydrolyser lentement en HTCC puis en safranal par l'intermédiaire de l'enzyme  $\beta$ -glucosidase, d'où un taux élevé en HTCC, un taux équivalent voire supérieur en safranal, (Tsimidou et Biliaderis, 1997) et une légère diminution de la picrocrocine (cf. I.2.1.2.2). Les enzymes mises en jeu n'ont, en effet, pas été dénaturées, le séchage ayant eu lieu à des températures inférieures ou égales à 60°C (cf.

V.2.2). La teneur en eau résiduelle des tissus des stigmates leur permet d'exercer alors leur activité, (Gregory et al., 2005).

La puissance aromatique des échantillons tend ainsi à augmenter avec le taux d'humidité (Figure 15).

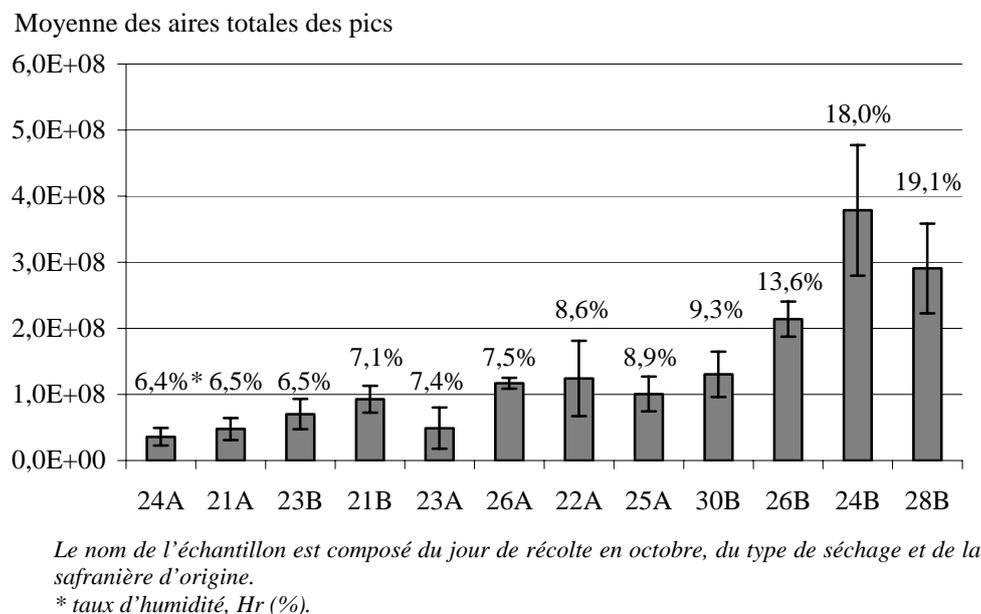


Figure 15. Puissance aromatique des safrans, secs donnée par les aires totales des pics obtenues par SPME/CPG-SM, en fonction du taux d'humidité Hr (%).

#### II.2.4.4. Comparaison avec des safrans étrangers

Les profils de la fraction volatile des safrans du Quercy (cf. II.2.4.2) et de quatre safrans étrangers provenant d'Espagne, de Grèce, du Maroc et d'Iran (acquis auprès de M. Algrech, conservatoire du safran "Le Safranario") ont été comparés afin de déterminer l'existence de différences notables entre l'arôme du safran quercynois et celui de safrans étrangers. Les composés volatils de ces échantillons ont été extraits comme précédemment par SPME puis analysés par CPG-SM.

Les safrans étrangers évalués lors de cette étude montre une puissance aromatique très proche de celle de l'ensemble des échantillons du Quercy (Figure 16).

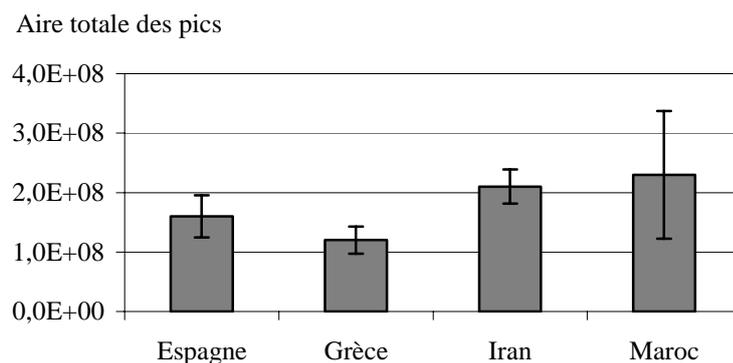


Figure 16. Puissance aromatique des safrans étrangers donnée par l'aire totale des pics obtenue SPME/CPG-SM.

Les composés volatils des safrans étrangers ont globalement le même profil comme indiqué sur la superposition des quatre chromatogrammes illustrée sur la Figure 17, celui-ci étant similaire à celui du safran du Quercy avec la présence d'éthanol, d'acétone, d'acide acétique, de buta-2,3-dione, d' $\alpha$ -isophorone, de cétoisophorone, de dihydroxophorone et de safranal (Figure 18).

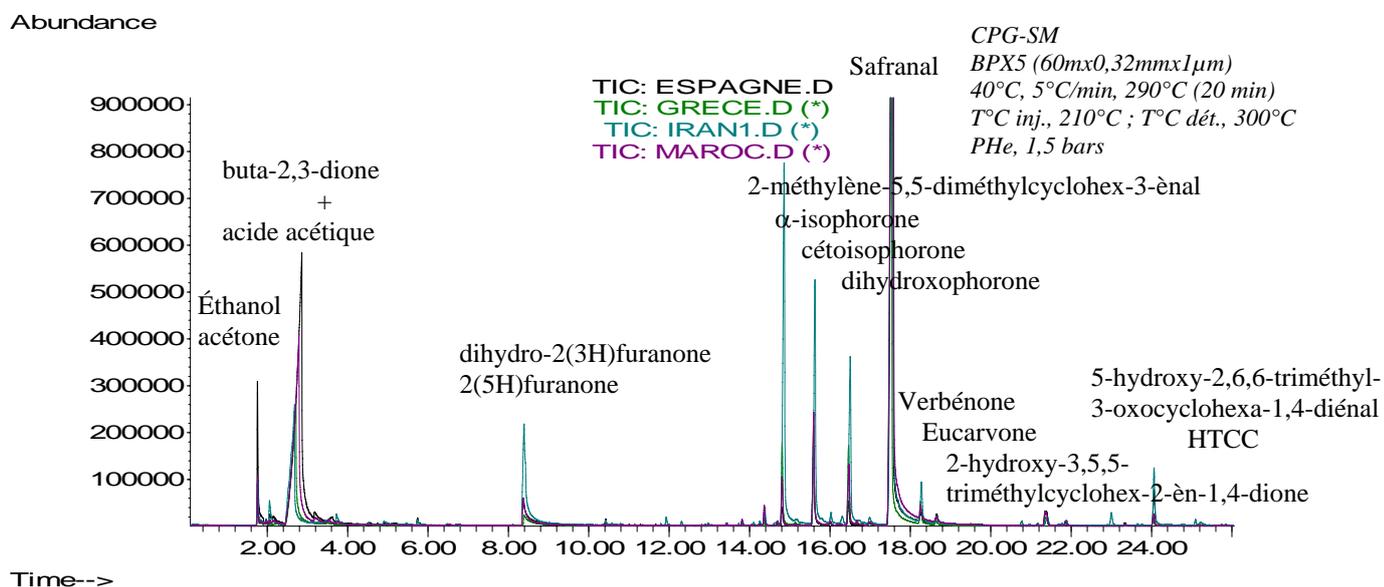


Figure 17. Chromatogrammes CPG-SM des composés volatils extraits de safrans étrangers par SPME.

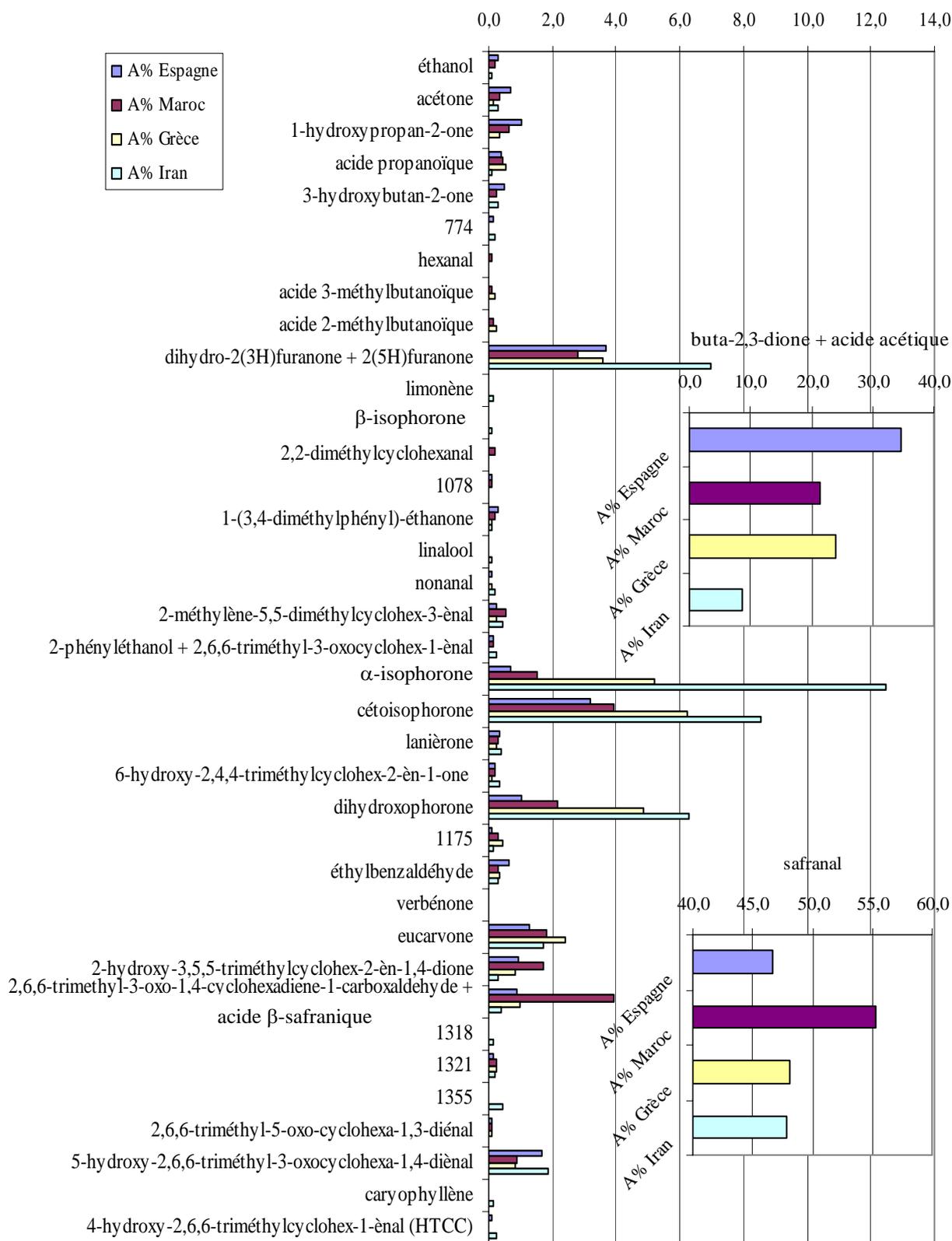


Figure 18. Chromatogramme des composés volatils de safrans étrangers, Espagne, Maroc, Grèce et Iran, extraits par SPME et analysés par CPG-SM. (Identification réalisée par les indices de rétention, les librairies (NIST 98, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature, (Tarantilis et Polissiou, 1997), (Zarghami et Heinz, 1971), (Cadwallader et al., 1997)).

Le safran grec est le plus pauvre, 32 composés volatils contre 37 pour le safran iranien. Huit composés supplémentaires ont été extraits par rapport aux safrans Quercynois, cinq ont été identifiés dont 3 jamais décrits dans la littérature : l'acide 3-méthylbutanoïque, l'acide 2-méthylbutanoïque, et le caryophyllène. Le limonène et le 2,6,6-triméthyl-5-oxocyclohexa-1,3-diène étaient présents dans la littérature, (Kanakis et al., 2004); (Rodel et Petrzika, 1991; Cadwallader et al., 1997).

**Tableau 12. Composés volatils (obtenus par CPG-SM) de safrans secs du Quercy (moyenne sur les 12 échantillons), d'Espagne, du Maroc, de Grèce et d'Iran extraits par SPME.**

Variables <sup>a</sup> /Identification	Spectre de Masse	IR <sup>b</sup>	%A. Q <sup>c</sup>	E.T. <sup>d</sup>	%A. E <sup>c</sup>	%A. M <sup>c</sup>	%A. G <sup>c</sup>	%A. I <sup>c</sup>
V1 éthanol [64-17-5]	45(100),46(50),43(30),42(15),41(2)	496	0,26	0,41	0,29	0,20	0,06	0,11
V2 acétone [67-64-1]	43(100),58(30),42(10),45(7),41(5),44(1)	506	0,50	0,33	0,68	0,36	0,16	0,32
V3 buta-2,3-dione [431-03-8] acide acétique [64-19-7]	43(100),86(20),42(8),45(4),41(3) 43(100),45(88),60(80),28(35),42(15),44(8)	601 621	8,62	3,79	34,69	21,32	23,86	8,78
V4 2-méthylpent-1-ène [763-29-1]	41(100),44(98),58(80),71(30),57(25),42(15)	659	0,19	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00
V5 1-hydroxypropan-2-one [116-09-6]	43(100),74(20),56(10),42(8),44(2)	667	0,18	0,17	1,02	0,66	0,35	0,00
V6 acide propanoïque [79-09-4]	74(100),45(98),73(70),57(50),60(45),55(30)	701	0,24	0,23	0,38	0,44	0,55	0,09
V7 3-hydroxybutan-2-one [513-86-0]	45(100),43(65),88(15),29(5),73(5)	709	0,74	0,80	0,49	0,24	0,00	0,28
V8 774	55(100),84(90),40(60),42(10),60(5),44(2)	774	0,13	0,24	0,17	0,06	0,00	0,18
V9 hexanal [66-25-1]	44(100),56(99),41(90),57(85),72(30),82(25),55(10)	802	0,05	0,09	0,00	0,09	0,00	0,00
V10 acide 3-méthylbutanoïque [53-74-2]	60(100),43(60),41(40),45(30),87(10),91(2)	843	0,00	-	0,00	0,12	0,19	0,00
V11 acide 2-méthylbutanoïque [116-53-0]	74(100),57(50),41(48),87(20),73(18),60(10)	854	0,00	-	0,00	0,16	0,24	0,00
V12 dihydro-2-[3H]furanone [96-48-0] 2-[5H]furanone [497-23-4]	55(100),84(65),42(35),86(25),54(24),56(23),85(10)	912	1,60	1,16	3,70	2,81	3,60	6,96
V13 limonène [7705-14-8]	68(100),93(80),136(45),121(43),107(40), 41(35)	1028	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,16
V14 β-isophorone [471-01-2]	96(100),81(97),95(80),138(76),123(70),67(40),41(37)	1040	0,14	0,21	0,00	0,00	0,00	0,09
V15 2,2-diméthylcyclohexanal [13155-56-1]	121(100),105(75),91(70),107(60),79(40),150(38)	1063	0,18	0,07	0,06	0,18	0,00	0,07
V16 1078	111(100),43(70),86(30),71(20),91(15),55(10),107(10)	1078	0,02	0,03	0,12	0,12	0,00	0,00
V17 1-(3,4-diméthylphényl)-éthanone [3637-01-2]	133(100),105(80),148(75),77(35),91(30),103(29),119(20)	1091	0,12	0,08	0,29	0,19	0,09	0,09
V18 linalool [78-70-6]	93(100),71(99),41(55),55(53),80(40),121(25),136(10)	1100	0,05	0,07	0,00	0,00	0,00	0,10
V19 nonanal [124-19-6]	57(100),41(95),43(93),55(70),56(60),69(50),81(40),98(38)	1104	0,16	0,10	0,07	0,00	0,08	0,17
V20 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex- -3-èneal [33399-00-9] 2-phényléthanol [60-12-8]	121(100),91(50),107(40),79(38),105(35),135(30),150(10)	1108	1,09	0,42	0,27	0,55	0,23	0,45
V21 2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-èneal [18378-66-0]	91(100),92(50),122(40),65(15),77(8) 123(100),166(20),108(10),105(8),95(5),138(3)	1116	0,03	0,05	0,16	0,13	0,06	0,24
V22 α-isophorone [78-59-1]	82(100),138(30),54(10),95(5)	1121	3,15	1,76	0,69	1,52	5,19	12,46
V23 cétoisophorone [1125-21-9]	68(100),96(80),152(45),39(30),109(20),137(15),156(3)	1143	1,42	0,85	3,19	3,94	6,26	8,56
V24 lanionone [28750-52-9]	109(100),124(70),137(50),152(25),79(25),123(34),91(23)	1156	0,11	0,08	0,34	0,28	0,23	0,38
V25 6-hydroxy-2,4,4-triméthylcyclohex- -2-ène-1-one [4883-60-7]	110(100),67(80),91(70),79(65),96(40),138(5),150(2)	1164	0,01	0,02	0,22	0,20	0,12	0,35
V26 dihydroxophorone [20547-99-3]	56(100),139(98),42(68),69(56),154(53),70(56),83(20)	1171	2,18	1,49	1,04	2,16	4,88	6,28
V27 1175	137(100),95(80),133(75),105(60),77(55),91(53)	1175	0,02	0,04	0,11	0,31	0,44	0,15
V28 éthylbenzaldéhyde [53951-50-1]	134(100),133(99),105(75),77(30),91(20),103(10)	1185	0,22	0,04	0,62	0,28	0,32	0,29
V29 safranal [116-26-7]	107(100),91(80),121(75),150(65),105(40),79(30),135(10)	1199	<b>76,83</b>	7,01	<b>46,68</b>	<b>55,33</b>	<b>48,09</b>	<b>47,85</b>
verbénone [80-57-9]	107(100),91(70),135(60),79(50),150(40), 67(20),122(10)	1204	traces	-	traces	traces	traces	traces

V30	eucarvone [1125-21-9]	107(100),150(70),109(45),66(44),91(40),135(35),122(15)	1220	traces	-	1,28	1,81	2,39	1,73
V31	2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-èn-1,4-dione [503-93-5]	84(100),126(69),168(50),56(48),153(40),125(38),140(35)	1231	traces	-	0,96	1,74	0,84	0,29
V32	2,6,6-triméthyl-3-oxo-1,4-cyclohexadienal [133399-09-6]	91(100),93(95),121(94),77(70),164(30),149(25),166(10)	1306	0,13	0,17	0,89	3,93	0,96	0,40
	acide $\beta$ -safranique [4430-99-3]								
V33	1318	147(100),148(90),119(50),91(45),77(44),105(30)	1318	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,17
V34	1321	116(100),172(45),118(40),88(30),53(25),144(20),157(5)	1321	0,00	-	0,15	0,26	0,26	0,20
V35	1355	153(100),111(70),107(55),43(53),91(30),125(25),79(20)	1355	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,45
V36	2,6,6-triméthyl-5-oxo-cyclohexa-1,3-diéanal [141891-13-6]	93(100),91(90),136(80),121(50),107(45),149(30),164(25)	1368	0,00	-	0,12	0,11	0,09	0,00
	5-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexa-1,4-diéanal [329323-90-2]	109(100),137(95),180(80),152(78),123(65),91(45),165(35)	1387	0,67	0,78	1,67	0,88	0,82	1,88
V37									
V38	caryophyllène [87-44-5]	93(100),133(98),79(95),105(50),120(40),161(20),185(10)	1426	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,14
V39	4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-1-éanal (HTCC) [35692-94-5]	107(100),135(95),91(70),121(68),168(30),150(20),153(18)	1426	1,00	1,37	0,09	0,06	0,04	0,23

<sup>a</sup>dénomination utilisée pour les traitements statistiques, variables Vn.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>pourcentage moyen.

<sup>d</sup>écart type sur les pourcentages.

Le nombre de variables (composés volatils, Vn) étant élevé (39, Tableau 12), une représentation en analyse en composante principale (ACP) permet une meilleure visualisation des résultats. La formation de groupe au sein des échantillons (différences entre safrans quercynois et étrangers) peut être mise en évidence ainsi que les corrélations existantes entre les variables. La réduction du nombre de variables est réalisée par l'expression de celles-ci sur de nouveaux axes, allant de la variance expliquée la plus importante sur les premiers axes à la plus faible sur les axes suivants. Cette analyse permet donc de représenter les composés volatils caractérisant un groupe d'individu (safrans) et de visualiser les différences entre safrans du Quercy et étrangers (Figure 19). Les axes PC1 et PC2 donnent 54% d'explication tandis que PC1 et PC3, 47%. La variance expliquée totale des trois axes est de 66%. Selon l'analyse de variance (ANOVA), deux variables ne sont pas significativement discriminantes ( $p > 0,05$ ), l'éthanol (V1) et le 2-méthylpent-1-ène (V4), Tableau 13.

L'axe PC1 discrimine les safrans du Quercy de ceux étrangers. Le safranal (V29) et l'eucarvone (V30) sont très proches de l'axe PC1 et sont anti-corrélés. Ces deux molécules permettent de dissocier les deux groupes d'échantillons, les safrans du Quercy étant riches en safranal, (76,8% en moyenne contre 49,5% (de 46,7% à 55,3%) pour les safrans étrangers), bien que leur teneur en HTCC reste très faible (de 0,04 à 0,23%), et ceux de provenance étrangères en eucarvone (1,8% en moyenne). Les safrans étrangers semblent plus riches en composés mineurs. L'acide 3-méthylbutanoïque est caractéristique des safrans espagnol, marocain et grec. Les axes PC2 et PC3 mettent en évidence les différences au sein des deux groupes d'échantillons. Le safran iranien est différent des trois autres safrans par ses teneurs

élevées en dihydroxophorone (V26, 6,3%) et en dihydro-2(3H)-furanone et 2(5H)-furanone (V12, 7,0%). Les safrans quercynois, discriminés selon PC3, montrent des teneurs en HTCC (V39) variables.

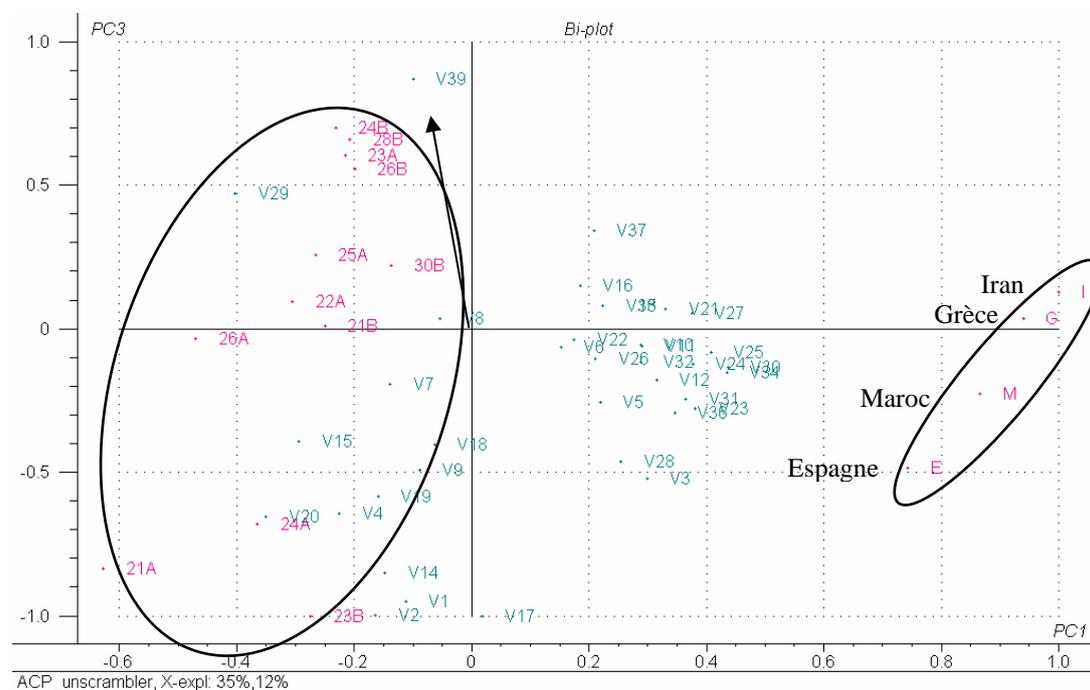
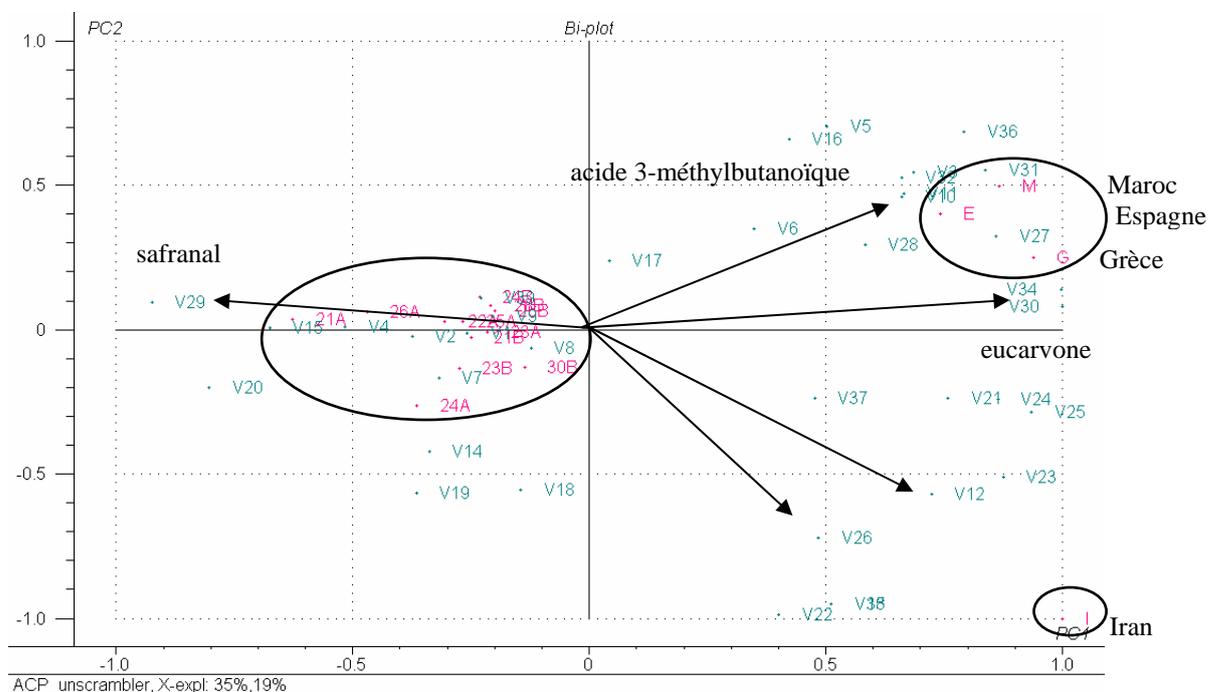


Figure 19. ACP des résultats donnés par l'analyse SPME/CPG-SM des safrans du Quercy et Etrangers (M : Maroc, G : Grèce, I : Iran et E : Espagne), réalisée avec 39 variables et 16 échantillons.

**Tableau 13. ANOVA sur les variables (composés volatils) à partir des 16 échantillons (Quercy et étrangers).**

Variables	Lambda	F-Statistic	Significance	Variables	Lambda	F-Statistic	Significance
V1	0,839	1,125	0,3465	V21	0,008	709,085	0,0000
V2	0,061	90,203	0,0000	V22	0,011	532,416	0,0000
V3	0,056	99,522	0,0000	V23	0,006	991,121	0,0000
V4	0,777	1,685	0,0687	V24	0,032	179,060	0,0000
V5	0,446	7,281	0,0000	V25	0,012	492,740	0,0000
V6	0,605	3,833	0,0000	V26	0,080	67,804	0,0000
V7	0,495	5,995	0,0000	V27	0,000	114724,857	0,0000
V8	0,720	2,278	0,0090	V28	0,001	6281,804	0,0000
V9	0,248	17,825	0,0000	V29	0,011	521,301	0,0000
V10	0,030	189,361	0,0000	V30	0,001	5748,912	0,0000
V11	0,153	32,477	0,0000	V31	0,042	134,326	0,0000
V12	0,327	12,086	0,0000	V32	0,531	5,175	0,0000
V13	0,308	13,169	0,0000	V33	0,360	10,439	0,0000
V14	0,245	18,073	0,0000	V34	0,074	73,735	0,0000
V15	0,517	5,473	0,0000	V35	0,030	187,212	0,0000
V16	0,525	5,306	0,0000	V36	0,037	154,716	0,0000
V17	0,693	2,596	0,0029	V37	0,168	29,019	0,0000
V18	0,302	13,563	0,0000	V38	0,024	243,215	0,0000
V19	0,219	20,966	0,0000	V39	0,230	19,615	0,0000
V20	0,238	18,835	0,0000				

Ces différences, et notamment la présence d'acides dans les safrans étrangers, pourraient être expliquées par les types de séchages employés selon les pays, (Berset et al., 1997). Le séchage des safrans grec et espagnol ne paraissent pas être adaptés puisqu'ils sont pauvres en composés volatils et en safranal, celui provenant d'Espagne étant également riche en acide acétique (sous-produit de la fermentation alcoolique, cf. II.2.4.3).

### **II.2.5. Conclusions**

L'étude des composés volatils présents dans l'headspace des safrans frais et sec permet de mettre en évidence la différence d'arôme du safran avant et après séchage, le linalool étant le composé majoritairement émis par le safran frais (59,1% extrait par HD) et le safranal par les stigmates secs (62,0 et 76,8 % par HD et SPME). Le linalool présent en faible quantité intrinsèque dans les stigmates frais (2% dans l'extrait issu du Likens-Nickerson), semble être relargué préférentiellement par la plante lorsqu'elle est vivante après émondage.

Le profil des composés volatils majoritairement extraits par SPME et par headspace dynamique est similaire. Cependant, comparativement à l'headspace dynamique, la SPME permet une meilleure caractérisation du safran sec puisqu'elle extrait un plus grand nombre de composés volatils et notamment des composés clefs dans la synthèse du safranal, tel que l'HTCC.

La fraction volatile des stigmates provenant du Quercy se démarque des safrans étrangers, par son haut taux de safranal (76,8% contre un maximum de 55,3%).

Bien que les profils des safrans quercynois soient semblables, une variation de la proportion des composés volatils a été observée au sein de ces échantillons, notamment l'HTCC, qui tend à augmenter avec le taux d'humidité des stigmates. La variation du taux d'humidité après séchage semble avoir un impact sur le pourcentage des composés volatils.

### **II.3. ETUDE DES MOLECULES DU SAFRAN DU QUERCY PRESENTANT UNE ACTIVITE ODORANTE PAR SPME/CPG-SM/ODP**

L'étude précédente a montré que les échantillons du Quercy possèdent un même profil de fractions volatiles, bien que des différences notables soient présentes sur certains composés. La connaissance des zones odorantes de l'headspace du safran permet, quant à elle, de déterminer un profil aromatique général des stigmates secs provenant du Quercy, mais également d'étudier les différences d'arôme entre échantillons. L'identification des molécules, présentes dans l'headspace du safran et ayant une activité odorante, a été réalisée par CPG-SM/ODP (Olfactory Detection Port, cf. V.2.6.3).

Huit échantillons, dont la fraction volatile est aromatiquement représentative de la production de safran de 2003, ont été sélectionnés par un juge entraîné pour cette étude. Treize juges (dont 3 de réserves) présents au sein de notre laboratoire se sont portés volontaires pour participer aux séances de CPG-ODP. La méthode choisie est la fréquence de détection (cf. Annexe I, 2.2) qui permet d'obtenir des aromagrammes par addition des détections de 10 juges.

Des descripteurs ont été attribués pour chaque zones odorantes parmi 15 pôles descriptifs définis en consensus par les juges : "beurrée", "piquant/âcre", "végétale", "animale", "grillée", "terreuse", "épicée", "florale", "fruitée", "agrumes/fraîche", "foin", "boisée", "douce", "pain cuit", "soufrée" et "indéterminée".

Lors de l'analyse, les juges ont utilisé le logiciel d'acquisition SNIF (SNIF software, Wageningen University) afin d'indiquer le début et la fin de la zone odorante ainsi que le pôle descriptif associé et l'ODP afin de marquer le chromatogramme dès que l'odeur apparaissait, l'identification des composés responsables de la zone odorante étant ainsi facilitée. Les modes opératoires ont été détaillés dans la partie expérimentale (V.2.6.3).

#### **II.3.1. Profils aromatiques**

L'analyse CPG-O des extraits générés par SPME, utilisant la méthode de fréquence de détection, a permis de mettre en évidence, à l'aide d'aromagrammes, 14 pics odorants dans la fraction volatile des safrans du Quercy (Figure 20 et Figure 21). Le safran 28B (Figure 21) est le plus riche avec 11 zones odorantes tandis que le 21A (Figure 20) est le plus pauvre avec seulement cinq pics détectés, au dessus du bruit de fond considéré ici en dessous de 2/10 réponses. Les pics 7, 9 et 10 ont été perçus dans tous les échantillons, les pics 9 et 10 étant les deux majoritaires, ainsi que les pics 2 et 8 exceptés dans l'échantillon 21A.

## Chapitre II : Caractérisation des métabolites secondaires et des composés volatils du safran du Quercy

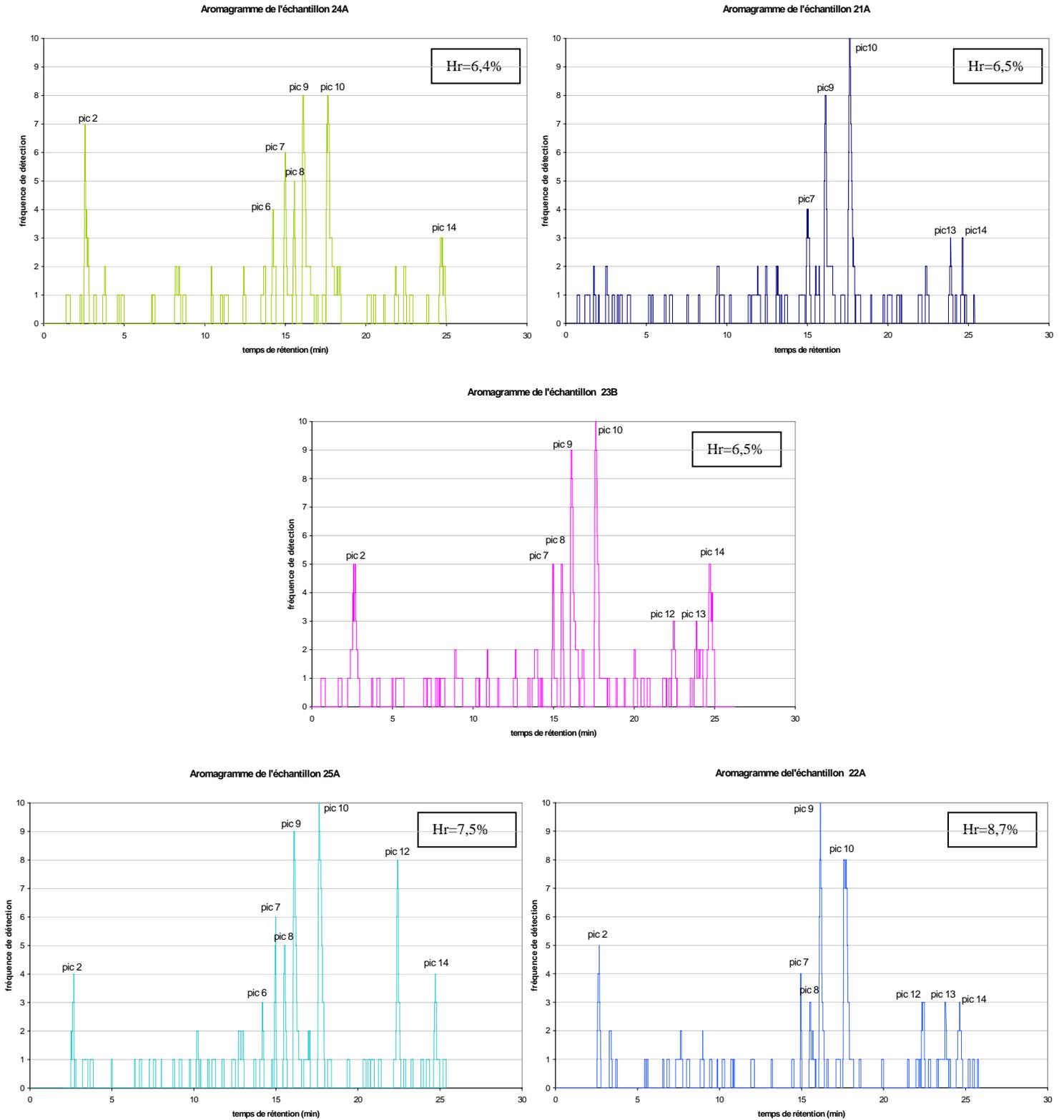


Figure 20. Aromagrammes des extraits SPME de safrans du Quercy représentatifs de la production de 2003 avec Hr < 12%, obtenus par CPG-SM/ODP.

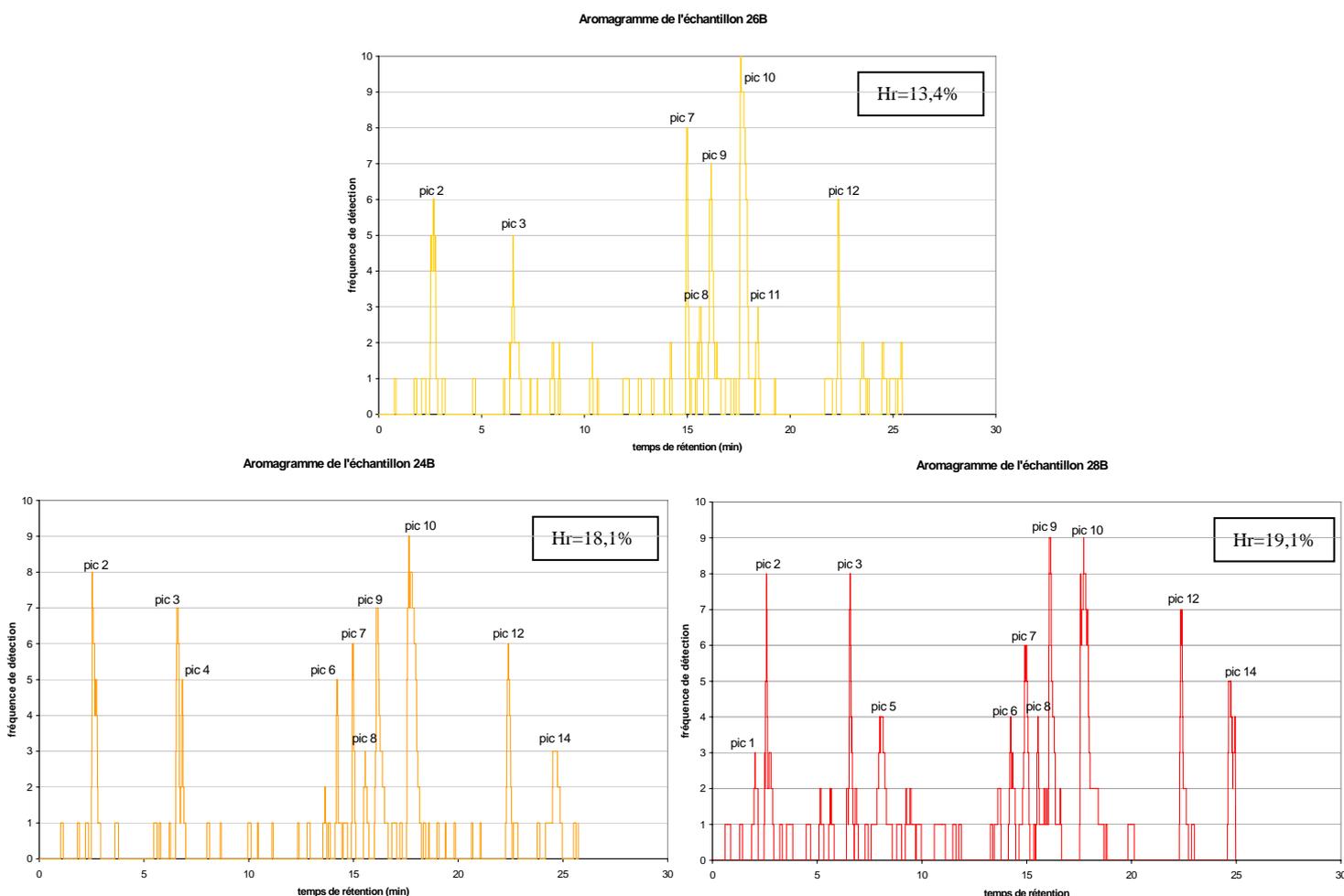


Figure 21. Aromagrammes des extraits SPME de safrans du Quercy représentatifs de la production de 2003 avec Hr > 12%, obtenus par CPG-SM/ODP.

### II.3.2. Identification des odeurs perçues

A chaque pic odorant, les juges ont associé un pôle descriptif parmi les 15 catégories décrites précédemment (cf. II.3). La fréquence d'attribution du descripteur pour un pic est indiquée dans le Tableau 14 (% à côté du descripteur). L'identification des composés volatils ayant une activité odorante a été étudiée par CPG-SM, le juge ayant marqué le chromatogramme par l'OID (Olfactory Intensity Device, cf. V.2.6.3.3.1) lorsqu'il détectait une odeur. Les pics 3, 4 et 11 sont en dessous du seuil de détection du CPG-SM. Néanmoins, ils ont un seuil de détection olfactif bas, (Devos, 1990), et ont pu être identifiés à l'aide des safrans étrangers riches en ces composés volatils par comparaison des indices de rétention analytique et olfactif (cf. II.2.4.4, Tableau 12) et des descripteurs donnés par la littérature. L'évaluation et la description d'une odeur varie en fonction de la concentration du composé :

le pic 9 a été décrit majoritairement comme ayant des notes "foin" et "épicée" à faible concentration et "foin" et "piquant/âcre" à concentration élevée.

Tableau 14. Résultats des analyses CPG-SM/ODP sur l'ensemble des fractions volatiles des safrans.

Pics	Descripteurs <sup>a</sup>	IR	Composés	Fréquence de détection <sup>b</sup>
1	Florale (67%), Epicée (33%)	506	Acétone*	3,7%
2	Grasse (68%)	601	Buta-2,3-dione	58,7%
	Piquant/âcre (26%)	621	Acide acétique	
3	Animale (59%)	843	Acide 3-méthylbutanoïque	25,0%
4	Fruitée (40%), Grillée (20%)	854	Acide 2-méthylbutanoïque*	6,2%
5	Grillée (20%), Epicée (20%)	912	2(5H)furanone*	5,0%
6	Agrume/fraîche (41%), Fruitée (24%)	1100	Linalool	20,0%
7	Florale (40%), Foin (28%)	1121	$\alpha$ -isophorone*	56,2%
8	Foin (55%)	1143	Cétoisophorone*	35,0%
<b>9</b>	<b>Foin (49%)</b>	<b>1156</b>	<b>Lanièrone</b>	<b>83,7%</b>
<b>10</b>	<b>Epicée (70%)</b>	<b>1199</b>	<b>Safranal</b>	<b>92,5%</b>
11	Florale (67%), Grillée (33%)	1221	Eucarvone*	3,7%
12	Foin (51%), Florale (31%)	1335	Non détecté (pas de signal)	41,2%
13	Douce (33%), indéterminée (33%)	1379	Non détecté (pas de signal)	11,2%
14	Foin (45%)	1379	Non détecté (pas de signal)	32,5%

<sup>a</sup>fréquence d'attribution du descripteur pour un pic  $\geq 20\%$  par l'ensemble des juges.

<sup>b</sup>fréquence de détection du pic sur l'ensemble des échantillons.

\*indique les composés dont l'activité odorante a été déterminée pour la première fois dans le safran.

15 composés présentent une activité odorante. Le safranal et le lanièrone, donnant respectivement des notes "foin" et "épicée", sont les deux composés majoritairement détectés (92,5 et 83,7%). Le lanièrone est présent en faible quantité dans l'extrait aromatique du safran comparativement au safranal (0,1% contre 76,7% en moyenne). Ce résultat confirme le fort pouvoir aromatique du lanièrone ( $\log_3$  (FD) = 5,5) mis en évidence par Cadwallader lors de son étude par AEDA, (Cadwallader et al., 1997). D'autres composés mineurs participent à l'arôme global du safran, tels que la buta-2,3-dione et l'acide acétique (58,7%) ainsi que l' $\alpha$ -isophorone (56,2%). Six nouveaux composés ont été détectés comme étant aromatiquement actifs (Tableau 14, \*). Une odeur "terreuse et de champignon cru", (IR = 978), a été détectée par un juge, correspondant au oct-1-èn-3-one d'après la littérature, (Cadwallader et al., 1997), mais n'a pas été retenue, son niveau de perception olfactif étant en-dessous du seuil de fréquence de détection déterminé sur les aromagrammes (signal/bruit de fond < 2/10 réponses).

### II.3.3. Empreinte aromatique du safran en fonction du taux d'humidité (Hr)

Les aromagrammes, illustrés Figure 20 et Figure 21 (cf. II.3.1), montrent que les échantillons les plus humides sont les plus riches en pics odorants (Hr < 12%, 7,2 pics en moyenne contre 9,7 pour Hr > 12%). Regroupés en deux classes Hr < 12% et Hr > 12%, les safrans donnent des profils sensoriels différents (Figure 22). Les deux notes majoritaires sont les mêmes "foin" (pic 9) et "épicé" (pic 10). Avec l'augmentation du taux d'humidité résiduelle dans les stigmates, la note "foin", donnée par le lanièrone tend à augmenter (de 77,7 à 88,0%) tandis que l'intensité de la note "épicée" donnée par le safranal diminue légèrement (de 93,3 à 92,0%). Les safrans humides possèdent des notes "grasse-piquante/âcre" et "animale" ayant une fréquence de détection élevée (73,3 et 66,7%, respectivement) et présentent une plus grande diversité aromatique avec la présence des notes "florale" (pics 1 et 11), "fruitée" (pic 4) et "grillée" (pic 5), non présentes dans les safrans secs.

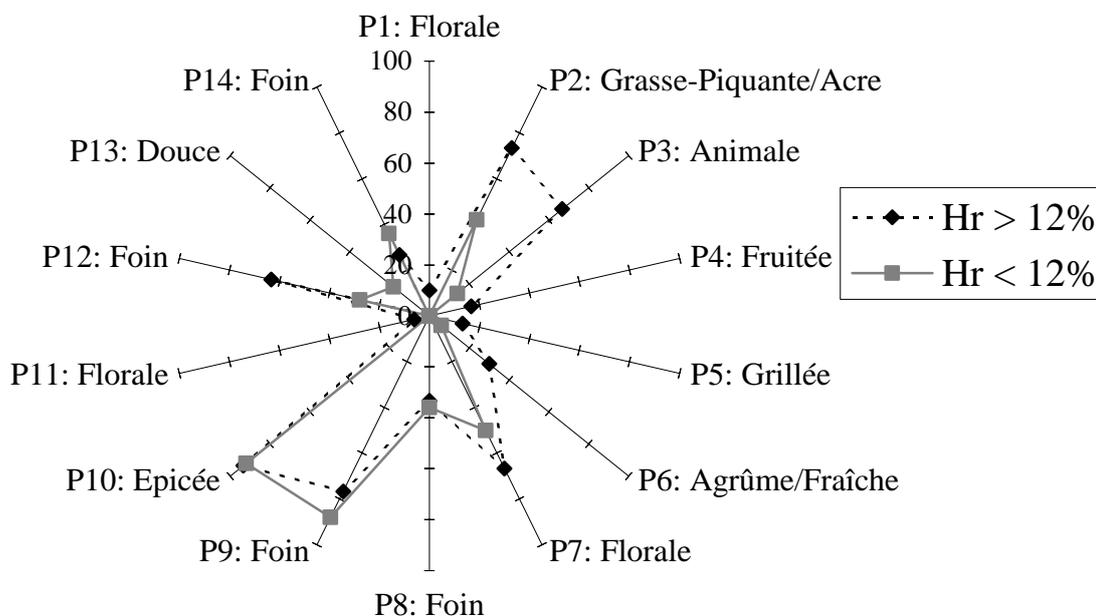


Figure 22. Profils sensoriels des 8 échantillons du Quercy regroupés selon Hr < 12% (21A, 22A, 24A, 25A et 23B) et Hr > 12% (24B, 26B et 28B). Pour chaque pic odorant le pourcentage indique la fréquence de détection parmi les échantillons : Hr < 12% et Hr > 12% et le descripteur associé le plus fréquemment attribué par les juges (Tableau 14).

La teneur en humidité résiduelle des safrans a un impact non négligeable sur la nature des molécules odorantes actives libérées. La présence des notes "fruité" et "animale", essentiellement données par l'acide 2-méthylbutanoïque et l'acide 3-méthylbutanoïque, résulterait de réactions d'oxydation et/ou d'hydrolyse au sein des stigmates en milieu humide, contrairement aux safrans espagnols pour lesquels, selon Cadwaller (Cadwallader et al.,

1997), la synthèse de cette dernière molécule proviendrait de réactions de Maillard. La note "piquante/âcre" est donnée par l'acide acétique, généré par fermentation alcoolique.

### **II.3.4. Conclusions**

Sur les 14 pics odorants détectés, les deux composés majoritaires mis en évidence dans l'arôme du safran sont le safranal et le lanièrone donnant respectivement des notes "épicée" et de "foin", les autres composés minoritaires participant activement à l'arôme global du safran.

Un séchage poussé produit un safran riche en note "épicée", le safranal étant généré au cours de la torrification, mais pauvre en autres notes aromatiques, tandis qu'un séchage plus doux donne des safrans plus riches en notes aromatiques ("grasse-piquante/âcre" et "animale"), générées par hydrolyse et/ou oxydation, mais potentiellement indésirable comme la note "animale", donnée par l'acide 3-méthylbutanoïque.

## **II.4. PROFIL SENSORIEL DU SAFRAN**

L'analyse des effluves par CPG-O du safran détermine les composés clefs de l'arôme de l'épice mais n'évalue pas sa perception aromatique globale. Une analyse sensorielle de type Descriptive Quantitative a été réalisée afin d'établir un profil de l'arôme du safran quercynois, résultant des effets synergiques entre les différentes molécules du mélange.

Onze échantillons du Quercy de la production de 2003 ont été utilisés pour cette étude (23B, 24B, 26B, 28B, 30B, 21A, 22A, 23A, 24A, 25A, 26A, cf. II.1, Tableau 1). Un échantillon étranger iranien commercial (Iran) a été introduit au moment de l'épreuve analytique uniquement afin d'évaluer la tendance aromatique, comparativement aux safrans du Quercy. Les juges, 11 membres du panel du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, huit femmes et trois hommes, n'avaient jamais été entraînés sur ce produit. Ils ont donc participé à quatre phases fondamentales nécessaires pour ce type d'analyse : la familiarisation, le développement du vocabulaire, l'entraînement et l'analyse réelle. L'échantillon iranien n'a pas été introduit lors de la phase du développement du vocabulaire. Tous les détails expérimentaux sont donnés dans la partie expérimentale (cf. V.2.7).

Le but de cette analyse est de connaître le profil sensoriel du safran, d'évaluer sa typicité et de reconnaître sa qualité. Les données sensorielles ont été corrélées au taux d'humidité déterminé selon la norme ISO/TS 3632.

### II.4.1. Analyse Sensorielle du safran du Quercy

Les descripteurs utilisés lors de l'analyse réelle étaient aux nombres de 13 (11 relatifs à l'odeur et deux à la couleur) et ont été définis comme suit par les juges :

Tableau 15. Définition des descripteurs de l'analyse sensorielle du safran du Quercy.

Descripteurs	Définition
Intensité globale	Intensité odorante des stigmates perçue juste après ouverture du flacon.
Epicé	Odeur de mélange d'épices regroupant les notes "poivrée", "vieille herbe de provence" et "camphrée".
Terreux	Odeur de serpillière humide, de terre humide et de sous-bois.
Renfermé	Odeur de cave et de poussière.
Grillé	Odeur de pain grillé ou de viande grillée.
Fumé	Odeur de cendre froide dans la cheminée.
Piquant	Acide acétique, vinaigre. Sensation physique de pénétration dans les cavités nasales. Odeur irritante.
Boisé	Odeur de planche, de bois fraîchement coupé, de menuiserie et d'encaustique.
Sucré	Odeur douce, de barbe à papa, de bonbons ou de miel.
Beurré	Odeur de gras, lourde et de beurre fondu.
Foin/Végétal/Herbe	Odeur d'herbe sèche fraîchement coupée (ni vert ni sec)
Rouge	-
Marron	-

#### II.4.1.1. Reproductibilité et justesse du panel

La cohérence du panel et les performances des juges ont été étudiées par traitement statistique et notamment par une ANOVA à deux facteurs : juges et safrans, avec interactions (Tableau 16).

Tableau 16. Etude de la cohérence du panel par une ANOVA à deux facteurs (juges et safrans) avec interactions.

	Intensité globale	Epicé	Terreux	Renfermé	Grillé	Fumé	Piquant	Boisé	Sucré	Beurré	Foin Herbe Végétal	Rouge	Marron
Probabilité du modèle	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Juges	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Produit	0,037	<0,0001	<b>0,300</b>	<0,0001	0,001	0,000	<0,0001	<0,0001	0,008	<0,0001	<b>0,321</b>	<0,0001	<0,0001
Répétition	0,151	0,090	0,844	0,370	0,731	0,128	0,817	0,505	0,255	0,152	1,000	0,048	0,048
Juges x Safrans	0,899	<b>0,020</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,220	0,780	<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	0,122	0,058	0,409	<b>0,007</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,008</b>

La probabilité du modèle est inférieure à 0,0001 pour tous les descripteurs. Les variables explicatives (les descripteurs) apportent une quantité d'information significative au modèle. Onze descripteurs sont significatifs et discriminent les produits : "intensité globale", "épicé", "renfermé", "grillé", "fumé", "piquant", "boisé", "sucré", "beurré", "rouge" et "marron". Tous les descripteurs ont un effet juge significatif. Les juges évaluent et notent alors différemment les produits ; ils utilisent l'échelle de notation de manière différente. En effet, l'intensité perçue pour un descripteur et un échantillon est souvent variable selon le

sujet. Néanmoins, l'effet répétition étant non significatif, les juges sont répétables sur les doublons, pour chaque descripteur. Ils sont donc fiables dans leur notation.

Un effet interaction juges x safrans est significatif pour les descripteurs suivants : "épicé", "terreux", "fumé", "piquant", "foin/herbe/végétal", "rouge" et "marron". Le panel n'est donc pas consensuel sur ces descripteurs. Pour les variables "épicé", "fumé", "piquant", "rouge" et "marron", l'effet produit étant très significatif, les juges utiliseraient l'échelle de notation différemment selon leur perception et leur sensibilité. Pour "terreux" et "foin/herbe/végétal", ces descripteurs étant non discriminants, les juges classeraient les produits dans un ordre différent. La compréhension du descripteur est alors remise en cause.

Le panel est donc répétable et cohérent. Les résultats obtenus lors de l'Analyse Descriptive Quantitative sont donc exploitables.

#### II.4.1.2. Profils sensoriels

Les résultats de l'analyse sensorielle sont présentés dans le Tableau 17.

*Tableau 17. Moyenne des scores obtenus pour chaque descripteur et chaque échantillon par l'ensemble des juges.*

Ech. <sup>a</sup>	Intensité globale	Epicé	Terreux	Renfermé	Grillé	Fumé	Piquant	Boisé	Sucré	Beurré	Foin		
											Herbe	Rouge	Marron
											Végétal		
Iran1	49	28	21	21	32	20	23	27	27	33	30	47	48
Iran2	51	30	30	29	34	19	22	33	28	23	41	54	42
23B1	51	30	25	17	36	18	25	27	38	37	41	68	24
23B2	49	33	32	16	34	14	17	27	28	38	36	71	25
24B1	57	51	28	21	23	29	34	35	24	17	35	54	43
24B2	54	53	22	26	24	22	30	34	24	18	29	53	39
26B1	63	54	30	26	24	31	33	42	31	23	41	58	38
26B2	52	39	38	29	24	29	25	41	25	21	36	57	35
28B1	48	49	25	32	23	29	27	33	18	14	36	25	74
28B2	55	49	33	30	23	21	33	41	24	20	35	26	68
30B1	41	34	32	19	24	21	14	30	27	34	30	73	23
20B2	47	29	28	17	37	19	19	24	38	44	32	71	23
21A1	47	39	25	16	25	21	20	27	29	35	33	73	21
21A2	46	31	26	16	43	17	13	26	31	26	33	77	20
22A1	42	34	35	19	43	17	16	25	29	32	34	69	26
22A2	50	31	28	12	44	19	18	23	32	40	41	71	28
23A1	55	38	27	14	41	17	21	27	36	36	34	71	26
23A2	48	41	28	20	29	20	25	29	32	31	39	64	32
24A1	55	41	25	19	36	22	28	39	26	22	33	56	43
24A2	59	48	37	21	27	22	32	40	25	28	35	63	34
25A1	55	39	34	33	33	13	25	35	31	25	43	71	29
25A2	55	35	31	25	35	18	29	31	32	29	41	71	21
26A1	48	23	31	18	31	15	26	25	33	34	38	72	26
26A2	54	26	27	19	34	15	15	30	37	40	40	70	26

<sup>a</sup>les chiffres 1 et 2 correspondent aux doublons effectués pour chaque échantillon.

Les profils sensoriels des safrans, obtenus et illustrés Figure 23, montrent que les deux descripteurs les plus intenses sont les couleurs, rouge (max. 72) et marron (max. 71), ceux décrivant l'odeur étant assez faibles (max. 57 pour l'"intensité globale", 52 pour "épicé", 42 pour "foin/herbe/végétal", 43 pour "grillé" et 41 pour "boisé").

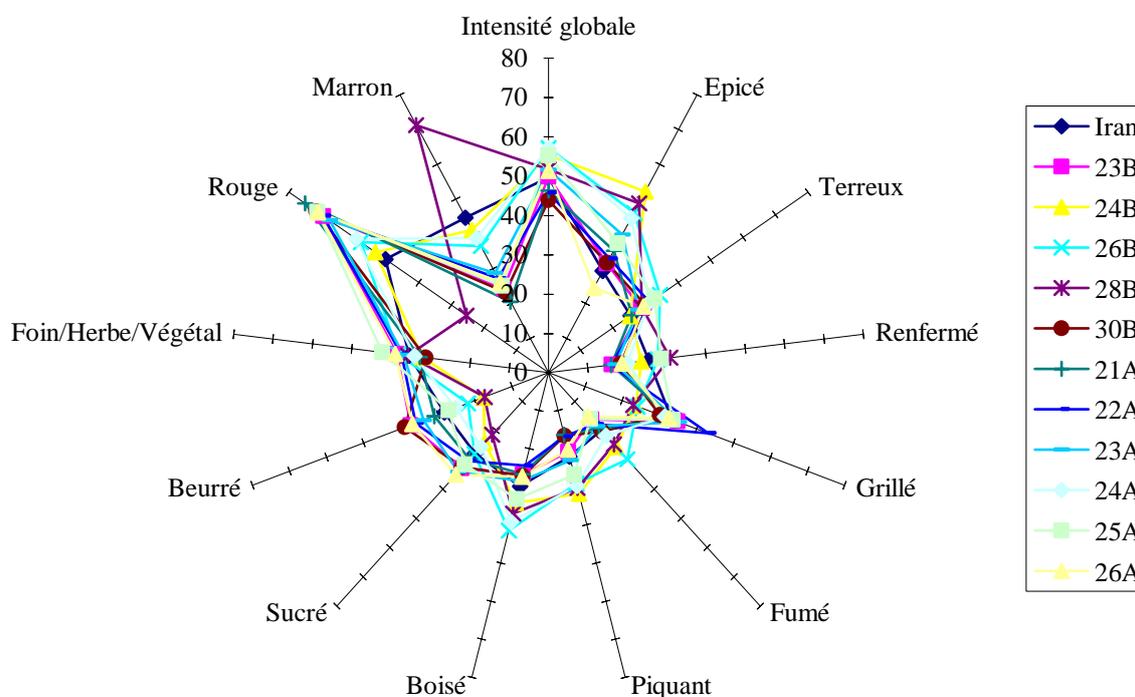


Figure 23. Profils sensoriels des 11 safrans du Quercy et du safran iranien.

Les descripteurs dont le coefficient de variation est supérieur à 20, "épicé", "renfermé", "fumé", "piquant", "beurré", "rouge" et "marron", expriment les variations entre échantillons.

Une ACP permet de représenter de manière plus explicite les échantillons et les variables (cf. Tableau 17) et de mettre en évidence les différences de profils entre échantillons. Les axes PC1 et PC2 permettent d'expliquer 67% de l'information tandis que l'axe PC4 seulement 8%, PC1 et PC4 étant significativement discriminants ( $p < 0,05$ ) vis à vis des 12 échantillons (Figure 24). Le cumul de la variance expliquée de PC1 à PC4 est de 84%. Une analyse de variance, ANOVA à un facteur (safran), sur les variables sensorielles a été réalisée afin de déterminer de façon précise les descripteurs ayant une influence significative sur la discrimination des produits. Le Tableau 18 montre que 8 descripteurs sont

discriminants ( $p < 0,05$ ) : "épicé", "renfermé", "fumé", "piquant", "boisé", "beurré", "rouge" et "marron".

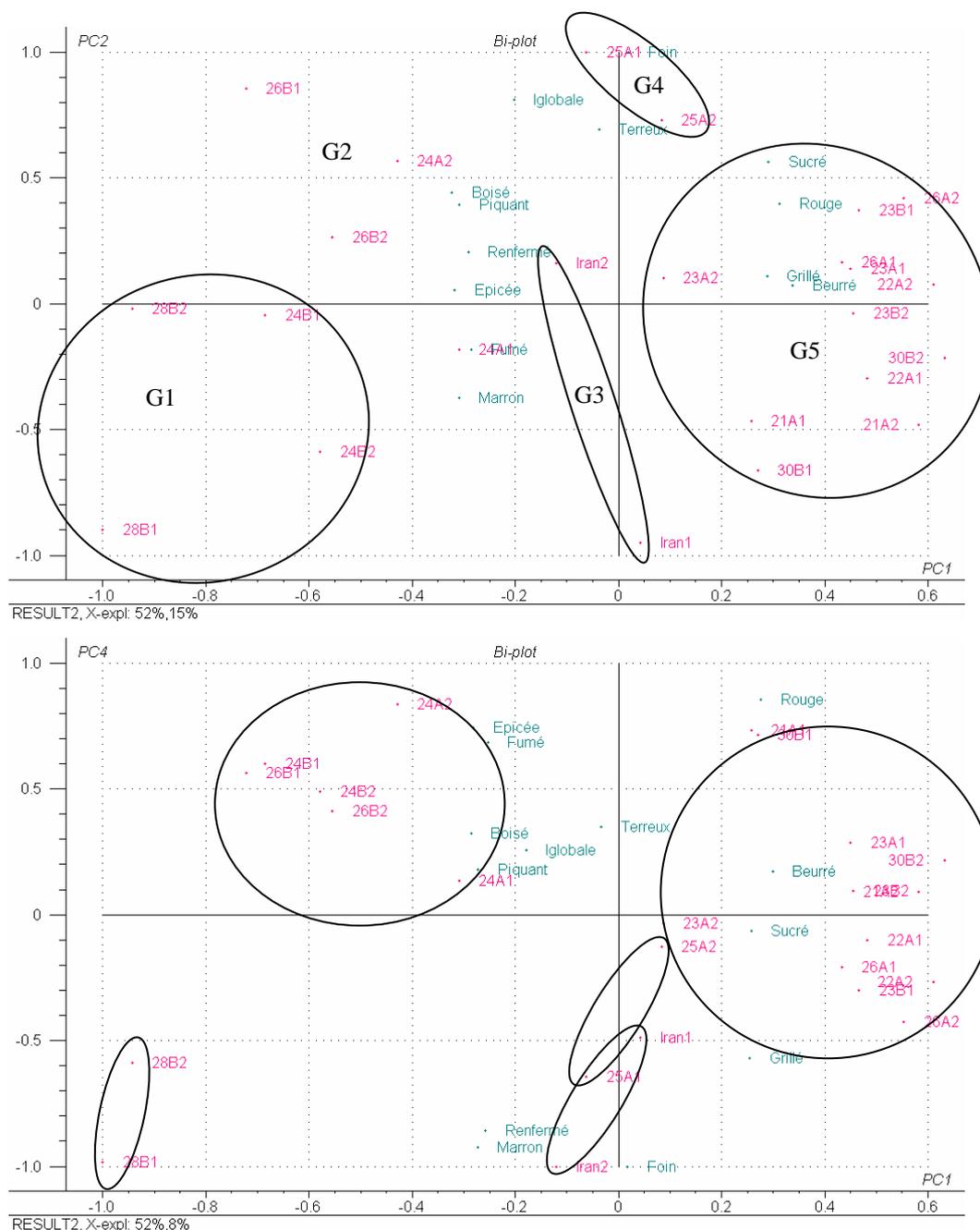


Figure 24. ACP des résultats donnés par l'Analyse sensorielle avec 13 variables et 12 échantillons ( $n=2$ ).

Quatre groupes, G1 : (28B, 24B), G2 : (26B, 24A), [G3 : (Iran) + G4 : (25A)] et G5 : (23A, 26A, 23B, 22A, 30B, 21A) sont discriminés selon l'axe PC1. L'axe PC2 discrimine les groupes G3 et G4. Le groupe 1 est caractérisé par l'odeur "fumé" et la couleur "marron", le groupe 2 par les notes "boisé", "piquant", "renfermé", "épicé" et le groupe 5 par "beurré", "grillé", "rouge" et "sucré". Les groupes 3 et 4 se situant près de l'origine des axes sont peu

expliqués par les descripteurs. Les entraînements du panel ayant été effectués sur des safrans du Quercy, les juges ont discriminé le safran iranien mais ne possédaient peut être pas le vocabulaire nécessaire à l'interprétation des différences par rapport aux safrans quercynois. Toutefois, son profil odorant semble se rapprocher du groupe 5, tout en ayant une couleur marron assez intense caractéristique des groupes 1 et 2.

**Tableau 18. ANOVA sur les variables sensorielles à partir des 11 échantillons du Quercy et du safran iranien.**

Variabes	Lambda	F-Statistic	Significance
Iglobale	0,3115	2,4108	0,0730
Epicé	0,1187	8,0977	0,0005
Terreux	0,5671	0,8326	0,6158
Renfermé	0,1621	5,6371	0,0029
Grillé	0,3420	2,0991	0,1092
Fumé	0,1821	4,8985	0,0054
Piquant	0,2246	3,7654	0,0156
Boisé	0,1275	7,4685	0,0008
Sucré	0,3039	2,4985	0,0654
Beurré	0,1671	5,4378	0,0034
Foin/Herbe/Végétal	0,3946	1,6734	0,1947
Rouge	0,0207	51,6082	0,0000
Marron	0,0302	34,9921	0,0000

La couleur ayant un poids important (Fstatistique, marron = 34 et Fstatistique, rouge = 51) par rapport aux descripteurs odorants, une ACP sans ces deux variables permet de confirmer les informations données sur les odeurs (Figure 25). PC1 et PC2 expriment 68% de l'information donnée par les variables explicatives. Seul PC1 est significativement discriminant ( $p < 0,05$ ) vis-à-vis des douze échantillons. Sans la couleur, les groupes 1 et 2 ne sont pas séparés, l'échantillon 28B étant discriminé essentiellement par sa couleur marron par rapport au groupe 2.

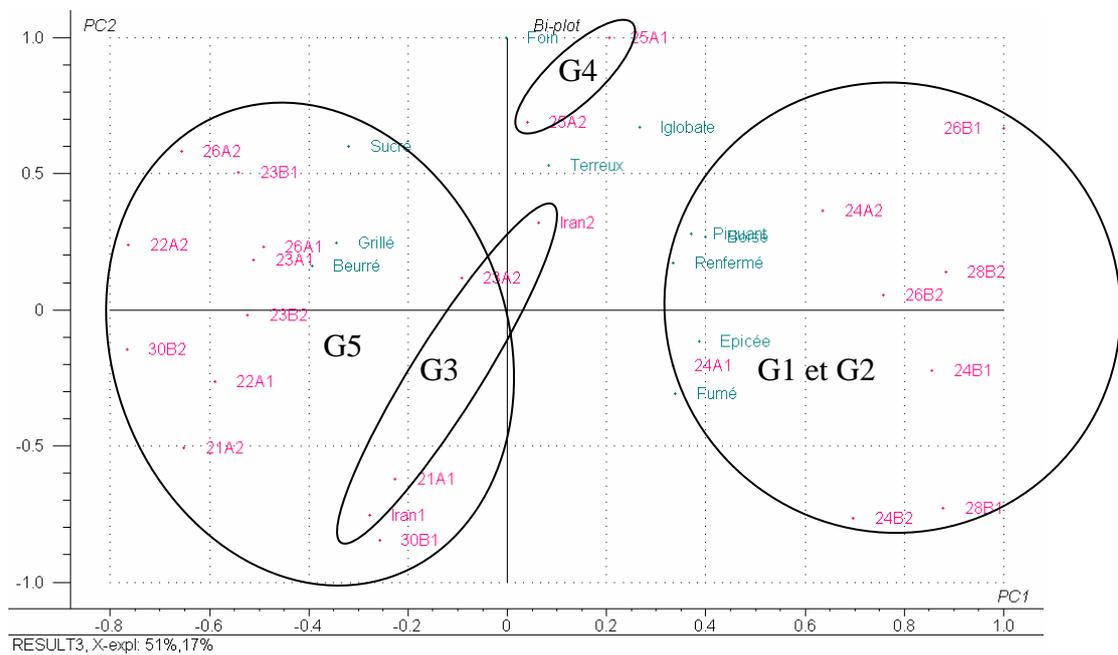


Figure 25. ACP des résultats de l'Analyse sensorielle réalisée sur les 11 variables odeurs et les 12 échantillons (n=2).

Dans l'ACP, représentée sur la Figure 26, seules les variables discriminantes sont prises en compte. Les axes PC1 et PC2 expriment une plus grande quantité d'informations, la variance expliquée cumulée est de 82%. Seul PC1 est significativement discriminant ( $p < 0,05$ ) pour les 12 échantillons. Les échantillons sont discriminés selon PC1 et sont divisés en deux groupes principaux, le groupe 1 et 2 dont les notes dominantes sont "boisé", "piquant" et "épicé" et le groupe 5 plutôt "beurré".

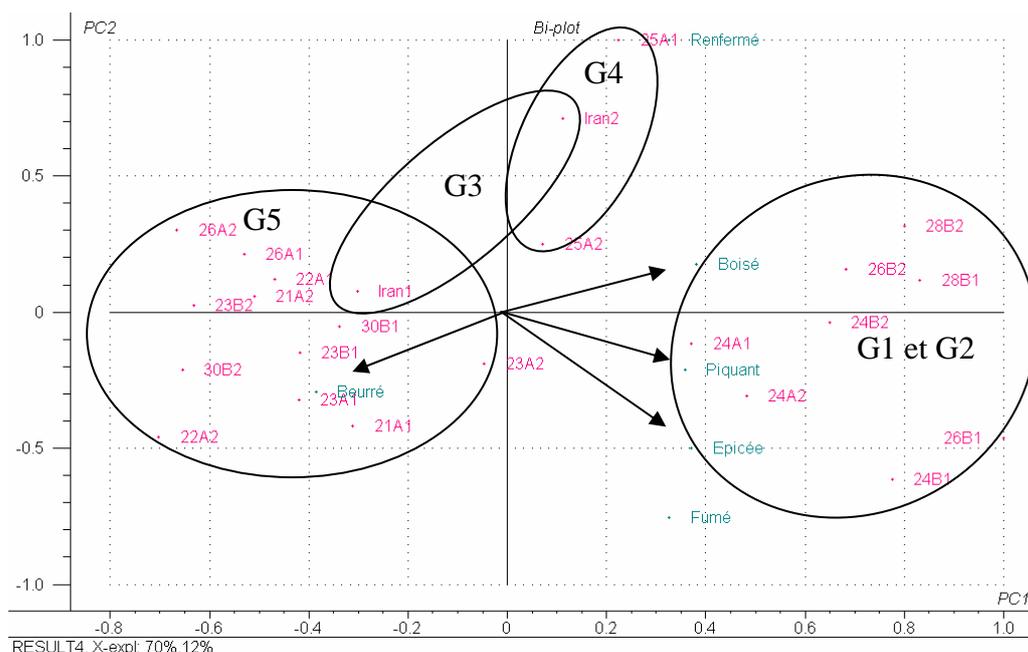


Figure 26. ACP des résultats de l'Analyse sensorielle réalisée sur les 6 variables odeurs discriminantes avec les 12 échantillons (n=2).

Le safran iranien est peu expliqué par les descripteurs d'odeurs définis par le panel. L'analyse de variance ANOVA sur les 11 échantillons du Quercy, fournit les mêmes descripteurs discriminants que celle réalisée sur les 12 échantillons (cf. Tableau 18). Aucune perte d'information n'est observée lorsque seuls les échantillons du Quercy sont pris en compte.

Les safrans du Quercy semblent répartis en deux groupes principaux dont la couleur et l'odeur sont très différentes : l'un est décrit comme "marron", "épicé", "piquant" et "boisé" et l'autre "rouge" et "beurré".

#### II.4.2. Influence du taux d'humidité sur le profil sensoriel du safran du Quercy

Les résultats de l'analyse sensorielle ont été regroupés et moyennés en fonction du taux d'humidité des échantillons de safran. Ils ont été classés en trois catégories, Hr < 12% (23B, 21A, 22A, 24A et 25A), Hr = 14% (26B) et Hr > 18% (24B et 28B) représentés sur la Figure 27. Un safran du Quercy dont la teneur en humidité est supérieure à 18% est plutôt "épicé", "renfermé", "fumé", "piquant", "boisé" et "marron", tandis qu'un safran dont Hr < 12% est décrit comme "grillé", "sucré", "beurré" et "rouge".

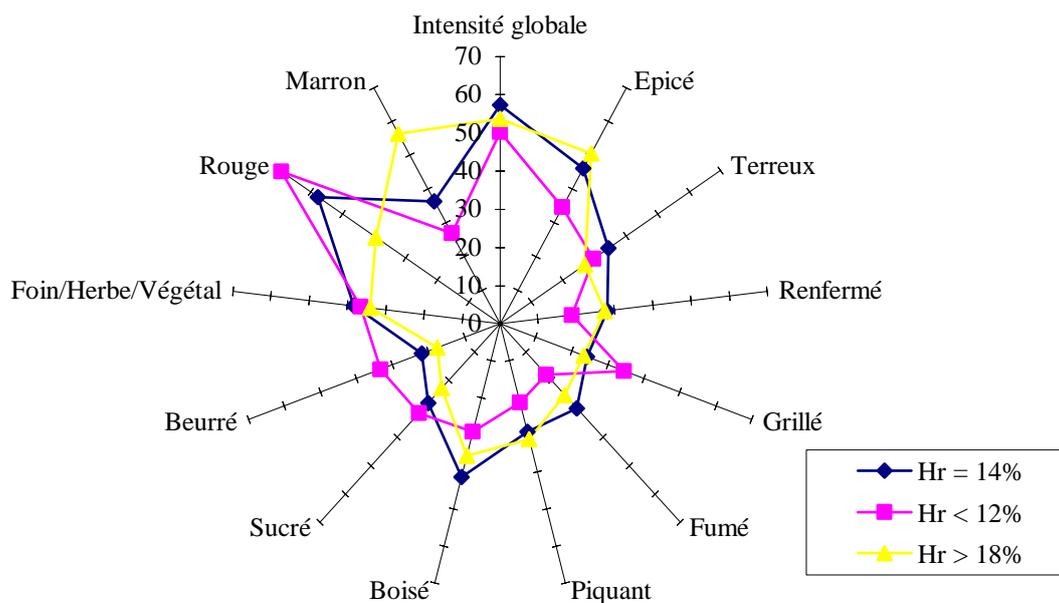


Figure 27. Profils sensoriels des safrans du Quercy pour Hr < 12%, Hr = 14% et Hr > 18%.

Le taux d'humidité a une influence sur la perception de l'odeur du safran. Il entraîne des dégradations de la couleur du rouge vers le marron dues à l'auto-oxydation de la crocine en crocétine incolore, (Alonso et al., 1993), et à l'activité enzymatique (type polyphénol oxydases) responsable du brunissement des tissus (les enzymes non dénaturées, le séchage ayant eu lieu à T°C < 60°C, cf. V.2.2), (Gregory et al., 2005). Il favorise également la formation de la note "épicé" intense due au safranal, produit par hydrolyse douce et enzymatique, (Tsimidou et Biliaderis, 1997) et induit des réactions d'oxydation, d'hydrolyse et/ou de fermentation générant des notes piquantes, pouvant provenir de l'acide acétique. Une note "âcre/âpre" a été également décrite dans la littérature par Narasimhan, (Narasimhan et al., 1992). Une torréfaction suffisante induirait des notes "grillé" et "beurré" pouvant provenir de réactions de Maillard.

### II.4.3. Conclusions

L'Analyse Descriptive Quantitative a permis de définir le profil sensoriel du safran du Quercy. Le traitement statistique de ces données a mis en évidence deux groupes d'échantillons au sein des safrans quercynois, ayant chacun des notes et une couleur caractéristiques. Ces variations pourraient être fonction de la torréfaction et de l'humidité résiduelle des stigmates qui dégradent des produits ou favorisent certaines réactions. Un séchage poussé pourrait induire des réactions de Maillard donnant les notes "beurré" et

"grillée" tandis qu'un séchage insuffisant donnerait par l'eau résiduelle des réactions d'hydrolyse, d'oxydation et/ou de fermentation pouvant être enzymatiques, induisant une dégradation de la crocine et un brunissement des tissus, la formation du safranal (note "épicé") et générant des acides donnant des notes "piquant" et "boisé".

## **II.5. CORRELATIONS DES DONNEES INSTRUMENTALES ET SENSORIELLES ET DISCUSSIONS**

La corrélation des données instrumentales et sensorielles permet de connaître l'existence de relations entre les résultats obtenus selon les techniques analytiques employées et d'expliquer l'influence des variables existantes.

Les données spectrophotométriques, analytiques, olfactives et sensorielles, exploitées sont celles des huit échantillons du Quercy ayant été caractérisés d'une part selon les critères de la norme puis par SPME/CPG-SM/ODP et enfin par analyse sensorielle. Il s'agit des safrans : 21A, 22A, 24A, 25A, 23B, 24B, 26B et 28B indiqués dans le Tableau 1 (cf. II.1). Pour l'ensemble des PLS, la moyenne des doublons a été réalisée.

### **II.5.1. Corrélation des données obtenues par SPME/CPG-SM/ODP et par analyse sensorielle avec les métabolites secondaires évalués selon la norme ISO/TS 3632**

#### **II.5.1.1. Composition de la fraction volatile et métabolites secondaires**

La relation entre les composés volatils extraits et analysés par SPME/CPG-SM/ODP (cf. Annexe II, Tableau 2 et 3) et les métabolites secondaires d'une part et le taux d'humidité d'autre part (cf. II.1) dont les valeurs ont été déterminées selon la norme (ISO/TS, 2003), cf. Annexe II, Tableau 1) a été étudiée en utilisant une analyse de régression PLS1.

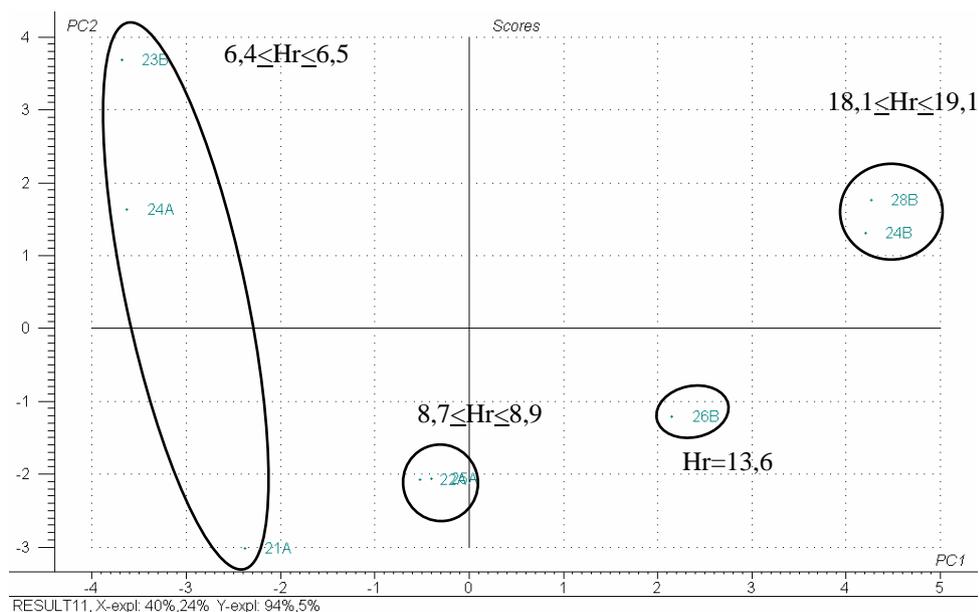
L'analyse de variance ANOVA sur les variables identifie trois composés non significativement discriminants ( $p > 0,05$ ) pour les 8 échantillons : l'éthanol (V1), le caryophyllène (V38) et un composé non-identifié (V8, IR = 774), (Tableau 19). Ces variables ne sont donc pas pris en compte dans les modèles de régression développés.

L'analyse de régression PLS1, illustrée Figure 28, permet de mettre en évidence les corrélations existantes entre les données analytiques (variables, cf. Annexe II, Tableau 2 et 3) et le taux d'humidité des échantillons (cf. Annexe II, Tableau 1).

Tableau 19. ANOVA sur les variables (composés volatils, V1-V39) à partir des huit échantillons du Query.

Variables	Lambda	F-Statistic	Significance	Variables	Lambda	F-Statistic	Significance
V1	0,883	1,361	0,2349	V19	0,747	3,481	0,0029
V2	0,680	4,839	0,0002	V20	0,364	17,949	0,0000
V3	0,176	48,294	0,0000	V21	0,347	19,357	0,0000
V4	0,824	2,191	0,0449	V22	0,029	344,002	0,0000
V5	0,537	8,874	0,0000	V23	0,022	466,634	0,0000
V6	0,697	4,475	0,0004	V24	0,579	7,480	0,0000
V7	0,528	9,191	0,0000	V25	0,763	3,200	0,0052
V8	0,895	1,209	0,3089	V26	0,167	51,157	0,0000
V9	0,246	31,524	0,0000	V27	0,438	13,186	0,0000
V12	0,620	6,306	0,0000	V28	0,741	3,590	0,0023
V14	0,252	30,604	0,0000	V29	0,187	44,864	0,0000
V15	0,654	5,444	0,0000	V32	0,553	8,323	0,0000
V16	0,725	3,911	0,0011	V37	0,338	20,151	0,0000
V17	0,804	2,508	0,0230	V38	0,845	1,891	0,0834
V18	0,591	7,111	0,0000	V39	0,246	31,468	0,0000

PC1 et PC2 expriment 64% de l'information des variables actives (composés volatils) et 99% et 5% de la variable illustrative "Hr", la variance résiduelle de ces deux axes étant de 0,11. Les échantillons sont discriminés selon PC1, axe corrélé avec le taux d'humidité. Les échantillons 24B et 28B, orientés selon le vecteur Hr, ont un taux d'humidité élevé ( $Hr \geq 18,1\%$ ) et les échantillons opposés à ce vecteur ont un taux d'humidité faible ( $Hr \leq 6,5\%$ ). Les données analytiques permettent de prédire avec succès le taux d'humidité des safrans (coef. de calib., 0,999 et coef. de valid., 0,987).



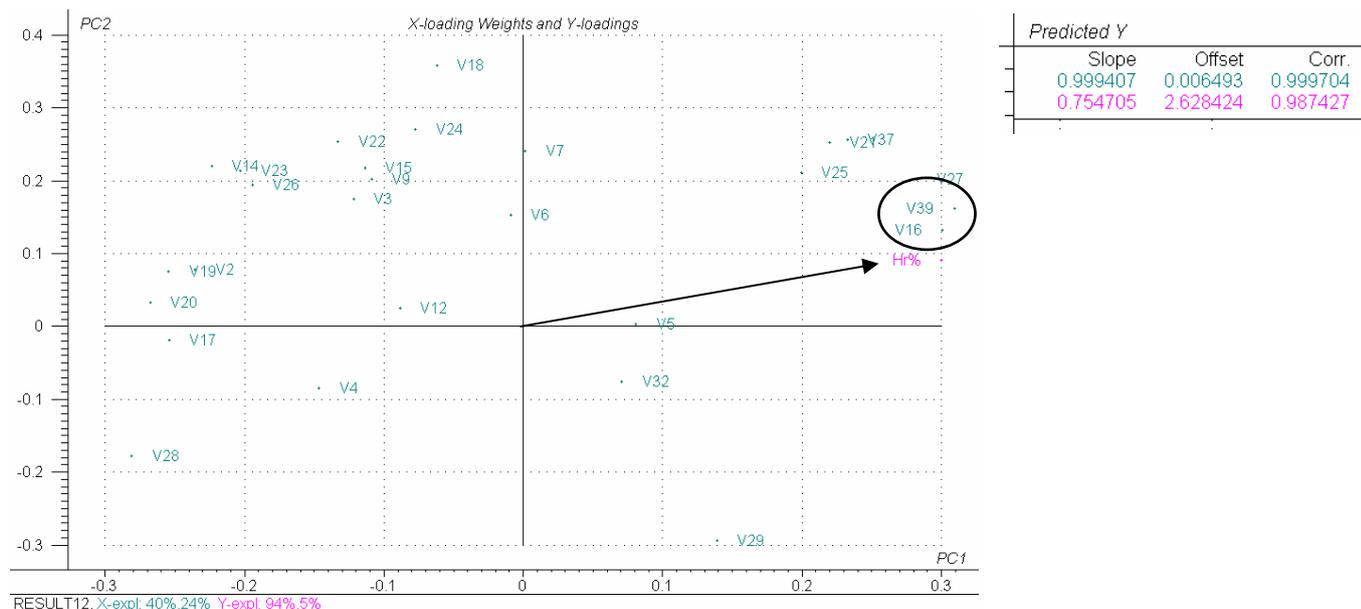


Figure 28. PLS1 illustrant les corrélations entre données analytiques et taux d'humidité pour les 8 échantillons du Quercy les plus représentatifs.

L'HTCC (V39) et un composé non-identifié (V16, IR = 1078) sont fortement corrélés au taux d'humidité. Ce traitement statistique confirme les observations réalisées sur les données brutes (cf. II.2.4.3), l'HTCC est présent en quantité plus importante dans les échantillons humides car il est synthétisé par hydrolyse douce enzymatique, (Rodel et Petrzika, 1991; Tsimidou et Biliaderis, 1997). Le pourcentage de ce composé, déterminé par SPME/CPG-SM, permet de prédire le taux d'humidité des échantillons.

L'analyse de régression PLS1, illustrée Figure 29, représente les données analytiques exprimées en fonction du taux de crocine déterminé selon la norme (ISO/TS, 2003), (cf. Annexe II, Tableau 1).

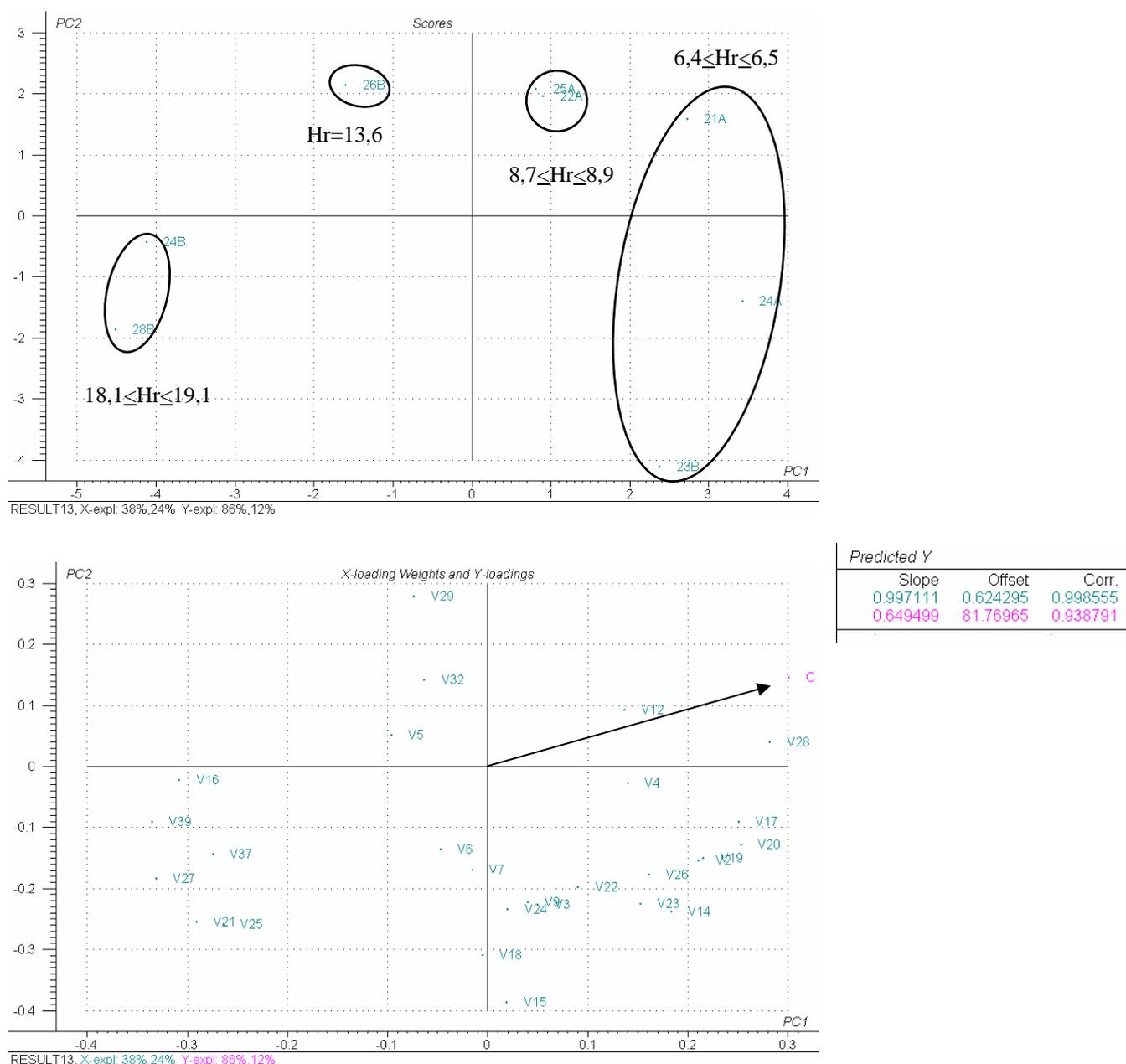


Figure 29. PLS1 illustrant les corrélations entre données analytiques et taux de crocine pour les 8 échantillons du Quercy les plus représentatifs.

PC1 et PC2 expliquent 62% de l'information des variables actives (composés volatils) et 98% de la variable illustrative "crocine (C)", la variance résiduelle étant de 0,23. Les échantillons comme précédemment sont discriminés selon l'axe PC1 en fonction de leur taux de crocine. Le vecteur crocine est corrélé à l'axe PC1. Les échantillons ayant un taux de crocine important ( $E^{1\%}_{1cm}C_{moyen} = 260$ ) sont dirigés selon le vecteur C et possèdent un faible taux d'humidité (Hr moyen = 6,4%). A l'inverse, les échantillons pauvres en crocine ( $E^{1\%}_{1cm}C_{moyen} = 107$ ) sont orientés dans le sens inverse du vecteur et sont humides (Hr moyen = 18,6%). Cette représentation confirme les observations réalisées sur les données brutes (cf.

II.1.6) : la crocine s'auto-oxyde et s'hydrolyse lorsqu'elle se trouve en milieu humide. Les données analytiques SPME/CPG-SM permettent de prédire le taux de crocine (coef. de calib., 0,998 et coef. de valid. 0,939).

Les données analytiques SPME/CPG-SM permettent de prédire de manière significative les taux d'humidité et de crocine, ces deux variables illustratives étant anti-corrélées. La variation du taux d'humidité entraîne des modifications chimiques importantes au sein de la fraction volatile émise par les stigmates, notamment la formation d'HTCC, et entraîne la dégradation de la crocine en crocétine.

### **II.5.1.2. Données olfactives SPME/CPG-O et métabolites secondaires**

Suite à l'étude précédente qui révèle une composition de la fraction volatile différente selon le taux d'humidité des safrans, l'analyse des données CPG-O permettrait d'évaluer l'impact de la teneur en humidité sur les composés ayant une activité odorante et l'existence de différences aromatiques entre échantillons.

L'analyse de régression PLS1 illustrée Figure 30, permet de représenter sur un même graphique les données olfactives, (cf. Annexe II, Tableau 4), et la teneur en humidité (cf. Annexe II, Tableau 1). PC1 et PC2 fournissent 46% de l'information pour les données olfactives et 97% pour la variable illustrative "Hr", la variance résiduelle étant de 0,56. Les échantillons sont discriminés selon PC1 et selon leur taux d'humidité. Hr est corrélé aux données olfactives (coef. de calib., 0,942) et notamment à la variable, P3, donnant une note "animale" provenant de l'acide 3-méthylbutanoïque. Ce traitement statistique confirme les conclusions obtenues sur les données olfactives brutes (cf. II.3.4), mais ne permet pas de prédire le taux d'humidité des safrans. Lorsque les échantillons sont humides, l'acide 3-méthylbutanoïque est présent en quantité plus importante non quantifiable par CPG-SM (son seuil de détection étant trop faible) mais perceptible en CPG-O (pouvoir olfactif massique - logarithme négatif de la concentration massique - 7,98, (Devos, 1990)). Selon Cadwallader, (Cadwallader et al., 1997), cette molécule proviendrait de réactions de Maillard. Aux vues des résultats précédents, elle pourrait résulter de réactions d'oxydation et/ou d'hydrolyse au sein des stigmates. Un taux d'humidité important génère des molécules olfactives potentiellement indésirables.

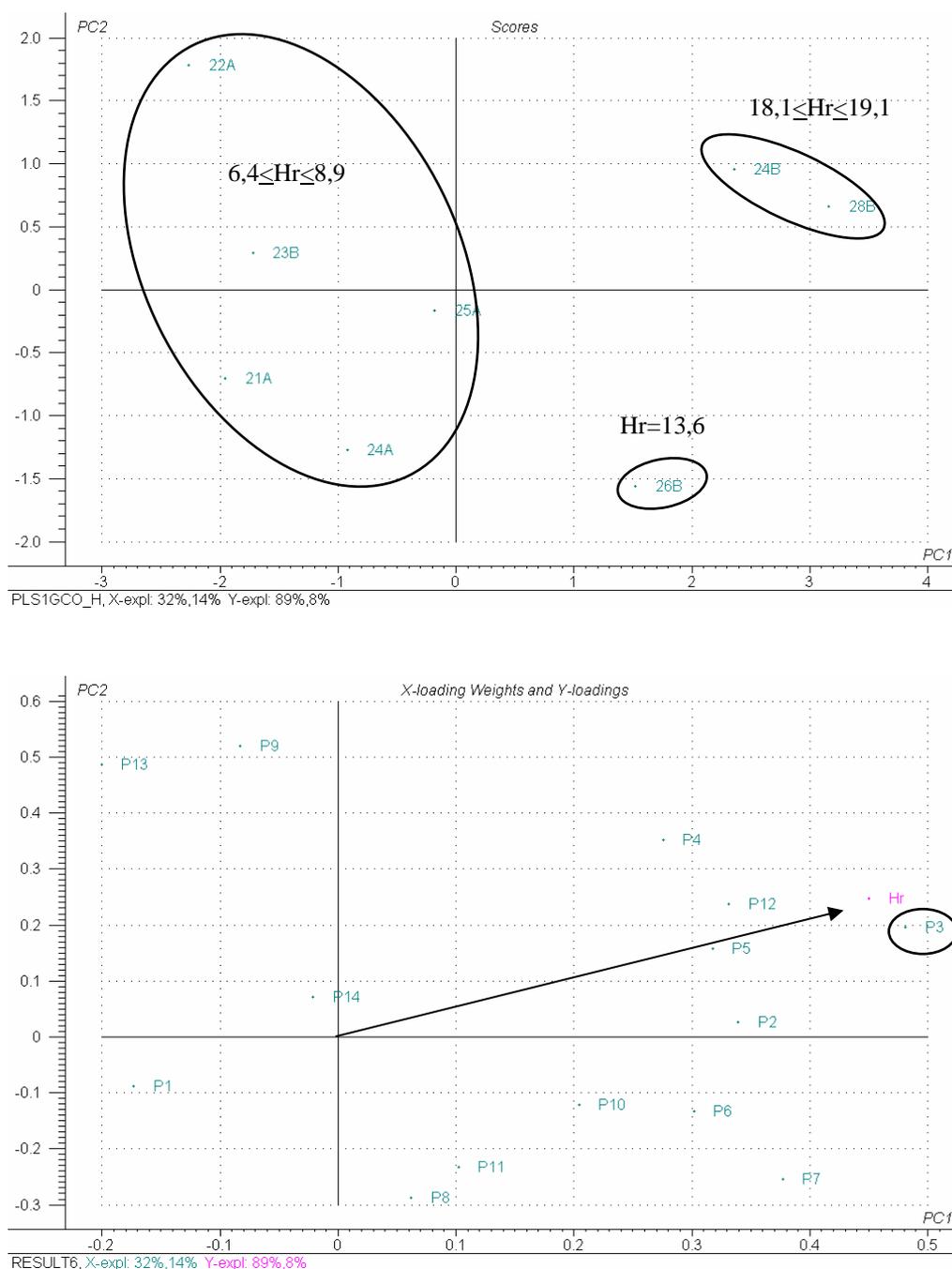


Figure 30. PLS1 illustrant les corrélations entre données olfactives et taux d'humidité pour les 8 échantillons du Quercy les plus représentatifs.

### II.5.1.3. Données sensorielles et métabolites secondaires

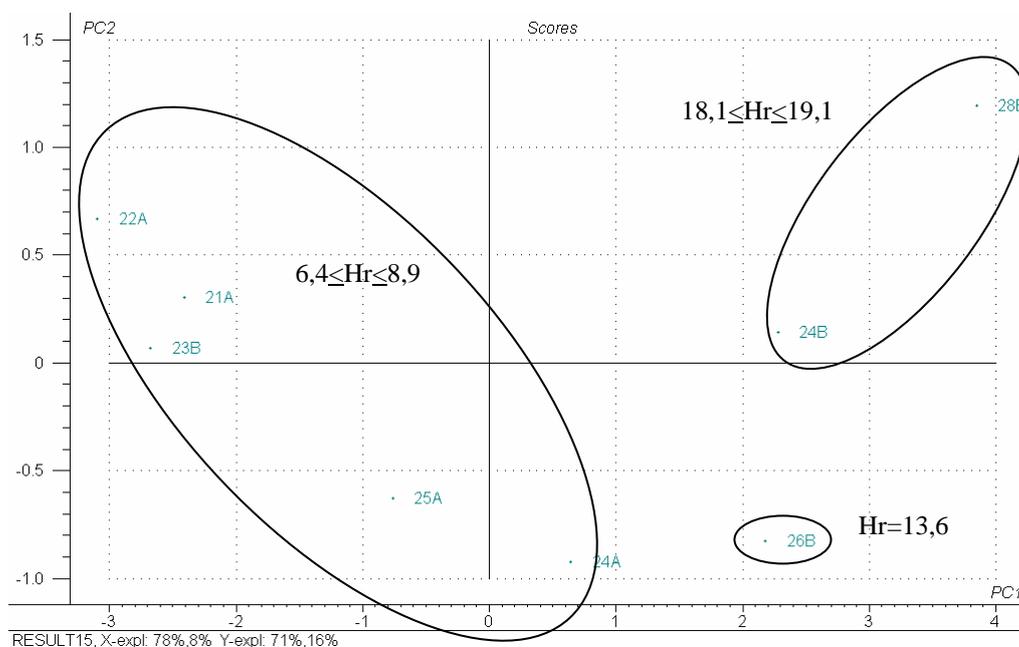
L'étude précédente a montré que le taux d'humidité avait une influence sur les composés odorants présents dans le safran. Les relations entre les données de l'Analyse sensorielle (cf. II.4.1.2, Tableau 17) et les teneurs en eau et en crocine du safran (cf. Annexe II, Tableau 1) ont alors été étudiées afin d'évaluer l'impact de l'eau résiduelle sur l'arôme global et la couleur du safran. Seules les variables significativement discriminantes pour les

huit échantillons ( $p < 0,05$ ), et déterminés par l'analyse de variance ANOVA, ont été utilisées pour les analyses de régression : "épicé", "renfermé", "grillé", "fumé", "piquant", "boisé", "beurré", "rouge" et "marron" (Tableau 20).

Tableau 20. ANOVA sur les variables sensorielles à partir des huit échantillons du Quercy.

Variabes	Lambda	F-Statistic	Significance
Iglobale	0,3071	2,5787	0,1040
Epicé	0,1799	5,2087	0,0167
Terreux	0,5606	0,8958	0,5512
Renfermé	0,1262	7,9155	0,0046
Grillé	0,2395	3,6285	0,0456
Fumé	0,2033	4,4786	0,0258
Piquant	0,1891	4,8996	0,0200
Boisé	0,0826	12,6891	0,0009
Sucré	0,3005	2,6605	0,0970
Beurré	0,1264	7,8987	0,0046
Foin/Herbe/Végétal	0,3214	2,4135	0,1202
Rouge	0,0108	104,8530	0,0000
Marron	0,0268	41,4586	0,0000

L'analyse de régression PLS1 illustrée par la Figure 31, représente les données sensorielles et le taux d'humidité des safrans évaluées selon la norme, (ISO/TS, 2003).



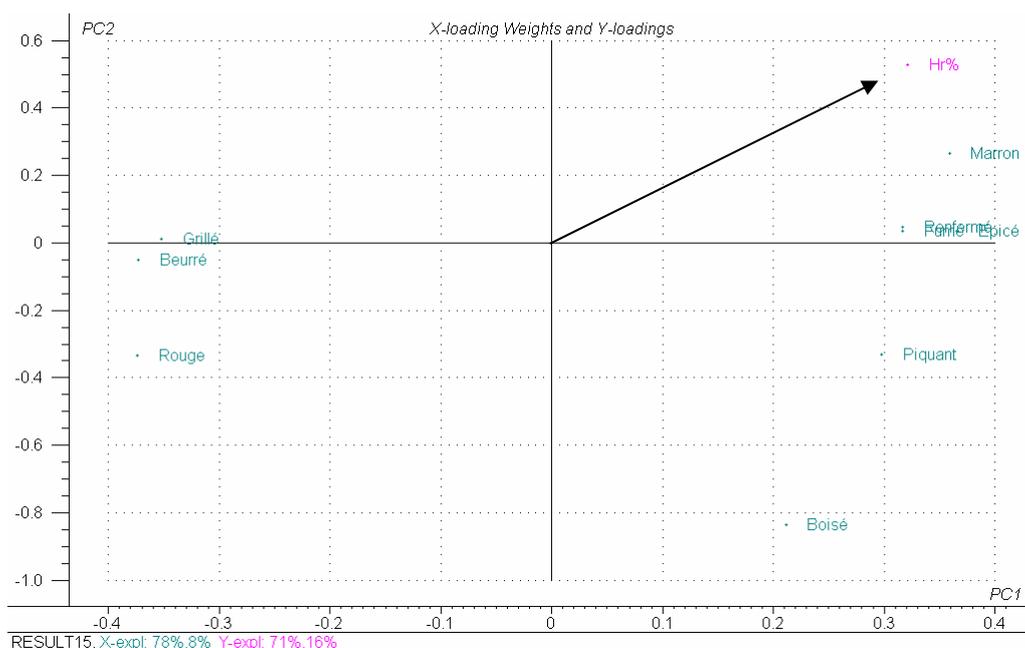


Figure 31. PLS1 illustrant les corrélations entre données sensorielles et taux d'humidité pour les 8 échantillons du Quercy les plus représentatifs.

PC1 et PC2 expliquent 86% de l'information donnée par les descripteurs et 87% de celle de la variable illustrative "Hr", la variance résiduelle étant de 0,40 sur PC2. Les safrans sont discriminés selon PC1 en fonction de leur taux d'humidité.

Les données sensorielles sont corrélées au taux d'humidité (coef. de calib., 0,932). Le modèle ne permet pas de prédire le taux d'humidité des safrans. Néanmoins, ce graphique montre que les échantillons secs sont d'aspect "rouge" et ont une odeur "grillé" et "beurré" tandis que les échantillons moins séchés sont "marron", "renfermé", "fumé" et "épicé", ce qui avait été constaté sur les données brutes (cf. II.4.2).

L'analyse de régression PLS1 illustrée par la Figure 32, représente les données sensorielles (couleurs et odeurs du safran) en fonction du taux de crocine, évalué selon la norme (ISO/TS, 2003). PC1 et PC2 montrent 87% de l'information pour les données sensorielles et 89% pour la variable illustrative "Crocine (C)", la variance résiduelle étant de 0,39. Les données sensorielles sont corrélées au taux de crocine (coef. de calib., 0,941), le vecteur crocine étant proche et dans la même direction que le descripteur "rouge" et opposé au vecteur "marron". Cependant, le modèle ne permet pas de prédire le taux de crocine. Les échantillons, comme précédemment, sont globalement discriminés selon le taux d'humidité et selon leur teneur en crocine, les échantillons les plus secs ( $Hr \leq 8,9\%$ ) étant les plus "rouge" et ayant un taux de crocine élevé ( $E^{1\%}_{1cm}C_{moyen} = 261$ ).

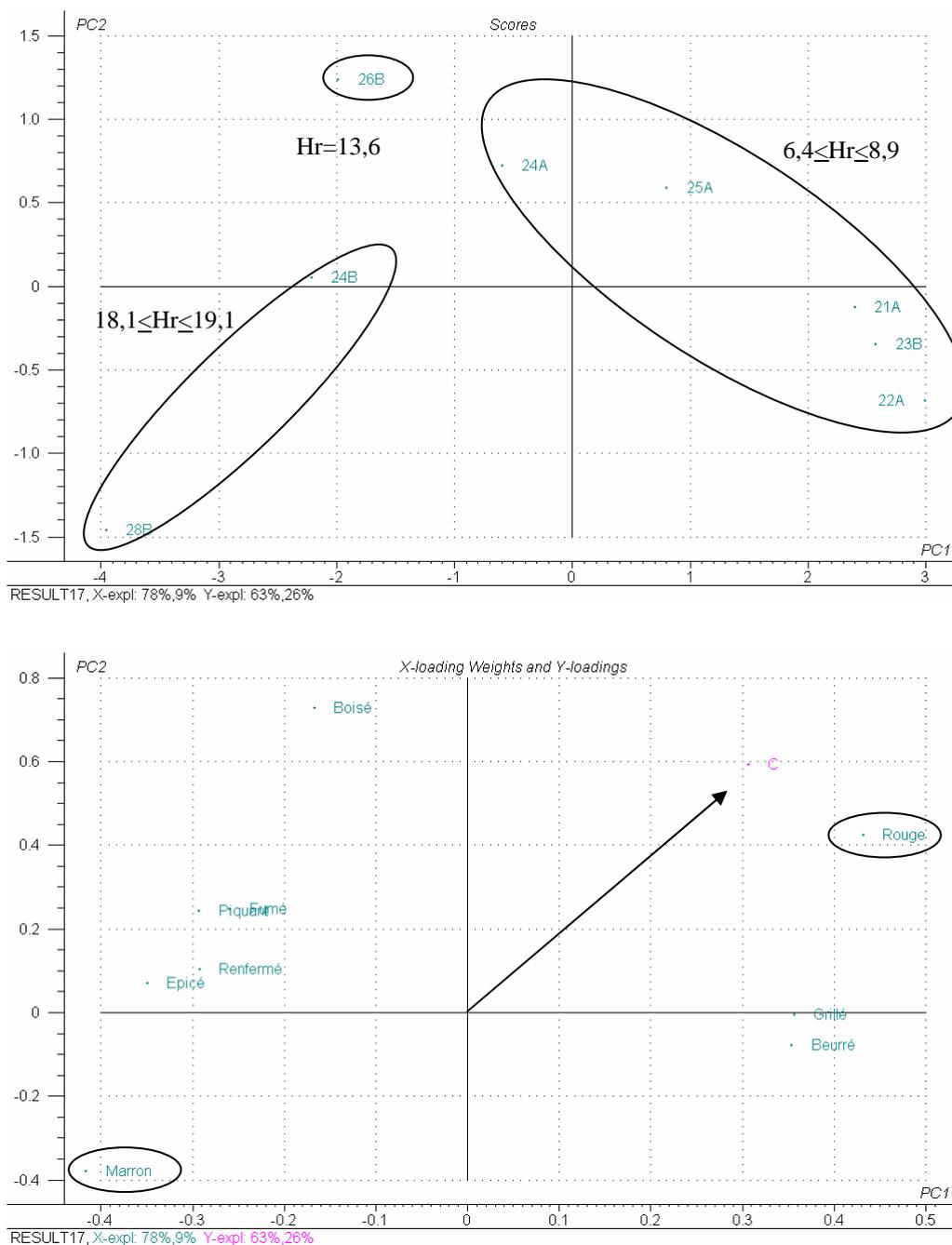


Figure 32. PLS1 illustrant les corrélations entre données sensorielles et taux de crocine pour les 8 échantillons du Quercy les plus représentatifs.

Les profils sensoriels sont différents pour les safrans, les plus humides étant plutôt "marron" et ayant des notes "épicé" et "piquant", les plus secs étant "rouge", "beurré" et "grillé". A différents taux d'humidité, les juges observent les différences visuelles et olfactives, provenant de réactions au sein des stigmates en milieu humide ou au contraire lors de la torréfaction.

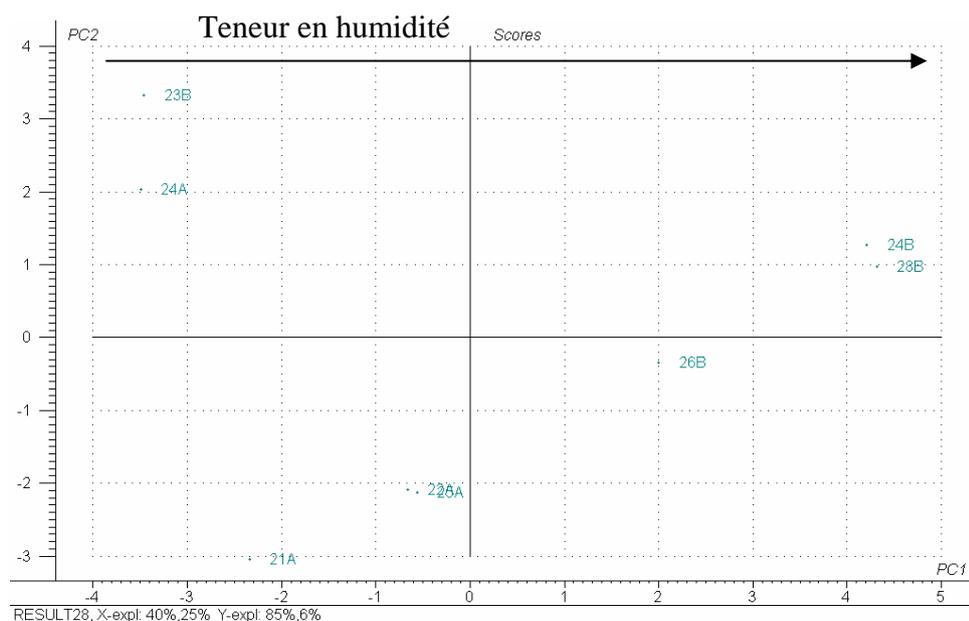
#### II.5.1.4. Conclusions

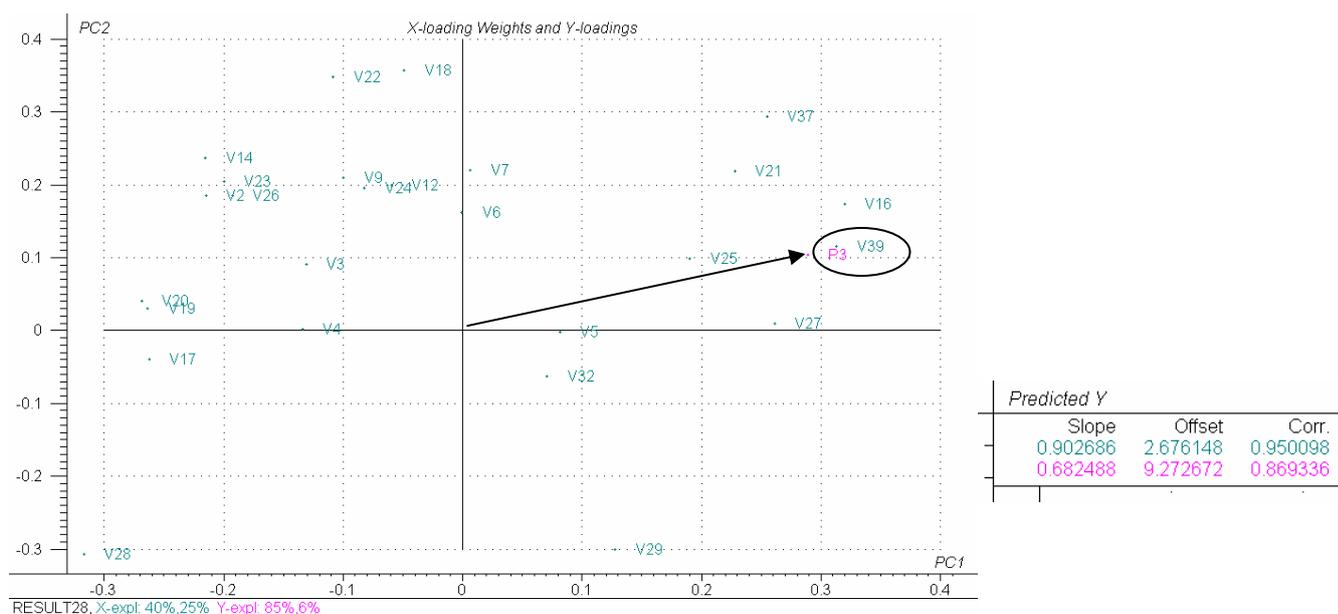
La fraction volatile, les composés odorants et le profil sensoriel (couleurs et odeurs) du safran sont fortement corrélés au taux d'humidité, le taux de crocine étant lui-même relié au taux d'humidité. Les pourcentages des composés volatils et notamment l'HTCC, permettent de prédire de manière significative la teneur en humidité et en crocine des safrans. L'étude suivante permet de déterminer s'il existe une corrélation entre ces différents résultats.

### II.5.2. Corrélation des données analytiques, olfactives et sensorielles

#### II.5.2.1. Composition de la fraction volatile et données olfactives

L'analyse de régression PLS2 permet de représenter les données analytiques (cf. Annexe II, Tableau 2 et 3) et olfactives (CPG-O, cf. Annexe II, Tableau 4). Le pic 3 (P3) est la variable la plus corrélée à ces données. L'analyse de régression PLS1 illustrée par la Figure 33, met en évidence cette inter-dépendance. Les axes PC1 et PC2 expliquent 65% des variables et 91% de la variable illustrative "P3". Les échantillons sont discriminés selon l'axe PC1 en fonction de leur taux d'humidité et de l'intensité du pic 3, celui-ci étant très proche de l'axe PC1. Il existe une bonne corrélation entre les données analytiques et la variable, P3 (coef. de calib., 0,950, coef. de valid., 0,869) notamment par la teneur en composé V39, l'HTCC. La teneur en HTCC serait un bon indicateur de l'apparition du pic 3 donnant la note "animale" potentiellement indésirable, générée par l'acide 3-méthylbutanoïque.





**Figure 33.** PLS1 illustrant les corrélations entre les variables discriminantes des données analytiques (cf. II.5.1.1, Tableau 19) et celle illustrative (P3) provenant des données olfactives sur les 8 échantillons du Quercy les plus représentatifs.

### II.5.2.2. Composition de la fraction volatile et données sensorielles

L'analyse de régression PLS2 permet de mettre en évidence les corrélations existantes entre les données analytiques (cf. Annexe II, Tableau 2 et 3) ainsi que celles de l'analyse sensorielle (cf. II.4.1.2, Tableau 17). La Figure 34 représente les composés volatils discriminant ( $p < 0,05$ , cf. II.5.1.1, Tableau 19) et les deux variables illustratives les plus corrélées à ces données "beurré" (coef. de calib., 0,982) et "épicé" (coef. de calib., 0,994). Les axes PC1 et PC2 expriment 57% de l'information des données et 92% des deux variables illustratives. La note "beurré" semble être caractéristique des safrans secs tandis que la note "épicé" est plutôt présente dans les safrans les plus humides. Cependant, les composés proches et dirigés dans la même direction que les variables illustratives, n'ayant a priori aucune activité odorante, ne permettent pas d'expliquer ces deux notes. S'il existe une bonne corrélation des données analytiques avec les notes "épicée" et "beurrée", le modèle n'est pas validé pour prédire l'intensité de ces deux descripteurs.

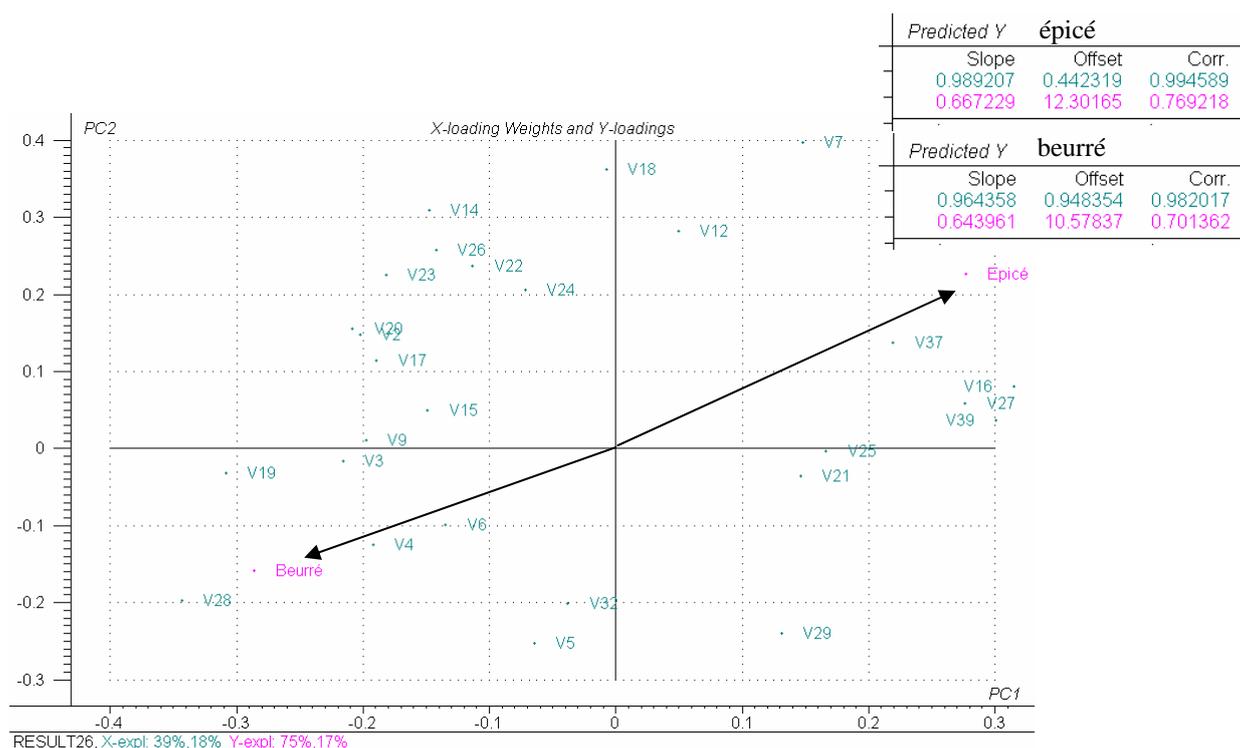
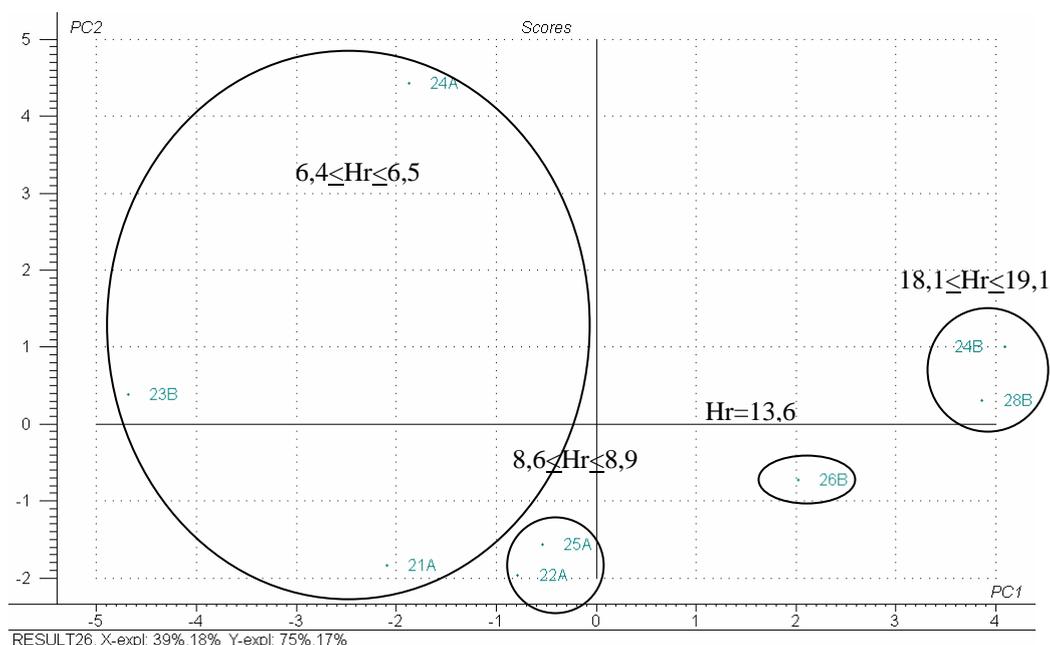
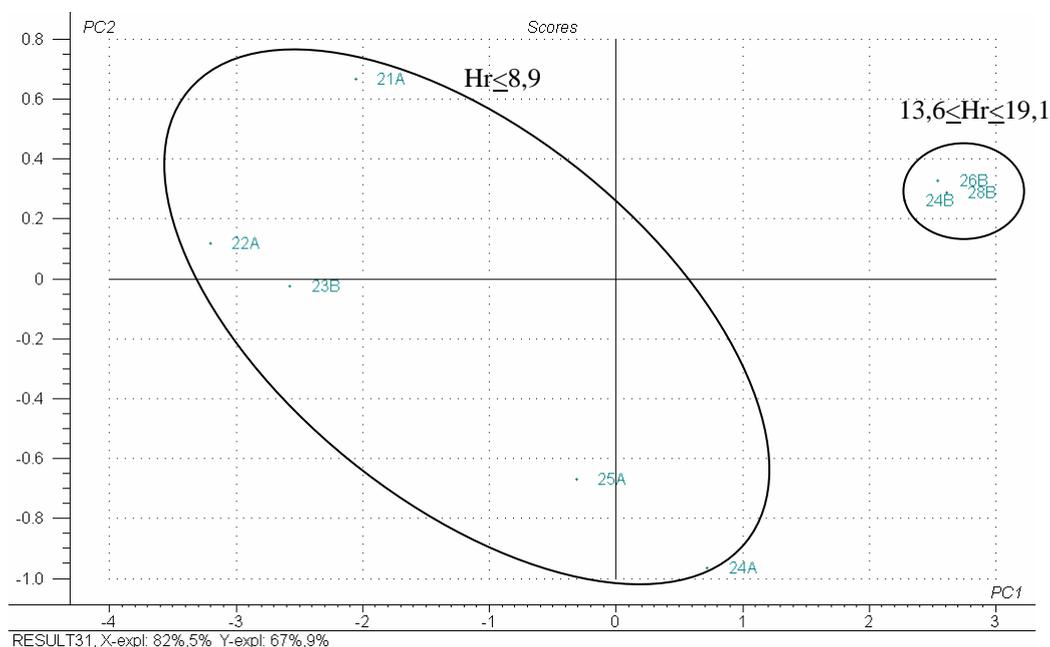


Figure 34. PLS2 illustrant les corrélations entre les variables discriminantes des données analytiques (cf. II.5.1.1, Tableau 19) et les deux variables illustratives "odeur", provenant de l'analyse sensorielle, les plus corrélées pour les 8 échantillons les plus représentatifs du Quercy.

### II.5.2.3. Données sensorielles et olfactives

Les données olfactives (cf. Annexe II, Tableau 4) ont été représentées sur le même graphique que celles de l'analyse sensorielle (cf. II.4.1.2, Tableau 17), (descripteurs significativement discriminants, cf. II.5.1.3, Tableau 20) et caractérisant l'odeur du safran, selon une PLS2. Seules les variables illustratives les plus corrélées ont été conservées pour une nouvelle analyse PLS2 (Figure 35) : pic 3 (coef. de calib., 0,855), pic 7 (coef. de calib., 0,851) et pic 13 (coef. de calib., 0,744). Les axes PC1 et PC2 représentent 87% de l'information des données sensorielles et 76% des variables illustratives "pic 3", "pic7" et "pic 13". Les échantillons sont répartis globalement selon deux groupes, échantillons plutôt secs et ceux humides, discriminés selon l'axe PC1. Vers les échantillons secs est orienté le vecteur douce pic 13 corrélé à la variable "beurré" et vers les safrans plus humides, sont dirigés les vecteurs pic 3 "animale" donné par l'acide 3-méthylbutanoïque et le pic 7 "florale/foin" donné par l' $\alpha$ -isophorone. Les pics 7 et 3 contribuerait à la perception de "fumé" et de "renfermé" en analyse sensorielle. Néanmoins, le modèle ne permet pas de prédire l'intensité de ces trois molécules odorantes.



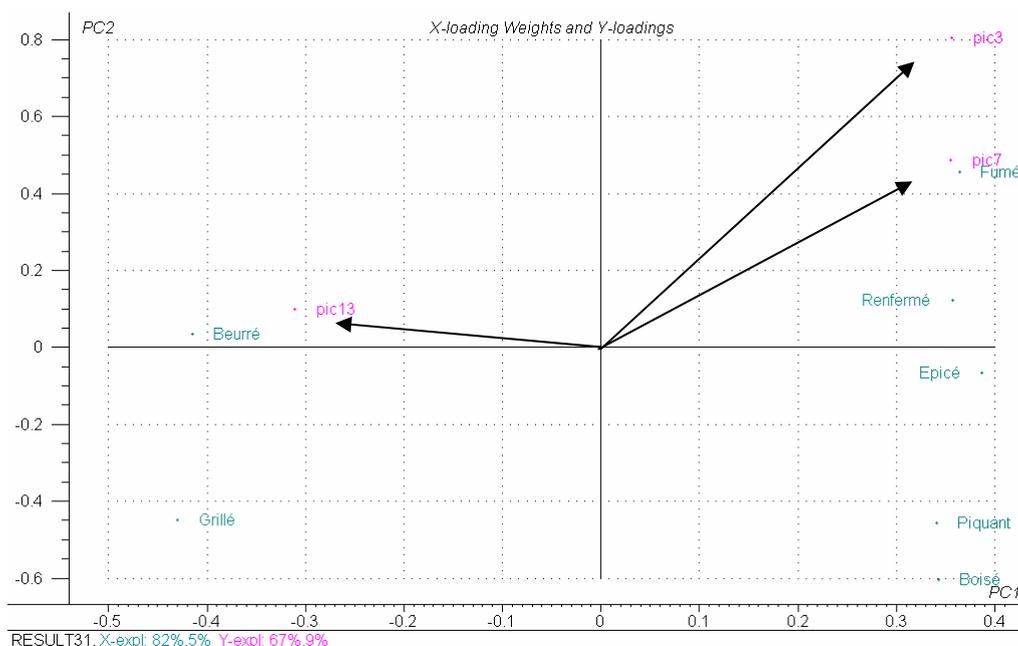


Figure 35. PLS2 illustrant les corrélations entre variables discriminantes des données sensorielles "odeur" (cf. II.5.1.3, Tableau 20) et trois variables illustratives (pic3, pic7 et pic13), provenant des données olfactives, les plus corrélées pour les 8 échantillons les plus représentatifs du Quercy.

#### II.5.2.4. Conclusions

Les données analytiques, olfactives et sensorielles semblent être en parties corrélées. Cependant, les composés volatils pouvant expliquer les données olfactives ou sensorielles ne sont pas à l'origine des notes perçues car ils ne possèdent pas d'activité odorante. La teneur en HTCC (inodore) est nettement corrélée à l'intensité du pic 3 "animale", provenant de l'acide 3-méthylbutanoïque. Les notes "beurré" et "épicé" déterminées par l'analyse sensorielle sont également corrélées aux données analytiques mais aucun composé odorant n'est proche de ces deux vecteurs. Les notes olfactives "florale/foin" et "animale" contribueraient à la perception des notes "fumé" et "renfermé" dans l'arôme global du safran.



L'analyse du safran selon la norme est une méthode simple qui permet d'évaluer correctement le taux d'humidité et celui de la crocine. Cependant, elle reste insuffisante pour déterminer le pouvoir aromatique du safran : le safran n'est évalué que de façon sommaire et les autres composés aromatiquement actifs ne sont pas pris en compte.

L'analyse du safran par HD/CPG-SM a permis de caractériser les composés volatils du safran frais, émettant majoritairement du linalool par action enzymatique et ceux du safran sec, le composé principal étant le safranal. La méthode d'extraction SPME semble plus appropriée puisqu'elle permet d'extraire une plus grande quantité de composés volatils. La

fraction volatile des safrans quercynois a un profil différent de celles des safrans étrangers (espagnol, grec, marocain et iranien), plus riche en safranal mais comportant moins de composés mineurs.

Les molécules ayant une activité odorante dans le safran du Quercy ont été déterminées et identifiées. Sur 14 zones odorantes, six nouveaux composés actifs ont été repérés. Le profil sensoriel du safran du Quercy a été établi.

Les échantillons du Quercy ont des taux d'humidité très disparates. Il en résulte une teneur en composés volatils différente, notamment avec la présence dans les safrans humides d'HTCC, produit d'hydrolyse enzymatique de la picrocrocine et intermédiaire dans la synthèse du safranal. Les composés odorants sont également modifiés avec l'apparition d'une note "animale", provenant de l'acide 3-méthylbutanoïque, produit d'hydrolyse et/ou d'oxydation, contrairement à la littérature qui l'indiquait comme étant synthétisé par réaction de Maillard. Le profil sensoriel donnant des notes "grillé" et "beurré" pour les échantillons secs, générées lors de la torréfaction, montre des notes "piquant", "fumé", "boisé" et "épicé" pour ceux dont la teneur en humidité résiduelle est plus élevée, ces odeurs pouvant provenir du safranal et de l'acide acétique, libérés, respectivement, par hydrolyse et par fermentation alcoolique. Un taux élevé d'eau résiduelle entraîne également une modification de la couleur. Le taux de crocine évalué par la norme chute. En analyse sensorielle, les échantillons humides sont décrits comme "marron" et les secs, comme "rouge". La crocine par des réactions d'hydrolyse et d'auto-oxydation est dégradée en crocétine, molécule incolore. De plus, des enzymes de type polyphénol oxydases entraînent le brunissement des tissus des stigmates.

Ainsi, une extraction SPME des composés volatils émis par les échantillons, permet de prédire le taux d'humidité des safrans ainsi que le taux de crocine. Le taux d'humidité est également fortement corrélé aux données olfactives (note "animale") et aux données sensorielles ("marron" et "renfermé"). Le taux d'HTCC est également corrélé à l'intensité odorante de la note "animale", étant tout deux dépendants du taux d'humidité. Cependant, les données analytiques ne permettent pas d'expliquer celles olfactives et sensorielles car les molécules proches des vecteurs les plus corrélés n'ont a priori pas d'activité odorante connue.

Le séchage est l'étape délicate dans la préparation du safran. Dans cette étude deux paramètres sont à prendre en compte : le séchage et l'évolution lors du stockage. Ces deux paramètres devront être étudiés séparément afin d'en évaluer les effets.

## Références bibliographiques

- Alonso G. L., Salinas M. R., Garijo J. et Sanchez-Fernandez M. A. (2001). "Composition of crocins and picrocrocin from spanish saffron (*Crocus sativus* L.)." *J. Food Qual.*, 24: 219-233.
- Alonso G. L., Varon R., Salinas M. R. et Navarro F. (1993). "Auto-oxidation of crocin and picrocrocin in saffron under different storage conditions." *Boll. Chim. Farmaceutico*, 132 (4): 116-120.
- Berset C., Giampaoli P. et Richard H. (1997). "Histoire de safran : arômes et pigments du safran". *Colloque de Beaune de Rolande*, France, ENSIA laboratoire de chimie des substances naturelles. 89-98.
- Cadwallader K. R., Baek H. H. et Cai M. (1997). "Characterization of saffron flavor by aroma extract dilution analysis". *Spices : Flavor Chemistry and Antioxydant Properties*. Risch S. J. et Ho C. T. ACS Symposium Series. Washington, 660. 66-79.
- Cseke L., Dudareva N. et Pichezsky E. (1998). "Structure and evolution of linalool synthase." *Mol. Biol. Evol.*, 15 (11): 1491-1498.
- D'Auria M., Mauriello G. et Rana G. L. (2004). "Volatile organic compounds from saffron." *Flavour Fragr. J.*, 19 (1): 17-23.
- Devos M. (1990). "Standardized Human Olfactory Thresholds". Ed.Devos M., Patte F., Rouault J., Laffort P. et Van Gemert L. J. Oxford University Press. New York.
- Gregory M. J., Menary R. C. et Davies N. W. (2005). "Effect of drying temperature and air flow on the production and retention of secondary metabolites in saffron." *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5969-5975.
- Himeno H. et Sano K. (1987). "Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro." *Agric. Biol. Chem.*, 51 (9): 2395-400.
- Holopainen J. K. (2004). "Multiple functions of inducible plant volatiles." *Trends in Plant Biology*, 9 (11): 529-533.
- ISO/TS (2003). "Safran (*Crocus sativus* L.)- Partie 1 : spécifications, Partie 2 : Méthodes d'essai." *Norme Européenne ISO/TS 3632-1 3632-2*.
- Kanakis C. D., Daferera D. J., Tarantilis P. A. et Polissiou M. G. (2004). "Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron." *J. Agric. Food Chem.*, 52 (14): 4515-4521.
- Macleod G. et Ames M. (1986). "Comparative assessment of the artefact background on thermal desorption of Tenax GC and Tenax TA." *Journal of Chromatography, A*, 355: 393-398.
- Narasimhan S., Chand N. et Rajalakshmi D. (1992). "Saffron : quality evaluation by sensory profile and gas chromatography." *J. Food Qual.*, 15: 303-314.
- Pawliszyn J. B., Ed. (1997). "Solid phase microextraction: theory and practice". USA, Wiley-VCH Inc.
- Pawliszyn J. B. et Belardi R. P. (1989). "The application of chemically modified fused silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns." *Water Pollut. Res. J. Can.*, 24: 179.
- Rodel W. et Petrzika M. (1991). "Analysis of the volatile components of Saffron." *J. High Resolution Chromatogr.*, 14 (11): 771-774.

Tarantilis P. A. et Polissiou M. G. (1997). "Isolation and identification of the aroma components from Saffron (*Crocus sativus*)." *J. Agric. Food Chem.*, 45: 459-462.

Tsimidou M. et Biliaderis C. G. (1997). "Kinetic studies of Saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (8): 2890-2898.

Zarghami N. S. et Heinz D. E. (1971). "The volatile constituents of Saffron." *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 4 (2): 43-45.

## Chapitre III

### Caractérisation des fleurs, des feuilles et des bulbes de *Crocus sativus*

## **Chapitre III Caractérisation des fleurs, des feuilles et des bulbes de *Crocus sativus*..... 129**

### **III.1. CARACTERISATION DE LA MATIERE VEGETALE..... 129**

III.1.1. Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr).....	129
III.1.2. Composition pariétale et composés hydrosolubles.....	130
III.1.3. Autres caractérisations des bulbes.....	130
III.1.3.1. Amidon.....	131
III.1.3.2. Lipides.....	132
III.1.3.3. Sucres.....	133
III.1.3.4. Protéines.....	134
III.1.4. Conclusions.....	134

### **III.2. CARACTERISATION DE LA FRACTION VOLATILE DES BULBES, DES FLEURS ET DES FEUILLES DE *CROCUS SATIVUS*..... 135**

III.2.1. Composés volatils des bulbes.....	135
III.2.2. Composés volatils des fleurs.....	137
III.2.2.1. Fraction volatile libérée par la fleur.....	137
III.2.2.2. Composés volatils présents dans la fleur.....	141
III.2.2.3. Conclusions de l'étude des composés volatils des fleurs.....	149
III.2.3. Composés volatils des feuilles.....	150
III.2.3.1. Huile essentielle et eaux florales.....	150
III.2.3.2. Composés volatils extraits par Likens-Nickerson (éther et pentane).....	155
III.2.3.3. Concrète de feuilles.....	158
III.2.3.4. Conclusions de l'étude des composés volatils des feuilles.....	163
III.2.4. Conclusions de l'étude de caractérisation des fractions volatiles.....	164

### **III.3. CARACTERISATION DES COLORANTS LIPOSOLUBLES, DES FLEURS ET DES FEUILLES, DE TYPE CAROTENOÏDE..... 165**

III.3.1. Extraction des caroténoïdes.....	165
III.3.2. Caractérisation des caroténoïdes.....	165
III.3.2.1. Profil analytique.....	166
III.3.2.2. Spectre de masse.....	170
III.3.2.3. Masse exacte et dosage.....	172
III.3.3. Conclusions.....	173

## Chapitre III Caractérisation des fleurs, des feuilles et des bulbes de *Crocus sativus*

Selon la littérature (cf. I.3), les fleurs, les feuilles et les bulbes de *Crocus* n'ont été que très peu étudiés alors qu'ils représentent une quantité importante de co-produits végétaux non-utilisés. La fabrication d'1kg de safran entraîne la production de 300kg de déchets floraux et 1,5t de feuilles vertes. Actuellement, seuls les bulbes sont valorisés en étant replantés dans les safranières pour les plus vigoureux ou revendus en pépinière pour ceux de faible calibre. La recherche de nouvelles applications pour les bulbes, et de valorisations aromatiques et colorantes pour les feuilles et les fleurs, implique la caractérisation de la matière végétale et notamment des composés volatils (Figure 1) et colorants, présents dans les co-produits de la culture du safran.

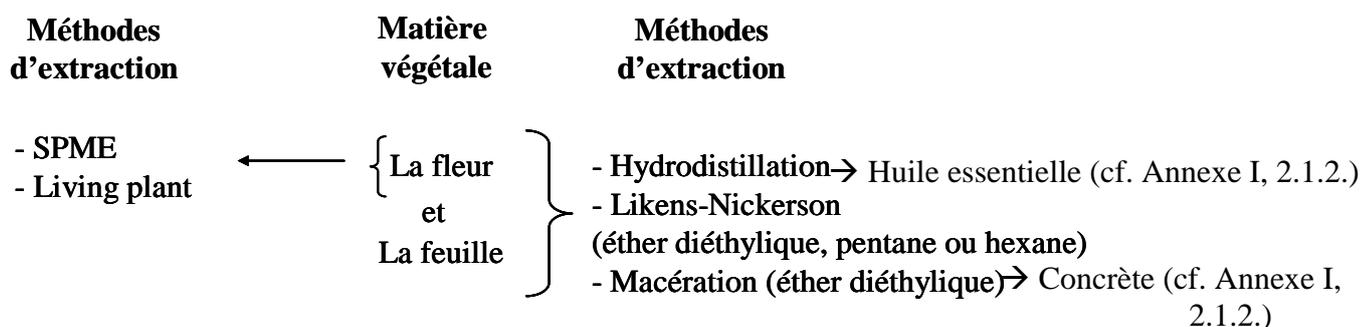


Figure 1. Méthodes d'extraction des composés volatils présents dans la fleur et la feuille.

### III.1. CARACTERISATION DE LA MATIERE VEGETALE

Cette étude concerne plus spécifiquement les feuilles et les bulbes.

#### III.1.1. Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr)

Les résultats de la teneur en humidité et en matières volatiles moyenne sur les échantillons de matière végétale, (cf. V.3.2.1), sont donnés à titre indicatif dans le Tableau 1.

Tableau 1. Teneur en humidité et en matières volatiles (Hr %) des fleurs, des feuilles et des bulbes.

	Fleurs	Feuilles	Bulbes
Hr <sub>moyen</sub> %	85,5	66,5	68,7

La matière végétale est constituée majoritairement par de l'eau présente dans les cellules (68-86%). La fleur de crocus en est l'organe le plus riche (85,5%), ce qui rend difficile sa conservation. (Le taux d'humidité a été mesuré avant chaque expérimentation afin de déterminer les rendements d'extraction par rapport à la matière sèche.)

### III.1.2. Composition pariétale et composés hydrosolubles

Cette étude a été réalisée sur les feuilles et les bulbes afin de connaître leur teneur en cellulose, hémicellulose et lignine et en composés hydrosolubles (cf. V.3.2.4), (Tableau 2). La composition pariétale a été déterminée par la méthode de dosage ADF/NDF (cf. V.3.2.2 et V.3.2.3). Cette méthode de dosage est approximative car la détermination de la quantité de lignine et d'hémicellulose est basée sur des différences de pourcentages, les attaques des composés constitutionnels étant successives. Cependant, elle permet d'évaluer la teneur de ces constituants dans les différents organes de la plante.

**Tableau 2. Composition pariétale et teneur en composés hydrosolubles par rapport à la matière sèche.**

	Feuilles		Bulbes	
	%	Ecart type <sup>a</sup>	%	Ecart type <sup>a</sup>
<b>Matières minérales</b>	<b>10,2</b>	0,1	1,0	0,6
<b>Cellulose</b>	<b>23,9</b>	0,4	5,0	0,1
<b>Hémicellulose</b>	5,5	0,7	5,3	0,4
<b>Lignine</b>	5,7	0,4	3,1	0,2
<b>Hydrosolubles</b>	<b>49,4</b>	0,4	<b>73,4</b>	0,2

<sup>a</sup> écart type sur la teneur (%).

Les feuilles sont plus riches en matières minérales et en cellulose que les bulbes qui contiennent plus de composés hydrosolubles. Les taux d'hémicellulose et de lignine sont très faibles pour les deux organes de la plante. Ces résultats sont cohérents avec le rôle que joue chaque organe, le bulbe étant un lieu de réserve et les feuilles d'échange pour la photosynthèse. Le taux élevé d'hydrosolubles présents dans les bulbes de *Crocus sativus* pourrait être dû à une importante quantité d'amidon (50%), comme décrit par la littérature, pour des bulbes récoltés en mai, (Chrungoo et Farooq, 1985; Craig et al., 1985).

### III.1.3. Autres caractérisations des bulbes

Selon l'étude précédente, le bulbe contient peu de composés pariétaux mais une quantité importante d'hydrosolubles (73,4%). L'étude de la composition chimique du bulbe a permis de connaître cette matière de manière plus approfondie. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 3.

**Tableau 3. Teneurs en amidon, en lipides, en sucres et en protéines dans le bulbe par rapport à la matière sèche.**

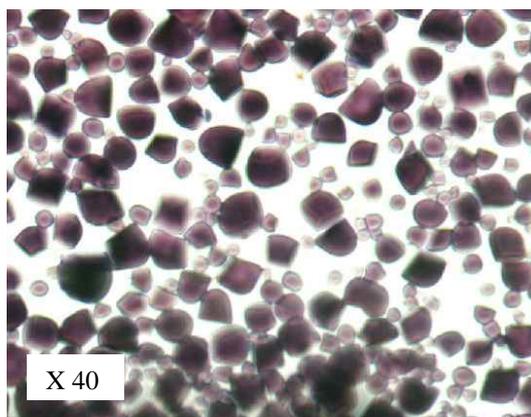
	Amidon	Lipide	Sucres	Protéines =N x 6,25
Teneur (%)	56,4	1,00	49,9	3,57
Ecart type	-	0,03	-	0,09

### **III.1.3.1. Amidon**

Les bulbes, organes de réserve, sont une source importante d'amidon, principale substance glucosidique synthétisée et stockée par les végétaux supérieurs à partir de l'énergie solaire.

#### **III.1.3.1.1. Etude microscopique**

D'après Loukis (Loukis et al., 1983), l'amidon, présent dans les bulbes, se trouve sous forme de grains striés, simples (3 à 18  $\mu\text{m}$ ) et composés (20 à 28  $\mu\text{m}$ ), sphériques, ellipsoïdes ou polyédriques. L'amidon a été mis en évidence par colorimétrie (cf. V.3.2.5.1) sur une coupe microscopique, effectuée sur des bulbes congelés, récoltés en juin 2004 (Figure 2).



**Figure 2. Grains d'amidon (violet) présents dans les bulbes de crocus, mis en évidence par colorimétrie.**

La coupe montre qu'une importante quantité d'amidon est présente au sein des bulbes et confirme les données bibliographiques, (Chrungoo et Farooq, 1985; Craig et al., 1985).

#### **III.1.3.1.2. Teneur en amidon**

D'après les données bibliographiques, (Chrungoo et Farooq, 1985), la teneur en amidon varie au cours de l'année. Ce taux a été déterminé par mesure de l'absorbance dans le visible ( $\lambda = 490 \text{ nm}$ ) du glucose libéré par action d'une enzyme, l'amyloglucosidase, sur l'amidon (Kit 207748, Boehringer Mannheim, (Boehringer, 1997), cf. V.3.2.5.2). La teneur des bulbes, récoltés en juin 2004, est très élevée, 56,4%. Elle confirme l'hypothèse émise sur les composés hydrosolubles et conforte les données bibliographiques déjà existantes.

Chrungoo, (Chrungoo et Farooq, 1985), avait déterminé une teneur de 50% par rapport à la matière sèche pour des bulbes récoltés en mai. Cette teneur, élevée, est supérieure à celle de certaines céréales telle que l'avoine (40,5%) et est proche de celle de l'orge (60,0%) et de la pomme de terre (71,0%), (Sauvant et al., 2002).

Cette teneur explique le rôle alimentaire qu'avaient autrefois les bulbes de crocus pendant les périodes de famines.

#### **III.1.3.1.3. Gélatinisation et extraction de l'amidon**

Les grains d'amidon sont organisés par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes intermoléculaires qui maintiennent leurs structures et leur permettent de gonfler dans l'eau chaude. Une hausse de température induit un gonflement de la structure par désorganisation des liaisons et insertion des molécules d'eau, qui s'accompagne d'un accroissement de la viscosité. Ce phénomène est appelé gélatinisation et est réversible jusqu'à une certaine température dépendante du type d'amidon. En vue d'une valorisation de l'amidon, nécessitant son extraction, la température de gélatinisation a été déterminée afin de se placer à des températures inférieures dans le procédé d'isolement de ce constituant au sein de la matière végétale (cf. V.3.2.5.3).

Dans la poudre issue des bulbes de crocus, ce phénomène n'est pas instantané. Pour une température de 70°C, la gélatinisation se forme après 12 min de chauffe et à 80°C, elle se produit beaucoup plus rapidement, après 2,5 min. Ces valeurs sont cohérentes avec les données bibliographiques puisque les températures de gélatinisation se situent entre 65 et 80°C selon la nature de l'amidon, (Raynal-Ioualalen, 1996).

Le bulbe de crocus est très riche en amidon. Son extraction devra être réalisée à une température inférieure à 70°C.

#### **III.1.3.2. Lipides**

La teneur en composés lipidiques de la poudre de bulbes a été évaluée après extraction au cyclohexane, à l'aide de l'ASE (en anglais : Accelerated Solvent Extractor), à chaud et sous pression. Elle est estimée à 1% en masse par rapport à la matière sèche. La composition en acides gras libres, indiquée dans le Tableau 4, a été déterminée par CPG-DIF, après microestérification des extraits. Les modes opératoires ont été détaillés dans la partie expérimentale (cf. V.3.2.6).

**Tableau 4. Composition en acides gras libres (n=3) déterminée par CPG-DIF.**

Acides gras libres	% Aire	Ecart type
Acide myristique C14:0	0,50	0,03
Acide pentadécanoïque C15:0	0,41	0,04
<b>Acide palmitique C16:0</b>	<b>22,2</b>	0,3
Acide heptadécanoïque C17:0	0,70	0,09
Acide stéarique C18:0	2,7	0,1
<b>Acide oléique C18:1 (n-9)</b>	<b>21,3</b>	0,3
<b>Acide linoléique C18:2 (n-6, n-9)</b>	<b>36,0</b>	0,8
Acide arachidique C20:0	0,73	0,08
Acide linoléique C18:3 (n-3, n-6, n-9)	3,02	0,07
Acide gadoléique C20:1 n-11	0,37	0,05
Acide béhénique C22:0	3,0	0,5

L'identification des composés, effectuée à l'aide d'un mélange d'étalon (Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix, Supelco), n'a pu être réalisée que sur 90,9% de la fraction lipidique. Les composés majoritaires sont : l'acide linoléique (36,0%, présent dans les huiles végétales et notamment dans celles de tournesol et de noix mais également dans les huiles animales), l'acide palmitique (22,2%, présent dans toutes les graisses, huiles végétales - coco et palme - et animales) et l'acide oléique (21,3%, abondant dans toutes les huiles animales et végétales comme celles de soja et de tournesol).

Ces données confirment et complètent les données bibliographiques selon lesquelles sont présents dans la fraction grasse, les acides : palmitique, palmitoléique (C16:1, n-9), oléique, linoléique et linoléique, (Loukis et al., 1983).

### III.1.3.3. Sucres

La teneur en sucres totaux de la poudre de bulbes a été déterminée selon la méthode colorimétrique de Dubois, (Dubois et al., 1956), (cf. V.3.2.8), par étalonnage externe à l'aide du D-glucose. L'absorbance a été mesurée pour des sucres de type hexose à une longueur d'onde de  $\lambda = 490$  nm, l'amidon étant le composé majoritairement présent dans les bulbes, et étant formé de motifs cyclisés de glucose.

L'échantillon de poudre de bulbes présente une absorbance de 0,45 soit une concentration en sucre de 50,5 mg/L. La teneur en sucres totaux de la poudre de bulbes est estimée à 49,9% en masse par rapport à la matière sèche. Cette valeur devrait correspondre à la teneur en amidon (56,4%, cf. III.1.3.1.2) additionnés des sucres totaux "hors amidon" (évalué à 5% par Chrungoo, (Chrungoo et Farooq, 1985)). La valeur déterminée par la méthode de Dubois est sous-estimée (49,9% contre 61,4%). En effet, l'hydrolyse de l'amidon est incomplète (49,9% < 56,4%) et les sucres de types pentoses ne sont pas pris en compte.

Elle permet tout de même de mettre en évidence la faible teneur en sucres de types hexoses "hors amidon" et de confirmer ainsi les données bibliographiques.

#### **III.1.3.4. Protéines**

La teneur en protéine sur la poudre de bulbes a été déterminée par la méthode Kjeldhal, (cf. V.3.2.7). Cette méthode dose le taux d'azote présent dans la matière puis à l'aide d'un facteur de conversion donne la teneur en protéine. Ce facteur, calculé selon la composition en acides aminés, est de 6,25 pour des matières riches en protéine et est employé dans la littérature pour les bulbes de *Crocus sativus*, (Chrungoo et Farooq, 1988). Il en résulte une teneur en azote de 0,57% et en protéines de 3,57% par rapport à la matière sèche. Les teneurs en azote totale et en protéines sont sous-estimées par rapport aux données bibliographiques. Sur des bulbes récoltés en juin, Chrungoo, (Chrungoo et Farooq, 1988), avait déterminé, selon cette même méthode, un taux d'azote de 0,24% et un taux de protéine de 1,53% par rapport à la matière humide, valeurs supérieures à 0,18% et 1,13% mesurées pour les bulbes du Quercy.

#### **III.1.4. Conclusions**

Dégageant une odeur intense lors de leur récolte et seuls les colorants hydrosolubles violets ayant été étudiés, la caractérisation des fleurs a été orientée plus spécifiquement sur l'étude des fractions volatiles et colorantes liposolubles, présentée dans une deuxième et troisième partie (cf. III.2.2, III.3).

Les feuilles ont une faible teneur en éléments pariétaux. Une caractérisation et une valorisation des fractions volatiles et colorantes ont été envisagées et décrites dans les parties III.2.3, III.3.

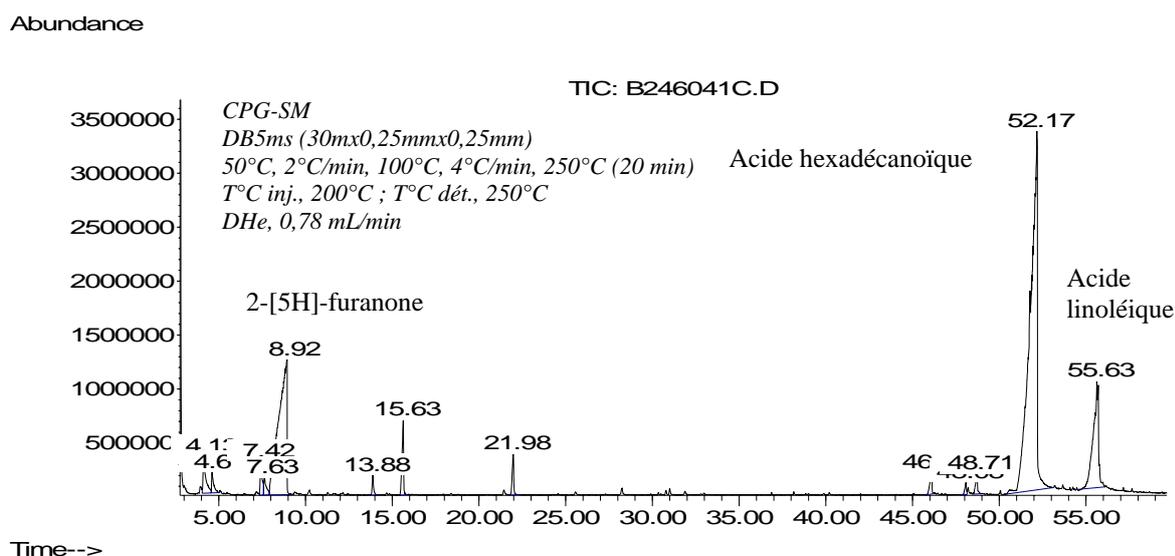
Les bulbes contiennent une fraction lipidique intéressante de par sa composition en acides gras : palmitique 22,2%, oléique 21,3% et linoléique 36,0%, ce dernier étant utilisé dans l'industrie de la cosmétique. L'amidon est également présent en grande quantité dans cette partie de plante (56,4%), teneur pouvant rivaliser avec celles de certaines céréales. Une valorisation de ces deux fractions est envisageable. Cependant, une étude complémentaire a été effectuée sur les composés volatils présents dans les bulbes (cf. III.2.1). Le *Crocus sativus* fait partie de la même famille que l'iris (iridacées) dont le rhizome est connu pour sa teneur élevée en précurseurs d' $\alpha$ -irones, molécules très recherchées en parfumerie. Cet organe est oxydé lentement à l'air libre pour fournir la précieuse molécule avec un rendement d'extraction de 0,05 à 3% selon le procédé utilisé, (Navres, 1974). Tout en caractérisant la fraction volatile du bulbe de *Crocus sativus*, la recherche de traces d' $\alpha$ -irones a été réalisée.

### **III.2. CARACTERISATION DE LA FRACTION VOLATILE DES BULBES, DES FLEURS ET DES FEUILLES DE *CROCUS SATIVUS***

Une étude succincte de la fraction volatile des bulbes est présentée dans cette partie, suivie d'une caractérisation complète des fractions volatiles des fleurs et des feuilles.

#### **III.2.1. Composés volatils des bulbes**

Le bulbe étant un organe de réserve, peu de composés volatils y sont présents. Cependant, en vue de la recherche d' $\alpha$ -irones et d'une caractérisation de cet organe, une hydrodistillation a été réalisée sur la poudre de bulbes. L'huile essentielle obtenue après 8h00 d'extraction (Mariotti et al., 1993), étant présente en faible quantité et solide à température ambiante, a été extraite de l'appareil ainsi que de l'eau de cohobage par du dichlorométhane. Le mode opératoire a été détaillé dans la partie expérimentale (cf. V.3.3.2.1). Les extraits obtenus possèdent une odeur intense de "châtaigne" et ont été analysés par CPG-SM (Figure 3).



**Figure 3. Chromatogramme CPG-SM d'un extrait d'huile essentielle dans du dichlorométhane, provenant de l'hydrodistillation des bulbes.**

Les composés volatils (dont le temps de rétention est inférieur au C<sub>18</sub>) sont au nombre de 22 (Tableau 5). Le composé, le plus abondant est la 2-[5H]-furanone, présent à 28,4%. Cette molécule a été décrite par les notes "grillée" et "épicee" dans le chapitre II (cf. II.3.2) lors de l'étude CPG-ODP des stigmates.

Tableau 5. Composés volatils (obtenus par CPG-SM, n=3) de l'huile essentielle extraite par du dichlorométhane après hydrodistillation des bulbes.

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	% A.	E. T. <sup>c</sup>
1-pentanol	765	55(100),42(90),91(80),70(70),92(50)	0,12	0,02
776	774	84(100),55(90),57(30),91(20)	0,73	0,06
<b>hexanal [66-25-1]</b>	803	44(100),56(90),41(70),72(40),82(38)	<b>2,84</b>	0,23
2,5,5-triméthylhex-2-ène [40467-04-7]	825	57(100),70(80),41(50),126(45),111(30)	0,13	0,05
heptan-2-one [110-43-0]	897	43(100),58(60),57(40),71(30),82(28),114(10)	0,21	0,03
<b>cyclohexanone [108-94-1]</b>	905	55(100),42(70),98(60),69(30),70(28),83(20)	<b>1,99</b>	0,57
<b>heptanal [111-71-7]</b>	907	70(100),44(90),57(50),81(30),86(28),96(25)	<b>1,13</b>	0,22
<b>2-[5H]-furanone [497-23-4]</b>	934	55(100),84(80),27(30),39(28),54(20)	<b>28,37</b>	4,13
945	945	70(100),71(90),43(70),55(69),84(40),97(38),140(30)	0,21	0,12
hept-2-ène [18829-55-5]	963	83(100),41(80),55(70),69(40),84(2)	0,26	0,05
3-éthyl-2-méthyl-hexa-1,3-diène [61142-36-7]	1033	67(100),95(60),124(50),109(40)	0,82	0,07
<b>oct-2-ène [2548-87-0]</b>	1063	70(100),55(95),41(90),83(70),97(30),108(10),111(5)	<b>3,05</b>	0,53
(E,Z)-nona-2,6-diène [557-48-2]	1154	41(100),70(98),69(70),94(10),109(8)	0,20	0,04
<b>non-2-ène [2353-63-8]</b>	1162	41(100),55(99),70(98),83(80),96(40),111(10),22(5)	<b>1,43</b>	0,17
(E,E)-nona-2,4-diène [5910-87-2]	1220	81(100),138(20),67(18),95(5),109(2)	0,11	0,06
5-pentyl-2-[3H]-furanone	1279	98(100),55(90),111(88),154(40),70(38),123(30)	0,24	0,09
1417	1417	121(100),91(70),77(68),94(60),150(59),103(10),107(8)	0,15	0,03
(E,E)-déca-2,4-diène [25152-84-5]	1322	81(100),95(10),152(8)	0,23	0,06
1336	1340	84(100),55(70),125(65),126(20)	0,12	0,06
$\alpha$ -irone [79-69-6]	1534	121(100),93(50),136(48),137(30),206(28),191(2)	0,05	0,08
1503	1503	88(100),55(90),101(70),155(85),157(83)	0,01	0,01
<b>acide tétradécanoïque [544-63-8]</b>	1775	73(100),60(80),129(50),185(45),228(40)	<b>1,00</b>	0,22
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>			<b>43,4</b>	<b>0,9</b>

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>écart type sur les pourcentages (n=3).

Les composés majoritairement extraits (% A.  $\geq$  1%), sont décrits par la littérature, (Arctander, 1994), par des notes "puissante", "verte" et "grasse": l'hexanal (2,8%, "puissante", "verte" et "grasse"), la cyclohexanone (2,0%, "puissante", "mentholée" et "camphrée"), l'heptanal (1,1%, "puissante", "grasse", "rance" et "piquante"), l'oct-2-ène (3,0%, "verte", "feuillage" et "grasse"), le non-2-ène (1,4%, "puissante", "grasse" et "odeur d'iris") et l'acide tétradécanoïque (1%, "grasse"). Ces molécules sont pour la plupart des aldéhydes pouvant provenir de la dégradation de précurseurs par réactions d'hydrolyse et d'oxydation dans l'eau au cours de l'extraction.

Trois acides gras sont présents en quantité élevée dans ces extraits: l'acide hexadécanoïque (ou palmitique, 22,1% en moyenne), l'acide linoléique (7,0% en moyenne) et l'acide tétradécanoïque (1,0%). Le point de fusion de l'acide hexadécanoïque est de 62,9°C et celui de l'acide tétradécanoïque de 58,5°C, ce qui explique l'aspect solide de l'huile essentielle obtenue à température ambiante. Ces données confirment la forte teneur des bulbes

en acides gras, notamment en acides palmitique (C16:0) (22,2%) et linoléique (C18:2) (36,0%) mais aussi en acide tétradécanoïque (ou myristique, 0,5%), déterminés précédemment dans la fraction lipidique (cf. partie III.1.3). L'huile essentielle issue de *Crocus sativus* est assimilable au beurre obtenu à partir des rhizomes d'iris séchés et oxydés. Ce dernier est également riche en acides gras saturés (80-90%), notamment en acide myristique (C14:0), et contient un mélange d'irones de 8 à 15%, (Garnero et al., 1978). La présence d' $\alpha$ -irone, très recherchée en parfumerie, est également observée en faible quantité (0,05%) dans l'extrait de *Crocus* ce qui supposerait la présence de précurseurs au sein du bulbe.

D'après Akoh, (Akho et Min, 2002), l'oxydation de l'acide linoléique au cours de l'extraction est à l'origine de la formation de certains composés volatils comme l'hexanal et le non-2-èneal, présents respectivement à 2,8% et 1,4% dans les extraits.

### **III.2.2. Composés volatils des fleurs**

La fleur de *Crocus sativus* est délicate et fragile et dégage un parfum "miellé" lors de sa récolte, (Algrech, 2001). Une caractérisation des composés volatils présents dans la fleur a été effectuée en vue d'une valorisation aromatique des déchets floraux.

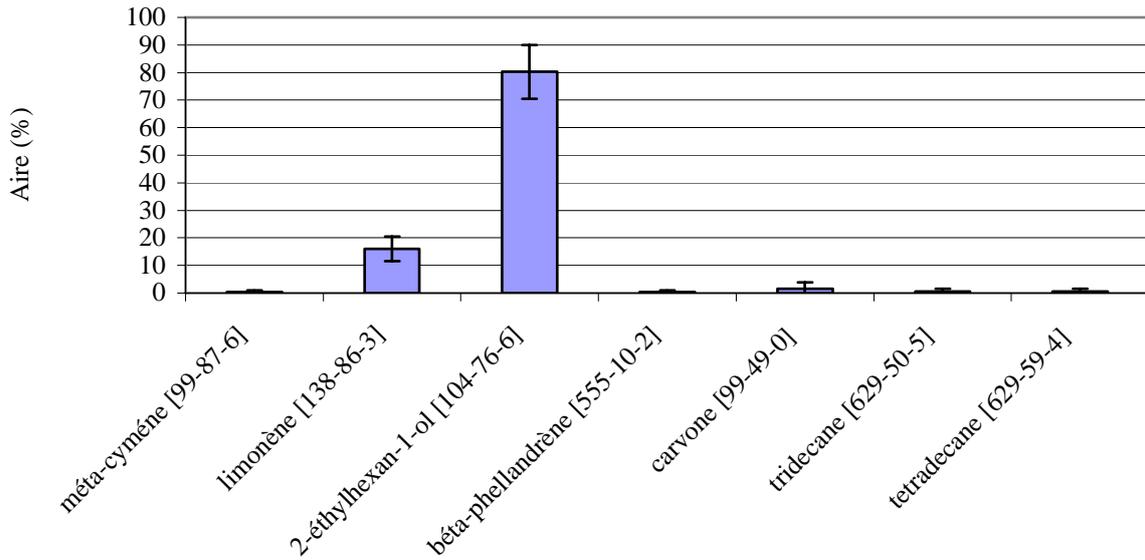
#### **III.2.2.1. Fraction volatile libérée par la fleur**

La fraction volatile a été analysée sur la fleur après récolte et émondage (les stigmates ayant été retirés) mais également lorsque la fleur était encore sur pied.

##### **III.2.2.1.1. Fleur émondée**

Les composés volatils émanant des fleurs fraîches et émondées (sans stigmates) ont été piégés sur une fibre SPME de type PDMS 100 $\mu$ m puis analysés par CPG-SM. Cette fibre est la plus universelle concernant l'extraction de composés volatils. Le mode opératoire est détaillé dans la partie expérimentale (cf. V.3.3.1.1).

Peu de composés volatils ont été extraits (7) (Figure 4). Les deux composés majoritaires sont le limonène (16,0%) et le 2-éthylhexan-1-ol (79,2%), responsables de notes "fraîche", "citronnée" et "florale", (Arctander, 1994).



**Figure 4.** Composés volatils (obtenus par SPME/CPG-SM, n=4), émis par la fleur émondée. (L'identification a été réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature).

#### III.2.2.1.2. Fleur sur pied

Les composés volatils, émanant d'une fleur de safran sur pied, ont été piégés par headspace dynamique à l'aide d'une pompe permettant de concentrer les effluves sur Tenax (Figure 5), (cf. V.3.3.1.2) et ont été analysés par CPG-SM (Figure 6).



**Figure 5.** Extraction et concentration des composés volatils émis par la fleur sur pied par HD.

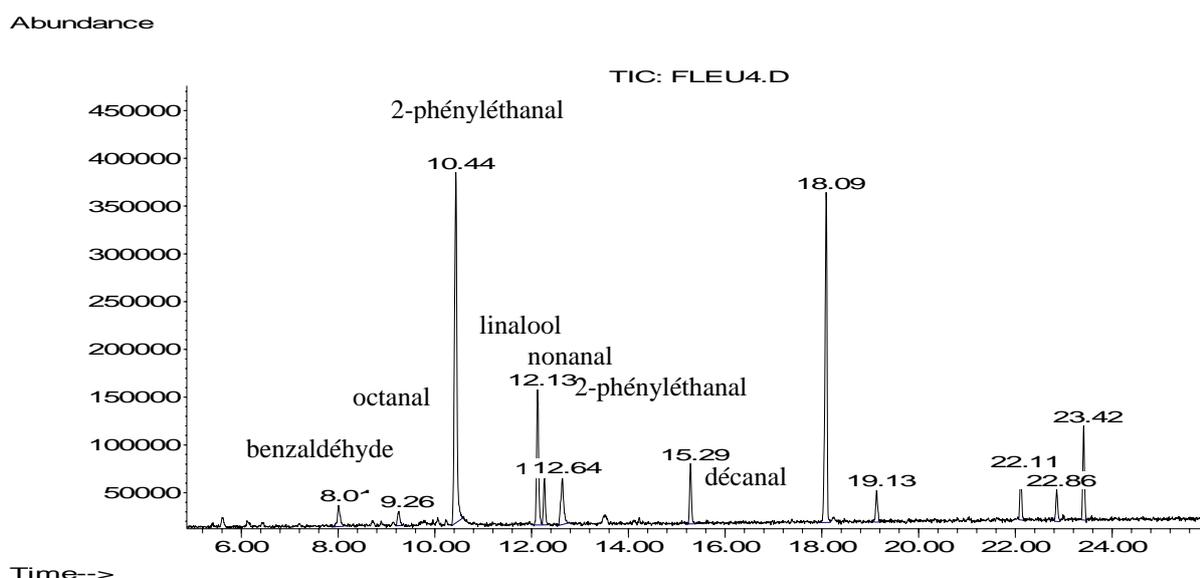


Figure 6. Chromatogramme d'extraits de fleur sur pied obtenus par HD/CPG-SM.

Deux temps de piégeage ont été testés : 20 min et 45 min. Un temps de piégeage de 45 min semble être le plus approprié puisqu'il permet d'extraire 23 composés contre 21 pour 20 min (Tableau 6).

Tableau 6. Composés volatils émis de la fleur sur pied (obtenus par HD/CPG-SM, n=3).

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments masse [ m/z (%) ]	% A.			
			20min <sup>c</sup>	45min <sup>c</sup>		
éthylbenzène [100-41-4]	841	91(100),106(50),77(20),65(18),107(2)		0,40	0,69	
<b>1,4-diméthylbenzène [106-42-3]</b>	849	91(100),106(50),28(30),105(28),77(20),103(2)	1,33	0,71	<b>1,04</b>	1,80
1,3-diméthylbenzène [108-38-3]	872	91(100),106(50),43(40),55(38),69(30),28(28),103(2)	0,71	1,00	0,42	0,72
heptanal [111-71-7]	883	43(100),70(98),28(80),41(78),55(75),57(73),81(20),86(18)	1,22	1,72	-	-
<b>benzaldéhyde [100-52-7]</b>	943	106(100),105(99),77(88),51(40),102(2)	1,63	0,55	<b>2,30</b>	1,01
1,3,5-triméthylbenzène [108-67-8]	973	105(100),120(70),91(20),119(2)	-	-	0,39	0,67
décane [124-18-5]	981	57(100),43(80),71(50),85(40),99(2),142(1)	0,65	0,92	0,54	0,08
octanal [124-13-0]	985	43(100),57(90),84(70),69(50),100(10),110(5)	1,81	0,78	0,13	0,22
limonène [138-86-3]	1012	68(100),67(80),93(78),79(50),121(35),136(33),107(28)	-	-	0,35	0,49
2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]	1013	57(100),40(50),28(48),83(20),117(2),120(2)	0,39	0,54	0,87	0,45
<b>2-phényléthanal [122-78-1]</b>	1027	91(100),92(30),120(29),65(20),121(1)	19,43	20,75	<b>23,27</b>	7,63
<b>linalool [78-70-6]</b>	1089	71(100),93(80),43(50),55(45),121(20),136(10)	15,79	8,68	<b>10,20</b>	1,54
nonanal [124-19-6]	1094	57(100),41(70),70(50),82(45),98(40),114(5),124(2)	5,05	2,59	0,79	0,23
<b>2-phényléthanol [60-12-8]</b>	1107	91(100),92(50),122(30),65(20),103(2),123(1)	2,30	3,25	<b>2,27</b>	1,98
cétoisophorone [1125-21-9]	1136	68(100),96(80),152(40),40(38)	0,69	0,98	0,64	0,66
lanièrone [28750-52-9]	1146	109(100),124(50),137(48),152(45),91(30)	-	-	0,19	0,33
décane [112-40-3]	1195	57(100),43(80),70(70),82(65),95(30),112(28),128(2)	5,22	2,04	0,19	0,32
β-cyclocitral [432-25-7]	1208	137(100),152(90),123(70),81(60),109(50),67(40)	0,84	1,18	0,17	0,29
<b>1300</b>	1299	83(100),112(100),98(95),55(60),125(20),139(5),153(2)	29,10	6,18	<b>36,67</b>	1,17
2,6,6-triméthyl-4-oxocyclohex-2-ène [79163-18-1]	1306	82(100),111(70),110(68),123(40),98(20),166(5),138(2)	-	-	0,33	0,57
<b>4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-ène [141891-14-7]</b>	1337	153(100),125(50),182(10),154(8)	3,51	1,82	<b>12,81</b>	2,96
<b>4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-</b>	1382	137(100),180(90),109(80),152(70),123(60),165(50)	-	-	<b>1,30</b>	0,53

<b>oxocyclohexa-1,4-diène</b>							
<b>[35692-95-6]</b>							
<b>dihydro-β-ionone [17283-81-7]</b>	1432	121(100),161(50),136(40),176(30),194(10)	3,86	5,45	<b>2,32</b>	1,60	
<b>α-himachalène [403786-35-6]</b>	1450	93(100),119(80),189(79),105(70),161(60),204(50)	1,63	2,31	-	-	
<b>β-ionone [14901-07-6]</b>	1477	177(100),43(30),178(10),192(2)	0,79	1,11	<b>1,62</b>	0,31	
1478 (M=204)	1478	133(100),93(98),105(95),204(70),119(68),189(39),147(30)	1,07	1,51	-	-	
<b>β-himachalène [1461-03-6]</b>	1499	119(100),204(50),105(38),134(37),161(10),189(3),206(2)	3,03	4,28	-	-	

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>pourcentage moyen.

<sup>d</sup>écart type sur les pourcentages.

Les composés majoritaires (% A.  $\geq$  1%) sont au nombre de 10 dont certains possèdent des notes intenses "amande amère" et "vert piquant" et douces "florale", "miellée" et "boisée", (Arctander, 1994): le 1,4-diméthylbenzène, le benzaldéhyde ("amande amère"), le 2-phényléthanal ("verte piquante"), le linalool ("légère, florale"), le 2-phényléthanol ("fruité, miellée"), le 4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-ène, le 4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexa-1,4-diène, la dihydro-β-ionone, la β-ionone ("chaude, boisée") et un composé inconnu (IR = 1300).

Certains de ces composés avaient été extraits directement des stigmates frais par HD (cf. II.2.3) : le décane, le linalool, la cétoisophorone, le lanièrone, le décanal, le β-cyclocitral, le 2,6,6-triméthyl-4-oxocyclohex-2-ène, le 4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-ène, le 4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexa-1,4-diène, la β-ionone, la dihydro-β-ionone et le composé inconnu (IR = 1300). Ils représentent 67,8% de la fraction volatile totale extraite par HD. D'autres composés volatils proviennent seulement des fleurs tels le limonène et le 2-éthylhexan-1-ol. Les faibles pourcentages de ces deux dernières molécules (respectivement 0,35 et 0,87%), étant pourtant largement majoritairement émises par la fleur émondée (respectivement 16,0 et 79,2%), confirme que la fraction volatile émise par les stigmates serait majoritaire par rapport à celle émise par la fleur émondée. Certains composés n'ont été identifiés ni dans les effluves émises par la fleur ni dans celles des stigmates (le 1,4-diméthylbenzène, le benzaldéhyde ou le 2-phényléthanal par exemple) et ne pourrait se dégager que lorsque la fleur est encore sur pied, en terre.

### **III.2.2.2. Composés volatils présents dans la fleur**

#### **III.2.2.2.1. Huile essentielle et eaux florales**

Afin d'extraire une huile essentielle, les fleurs émondées ont été hydrodistillées pendant 3h, temps utilisé pour des fleurs de type fragile (comme le jasmin), (Eddaouiri et al., 1993). L'huile essentielle, obtenue en très faible quantité (rendement par rapport à la matière sèche estimé à  $3,3 \cdot 10^{-2}\%$ ), a été extraite de l'eau de cohobage par solvant. Le mode opératoire a été détaillé dans la partie expérimentale (cf. V.3.3.2).

Les extractions aux nombres de trois, sont reproductibles aux vues des écarts types obtenus sur les pourcentages des composés extraits. Sur 28 composés volatils (temps de rétention inférieur au C<sub>18</sub>), 23 ont été identifiés (Figure 7). La fraction volatile (composés dont le temps de rétention est inférieur au C<sub>18</sub>) représente 87,2% de l'ensemble des molécules détectées par CPG-SM.

La molécule majoritairement extraite est le 2-éthylhexanol (55,7% en moyenne par rapport à l'aire totale) donnant des notes "douce", "sucrée", "florale" et de "rose", (Arctander, 1994). Cependant, sept autres composés sont relativement importants (% A.  $\geq 1\%$ ) et possèdent pour certains des notes intéressantes, (Arctander, 1994) : la 2-[5H]-furanone (15,1%), le 2-phényléthanal (2,3%, "verte", "piquante"), le 2-phényléthanol (1,9%, "fruitée", "miellée"), le safranal (1,6%, "épicée", "safranée"), le dihydrocarvéol (1,9%, "poivrée", "épicée" et "boisée"), la carvone (2,1%, "herbacée", "épicée") et un composé inconnu (IR = 779, 2,1%). La présence de safranal dans ces extraits (1,6%) pourrait être due à l'extraction des bas de style, non retirés lors de l'émondage.

L'aspect solide de l'huile essentielle à température ambiante est dû à la présence d'acides gras dans sa composition. L'acide hexadécanoïque (C<sub>16:0</sub>), représentant 0,8% de l'extrait, a un point de fusion de 62,9°C.

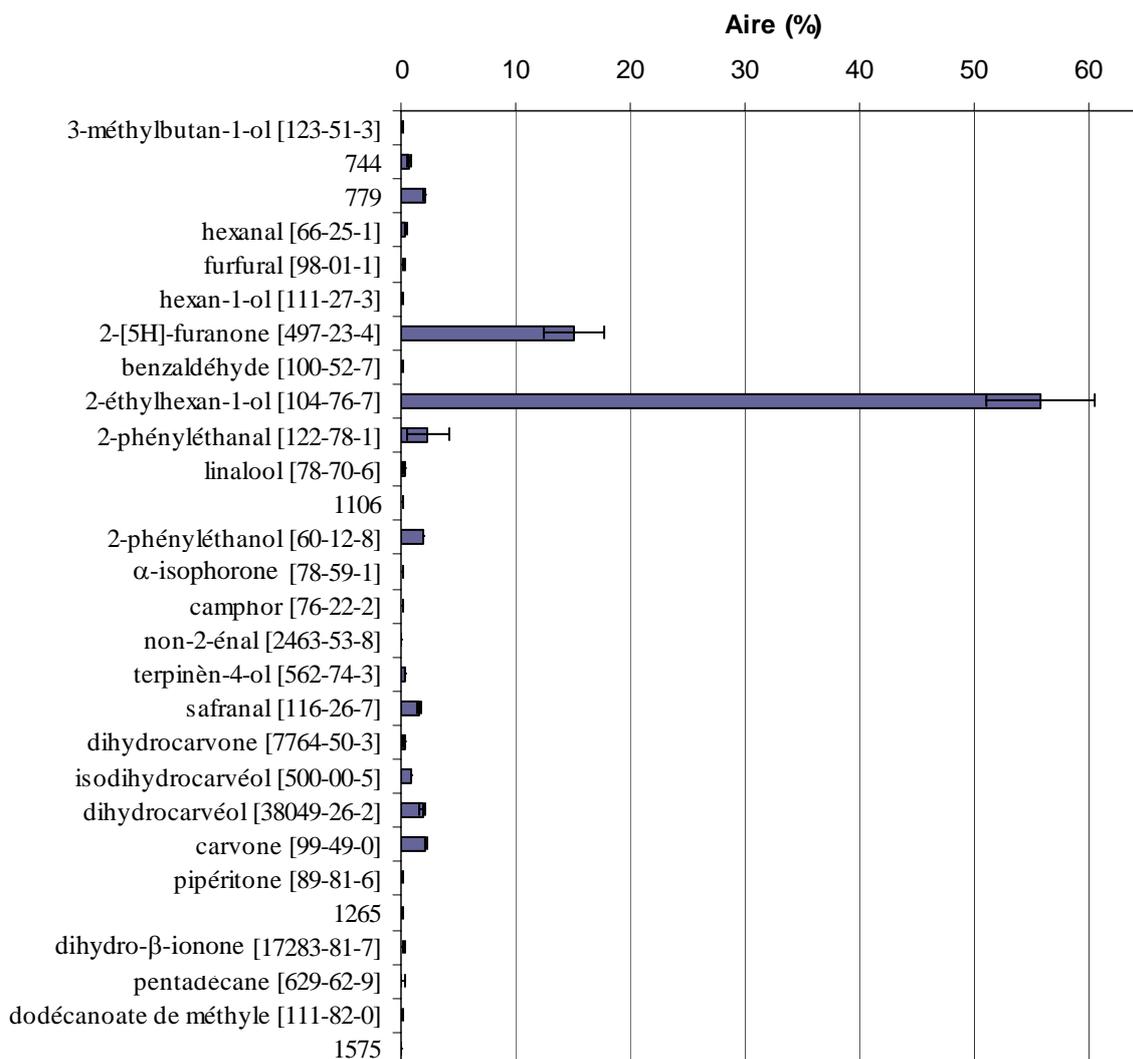


Figure 7. Composés volatils, (obtenus par CPG-SM, n=3), de l'huile essentielle extraite par du dichlorométhane, après hydrodistillation des fleurs. (L'identification a été réalisée à partir des indices de rétention, les librairies (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature. Les indices de rétention ont été calculés à partir des alcanes et les écarts types, sur les pourcentages).

#### III.2.2.2.2. Composés volatils extraits par Likens-Nickerson (éther et hexane)

L'huile essentielle étant présente en faible quantité et sous forme solide (présence d'acides gras), l'extraction par un appareillage de type Likens-Nickerson a permis d'isoler les composés volatils. Deux types de solvants ont été utilisés : l'éther diéthylique, solvant polaire (index de polarité de 2,8, (Burdick et Jackson, 1982)) ayant un point d'ébullition bas ( $T_{éb} = 35^{\circ}\text{C}$ ) et l'hexane, solvant apolaire ayant un point d'ébullition plus élevé ( $T_{éb} = 69^{\circ}\text{C}$ ). La masse de composés volatils extraite a été quantifiée par ajout d'un étalon interne. Le temps d'extraction, le rapport solvant/eau et les types de solvants utilisés ont été déterminés selon les

données de la littérature (cf. Annexe I, 2.1.1). Les modes opératoires ont été détaillés dans la partie expérimentale (cf. V.3.3.3.1). Les extraits ont été analysés par CPG-SM (Tableau 7).

**Tableau 7. Composés volatils (obtenus par CPG-SM, n=3) extraits des fleurs par Likens-Nickerson (éther diéthylique et hexane).**

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments masse [m/z (%)]	% A. Eth. <sup>c</sup>	E. T. <sup>d</sup>	% A. Hex. <sup>c</sup>	E. T. <sup>d</sup>
heptane [142-82-5]	705	43(100),57(80),71(79),41(78),100(30),85(2)	<b>3,76</b>	5,61	<b>8,81</b>	6,60
3-méthylbutanol [123-51-3]	732	55(100),70(80),42(70),57(20),69(10),71(2)	0,01	0,02	-	-
4-méthylpentan-2-one [108-10-1]	735	43(100),57(90),41(80),85(40),100(38),70(30),98(2)	0,01	0,02	-	-
octane [111-65-9]	801	43(100),85(50),57(40),71(35),114(5)	<b>1,39</b>	1,67	<b>2,07</b>	1,41
hexanal [66-25-1]	801	44(100),56(98),41(90),72(40),82(38),114(2)	0,08	0,13	-	-
811	811	43(100),45(50),61(20),73(18),70(10)	0,12	0,05	-	-
nonane [111-84-2]	899	43(100),57(90),85(40),71(30),99(10),128(8)	0,20	0,20	0,69	0,29
heptanal [111-71-7]	902	70(100),44(80),41(79),55(70),81(30),86(25),96(20)	0,05	0,09	0,08	0,07
2-[5H]-furanone [497-23-4]	920	55(100),84(60),54(20),104(2)	0,57	0,98	-	-
<b>2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]</b>	1031	57(100),41(50),70(30),83(28),98(10),112(5)	<b>81,45</b>	7,74	<b>77,00</b>	9,22
β-isophorone [471-01-2]	1042	96(100),81(95),95(80),138(70),123(60)	0,23	0,39	0,80	0,10
<b>2-phényléthanal [122-78-1]</b>	1046	91(100),92(30),120(28),65(25)	<b>3,84</b>	2,06	<b>4,85</b>	0,78
γ-terpinène [99-85-4]	1058	93(100),91(90),136(40),121(35),105(10)	0,03	0,04	0,14	0,12
linalool [78-70-6]	1101	55(100),71(70),93(69),83(64),121(10),136(2)	0,25	0,34	-	-
nonanal [124-19-6]	1106	55(100),57(98),83(40),98(38),114(5),126(5)	0,74	0,20	0,61	0,54
1112	1112	91(100),92(50),138(48),122(20),54(10),67(5)	-	-	0,07	0,13
2-phényléthanol [60-12-8]	1119	91(100),55(50),92(49),122(40),101(10)	0,17	0,19	0,65	1,00
α-isophorone [78-59-1]	1120	82(100),138(30),54(20),95(19),79(18)	-	-	0,07	0,13
terpinèn-4-ol [562-74-3]	1181	71(100),93(50),111(49),154(20),136(10)	0,18	0,16	0,20	0,03
α-terpinéol [98-55-5]	1195	59(100),93(80),121(70),136(60),81(40),139(10),137(8)	0,03	0,05	0,22	0,09
safranal [116-26-7]	1198	107(100),91(80),121(70),150(30),135(10)	0,33	0,39	0,38	0,03
dihydrocarvone [7764-50-3]	1204	67(100),95(98),82(60),152(40),109(30),137(10)	0,18	0,16	0,39	0,07
isodihydrocarvéol [500-00-5]	1218	107(100),79(98),82(88),93(85),121(80),136(70),154(2)	0,44	0,22	0,20	0,21
<b>dihydrocarvéol (isomère) [38049-26-2]</b>	1232	93(100),107(95),121(90),136(40),141(10)	<b>1,15</b>	0,38	-	-
<b>carvone [99-49-0]</b>	1244	82(100),54(50),93(48),108(45),150(10),135(5),121(2)	<b>1,22</b>	0,12	<b>1,34</b>	0,08
hexadécane-1-ol [36653-82-4]	1270	43(100),57(99),69(70),82(68),95(50),109(30)	0,26	0,10	0,30	0,06
nonanoate d'éthyle [123-29-5]	1292	88(100),101(50),135(40),141(38),115(5),157(1)	0,02	0,03	0,12	0,16
1397	1397	57(100),43(80),71(70),141(5),99(2)	0,19	0,12	-	-
<b>2,6-di-(tbutyl)-4-hydroxy-4-méthyl-cyclohexa-2,5-dièn-1-one [10396-80-2]</b>	1457	205(100),165(85),57(70),180(40),220(20),236(5)	-	-	<b>1,32</b>	0,70
pentadécane [629-62-9]	1498	57(100),43(80),71(70),85(50),212(5)	0,64	0,32	0,43	0,13
dodécanoate de méthyle [106-33-2]	1522	74(100),87(60),168(20),143(18),183(15),214(2)	-	-	-	-
ionol [128-37-0]	1551	219(100),234(30),220(25)	0,40	0,47	-	-
2,2,4-triméthylpentan-1,3-dioldiisobutyrate	1585	71(100),43(50),149(10),111(5),205(2)	0,16	0,27	-	-
hexadécane [544-76-3]	1596	57(100),43(80),71(79),85(50),99(10)	0,48	0,52	-	-
2-propanoate de dodécyle [2156-97-0]	1691	55(100),69(50),83(48),111(30),127(20),140(1)	0,66	0,76	-	-
heptadécane [629-78-7]	1698	57(100),71(80),43(75),85(70),99(20),240(1)	0,56	0,70	-	-
octadécane [593-45-3]	1799	57(100),43(80),71(79),85(60),99(20),113(10),127(2)	0,33	0,36	-	-

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>pourcentage moyen des composés volatils extraits à l'éther et à l'hexane.

<sup>d</sup>écarts type sur les pourcentages.

La masse de la fraction volatile (déterminée à l'aide de l'étalon interne) obtenue en moyenne dans les extraits éthérés est de 0,571 mg, soit un rendement d'extraction de  $9,1 \cdot 10^{-3}\%$  par rapport à la matière sèche, et de 1,124 mg dans les extraits à l'hexane, soit un rendement d'extraction par rapport à la matière sèche de  $17,9 \cdot 10^{-3}\%$ . L'hexane semble être un solvant d'extraction plus efficace. Cependant ces extractions sont peu reproductibles car elles dépendent de l'équilibre établi entre les vapeurs de solvant et celles de l'eau, difficilement similaire lors de manipulations successives. Néanmoins, elles permettent une bonne caractérisation des composés volatils présents dans la fleur.

Les extraits éthérés comportent 34 composés volatils alors que les extraits hexaniques n'en comptent que 22. L'éther extrait un plus grand nombre de composés du fait de sa polarité (ex : 2(5H)-furanone) et de son faible point d'ébullition (ex : 3-méthylbutanol, 4-méthylpentan-2-one), mais en moindre quantité par rapport à l'hexane (rendement d'extraction inférieur,  $9,1 \cdot 10^{-3}\% < 17,9 \cdot 10^{-3}\%$ ).

Le composé majoritairement extrait est le 2-éthylhexan-1-ol, présent en moyenne à 81,5% dans les extraits à l'éther et à 77,0% dans ceux réalisés à l'hexane. L'étalon interne étant assez concentré dans l'extrait, seul ce composé a pu être quantifié de façon fiable. L'éther a permis d'extraire 0,46 mg de 2-éthylhexan-1-ol, soit 0,079 mg/g de matière sèche et l'hexane 0,79 mg, soit 0,135 mg/g de matière sèche. Les valeurs des pourcentages sont supérieures à celles données par l'hydrodistillation (55,7% en moyenne) qui extrayait d'avantage de composés lourds tels que des acides gras. Les composés majoritaires (% A.  $\geq$  1%) sont quasiment similaires pour les profils obtenus avec les deux types de solvants (éther/hexane) et certains d'entre eux possèdent des propriétés odorantes connues (Arctander, 1994) : l'heptane (3,7%/8,8%, "douce", "éthérée"), l'octane (1,4%/2,1%), le 2-phényléthanal (3,8%/4,8%, "verte", "piquante"), la carvone (1,2%/1,3%, "herbacée", "épicée") et le 2-éthylhexan-1-ol (81,4%/77,0%, "florale", de "rose").

Parmi les composés extraits par l'éther et non par l'hexane, certains possèdent des notes aromatiques intéressantes telles que : l'hexanal (0,1%, "grasse", "verte"), le linalool (0,2%, "légère", "florale"), le dihydrocarvéol (1,1%, "poivrée", "épicée" et "boisée") et l'ionol (0,4%, "huile", "herbacée").

La présence de safranal en faible quantité (0,3%/0,4%) pourrait être due, comme précédemment, à l'extraction des bas de style, non écartés lors de l'émondage.

La comparaison des extraits obtenus par SPME (cf. III.2.2.1.1) et par Likens-Nickerson montre que le 2-éthylhexan-1-ol est le composé majoritairement émis par la plante - il représente 79,2% de l'extrait headspace obtenu par SPME - mais est également présent en

quantité importante au sein de la plante, entre 77,0% et 81,5% selon le solvant utilisé. Le limonène représente 16% de la fraction volatile émise par la plante mais n'est pas présent dans les extraits par solvants. Ainsi, cette molécule serait libérée par la plante en quantité importante au cours du temps tout en étant présente à l'état de traces au sein de ses tissus.

### ***III.2.2.2.3. Concrète de fleur***

Le rendement en huile essentielle étant trop faible pour obtenir un extrait valorisable et la caractérisation des composés volatils par Likens-Nickerson démontrant un potentiel aromatique intéressant, les composés présents dans les fleurs ont été extraits à l'aide d'un solvant à froid, afin de n'engendrer aucune dégradation. En vue d'une caractérisation chimique, l'éther diéthylique a été choisi pour son pouvoir extractant et son faible point d'ébullition. Trois temps de macération ont été testés 15 min, 30 min et 60 min, correspondant au temps d'extraction de fleurs fragiles comme le jasmin ou la rose (cf. V.3.3.4.1). Le rendement d'extraction pour chaque temps de macération, a été évalué à partir de trois lots de fleurs récoltées en 2004 (Tableau 8).

**Tableau 8. Rendements d'extraction moyens en concrètes de fleurs par rapport à la matière sèche (Hr = 85,5%) en fonction du temps de macération dans l'éther diéthylique, 15 min, 30 min et 60 min (n=3).**

Solvant et temps d'extraction (min)	Ether 15 min	Ether 30 min	Ether 60 min
Rendements d'extraction moyens en concrète (%)	1,9	2,2	2,9
Ecart type	0,4	0,2	1,2

Le rendement d'extraction moyen est relativement élevé et augmente progressivement avec le temps de macération. Cependant, un écart type important est observé pour 60 min de macération. Une phase aqueuse présente dans le milieu (due à la dégradation des fleurs), pourrait solubiliser et/ou dégrader une partie des composés hydrosolubles et diminuer ainsi la reproductibilité des extractions.

Le caractère aromatique des concrètes, a été évalué sur des extraits de fleurs récoltées en 2003. Ces concrètes ont été caractérisées globalement par le parfumeur Pierre BERDOUES (Parfums Berdoues SA, 31270 Cugnaux, France) par des notes "miellées" mais aussi "florales" telles que "mimosa", "genêt" et "soucis" et évaluées comme étant susceptibles d'intéresser l'industrie de la parfumerie. La macération de 30 min semble légèrement

différente olfactivement puisqu'elle présente également des notes "verte". Les concrètes de fleurs ont été reprises dans de l'éthanol absolu à 40°C afin d'éliminer les cires qui précipitent dans ce solvant à froid.

Elles ont été analysées par CPG-SM/ODP, afin de déterminer séparativement les composés ayant une activité odorante (cf. V.3.3.4.1.1). Les zones odorantes, présentes dans les absolues de fleurs, ont été détectées par un juge qualifié (sujet choisi pour sa capacité à effectuer une analyse sensorielle GC-O et dont les performances ont été contrôlées). Des descripteurs ont été attribués pour chaque pic odorant dont l'intensité a été évaluée sur une échelle allant de 0 à 5.

Les concrètes ont également été analysées par CPG-SM afin de caractériser leur fraction volatile (composés dont le temps de rétention est inférieur au C<sub>18</sub>). Cette étude a été menée sur des macérations de fleurs récoltées en 2004, les concrètes ayant été produites sur trois lots différents pour chaque temps de macération (cf. V.3.3.4.1.2).

Les résultats obtenus ont été regroupés dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Résultats des analyses par CPG-SM/ODP (n=3) de la fraction volatile présente dans les extraits de fleurs issus de macérations dans l'éther diéthylique (15 min, 30 min et 60 min).**

Pics <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	Odeurs perçues <sup>d</sup>	% A.	% A.	% A.
					15 min	30 min	60 min
Pic 1	hexanal [66-25-2]	808	44(100),56(80),57(60), 72(35),82(20),67(15)	verte	- <sup>e</sup>	-	-
Pic 2	-	880	-	cacahouète	nd <sup>f</sup>	nd	nd
-	<b>2-[5H]-furanone [497-23-4]</b>	924	55(100),84(80),27(20), 39(15),149(1)	-	<b>1,69</b>	<b>1,78</b>	<b>1,60</b>
Pic 3	oct-1-èn-3-one	979	55(100),70(80),27(40), 83(10),97(10),111(2)	champignon	-	-	-
-	2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]	1032	57(100),41(30),70(28), 83(25),29(15),112(1)	-	-	0,32	0,76
Pic 4	undécane [1120-21-4]	1097	57(100),43(80),71(70), 85(40),70(5),84(3),99(2),156(2)	brûlée	-	-	-
-	nonanal [124-19-6]	1107	57(100),41(75),70(45), 82(35),98(30),149(1)	-	0,09	0,03	0,08
<b>Pic 5</b>	<b>2-phényléthanol [60-12-8]</b>	1117	91(100),92(55),122(30), 65(15),39(1),51(1)	<b>florale, miellée</b>	<b>0,09</b>	<b>0,28</b>	<b>0,11</b>
Pic 6	formiate de 2-phényléthyle [104-62-1]	1176	104(100),91(75),51(25), 105(15),92(10),103(5),122(2)	<b>verte piquante</b>	-	-	-
-	dihydro-4-hydroxy-2-[3H]- -furanone [5469-16-9]	1213	44(100),74(30),29(15), 102(15),149(1)	-	<b>9,05</b>	<b>25,09</b>	<b>20,27</b>
Pic 7	acide phénylacétique [103-82-2]	1245	91(100),136(30),92(20), 65(20)	fruitée	-	-	-
Pic 8	-	1267	-	florale, miellée	nd	nd	nd
Pic 9	-	1328	-	pain de mie	nd	nd	nd
Pic 10	4-hydroxyphényléthanol	1367	107(100),138(30),77(28), 108(4)	miellée, florale	-	-	-
-	5-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-	1387	180(100),137(97),109(95), 152(70),39(60),77(50)	-	0,02	0,04	-

	-oxocyclohex-1,4-diène [329323-90-2]							
	déca-2,4-diène [2363-88-4]	1323	81(100),67(20),55(10),27(8), 29(5),107(1),122(1)	-	-	-	0,05	
Pic 11	-	1407	-	florale, miellée	nd	nd	nd	
-	4-hydroxy-2,6,6- -triméthylcyclohex- -1-ène (HTCC) [35692-94-5]	1426	135(100),107(80),121(70),178(70), 168(60),91(50),79(50)	-	0,04	0,17	0,22	
-	<b>4-hydroxyphényléthanol</b> <b>[501-94-0]</b>	1444	107(100),138(30),77(20), 51(2),149(1)	-	<b>0,52</b>	<b>0,75</b>	<b>0,88</b>	
-	2,6-di(tbutyl)-4-hydroxy-4- -méthylcyclohexa-2,5- -diènone [10396-80-2]	1458	165(100),180(70),57(70), 137(40),41(40),22(20),77(5)	-	-	0,03	0,00	
-	2,6-di(tbutyl)-4- -méthylène-cyclohexa-2,5- -diènone	1472	161(100),203(70),218(60), 175(40),185(20)	-	-	0,03	0,05	
-	acide dodécanoïque [143-07-7]	1566	73(100),60(95),43(55),85(25), 129(25),157(20),200(10)	-	0,14	0,05	-	
-	1661	1661	151(100),135(95),109(85), 43(75),95(30),208(25)	-	0,02	-	-	
-	acide tétradécanoïque [544-63-8]	1784	73(100),60(90),43(70), 129(45),185(30),228(25)	-	0,45	-	-	
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>					12,1	28,6	24,0	

<sup>a</sup> pics odorants perçus lors du sniffing.

<sup>b</sup> identification réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France), la littérature et les odeurs perçues.

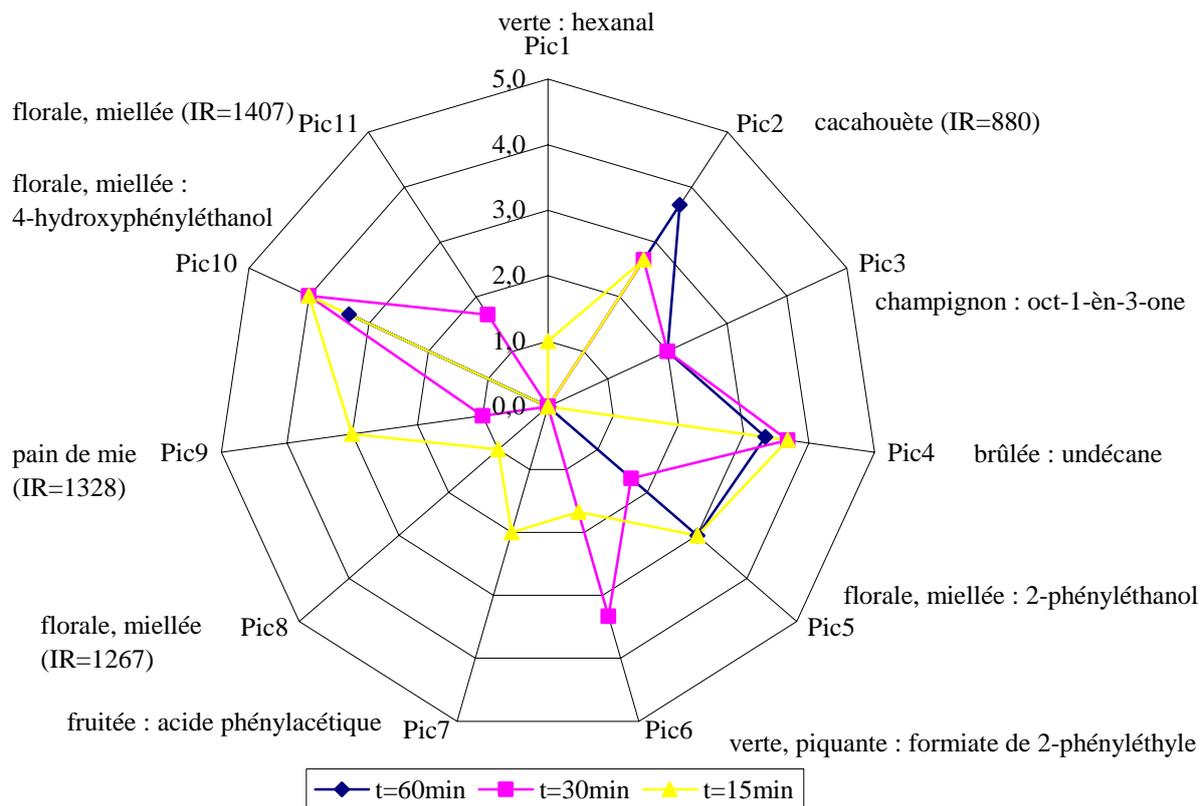
<sup>c</sup> indice de rétention calculé à partir des alcanes, sur un pic détecté par CPG-SM ou par CPG-ODP.

<sup>d</sup> descripteurs attribués lors du sniffing pour chaque pic odorant.

<sup>e</sup> - composé dont le pourcentage est inférieur au seuil de quantification fixé.

<sup>f</sup> nd, composé perçu lors du sniffing mais non-détecté en CPG-SM.

Les molécules ayant une activité odorante ont des indices de rétention faibles ( $IR \leq 1407$ ) et sont particulièrement volatiles. Les composés majoritairement extraits sont la dihydro-4-hydroxy-2[3H]-furanone (de 9,0% à 25,1%) et la 2-[5H]-furanone (de 1,6% à 1,8%) qui n'ont pas été perçus par le juge. Onze pics odorants, de type "vert", "pyrogéné", "floral", "fruité" et "champignon", ont été détectés dans les concrètes de fleurs, leurs intensités variant avec le temps de macération (Figure 8).



**Figure 8. Profils aromatiques des absolues de fleurs, obtenues par macération dans l'éther, réalisés par CPG-SM/ODP (n=3). (L'identification a été effectuée à l'aide des indices de rétention et les bibliothèques, NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France. Seules les notes dont l'intensité moyenne perçue a été  $\geq 0,7$  ont été prises en compte).**

Les notes les plus intenses sont "cacahouète" (pic 2, IR = 880), "brûlée" (pic 4, undécane) et "florale, miellée" (pic 5, 2-phényléthanol et pic 10, 4-hydroxyphényléthanol). La concrète de 15 min possède un plus grand nombre de notes aromatiques diverses : "verte" (pic 1, hexanal), "fruitée" (pic 7, acide phénylacétique) et "florale, miellée" (pic 8, IR = 1267). L'étude olfactive de la concrète de 30 min confirme les données du parfumeur, elle est plus "verte" (pic 6, intensité de 3,3), note donnée par le formiate de 2-phényléthyle. Le seul composé quantifiable et perçu en CPG-ODP est le 2-phényléthanol. La note aromatique donnée par le 4-hydroxyphényléthanol a été jugée intense dans les trois extraits 15 min (4), 30 min (4) et 60 min (3,3). Peu de différences olfactives ont été notées avec l'augmentation du temps d'extraction. La fraction volatile ne constitue qu'un faible pourcentage des composés détectés en CPG-SM. Néanmoins, sa proportion au sein de l'extrait ainsi que le nombre de ses composés évoluent légèrement en fonction du temps de macération. Après 15 min d'extraction, dix composés volatils ont été extraits, mais en faible quantité (12,1%), après 30 min, ce nombre augmente légèrement (11) mais la quantité extraite est plus importante par

rapport aux autres composés (28,6%) et dans l'extrait de 60 min, seulement neuf composés sont présents avec une fraction volatile de 24,0%. Lors d'un temps de macération trop long, la proportion de composés volatils diminue. Ce phénomène pourrait être dû à la dégradation et à la solubilisation de composés volatils hydrosolubles au contact de la phase aqueuse présente dans le milieu après 60 min de macération, mais aussi à l'extraction de composés plus lourds avec l'augmentation du temps de macération.

En résumé des études précédentes, la caractérisation chimique et aromatique des concrètes de fleurs, en fonction du temps de macération, a permis de réaliser certaines observations :

- Une dégradation des fleurs et la formation d'une phase aqueuse dans le milieu à partir de 60 min de macération.
- Une augmentation du rendement d'extraction.
- Une faible évolution aromatique des concrètes, trois notes étant majoritaires "cacahouète" (IR = 880), "brûlée" (undécane) et "florale miellée" (2-phényléthanol et 4-hydroxyphényléthanol) quelque soit le temps de macération. La dernière note est caractéristique de la fleur fraîche coupée et émondée.
- Une faible évolution des pourcentages, l'extraction de 30 min étant la plus riche en composés volatils, 15 min étant un temps trop court et 60 min trop long, entraînant tous deux pour des raisons différentes une perte de la fraction volatile.
- Deux composés majoritairement détectés par CPG-SM : la dihydro-4-hydroxy-2[3H]-furanone et la 2-[5H]-furanone, quelque soit le temps de macération.

L'extraction de 60 min des fleurs à froid et dans l'éther semble être la plus intéressante d'un point de vue analytique et aromatique ainsi que par le rendement obtenu (2,9%).

### **III.2.2.3. Conclusions de l'étude des composés volatils des fleurs**

La caractérisation de la fraction volatile de la fleur a montré le potentiel aromatique de cet organe, par sa composition et son arôme. Le composé majoritairement libéré par la fleur est le 2-éthylhexan-1-ol (80%), présent également en quantité importante dans l'huile essentielle (55,7%) et dans l'extrait par Likens-Nickerson (de 77,0 à 81,5%). Cette molécule est responsable de note "douce", "sucrée", "florale" et de "rose". L'huile essentielle étant obtenue en faible quantité, seule l'extraction à froid par macération permet d'obtenir un rendement d'extraction convenable (de 1,9 à 2,9%). Le composé volatil majoritaire de la

concrète est la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone (de 9,1 à 25,1%) et les notes les plus intenses sont "florale miellée" (2-phényléthanol et 4-hydroxyphényléthanol), "cacahouète" (IR=880) et "brûlée" (undécane). Le 2-éthylhexan-1-ol est présent en très faible quantité dans ces extraits (de 0,3 à 0,8%). Le temps de macération le plus approprié est de 60 min. La valorisation aromatique des fleurs devra être réalisée par extraction à froid de la matière végétale dans un solvant compatible avec un procédé industriel, tel que l'hexane.

### **III.2.3. Composés volatils des feuilles**

Les feuilles étant particulièrement appréciées par les vaches laitières, (Algrech, 2001), une étude des composés volatils a été réalisée en vue d'une valorisation aromatique de ce co-produit.

#### **III.2.3.1. Huile essentielle et eaux florales**

La technique d'hydrodistillation a été employée afin d'extraire l'huile essentielle présente dans les feuilles.

##### **III.2.3.1.1. Extraction et caractérisation**

Très peu d'huile essentielle est présente dans cette partie de la plante (cf. V.3.3.2.3.1) puisqu'après 8h00 d'hydrodistillation, (Mariotti et al., 1993), le rendement par rapport à la matière sèche est de l'ordre de  $6,1 \cdot 10^{-3}\%$ . L'extraction de cette huile, verte et visqueuse à température ambiante, débute après 2h00 d'hydrodistillation. En fin d'extraction, l'huile essentielle obtenue a été extraite de l'appareillage et de l'eau de cohobage par du dichlorométhane. L'hydrodistillation a été poursuivie pendant 8h00 supplémentaires et l'huile à nouveau présente a été extraite comme précédemment.

D'après les observations réalisées en cours de manipulation, l'huile récupérée pourrait être constituée majoritairement d'acides gras puisqu'elle est solide à température ambiante et qu'elle ne se forme pas dès le début de l'extraction. Dans le milieu eau/feuille, les triglycérides présents dans les feuilles s'hydrolyseraient lors du chauffage pour donner du glycérol et des acides gras qui seraient entraînés par l'eau en même temps que l'huile essentielle.

Les extraits ont été analysés par CPG-SM (Tableau 10).

Tableau 10. Composés volatils (obtenus par CPG-SM, n=3) de l'huile essentielle extraite par du dichlorométhane après hydrodistillation des feuilles.

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	%	E.T. <sup>c</sup>	%	E.T. <sup>c</sup>
			A. 8h	8h	A. 16h	16h
pent-3-èn-2-one [625-33-2]	732	69(100),41(98),43(60),39(40),84(38),98(3)	0,09	0,10	-	-
pent-2-ènal [1567-87-0]	748	55(100),83(60),39(55),84(54),86(10),88(2)	0,10	0,13	0,03	0,03
pentan-1-ol [71-41-0]	762	42(100),55(75),31(70),41(68),70(60),84(10)	0,11	0,13	0,01	0,01
cyclopentanone [120-92-3]	767	55(100),84(50),27(30),85(2),91(1)	0,65	0,41	0,44	0,06
hexanal [66-25-1]	801	41(100),44(80),56(70),49(65),84(30),86(28),98(2)	0,27	0,26	0,09	0,05
<b>furfural</b> [98-01-1]	827	96(100),95(95),39(70),49(15),67(11),84(10),98(2)	0,84	0,79	<b>1,03</b>	0,29
hex-2-ènal [505-57-7]	848	41(100),55(80),69(70),83(50),57(45),98(30)	<b>3,93</b>	3,79	0,49	0,10
hex-2-èn-1-ol [928-95-0]	859	57(100),41(30),82(20),71(18),86(3)	0,09	0,15	-	-
hexan-1-ol [111-27-3]	863	56(100),43(50),55(45),69(40),84(3),87(2)	0,15	0,16	0,01	0,02
<b>2-[5H]-furanone</b> [497-23-4]	916	55(100),84(40),27(30),39(20),95(5),110(2)	<b>6,58</b>	1,98	<b>5,81</b>	1,31
hept-2-ènal [18829-55-5]	951	41(100),55(80),57(75),83(70),39(65),69(50),97(2)	0,04	0,06	0,00	0,00
benzaldéhyde [100-52-7]	956	77(100),106(90),105(87),51(40),74(10),110(1)	0,03	0,04	0,14	0,04
coumarone [271-89-6]	991	118(100),89(50),90(40),63(30),119(5)	-	-	0,03	0,03
hepta-2,4-diènal [4313-03-5]	1009	81(100),53(20),39(19),67(18),110(10)	0,14	0,13	0,11	0,02
2-phényléthanal [122-78-1]	1038	91(100),65(30),92(28),39(10)	0,37	0,30	0,30	0,08
octan-1-ol [111-87-5]	1068	56(100),41(90),55(85),69(60),70(59),84(40)	0,44	0,31	0,11	0,04
nonanal [124-19-6]	1103	57(100),41(90),70(40),82(38),98(35),114(2)	0,17	0,13	-	-
non-2-ènal [2463-53-8]	1260	43(100),41(90),70(88),55(80),83(50),124(10)	0,07	0,08	-	-
1266	1266	43(100),84(50),87(30),127(10),110(5)	0,27	0,22	0,08	0,08
1287	1287	43(100),84(50),87(30),127(10),110(8),134(5)	0,10	0,06	-	-
4-(2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-diènyl)-butan-2-one	1325	119(100),43(50),91(45),105(40),147(30),192(20)	0,18	0,15	-	-
<b>1346</b>	1346	157(100),142(50),172(30),141(20),115(10),173(2)	<b>1,32</b>	2,06	0,33	0,05
β-damascénone [23726-93-4]	1373	69(100),121(50),190(10),105(5),175(3)	0,42	0,33	0,12	0,05
<b>1381</b>	1381	43(100),159(90),91(70),105(50),119(40),192(2)	<b>1,15</b>	0,96	0,21	0,04
1389	1389	163(100),43(30),105(20),193(2)	0,04	0,03	0,26	0,04
1,3,5,7-tétraméthyladamantane [1687-36-1] + ionone [127-41-3]	1397	121(100),177(80),159(79),136(40),192(20)	0,07	0,03	0,01	0,02
4-(2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3-diènyl)-butan-2-one	1402	119(100),43(30),84(28),121(25),192(23),159(10)	0,16	0,18	-	-
1-(6,6-diméthyl-2-méthylèncyclohex-3-ènyl)-butèn-3-one	1420	43(100),105(40),147(38),91(30),190(28),175(20)	0,15	0,10	0,14	0,04
géranyl acétone [3796-70-1]	1444	43(100),69(30),107(10),136(9),151(8),161(1)	0,12	0,14	-	-
1451	1451	43(100),91(50),105(45),147(43),190(40)	0,04	0,07	-	-
β-ionone [14901-07-6]	1472	177(100),43(50),135(10),192(5)	0,04	0,07	-	-
<b>acide dodécanoïque</b> [143-07-7]	1578	60(100),73(98),129(30),157(2),200(10),171(5)	<b>2,98</b>	1,94	<b>1,21</b>	0,58
dodécanoate d'éthyle [106-33-2]	1590	88(100),101(50),43(30),157(20),183(18),228(10)	0,15	0,16	0,20	0,28
1608	1608	43(100),97(50),111(43),137(30),165(10)	0,04	0,04	-	-
<b>acide tétradécanoïque</b> [544-63-8]	1767	78(100),60(98),43(50),129(35),185(30),228(28)	<b>1,66</b>	0,50	<b>1,48</b>	0,38
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>			<b>23,0</b>	<b>0,8</b>	<b>12,7</b>	<b>0,3</b>

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>écarts type sur les pourcentages.

Les trois hydrodistillations sont peu reproductibles. Après 8h00 d'extraction, sur 35 composés volatils extraits (temps de rétention inférieur à celui du C<sub>18</sub>), 28 ont été identifiés. Ces composés possèdent globalement des notes puissantes, "verte", "florale" et "grasse", (Arctander, 1994). Six composés volatils sont majoritaires (% A.  $\geq$  1%) : l'hex-2-èneal (3,9%) donnant une odeur "verte puissante", la 2-(5H)-furanone (6,6%), l'acide dodécanoïque (3,0%) et l'acide tétradécanoïque (1,7%) ayant tout deux des notes "grasse" et "cireuse" et deux composés inconnus (IR = 1346 et 1381). Après 8h00 supplémentaires d'hydrodistillation, seulement 25 composés volatils ont été extraits. Les composés volatils majoritaires sont le furfural (1,0%) donnant des notes "épicée" et "cannelle", la 2-[5H]-furanone (5,8%), l'acide dodécanoïque (1,2%, "grasse") et l'acide tétradécanoïque (1,5%, "grasse"). L'huile essentielle générée lors de l'hydrodistillation s'appauvrit en composés volatils au cours de l'extraction. La fraction volatile (composés dont le temps de rétention est inférieur à celui du C<sub>18</sub>) est de 23,0% après 8h00 d'extraction et de 12,6% après 8h00 supplémentaires. Le pourcentage de certains composés participant à l'arôme global de l'extrait diminue notablement : l'hexanal (de 0,3 à 0,1%), l'hex-2-èneal (de 3,9 à 0,5), le nonanal (de 0,2 à 0) et le non-2-èneal (de 0,1 à 0). Une partie des composés volatils sont des aldéhydes, produits par des réactions d'oxydation et d'hydrolyse de composés par action de l'eau et du chauffage.

L'extrait obtenu est très riche en acides gras, lui conférant cet aspect solide à température ambiante: acides dodécanoïque (C<sub>12:0</sub>, T<sub>éb</sub> = 44°C, 3,0% après 8h d'extraction), tétradécanoïque (C<sub>14:0</sub>, T<sub>éb</sub> = 58,5°C, 1,7%), les acides hexadécanoïque (C<sub>16:0</sub>, T<sub>éb</sub> = 62,9°C) et linoléique (C<sub>18:2</sub>), étant les deux composés majoritaires de ces extraits, présents respectivement après 8h00 d'extraction, à 19,5% et 40,6% et après 8h00 supplémentaires, à 28,4% et 54,1% (Figure 9 et Tableau 11). La présence d'acide gras en quantité importante, confirme l'hypothèse d'hydrolyse de triglycérides, émise précédemment. D'après Akoh, (Akho et Min, 2002), comme dans le cas des bulbes, la formation d'hexanal (0,26% après 8h00 d'extraction), d'hexan-1-ol (0,15%) et du non-2-èneal (0,08%) provient de l'oxydation de l'acide linoléique au cours de l'extraction.

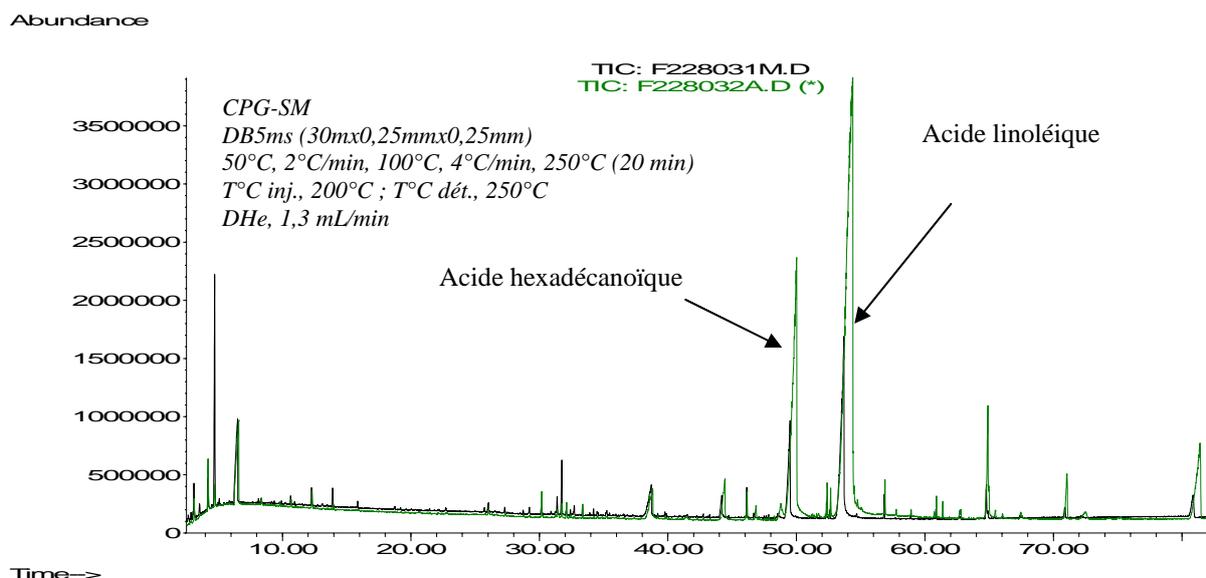


Figure 9. Chromatogrammes CPG-SM d'extraits au dichlorométhane issus de l'hydrodistillation de feuilles après 8h00 (noir) et après 16h00 (vert) d'extraction.

Tableau 11. Acides gras majoritaires (obtenus par CPG-SM, n=3) dans les extraits au dichlorométhane, issus de l'hydrodistillation de feuilles.

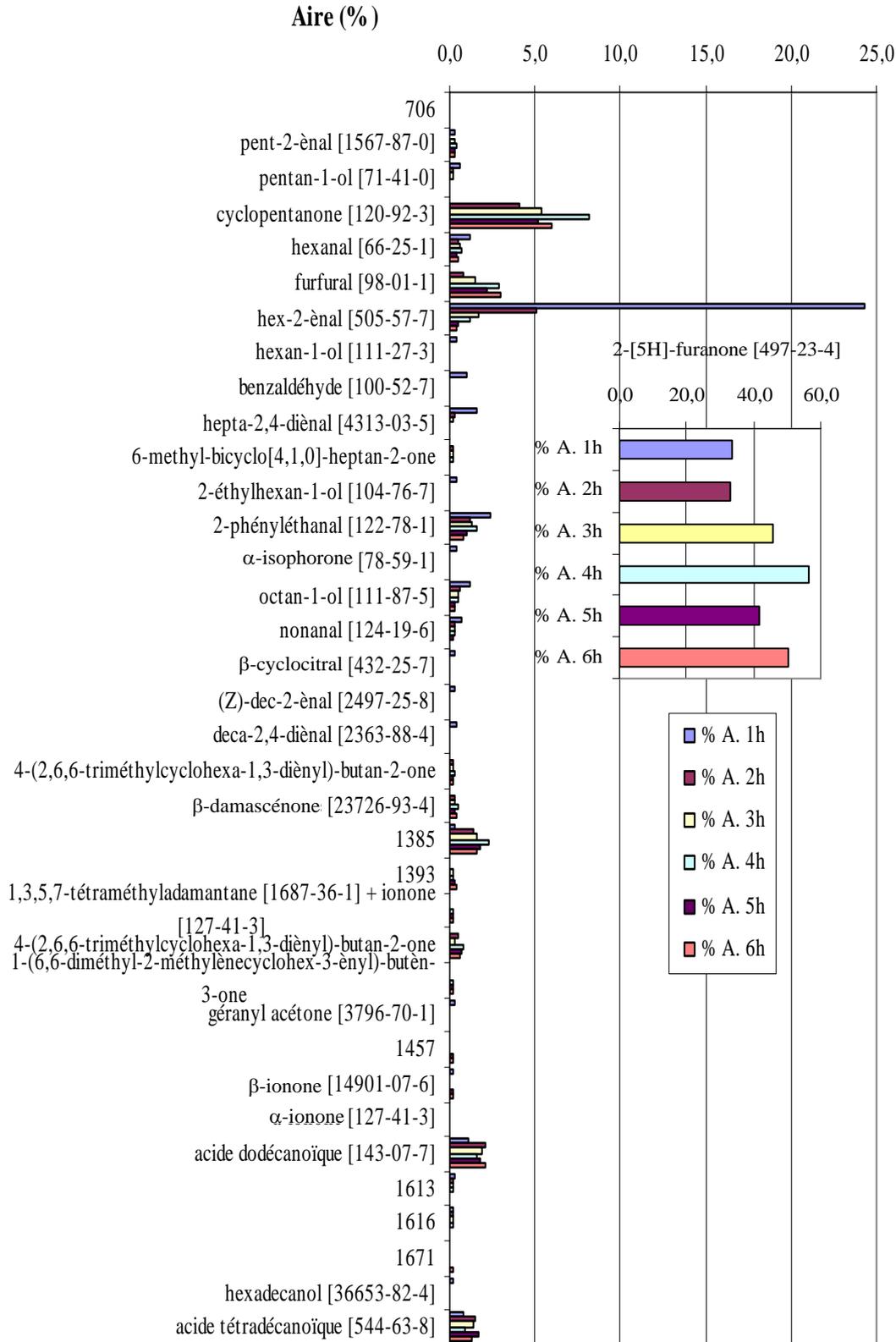
Acides gras majoritaires	Aire (%) 8h00	Aire (%) 16h00
Acides hexadécanoïque et linoléique	60	72
Ecart type	8	2

Le phytol (composé dont l'indice de rétention est supérieur à celui du C<sub>18</sub>), utilisé dans la synthèse des vitamines E et K et dans la parfumerie, est également présent dans les extraits à 0,3% et provient de l'hydrolyse de la chlorophylle des feuilles dans l'eau.

Les acides gras sont majoritaires devant les composés volatils dans cet extrait, notamment l'acide hexadécanoïque et linoléique.

### III.2.3.1.2. Cinétique d'hydrodistillation

Un suivi d'hydrodistillation a été réalisé afin d'étudier la cinétique d'extraction des composés volatils sur 6h00 (cf. V.3.3.2.3.2). L'huile essentielle a été extraite comme précédemment au cours de l'hydrodistillation (à t = 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h) et analysée par CPG-SM (Figure 10).



**Figure 10.** Composés volatils (obtenus par CPG-SM, n=3) de l'huile essentielle extraite par du dichlorométhane après hydrodistillation des feuilles à t = 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h. L'identification a été réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature. Les indices de rétention ont été calculés à partir des alcanes.

Au cours de cette hydrodistillation, 38 composés volatils ont été extraits. De nouveaux composés (10), supposés à l'état de traces dans les hydrodistillations de 8h00, ont été caractérisés, (Arctander, 1994): la 6-méthyl-bicyclo[4,1,0]-heptan-2-one, le 2-éthylhexan-1-ol ("sucré", "florale" et "rose"), l' $\alpha$ -isophorone ("piquante", "camphrée" et "lourde"), le  $\beta$ -cyclocitral, le (Z)-dec-2-ène ("puissante", "cire-orange" et "sucrée aldéhydique"), le déca-2,4-diène ("puissante", "orange" et "fraîche citronnée"), l' $\alpha$ -ionone ("boisée" et "chaude") et trois composés inconnus (I.R = 1385, 1616 et 1671), le 2-éthylhexan-1-ol étant un composé volatil majoritairement présent dans les fleurs et l' $\alpha$ -isophorone étant également extraite des stigmates.

L'hex-2-ène est le composé majoritairement extrait au cours de la première heure puisqu'il représente 24,3% de l'extrait total. Un enrichissement progressif au cours du temps est observé pour les composés majoritaires (% A.  $\geq$  1%) : la cyclopentanone, le furfural, la 2-[5H]-furanone, le 2-phényléthanal, un non-identifié (IR=1385) et les acides dodécanoïque et tétradécanoïque.

### **III.2.3.2. Composés volatils extraits par Likens-Nickerson (éther et pentane)**

L'hydrodistillation donnant très peu d'huile essentielle et sous forme solide, le Likens-Nickerson permet de caractériser les composés volatils présents dans les feuilles par extraction directe et sélective de ces derniers dans un solvant. Deux types de solvant ont été utilisés, l'éther diéthylique pour sa polarité (index de polarité de 2,8, (Burdick et Jackson, 1982)) et son faible point d'ébullition ( $T_{eb} = 35^{\circ}C$ ) et le pentane solvant apolaire ayant également un point d'ébullition bas ( $T_{eb} = 36^{\circ}C$ ). Le temps d'extraction moyen donné par la littérature étant de 2h00 (cf. Annexe I, 2.1.1), deux temps d'extraction ont été testés : 1h30 et 3h00. Le rapport solvant/eau a également été déterminé par les données bibliographiques (cf. Annexe I, 2.1.1). Le mode opératoire a été détaillé dans la partie expérimentale (cf. V.3.3.3.2). Les extraits limpides et très odorants ont été analysés par CPG-SM (Tableau 12).

Comme précédemment, l'ensemble de ces extractions montre une faible reproductibilité du fait de l'équilibre difficile à atteindre entre les vapeurs de solvant et celles de l'eau. Cependant, elles permettent de caractériser sélectivement les composés volatils présents dans les feuilles (sans les acides gras).

Tableau 12. Composés volatils (obtenus par CPG-SM, n=3) extraits des feuilles par Likens-Nickerson (éther diéthylique et pentane).

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	% A.	% A.	% A.	% A.
			pent. 1h30	pent. 3h00	eth. 1h30	eth. 3h00
<b>pent-1-èn-3-ol</b> [616-25-1]	683	57(100),55(30),84(2)	-	-	<b>6,82</b>	<b>5,80</b>
pentan-3-one [96-22-0]	700	57(100),29(60),43(30),86(20),100(2)	-	-	0,39	0,19
heptane [142-82-5]	701	44(100),81(98),57(40),96(38),53(30),86(5),100(2)	0,97	2,46	1,85	1,75
<b>pentan-3-ol</b> [584-02-1]	703	59(100),41(20),55(5)	1,28	1,59	<b>6,79</b>	<b>4,90</b>
pentan-1-ol [71-41-0]	730	55(100),42(80),70(79),86(2)	0,31	0,24	1,03	0,48
3-méthylbutan-1-ol [123-51-3]	734	55(100),70(80),42(78),41(75),69(30),71(5)	0,42	0,30	0,64	0,53
(E)-pent-2-ènal [1567-87-0]	752	55(100),83(70),84(68),39(60),41(55),85(2)	0,22	0,79	0,83	0,71
<b>771</b>	771	55(100),84(98),91(2),98(2)	-	0,54	<b>8,11</b>	<b>17,22</b>
<b>octane</b> [111-65-9]	800	41(100),69(40),55(35),85(5),98(2)	<b>11,78</b>	<b>10,70</b>	2,15	1,92
<b>hexanal</b> [66-25-1]	801	44(100),56(98),72(30),82(20),98(2)	<b>4,99</b>	<b>3,09</b>	<b>4,04</b>	<b>3,35</b>
810	810	43(100),45(60),61(30),73(28),207(2)	-	-	0,04	-
furfural [98-01-1]	831	96(100),95(98),39(60),67(10)	-	0,63	0,22	2,07
5,5-diméthyl-1-éthylcyclopenta-1,3-diène [496862-86-3]	841	107(100),91(60),122(30),105(10)	0,46	0,87	1,16	0,84
7-oxabicyclo[4,1,0]heptane [286-20-4]	843	55(100),41(90),83(85),69(70),97(10)	0,98	0,70	1,30	1,19
<b>hex-2-ènal</b> [6728-26-3]	852	41(100),55(80),69(75),83(60),98(20)	<b>52,24</b>	<b>40,49</b>	<b>38,69</b>	<b>32,60</b>
phénylétane [100-41-4]	859	91(100),106(30),55(20),69(18),103(5)	0,49	-	1,02	1,01
nonane [111-84-2]	899	557(100),43(90),68(50),84(48),128(5),98(4)	-	0,17	-	-
heptanal [111-71-7]	902	70(100),41(98),55(80),81(30),86(28),96(20)	0,54	0,54	0,46	0,33
3-méthylthiopropional [3268-49-3]	908	48(100),104(70),76(40),61(30),112(5)	-	0,07	-	-
<b>2-[5H]-furanone</b> [497-23-4]	911	55(100),84(60),95(5),110(2)	-	-	<b>6,95</b>	<b>5,36</b>
hept-2-ènal [18829-55-5]	956	41(100),55(80),83(75),97(5),112(5)	0,55	0,48	0,55	0,27
benzaldéhyde [100-52-7]	962	106(100),105(98),77(97),51(40)	-	0,11	0,04	-
6-méthylhept-5-èn-2-one [110-93-0]	983	43(100),55(30),69(28),71(27),108(25),126(5)	0,14	0,27	0,22	-
2-pentylfurane [3777-69-3]	988	81(100),82(30),53(20),138(18),109(5)	0,70	0,65	0,53	0,73
(E,E)-hepta-2,4-diènal [4313-03-5]	996	81(100),110(30),68(20),136(5)	0,39	0,54	0,60	0,38
octanal [124-13-0]	1002	41(100),43(98),57(80),55(78),84(60),100(30),10(20)	1,11	1,28	0,87	0,84
hepta-2,4-diènal (isomère) [5910-85-0]	1011	81(100),110(30),53(28),67(20),79(10)	0,37	0,79	0,71	0,18
1019	1019	68(100),124(20),81(10),105(8),109(5),150(2)	0,06	0,39	0,08	-
1036	1036	41(100),67(80),54(75),85(60),100(50),111(20),128(10)	0,08	0,65	0,09	-
<b>2-phénylétanal</b> [122-78-1]	1044	91(100),65(30),129(28),92(20)	<b>11,03</b>	<b>10,49</b>	<b>6,72</b>	<b>6,45</b>
2-éthyl-6-méthyl-1,5-heptadiène [10054-09-8]	1050	69(100),41(80),95(20),109(10),138(8),123(5)	0,16	0,25	0,17	-
oct-2-ènal [2548-87-0]	1058	82(100),41(90),55(80),70(75),91(50),138(10)	0,10	0,37	0,13	-
octan-1-ol [111-87-5]	1072	55(100),41(98),84(60),109(10),123(5)	0,16	1,02	0,51	-
terpinolène [586-62-9]	1085	93(100),121(98),136(80),79(50),105(30)	-	-	-	0,30
undécane [1120-21-4]	1098	57(100),43(80),71(60),85(40),98(5),156(4)	0,58	0,57	-	-
<b>nonanal</b> [124-19-6]	1104	57(100),41(80),70(40),98(38),82(35),124(5)	<b>6,75</b>	<b>4,34</b>	<b>3,66</b>	<b>2,95</b>
β-terpinéol [138-87-4]	1150	71(100),93(80),136(65),107(63),121(62),139(5)	-	-	-	0,28
non-2-ènal [2353-63-8]	1158	43(100),55(98),83(80),70(70),96(40),109(30),152(5)	-	0,15	-	-
α-terpinéol [10482-56-1]	1194	59(100),93(80),121(78),136(70),81(65),139(5)	-	-	0,16	2,53
dodécane [112-40-3]	1195	57(100),43(80),71(50),85(35),170(5)	0,64	0,41	-	-

$\gamma$ -terpinéol [586-81-2]	1198	121(100),93(60),136(50),107(20),154(5),150(2)	-	-	-	0,50
décanal [112-31-2]	1202	41(100),57(98),70(50),82(48),112(20),95(10),128(10)	0,49	0,53	0,29	-
$\beta$ -cyclocitral [432-25-7]	1218	137(100),152(90),109(88),123(85),81(80)	0,24	0,44	0,24	-
(E)-dec-2-ènal [3913-81-3]	1261	41(100),70(95),55(90),83(50),98(30),110(25),121(20)	0,64	0,72	0,46	0,28
1274	1274	43(100),84(50),87(10),127(6),99(5),110(4)	-	-	0,29	0,20
(E,Z)-déca-2,4-diènal [25152-83-4]	1295	81(100),41(30),67(28),121(10),152(9)	-	0,11	0,17	-
déca-2,4-diènal (isomère) [2363-88-4]	1319	81(100),41(30),67(28),121(10),152(9)	-	0,64	-	-
2,3-dihydro-1,1,4,6- tétraméthyl-1H-indène	1347	159(100),144(50),129(48),174(35),119(20),105(10)	-	0,49	-	-
undécanal [112-44-7]	1363	70(100),41(95),57(90),83(85),121(30),281(5),144(4)	-	0,18	-	-
trans- $\beta$ -damascènone [23726- 93-4]	1378	69(100),121(80),105(30),91(28),190(20)	0,05	1,32	0,18	0,87
1386	1386	159(100),91(80),105(78),119(75),131(30),174(10),192(5)	-	1,79	0,26	0,33
1409	1409	119(100),159(40),192(10),174(5),105(4),91(3)	-	0,94	-	-
géranylacétone [689-67-68]	1445	43(100),69(60),151(30),136(28),107(5),158(2)	0,15	0,40	0,26	-
1457	1457	43(100),57(80),71(75),121(35),105(20),192(5),190(8)	-	0,12	0,16	-
1475	1475	43(100),175(90),190(30),131(30),147(28),91(20),157(10)	-	0,07	-	-
$\beta$ -ionone [14901-07-6]	1478	177(100),43(20),91(10),135(10),159(5),192(2)	0,11	0,28	0,13	-
5,6-époxyde-trans- $\beta$ -ionone [23267-57-4]	1481	123(100),43(30),135(10),145(5)	-	0,12	-	-
acide dodécanoïque [143-07- 7]	1563	73(100),60(80),55(70),129(30),157(28),200(20)	-	1,42	0,19	0,94
1613	1613	43(100),97(60),111(50),85(48),137(40),165(10),223(5)	0,20	0,57	0,28	0,50
1616	1616	43(100),97(60),111(50),85(48),137(40),165(10),223(5)	0,37	0,72	0,55	0,70
1669	1669	57(100)71,(60)85(40),126(35),111(34),137(20),196(2)	-	0,07	-	-
tétradécanal [124-25-4]	1713	57(100),43(90),82(80),96(60),68(50),169(10)	-	0,09	-	-
acide tétradécanoïque [544-63-8]	1760	73(100),60(80),129(50),185(40),228(30),171(5)	-	0,16	-	0,10

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

Le profil général des extraits est le même pour les 4 types d'extraction. Le composé majoritairement présent est l'hex-2-ènal. Dans les extraits éthers (1h30/3h00), il constitue 38,7%/32,6% de l'ensemble des volatils et dans ceux au pentane 52,2%/40,5%, donnant une odeur "verte puissante" aux extraits. Le pourcentage tend à diminuer lorsque le temps d'extraction augmente, cette molécule semble être extraite dès la première heure de manipulation, fait également observé lors de l'hydrodistillation (cf. III.2.2.2.1). Les composés présents sont en grande partie des aldéhydes (21), formés par des réactions d'oxydation et d'hydrolyse lors du chauffage de la matière végétale dans l'eau, hypothèse formulée également lors de la caractérisation des volatils présents dans l'huile essentielle.

Avec l'éther diéthylique, 46 composés volatils ont été extraits après 1h30 alors que seulement 36 sont présents dans les extraits de 3h00, les deux extraits ayant 31 composés communs. Les composés volatils supplémentaires présents dans l'extrait d'1h30 présentent

des notes aromatiques intéressantes et plutôt "fraîches", (Arctander, 1994) : le benzaldéhyde (0,1%, "amande amère"), l'octan-1-ol (0,5%, "fraîche", "orange" et "grasse"), le décanal (0,3%, "puissante", "sucrée", "orange" et "grasse"), le  $\beta$ -cyclocitral (0,2%), le (E,Z)-déca-2,4-diène (0,2%, "puissante", "orange", "sucré" et "citronnée"), la géranylacétone (0,3%, "florale", "fraîche" et "sucrée") et la  $\beta$ -ionone (0,1%, "chaude" et "boisée"). Les composés majoritairement présents (% A.  $\geq$  2,5%) sont les mêmes pour les deux temps d'extraction et possèdent des notes "vertes" intenses : le pent-1-èn-3-ol (6,8% et 5,8%, "puissante" et "verte"), le pentan-3-ol (6,8% et 4,9%), un non-identifié (IR=772, 8,1% et 17,2%), l'hexanal (4,0% et 3,3%, "puissante", "verte" et "grasse"), la 2-[5H]-furanone (6,9% et 5,4%), le 2-phényléthanal (6,7% et 6,4%, "verte" et "piquante") et le nonanal (3,7% et 2,9%, "puissante", "grasse" et "florale"). Une extraction d'1h30 paraît être la plus appropriée, donnant un extrait caractérisé par une note globale "verte".

Les extraits au pentane d'1h30 comportent 35 composés contre 53 dans ceux de 3h00. Un temps d'extraction plus long permet l'obtention d'un plus grand nombre de composés volatils (notamment ceux de haut poids moléculaire, IR  $\geq$  1274) et d'un extrait aromatique différent avec la présence de composés volatils odorants supplémentaires tels que le furfural (0,6%, note "épicée" et "cannelle"), le benzaldéhyde (0,1%, note "d'amande amère"), le non-2-ène (0,2%, note "puissante" et "grasse type iris"), le déca-2,4-diène (0,6%, note "puissante", "orange", "sucré" et "citronnée") et le undécanal (0,2%, note "fruitée", "florale" et "cireuse").

L'extrait au pentane de 3h00 permet l'extraction d'un plus grand nombre de composés volatils. Cependant, l'éther extrait des composés plus polaires tels que la 2-[5H]-furanone et l' $\alpha$ -terpinéol et des molécules très volatiles telles que le pent-1-èn-3-ol et la pentan-3-one, son point d'ébullition étant légèrement inférieur à celui du pentane. Les deux types d'extraction sont donc complémentaires en vue de la caractérisation des composés volatils présents dans les feuilles, cette technique étant mieux adaptée car elle n'extrait pas les acides gras présents en grande quantité dans le milieu eau/feuille.

### **III.2.3.3. Concrète de feuilles**

L'huile essentielle de feuille étant difficilement extractible car présente en trop faible quantité et sous forme solide, mais possédant des notes "vertes" intéressantes, les composés présents dans les feuilles ont été extraits à froid, par macération (cf. V.3.3.4.2). L'extrait aromatique ainsi obtenu est non dégradé thermiquement et facilement utilisable car présent en plus grande quantité (une matrice de corps gras étant extraite simultanément). En vue d'une

caractérisation, l'éther diéthylique a été choisi pour sa polarité (index de polarité de 2,8, (Burdick et Jackson, 1982)) et son faible point d'ébullition. Trois temps de macération (sur trois lots de feuilles récoltés en 2003) ont été testés : 3, 5 et 7 jours, temps requis selon les données bibliographiques pour des feuilles (cf. Annexe I, 2.1.2).

Les rendements d'extraction en concrètes sont indiqués dans le Tableau 13.

**Tableau 13. Rendements d'extraction moyens en concrètes de feuilles par rapport à la matière sèche ( $H_r = 73,8\%$ ) en fonction du temps de macération dans l'éther diéthylique ( $n=3$ ).**

Solvant et durée d'extraction (jour)	Ether 3 jours	Ether 5 jours	Ether 7 jours
Rendements d'extraction moyens en concrète (%)	1,40	1,65	1,80
Ecart type	0,06	0,02	0,70

Le rendement d'extraction moyen en concrète est relativement élevé et augmente progressivement avec le temps de macération. De même que pour la macération des fleurs, un écart type important est observé pour la macération de 7 jours. Le contact de la phase organique avec une phase aqueuse, formée par dégradation de la matière végétale, engendrerait une solubilisation et/ou une dégradation de composés hydrosolubles, induisant ainsi un paramètre supplémentaire à l'origine des écarts perceptibles au cours d'extractions similaires et successives.

Le pouvoir aromatique des concrètes, ayant une odeur globale "verte" très intense, a été évalué note par note distinctement par CPG-SM/ODP par un juge qualifié (cf. V.3.3.4.2.2). Parmi les trois extraits réalisés pour chaque temps de macération, 3, 5 et 7 jours, les extraits les plus riches en composés volatils ont été sélectionnés pour réaliser cette analyse. Les composés odorants étant pour la plupart détectés à l'état de traces par CPG-SM, leur identification a été délicate. L'intensité des pics odorants a été notée sur une échelle allant de 0 à 5 et les notes perçues ont été décrites par le juge.

Les concrètes, effectuées à partir de trois lots de feuilles pour chaque temps de macération, ont été également diluées dans du dichlorométhane et analysées par CPG-SM afin de les caractériser (cf. V.3.3.4.2.3). Seule l'identification des composés les plus volatils (dont le temps de rétention est inférieur à celui du  $C_{18}$ ) a été étudiée. Elle s'est avérée délicate, surtout concernant les composés les plus lourds ( $IR \geq 1540$ ).

Les résultats ont été regroupés dans le Tableau 14.

Tableau 14. Résultats des analyses par CPG-SM/ODP (n=3) de la fraction volatile présente dans les extraits de feuilles issus de macération dans l'éther diéthylique (3 jours, 5 jours et 7 jours).

Pics <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Fragments de masse [m/z (%)]	Odeurs perçues <sup>d</sup>	% A. 3j	% A. 5j	% A. 7j
Pic 1	2-[5H]-furanone [497-23-4]	931	55(100),84(55),28(25),39(5),29(5),18(1)	cacahouète grillée	2,75	2,88	4,47
Pic 2	-	992	-	champignon	nd <sup>e</sup>	nd	nd
-	hepta-2,4-diéнал [5910-85-0]	1015	28(100),81(45),39(5),53(3),79(1),91(1),110(1)	-	0,00	0,06	0,07
-	2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]	1045	28(100),57(65),41(7),70(5),18(2),83(1),98(1)	-	0,06	0,00	0,30
Pic 3	2-phényléthanal [122-78-1]	1081	91(100),120(20),65(10),92(5),89(3)	miellée, florale	- <sup>f</sup>	-	-
Pic 4	2-phényléthanol [60-12-8]	1132	28(100),90(70),122(15),65(3),18(2),103(1),41(1)	miellée, piquante	0,27	0,06	0,53
Pic 5	dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone [5469-16-9]	1180	28(100),44(74),74(10),18(5),55(5),102(3),45(1)	miellée, verte	61,29	63,09	56,45
Pic 6	-	1190	-	miellée, verte	nd	nd	nd
Pic 7	coumaran [496-16-2]	1225	120(100),91(50),65(10),94(5),121(2)	miellée, foin	-	-	-
Pic 8	acide 2-phénylacétique [103-82-2]	1251	91(100),136(30),92(20),95(5),120(1)	miellée	-	-	-
-	2-méthoxy-4-vinylphénol [7786-61-0]	1329	28(100),150(45),135(40),107(10)	-	0,13	0,15	0,19
-	(E,E)-déca-2,4-diéнал [25152-84-5]	1337	28(100),81(45),44(15),55(5),67(3),121(1),152(1)	-	0,04	0,05	0,06
-	1356	1356	71(100),125(45),96(43),110(20),41(15),27(3),83(1)	-	0,35	0,26	0,12
Pic 9	-	1364	-	foin, sucrée	-	-	-
-	2,6-diméthyl-octa-2,7-diène-1,6-diol [64142-78-5]	1381	43(100),71(80),55(45),93(10),137(1)	-	0,27	0,18	0,24
-	orcinol [504-15-4]	1425	124(100),123(60),95(15),39(10),69(10),27(1),107(1)	-	0,13	0,07	0,00
-	2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-méthyl-cyclohexa-2,5-diène-1-one [10396-80-2]	1475	165(100),57(90),43(50),137(40),193(10),236(2) 177(100),220(70),135(50),149(40),205(34),192(10)	-	0,69	0,35	0,58
-	2,6-bis-(1,1-diméthyléthyl)-cyclohexa-2,5-diène-1,4-dione	1540	28(100),93(40),32(30),234(5),149(1),219(1)	-	0,19	0,09	0,03
-	1567	1567	153(100),57(20),43(15),181(10),27(1),237(1)	-	0,14	0,04	0,00
-	1577	1577	193(100),43(55),73(20),60(20),109(15),12(10),208(1)	-	0,25	0,23	0,09
-	1588	1588	127(100),99(3),69(1),41(1),83(1),168(1),193(1)	-	0,22	0,10	0,11
-	[3S,5R,6R,7E,9Xi]-3,6-époxy-7-megastimène-5,9-diol	1615	43(100),109(45),208(35),125(30),99(10),55(15),166(1)	-	0,29	0,33	0,08
-	1630	1630	28(100),43(20),111(5),55(1),121(1),137(1),165(1)	-	0,06	0,02	0,00
-	1633	1633	43(100),97(75),111(50),137(40),81(10),121(1),165(7)	-	0,06	0,02	0,00
-	3-oxo- $\alpha$ -ionol [97-07-5]	1660	99(100),43(45),137(35),119(25),181(10),211(8),267(1)	-	0,46	0,21	0,69
-	1663	1663	108(100),137(60),43(50),57(45),182(15),219(5),267(1)	-	0,14	0,31	0,07
-	1687	1687	28(100),43(30),125(12),107(8),	-	0,15	0,40	1,37

			82(5),208(3),166(1)				
-	1703	1703	43(100),193(98),123(80),91(12), 147(7),55(6),208(1)	-	0,40	0,34	0,50
-	acide tétradécanoïque [544-63-8]	1778	28(100),73(15),60(15),129(2), 228(2),185(2),97(1)	-	0,12	0,11	0,06
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>					68,4	69,3	66,0

<sup>a</sup> pics odorants perçus lors du sniffing.

<sup>b</sup> identification réalisée à partir des indices de rétention, les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France), la littérature et les odeurs perçues.

<sup>c</sup> indice de rétention calculé à partir des alcanes, sur un pic détecté par CPG-SM ou par CPG-ODP.

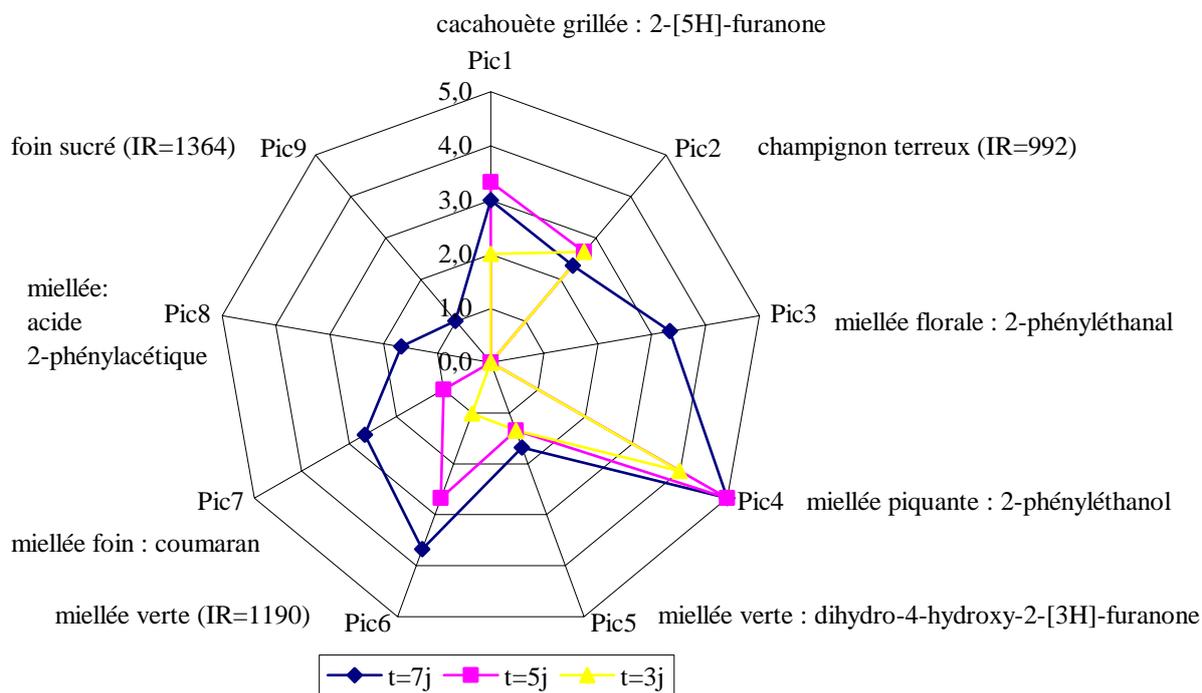
<sup>d</sup> descripteurs attribués lors du sniffing pour chaque pic odorant.

<sup>e</sup> nd, composé perçu lors du sniffing mais non-détecté en CPG-SM.

<sup>f</sup> - composé dont le pourcentage est inférieur au seuil de quantification fixé.

Les composés odorants sont des molécules légères et très volatiles ( $IR \leq 1364$ ). Les deux composés majoritairement extraits sont la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone (de 56,5 à 63,0%) et la 2-[5H]-furanone (2,8 à 4,5%). Ils donnent respectivement des notes "miellée verte" et "cacahouète grillée".

Neuf pics odorants, de type, "pyrogénés", "miellé", "piquant", "vert" et "foin", ont été détectés par CPG-SM/ODP, leur intensité variant avec le temps de macération (Figure 11).



**Figure 11.** Profils aromatiques des concrètes de feuilles réalisées dans l'éther diéthylique (obtenus par CPG-SM/ODP). L'identification a été effectuée à l'aide des indices de rétentions et les bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France). Seules les notes dont l'intensité moyenne perçue était  $\geq 0,7$  ont été prises en compte.

Cinq pics odorants sont présents dans les trois extraits : pic 1, "cacahouète grillée" (2-[5H]-furanone), pic 2, "champignon terreux" (IR = 992), pic 4, "miellée piquante" (2-phényléthanol) et pics 5 et 6, "miellée verte" (dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone, IR = 1190). La note "miellée piquante", donnée par le 2-phényléthanol, est beaucoup plus intense (intensité : 4, 5 et 5) que la note "miellée verte" caractéristique de la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone (1,3, 1,3 et 1,7), quel que soit l'extrait, bien que son aire absolue soit très faible par rapport à celui de la furanone. Le 2-phényléthanol possède donc un seuil de perception beaucoup plus bas (Devos, 1990), que la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone. Une note "verte" est perçue à deux reprises, au cours de l'évaluation olfactométrique, avec une note "miellée" de fond (pics 5 et 6), confirmant la perception odorante globale de l'extrait.

Le nombre de notes croît avec le temps de macération ainsi que l'intensité totale résultante (Tableau 15).

**Tableau 15. Nombre de notes et intensité totale résultante perçus dans les concrètes de feuilles par CPG-ODP.**

<b>Durée (jour)</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
Nombre de notes	5	6	9
Intensité totale	12	16	24

L'augmentation du temps de macération implique la perception de notes supplémentaires "miellée" et "foin" s'intensifiant au cours du temps (pic 3, 2-phényléthanol ; pic 6, IR = 1190 ; pic 7, coumaran ; pic 8, acide 2-phénylacétique et pic 9, IR = 1364) tandis que les pics 1, "cacahouète grillée" (2-[5H]-furanone), 2, "champignon terreux" (IR = 992) et 4 "miellée piquante" (2-phényléthanol) en sont indépendants.

La fraction volatile est relativement importante dans les feuilles et évolue peu avec le temps de macération : 68,4% pour l'extrait de 3 jours, 69,3% pour celui de 5 jours et 66,0% pour 7 jours. Le nombre de composés volatils totaux extraits est de 22 puis 21 et 19. Une légère diminution a été observée avec l'augmentation du temps de macération, mais elle n'est pas significative. L'augmentation puis la diminution de la fraction volatile en fonction du temps de macération, observés également pour les concrètes de fleurs, peuvent être expliquées par différents phénomènes. Dans le cas des feuilles, trois jours est un temps de macération court ne permettant pas d'extraire la totalité des composés volatils. Cependant, sept jours de macération entraînent d'une part la formation d'une phase aqueuse provenant de la

dégradation des feuilles et solubilisant des composés volatils hydrophiles et d'autre part l'extraction de composés plus lourds.

La caractérisation aromatique des concrètes de feuilles a permis de mettre en évidence en fonction du temps de macération :

- Une dégradation des feuilles et la formation d'une phase aqueuse dans le milieu à partir de 5 jours.
- Une augmentation du rendement.
- Quatre notes indépendantes et décelées dans tous les extraits : "cacahouète grillée" (2-[5H]-furanone), "champignon terreux" (IR=992), "miellée piquante" (2-phényléthanol) et "miellée verte" (dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone).
- Une évolution aromatique vers des notes "foin" et "miellée" (2-phényléthanol, IR=1190, coumaran, acide 2-phénylacétique et IR = 1364).
- Une évolution de la fraction volatile (les deux composés majoritaires étant la 2-[5H]-furanone et la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone), 3 jours étant trop court et 7 jours trop long, ces deux temps de macérations entraînant pour des raisons différentes une perte de la fraction volatile.

L'extraction de 5 jours est la plus appropriée car elle évite la formation d'une phase aqueuse importante, donne un rendement acceptable et la concrète résultante est aromatiquement intéressante.

#### **III.2.3.4. Conclusions de l'étude des composés volatils des feuilles**

L'étude des composés volatils présents dans la feuille a montré une composition de la fraction volatile différente selon la technique d'extraction utilisée. L'huile essentielle est riche en hex-2-èneal (3,9%, note "verte puissante") et en 2-[5H]-furanone (6,6%, note "cacahouète grillée"), l'extrait par Likens-Nickerson en hex-2-èneal (de 40,5 à 52,2%, note "verte puissante") et la concrète réalisée à l'éther diéthylique en dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone (61,3%, note "miellée verte"). L'huile essentielle étant obtenue en très faible quantité, seule la macération à froid permet d'obtenir un rendement d'extraction convenable (de 1,4 à 1,8%). La concrète obtenue après 5 jours de macération est aromatiquement intéressante. Elle possède une note "miellée piquante" intense donnée par le 2-phényléthanol. La valorisation aromatique des feuilles serait donc réalisée par l'extraction à froid de la matière végétale dans un solvant adapté à l'échelle industrielle tel que l'hexane.

### III.2.4. Conclusions de l'étude de caractérisation des fractions volatiles

La caractérisation de la fraction volatile des différents organes de la plante obtenue par hydrodistillation, a permis de mettre en évidence des composés communs à toutes les parties de la plante, fleur, feuille et bulbe, et rencontrés en quantités différentes et non négligeables, telles que l'hexanal, la 2-[5H]-furanone, les acides hexadécanoïque et linoléique (Tableau 16).

**Tableau 16. Composés (obtenus par CPG-SM) présents dans les fleurs, les feuilles et les bulbes.**

	% A. Fleurs	% A. Feuilles	% A. Bulbes
hexanal	0,4	0,3	2,8
2-[5H]-furanone	<b>15,1</b>	6,6	<b>28,4</b>
acide hexadécanoïque (C16:0)	0,8	<b>19,5</b>	<b>22,1</b>
acide linoléique (C18:2)	0,4	<b>40,6</b>	7,0

Les autres techniques d'extraction (SPME, Lickens-Nikerson) ont permis la caractérisation sélective des composés volatils. La fleur libère majoritairement le 2-éthylhexan-1-ol (79,2%), molécule également présente en quantité importante dans la fraction volatile intrinsèque de la fleur, à 81,5% dans les extraits Lickens-Nickerson éther et à 77,0% dans ceux à l'hexane. Ce composé donne des notes "douce", "sucrée", "florale" et de "rose". Dans la feuille, le composé volatil majoritairement extrait par le Lickens-Nikerson est l'hex-2-èneal (de 32,6% à 52,2%), possédant des notes "verte et puissante".

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle de ces deux co-produits de la culture du safran étant très faible, l'extraction des molécules aromatiques par macération à froid, peut être envisagée afin d'obtenir un rendement en concrète convenable et exploitable. La concrète de fleur semble être la plus intéressante à développer de part ses notes "miellée" et "florale", données par le 2-phényléthanol et le 4-hydroxyphényléthanol, mais les concrètes de feuilles libèrent également des notes "miellée" (2-phényléthanol) et "vertes" (4-hydroxy-2-[3H]-furanone) très puissantes. Cependant, les macérations dans ce type de solvant ne sont pas industrialisables. Une étude à l'échelle laboratoire de macérations dans l'hexane de ces deux organes ainsi que le passage à l'échelle pilote du procédé d'extraction sont présentés dans le chapitre IV.

### **III.3. CARACTERISATION DES COLORANTS LIPOSOLUBLES, DES FLEURS ET DES FEUILLES, DE TYPE CAROTENOÏDE**

Les molécules colorantes présentes dans les feuilles et les fleurs n'ont été que très peu étudiées et pourraient constituer une source de composés intéressants à valoriser. Dans la fleur seuls ont été extraits des anthocyanines et des flavonoïdes, (Norbek et Kondo, 1998), composés hydrosolubles, responsables de sa couleur violette. Les feuilles, quant à elles, coloraient autrefois le lait des vaches en jaune, (Algrech, 2001). Une étude des colorants liposolubles de type caroténoïdes (jouant un rôle essentiel d'initiateur de la photosynthèse et de photoprotecteur au sein des plantes), présents dans les fleurs et les feuilles, a donc été menée. Une extraction sélective des caroténoïdes a été réalisée sur ces deux co-produits de la culture du safran.

#### **III.3.1. Extraction des caroténoïdes**

Les caroténoïdes ont été extraits sélectivement des fleurs et des feuilles selon les protocoles préconisés par Britton et Harborne, (Harborne, 1984; Britton et al., 1995). Après extraction de la matière végétale par macération à froid dans l'acétone, les colorants sont extraits par de l'éther diéthylique. La chlorophylle et les esters de caroténoïdes, présents dans l'extrait, sont alors saponifiés par de la potasse (cf. V.4.3.1). La fraction insaponifiable restante est de couleur rouge-orangée et par dilution tend vers le jaune, caractéristique des caroténoïdes. Le rendement de ces deux extraits a été donné à titre indicatif car ils n'ont été réalisés que dans un but de caractérisation.

*Tableau 17. Rendement par rapport à la matière sèche des extraits sélectifs de caroténoïdes présents dans les fleurs et les feuilles.*

	Caroténoïdes fleurs	Caroténoïdes feuilles
<b>Rendement (%)<sup>a</sup></b>	0,2	1,1

<sup>a</sup> extraction réalisé sur 35g de fleurs fraîches et 100g de feuilles congelées.

Un meilleur rendement a tout de même été observé pour l'extrait de feuilles.

#### **III.3.2. Caractérisation des caroténoïdes**

Les extraits de feuilles et de fleurs ont été analysés par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance), puis par CLHP-SM et par TOF (Time Of Flight) afin de déterminer leur profil analytique, la masse et la structure des caroténoïdes et de comparer la composition colorante des extraits de feuilles et de fleurs. Les modes opératoires ont été détaillés dans la partie expérimentale (cf. V.3.4.2).

### III.3.2.1. Profil analytique

Les extraits, dilués dans de l'acétonitrile, ont été analysés par CLHP, muni d'un détecteur à barrette de diodes, à la longueur d'onde caractéristique des caroténoïdes ( $\lambda=450$  nm).

#### III.3.2.1.1. Extrait de fleurs

Le chromatogramme de l'extrait sélectif des caroténoïdes de fleurs contient sept pics, dont quatre sont intenses, entre 30 et 35 min d'analyse, pour une composition en éluant très apolaire, (% acétonitrile entre 90% et 95%), (Figure 12).

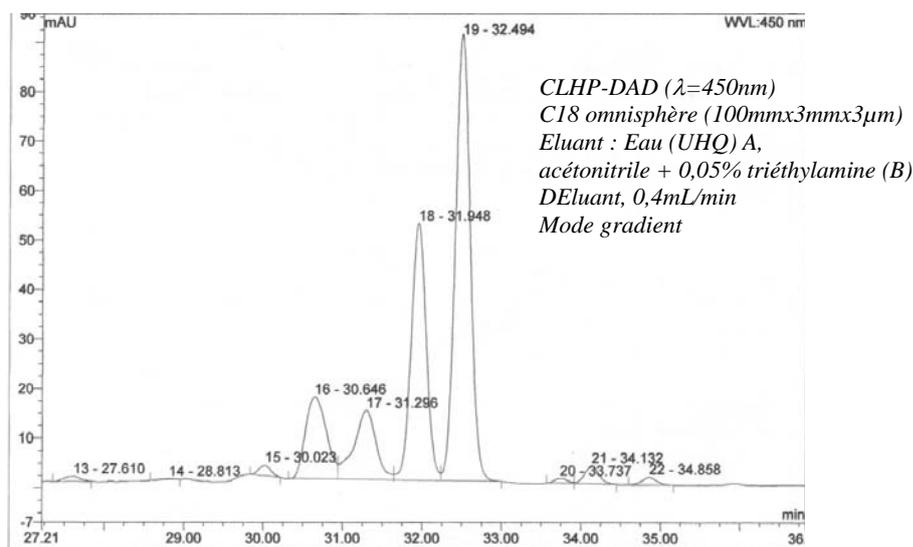


Figure 12. Chromatogramme de l'extrait sélectif des caroténoïdes des fleurs, obtenu par CLHP à  $\lambda = 450$  nm.

Les spectres d'absorption en UV-Visible obtenus pour chaque molécule sont indiqués dans le Tableau 18. Ces spectres sont typiques des caroténoïdes et sont peu différents les uns des autres. Les courbes des spectres d'absorption des pics 4 et 5 (pics les plus intenses) ont été illustrées Figure 13, à titre d'exemple.

Tableau 18. Spectres d'absorption en UV-Visible des molécules détectées à  $\lambda = 450$  nm par CLHP avec un détecteur à barrette de diodes dans l'extrait de fleurs.

Pics	Temps de rétention	Spectres UV-Visible
1	30,02	415 sh ; 435,0 ; 460,9
2	30,64	273,4 ; 415 sh ; 436,5 ; 461,2
3	31,30	332,5 ; 415 sh ; 440,7 ; 466,4
4	31,95	415 sh ; 441,7 ; 468,8
5	32,49	268,8 ; 420 sh ; 446,6 ; 473,6
6	34,13	Signal trop faible
7	34,86	Signal trop faible

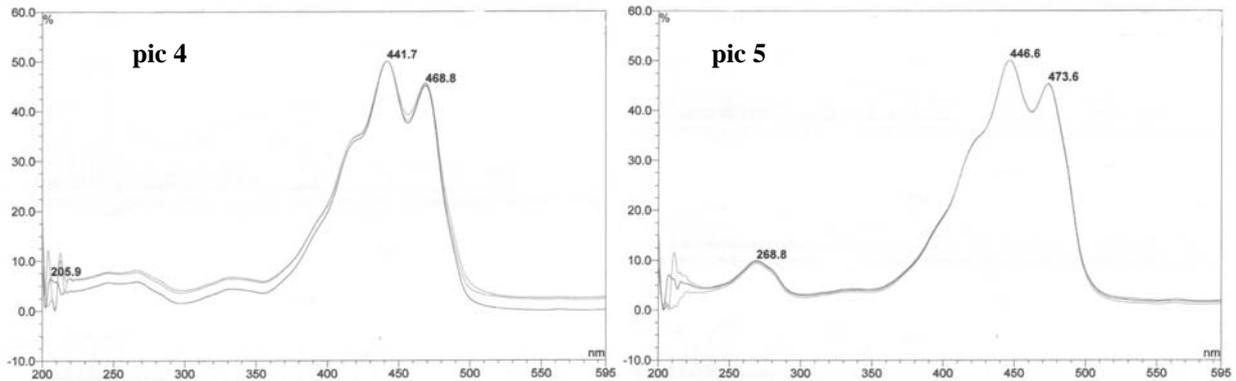


Figure 13. Spectres d'absorption en UV-Visible des pics 4 et 5, obtenus par CLHP avec un détecteur à barrette de diodes.

L'extrait sélectif des caroténoïdes présent dans les fleurs semble être composé d'un groupe de molécules de structures très proches et ayant des spectres d'absorption semblables.

### III.3.2.1.2. Extrait de feuilles

L'extrait sélectif des caroténoïdes présents dans les feuilles a été analysé par CLHP. Huit pics ont été détectés sur le chromatogramme dont trois sortent à des temps de rétention très courts (de 6,3 à 7,2 min) avec un éluant à 80% d'acétonitrile et cinq à des temps plus grands (de 17,6 à 22,0 min), l'éluant étant constitué de 95 à 100% d'acétonitrile (Figure 14).

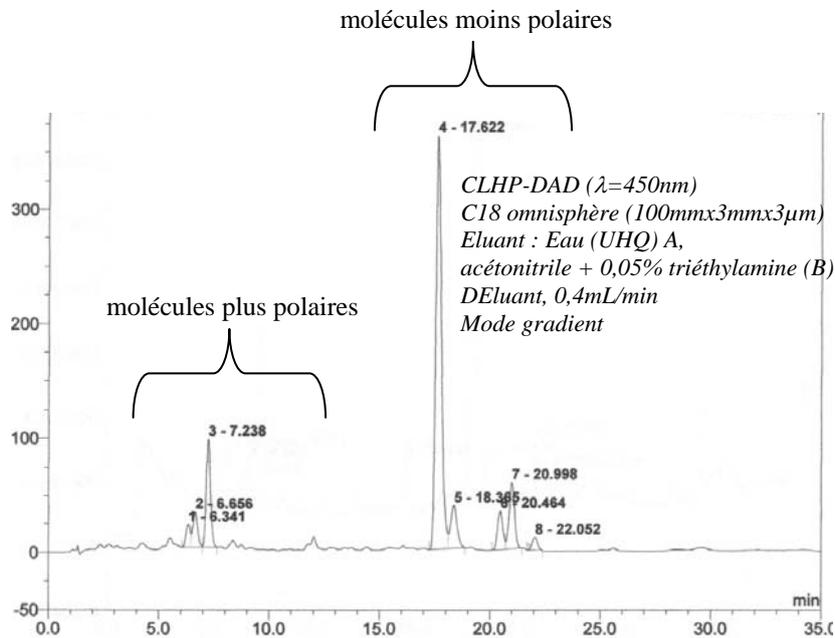


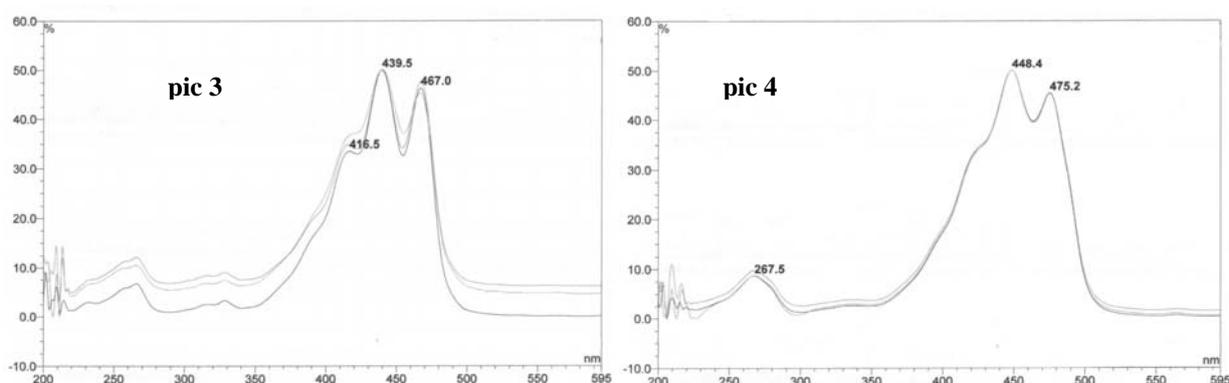
Figure 14. Chromatogramme de l'extrait sélectif des caroténoïdes des feuilles, obtenu par CLHP à  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

Les spectres d'absorption en UV-Visible obtenus pour chaque molécule sont indiqués dans le Tableau 19. Ils sont caractéristiques des caroténoïdes. Les spectres obtenus pour les

pics 1, 2 et 3 sont légèrement différents des autres. Les courbes des spectres d'absorption des pics 3 et 4 (pics majoritaires) ont été illustrées Figure 15, à titre d'exemple.

**Tableau 19.** Spectres d'absorption en UV-Visible des molécules détectées à  $\lambda = 450$  nm par CLHP avec un détecteur à barrette de diodes dans l'extrait de feuilles.

Pics	Temps de rétention	Spectres UV-Visible
1	6,34	416,0 ; 436,9 ; 463,4
2	6,65	404,0 ; 425,4 ; 451,2
3	7,24	416,5 ; 439,5 ; 467,0
4	17,62	267,5 ; 448,4 ; 475,2
5	18,36	454,0 ; 478,6
6	20,46	415 sh ; 444,5 ; 471,1
7	29,99	331,9 ; 415 sh ; 442,9 ; 469,7
8	22,05	346,1 ; 448,8 ; 473,5



**Figure 15.** Spectres d'absorption en UV-Visible des pics 3 et 4 obtenus par CLHP avec un détecteur à barrette de diodes.

Les caroténoïdes présents dans les feuilles semblent être de deux types. Des molécules plus polaires sortant en début d'analyse et des molécules plutôt apolaires sortant en fin d'analyse. Ces deux types de caroténoïdes ont des spectres d'absorption légèrement différents, notamment le pic 3 par rapport aux autres molécules.

### III.3.2.1.3. Etalons

Deux étalons, la zéaxanthine et la lutéine, ont été analysés par CLHP. Les temps de rétention, selon la méthode utilisée, sont situés entre 29 et 35 min pour les extraits de fleurs et entre 15 et 25 min pour les extraits de feuilles. Les spectres d'absorption en UV-Visible de ces deux molécules sont indiqués dans le Tableau 20 et illustrés Figure 16.

Tableau 20. Spectres d'absorption en UV-Visible des étalons détectés à  $\lambda = 450 \text{ nm}$  par CLHP avec un détecteur à barrette de diodes.

Composés	Spectres UV-Visible
zéaxanthine	277,4 ; 452,3 ; 477,8
lutéine	268,2 ; 446,0 ; 473,2

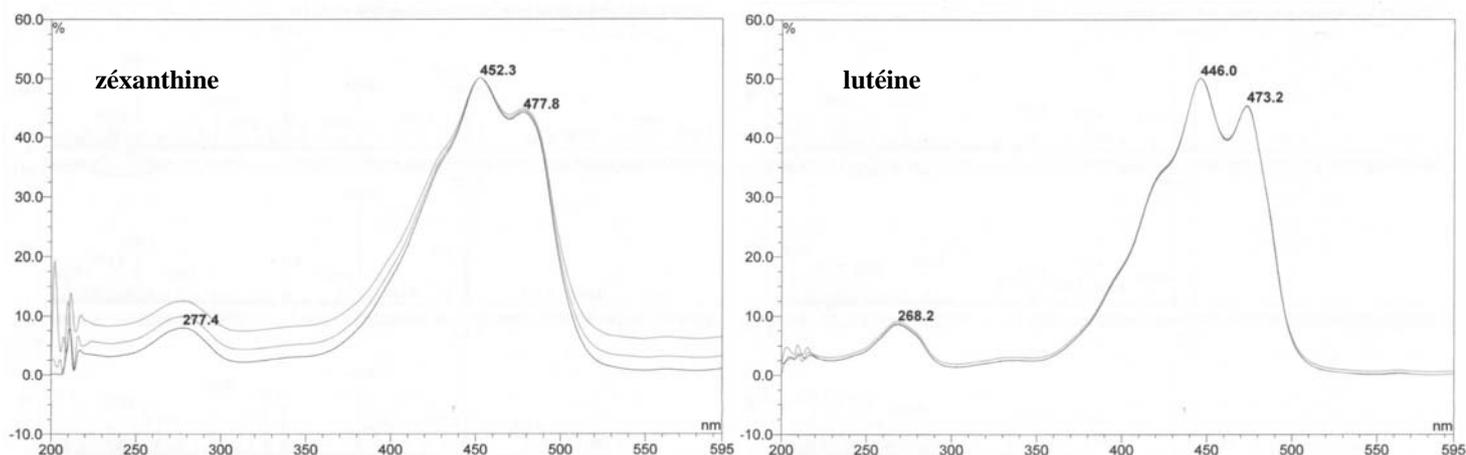


Figure 16. Spectres d'absorption en UV-Visible de la zéaxanthine et de la lutéine obtenus par CLHP avec un détecteur à barrette de diodes.

#### III.3.2.1.4. Conclusions

L'injection de deux étalons, la lutéine et la zéaxanthine, montre des temps de rétention, et des spectres d'absorption comparables à ceux obtenus pour les fleurs (pics de 1 à 7) et pour les feuilles (pics de 4 à 8). Les molécules présentes dans ces extraits auraient une structure et une polarité proche de ces étalons. Cependant, ces données ne permettent pas de conclure quant à l'identité des molécules présentes dans les extraits de fleurs et de feuilles. Du fait de la matrice des extraits et des molécules à analyser, une variation importante des temps de rétention a été observée.

Certaines structures de molécules, présentes dans les deux types d'extraits, semblent être proches. Les pics présents dans l'extrait de fleurs correspondent en temps de rétention aux molécules plutôt apolaires présentes dans les extraits de feuilles.

### III.3.2.2. Spectre de masse

Les extraits ont été analysés par CLHP-SM afin d'identifier les fragments moléculaires des composés présents de types caroténoïdes.

#### III.3.2.2.1. Extrait de fleurs

Les pics 1, 6 et 7 n'ont pu être détectés par CLHP-SM car l'intensité du signal était trop faible. Le fragment majoritaire présent dans les spectres de masse des pics de 2 à 5 est 551 (Tableau 21 et Figure 17).

Tableau 21. Fragments de masse des molécules présentes dans l'extrait sélectif des caroténoïdes de fleurs (pics de 1 à 7), à  $\lambda = 450$  nm, obtenus par CLHP-SM.

Pics	Temps de rétention	Fragments de masse [(m+H)/z]
1	-	-
2	14,34	407, 473, <b>551</b> , 569
3	15,10	425, 445, 469, 533, <b>551</b> , 569
4	15,96	425, 443, 503, 519, 533, <b>551</b> , 568, 569
5	16,82	441, 459, 519, 533, <b>551</b> , 567, 568, 569
6	-	-
7	-	-

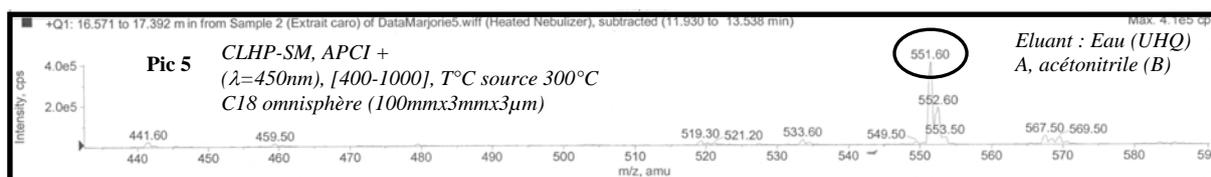


Figure 17. Spectre de masse du pic majoritaire (5) présent dans l'extrait sélectif des caroténoïdes des fleurs à  $\lambda=450$ nm, obtenu par CLHP-SM.

Les fragments de masse sont similaires pour les différents pics obtenus.

#### III.3.2.2.2. Extrait de feuilles

Le pic 8 n'a pas pu être détecté par CLHP-SM, le signal étant trop faible, et les pics 4 et 5 étaient coélus. Le fragment majoritaire est 583 pour les pics de 1 à 3 et 551 pour ceux de 4 à 7 (Tableau 22 et Figure 18).

Tableau 22. Fragments de masse des molécules présentes dans l'extrait sélectif des caroténoïdes de feuilles (pics de 1 à 8), à  $\lambda = 450$  nm, obtenus par CLHP-SM.

Pics	Temps de rétention	Fragments de masse [(m+H)/z]
1	6,30	409, 473, 565, <b>583</b> , 601
2	6,65	565, <b>583</b> , 601
3	7,12	565, <b>583</b> , 601
4		
5	17,55	441, 533, <b>551</b> , 567, 585
6	19,50	409, <b>551</b> , 567, 583
7	19,91	409, 477, <b>551</b> , 567
8	-	-

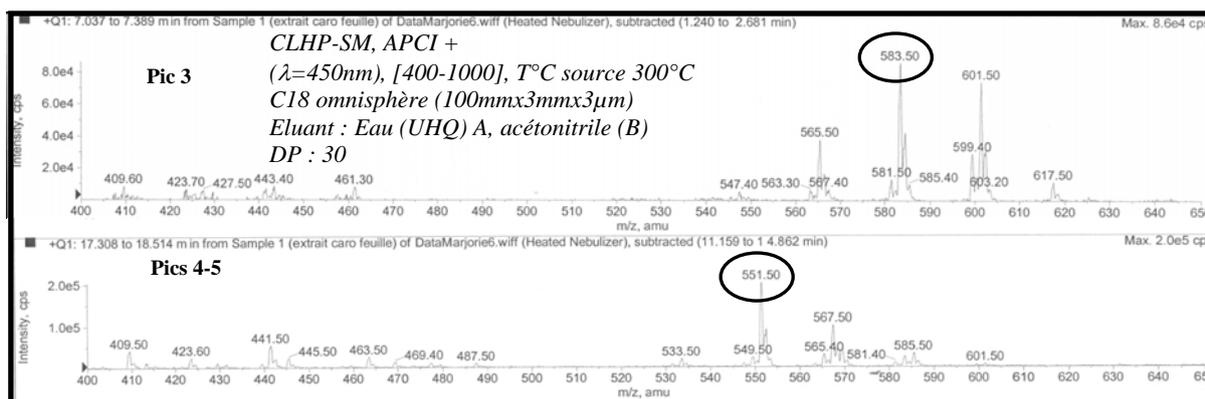


Figure 18. Spectres de masse des pics majoritaires 3 et 4-5 présents dans l'extrait sélectif des caroténoïdes des feuilles à  $\lambda=450\text{nm}$ , obtenus par CLHP-SM.

Les fragments de masse obtenus sont différents pour les deux groupes de pics (Figure 18). Il s'agirait donc de molécules de structures et de masses différentes.

### III.3.2.2.3. Etalons

L'analyse des étalons de lutéine et de zéaxanthine, par CLHP-SM, donne les spectres de masse indiqués dans le Tableau 23 et représentés sur la Figure 19.

Tableau 23. Fragments de masse des deux étalons (zéaxanthine et lutéine) obtenus par CLHP-SM.

Composés	Fragments de masse [(m+H)/z]
zéaxanthine	477, 551, 569, 585
lutéine	459, 533, 551, 569

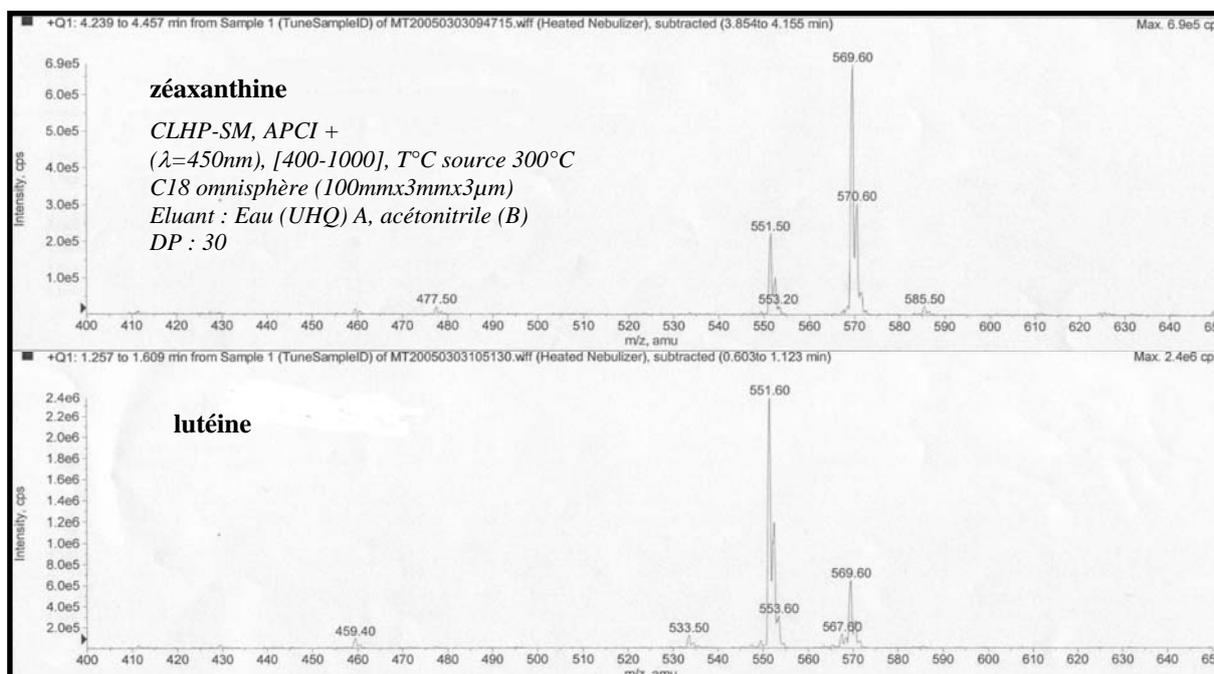


Figure 19. Spectres de masse de la zéaxanthine et de la lutéine obtenus par CLHP-SM.

La structure de ces molécules de masse  $M = 568 \text{ g.mol}^{-1}$ , donne par déshydratation le fragment 550 ( $M-H_2O$ ), soit 551 ( $M+H$ ) détecté par CLHP-SM.

#### **III.3.2.2.4. Conclusions**

Les fragments de masse caractéristiques des caroténoïdes présents dans les extraits sont 551 et 583. La lutéine et la zéaxanthine présentent toutes deux le fragment 551, ainsi qu'un grand nombre de caroténoïdes, (Britton et al., 2004). Cette analyse n'est donc pas suffisante pour conclure quant à la masse ou l'identification des caroténoïdes extraits des feuilles et des fleurs. L'analyse de la masse exacte de ce fragment, présentée dans le paragraphe suivant (cf. III.3.2.3), permet de déterminer la formule brute de la molécule correspondante.

#### **III.3.2.3. Masse exacte et dosage**

L'analyse des échantillons par TOF permet d'évaluer la masse exacte d'un fragment moléculaire donné afin d'en déterminer la formule brute. Cette molécule peut être dosée de manière approximative si le fragment caractéristique est suffisamment intense.

##### **III.3.2.3.1. Formule brute**

Les recherches des masses exactes 551 et 583, ont été réalisées avec une marge d'erreur de 50 ppm dans les extraits concernés.

##### **III.3.2.3.1.1. Extrait de fleurs**

L'analyse de l'échantillon par TOF n'a pas pu avoir lieu sur l'extrait de fleurs, le bruit de fond étant trop important. Cependant, l'analyse d'un autre extrait de fleur (extraction réalisée au cyclohexane suivie d'une saponification) donne le même profil CLHP et le même fragment de masse caractéristique que l'extrait sélectif des caroténoïdes (cf. IV.2.2.2.2). Elle permet alors de conclure sur la recherche de la masse exacte. Aux vues de la parité de l'ion et de l'abondance isotopique mesurée en spectrométrie de masse, seules deux formules peuvent être retenues avec une marge d'erreur de 10 ppm :  $C_{40}H_{55}O$  et  $C_{36}H_{55}O_4$ . Compte tenu de la polarité de la molécule (proche de celle des deux étalons, lutéine et zeaxanthine, cf. III.3.2.1.4), seule la formule ( $M-H_2O+H$ )  $C_{40}H_{55}O$  correspondrait. Elle équivaut à la formule brute  $C_{40}H_{56}O_2$ .

##### **III.3.2.3.1.2. Extrait de feuilles**

L'analyse de l'échantillon par TOF a pu être faite, le bruit de fond étant faible dans cet extrait. La recherche de masse exacte de 551,4201 a été réalisée avec une marge d'erreur de 50 ppm. Huit réponses ont été obtenues pour cet échantillon. Selon la parité de l'ion et

l'abondance isotopique, deux formules correspondent avec une marge d'erreur de 10 ppm :  $C_{40}H_{55}O$  et  $C_{36}H_{55}O_4$ . La molécule étant peu polaire (polarité proche des étalons, lutéine et zéaxanthine, cf. III.3.2.1.4), seule la formule (M-H<sub>2</sub>O+H)  $C_{40}H_{55}O$  est possible. Elle équivaut à la molécule  $C_{40}H_{56}O_2$ .

La recherche de la masse 583,4376 a également été effectuée. Une masse de 583,4151 pourrait être retenue avec une marge d'erreur de 22 ppm, compte tenu de la faible intensité du fragment. La formule  $C_{40}H_{55}O_3$  correspondrait à cette masse. Cette formule (M-H<sub>2</sub>O+H) correspond à la molécule  $C_{40}H_{56}O_4$ .

Dans l'extrait de fleurs, les molécules de type caroténoïde, présentes auraient une masse moléculaire de 568 et correspondrait à la formule brute  $C_{40}H_{56}O_2$ . Dans les extraits de feuilles, deux types de caroténoïdes seraient présents, un de masse moléculaire 568 et de formule brute  $C_{40}H_{56}O_2$  et un plus polaire, de masse 600 et de formule brute  $C_{40}H_{56}O_4$ . La formule, commune aux deux extraits, correspond à celles de la lutéine et de la zéaxanthine. Cependant, cette méthode d'analyse ne permet pas de conclure quant à l'enchaînement des groupements dans la molécule.

#### **III.3.2.3.2. Dosage d'un des caroténoïdes majoritaires**

Le dosage du fragment 551, majoritaire, n'a pu être effectué que dans l'extrait de feuille, l'extrait de fleur ayant un bruit de fond trop important. Ce fragment a été dosé par calibration externe à l'aide de la lutéine. L'effet matrice (impact des autres molécules présentes dans l'extrait sur la réponse de la lutéine) a été évalué dans l'extrait. Le signal est diminué de 50%. La réponse du fragment sur 10 scans est de 147. L'ordre de grandeur du caroténoïde de formule  $C_{40}H_{56}O_2$  est de 0,0568 mg dans l'extrait sélectif de feuilles réalisé à partir de 16,6 mg. Ce caroténoïde est présent à 0,34% dans l'extrait de feuilles.

#### **III.3.3. Conclusions**

Les extraits végétaux sont très difficiles à analyser car ils sont constitués de nombreux composés qui génèrent un bruit de fond très important. Les caroténoïdes saponifiés présents dans les fleurs sont de types  $C_{40}H_{56}O_2$  et ont une masse de 568. Ceux contenus dans les feuilles correspondent à des molécules plus polaires de type  $C_{40}H_{56}O_4$ , de masse 600, présents en faible quantité et à des molécules moins polaires,  $C_{40}H_{56}O_2$ , de masse 568. D'après la littérature, (Harborne, 1984), les caroténoïdes présents dans les feuilles sont généralement : la lutéine, la zéaxanthine, la violaxanthine, la néoxanthine, la cryptoxanthine, le  $\beta$ -carotène et l' $\alpha$ -carotène à l'état de traces. Les caroténoïdes les plus polaires, présents dans l'extrait de

feuilles, ( $M = 600 \text{ g.mol}^{-1}$ ) pourraient être la violaxanthine et/ou la néoxanthine et les autres, communs aux deux extraits de feuilles et de fleurs ( $M = 568 \text{ g.mol}^{-1}$ ), la lutéine et/ou la zéaxanthine. Ces dernières molécules sont présentes à 0,34% dans l'extrait sélectif de caroténoïdes de feuilles soit un rendement d'extraction dans la feuille par rapport à la matière sèche de  $3,75.10^{-3}\%$ . Aucune étude à ce jour n'avait fait état de ces molécules dans les feuilles et les fleurs de safran.



La caractérisation des différents organes de la plante a permis de mettre en évidence des fractions moléculaires sources d'applications potentielles à partir des fleurs, des feuilles et des bulbes (Tableau 24).

**Tableau 24. Fractions valorisables des co-produits de la culture du safran et les perspectives d'applications.**

Co-produits	Fractions valorisables	Potentiels moléculaires	Perspectives d'applications
Bulbes	Amidon (56,4%)	-	Industrie des bioplastiques en tant que co-constituant de plastiques biodégradables (après traitement)
	Lipides (1%)	Acide linoléique (36,0%)	Industrie de la cosmétique
Fleurs & Feuilles	Concrètes étherées (Rdt : 2,9%, 1,6%) Extraits sélectifs de colorants liposolubles	Composés volatils Notes miellées <i>2-phényléthanol</i> Caroténoïdes Rouge-jaune <i>Xanthophylles</i> $C_{40}H_{46}O_2, C_{40}H_{56}O_4$	Extraction dans un solvant compatible avec l'extrapolation à l'échelle industrielle dans les domaines de la parfumerie ou de la cosmétique (concrète industrielle et formulation à base de néo-pigments)

Les bulbes de *Crocus sativus* possèdent une teneur élevée en amidon (56,4%). Après extraction, il pourrait être utilisé, comme dans le cas du maïs, comme matrice ou comme co-constituant en mélange avec d'autres thermoplastiques, tels que des polymères à base de monomères naturels, dans certains plastiques biodégradables commercialisés (Rouilly, 2002). En vue d'une éventuelle application, son extraction devra être réalisée à une température inférieure à celle de gélatinisation déterminée dans cette étude à 70°C. Les grains seraient ensuite extrudés ou mis sous pression afin de leur conférer des propriétés thermoplastiques. La fraction lipidique des bulbes est également intéressante pour l'industrie cosmétique de par

sa composition en acides gras, notamment avec l'acide linoléique (oméga-6), dont les effets biochimique et thérapeutiques sur la peau ont été prouvés par des études cliniques.

Les composés volatils présents dans les fleurs et les feuilles sont intéressants et pourraient être valorisés par extraction de la fraction volatile par macération. Le 2-éthylhexan-1-ol, responsable de notes "douce", "sucrée", "florale" et de "rose", est le composé volatil majoritairement libéré (79,2% dans les extraits SPME) et contenu par la fleur (55,7% dans l'huile essentielle et 77,0/81,5% dans les extraits Likens-Nickerson éther/hexane). Les concrètes de fleurs, réalisées à l'éther, possèdent des notes "miellée" et "florale" intenses, données par le 2-phényléthanol et le 4-hydroxyphényléthanol. Le rendement d'extraction pour un temps de macération de 60 min est de 2,9%.

Les composés volatils majoritairement extraits des feuilles sont différents selon le type d'extraction. L'hex-2-èneal (note "verte puissante") et la 2-[5H]-furanone (note "cacaouète grillée") sont présents respectivement à 3,9 et 6,6%, dans l'huile essentielle tandis que l'hex-2-èneal l'est de 40,5 à 52,2% dans l'extrait par Likens-Nickerson. La concrète, réalisée à l'éther, est riche en dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone (61,3%), responsable de notes "miellée verte" et possède également une note "miellée piquante" intense, donnée par le 2-phényléthanol. Le rendement d'extraction des composés volatils est légèrement inférieur à celui obtenu par macération des fleurs. Après 5 jours de macération, il est de 1,6%. L'extraction des composés volatils des fleurs et des feuilles a été effectuée par la suite dans un solvant compatible avec la production industrielle (cf. chapitre IV).

Selon l'étude des colorants liposolubles, de type caroténoïde, présents dans les fleurs et les feuilles, ces deux parties de la plante sont constituées de xanthophylles  $C_{40}H_{56}O_2$ , à  $3,75 \cdot 10^{-3}\%$  pour les feuilles ainsi que de molécules plus polaires en ce qui concerne les feuilles de formule,  $C_{40}H_{56}O_4$ . Les molécules hypothétiquement présentes seraient la violaxanthine et/ou la néoxanthine et la lutéine et/ou la zéaxanthine. Les extraits végétaux étant très difficilement analysables de part leur matrice complexe, seul l'isolement de ces molécules par chromatographie préparative et analyse des fractions obtenues par RMN, IR et analyse élémentaire permettrait de conclure quant à leur identification.

La valorisation des fleurs et des feuilles, par extraction des molécules aromatiques et colorantes par macération dans un solvant compatible avec l'industrie, est décrite dans le chapitre IV, à l'échelle laboratoire dans une étude préliminaire (macération à l'hexane) puis à l'échelle pilote (macération au cyclohexane), afin d'étudier l'extrapolation du procédé d'extraction et d'obtenir des extraits en quantité suffisante en vue d'explorer de nouvelles applications.

## **Références bibliographiques**

- Akho C. et Min D. (2002). "Food lipids". Dekker, M. New York.
- Algrech C. (2001). "Le safran du Quercy." *Revue Quercy recherche*, 97 et 98 (1-2-4): 20-27;9-16;18-26.
- Arctander S. (1994). "Perfume and Flavor chemicals". Ed.Stream C. Allured Publishing Corporation. USA.
- Boehringer (1997). "Enzymatic bioanalysis". *Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis using test-combinations*. Boehringer Mannheim GmbH Biochemicals. Mannheim, Germany. 159.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (1995). "Carotenoids. Isolation and Analysis". Birkhauser Verlag. Boston.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (2004). "Handbook : Carotenoids". Ed.Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Burdick et Jackson (1982). "High Purity Solvent Guide". Burdick and Jackson Laboratories. Muskegon, Michigan USA.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1985). "Correlative changes in carbohydrate content and starch hydrolyzing enzymes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 180 (1): 55-61.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1988). "Correlative changes in nitrogen fractions, proteins, protease activity and nucleic acids in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Acta Physiol. Plant.*, 10 (3): 247-255.
- Craig S. A. S., Stark J. R., Dhar D. N. et Tiwari U. K. (1985). "Studies on starch from indian crocus." *Starch/Stärke*, 37 (7): 220-224.
- Devos M. (1990). "Standardized Human Olfactory Thresholds". Ed.Devos M., Patte F., Rouault J., Laffort P. et Van Gemert L. J. Oxford University Press. New York.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. et Smith F. (1956). "Colorimetric method for the determination of sugars and related substances." *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Eddaouiri M., Belanger A. et Benjilali B. (1993). "La verveine : effet de séchage du matériel végétal sur le rendement en huile essentielle et sa composition chimique". *2èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Dignes-Les-Bains, Instituto Tetrahedron. 713-726.
- Garnero F., Joulain D. et Buil P. (1978). "De l'influence du stockage des rhizomes d'Iris sur la composition de l'huile essentielle ou beurre d'iris et quelques constituants inédits." *Riv. Ital. EPPOS*, 60: 568-590.
- Harborne J. B. (1984). "Phytochemical Methods". Chapman & hall. New York.
- Loukis A., Al-Kofahi A. et Philianos S. (1983). "Etude des constituants des bulbes de *Crocus sativus* L." *Plant. méd. phytothér.*, 17 (2): 89-91.
- Mariotti J. P., Tomi F., Bernardini A. F., Costa J. et Casanovan J. (1993). "Etudes d'huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* L, cultivé en Corse". *12èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Digne-Les-Bains. 615-620.
- Navres Y. R. (1974). "Technologie et chimie des parfums naturels". Masson et Cie.

Norbek R. et Kondo T. (1998). "Anthocyanins from flowers of Crocus (Iridaceae)." *Phytochem.*, 47 (5): 861-864.

Raynal-Ioualalen R. (1996). "Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes.". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des Agroressources. Toulouse.

Rouilly A. (2002). "Nouveaux agro-matériaux composites à matrice protéique ou polysaccharidique : étude du fractionnement, de la transformation et de la mise en forme par extrusion et par injection-moulage de la pulpe de betterave et du tourteau de tournesol". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des Agroressources. Toulouse.

Sauvant D., Perez J. M. et Tran G. (2002). "Tables de compositions et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevages". INRA Editions Versailles. 304.



## Chapitre IV

# Valorisation des fractions aromatiques et colorantes des fleurs et des feuilles de *Crocus sativus*

## Chapitre IV Valorisation des fractions aromatiques et colorantes des fleurs et des feuilles de *Crocus sativus* .... 181

<b>IV.1. ETUDE PRELIMINAIRE A L'ECHELLE LABORATOIRE .....</b>	<b>181</b>
IV.1.1. Macération dans l'hexane à froid .....	181
IV.1.1.1. Les fleurs .....	181
IV.1.1.2. Les feuilles .....	187
IV.1.2. Comparaison avec une extraction dans du cyclohexane à chaud .....	191
IV.1.2.1. Les fleurs .....	192
IV.1.2.2. Les feuilles .....	194
IV.1.3. Conclusions .....	196
<b>IV.2. MACERATION A L'ECHELLE PILOTE .....</b>	<b>196</b>
IV.2.1. Procédés d'extraction.....	197
IV.2.1.1. Les fleurs .....	198
IV.2.1.2. Les feuilles .....	200
IV.2.1.3. Conclusions .....	201
IV.2.2. Caractérisation aromatique et colorante des extraits.....	202
IV.2.2.1. Fraction volatile.....	202
IV.2.2.2. Molécules colorantes liposolubles de type caroténoïde .....	207
IV.2.3. Fixation par voie thermique des molécules colorantes et étude de la photodégradation des néo-pigments à base de safran.....	215
IV.2.3.1. Mise au point du protocole de fixation des pigments sur l'argile .....	215
IV.2.3.2. Étude colorimétrique et résistance à la lumière .....	216
IV.2.3.3. Conclusions .....	221

## Chapitre IV Valorisation des fractions aromatiques et colorantes des fleurs et des feuilles de *Crocus sativus*

La caractérisation des composés volatils et des molécules colorantes liposolubles (caroténoïdes), présentée dans le chapitre précédent, a révélé des notes aromatiques et des molécules colorantes intéressantes, non encore étudiées, dans les fleurs et les feuilles de *Crocus sativus*. L'extraction des fractions aromatiques et colorantes pourrait être effectuée à froid dans un solvant en vue de leur valorisation.

Une étude préliminaire a été menée à l'échelle laboratoire afin d'évaluer le pouvoir aromatique d'extraits réalisés dans un solvant compatible avec un procédé industrialisable (hexane), et de déterminer les conditions optimales de macération. Une comparaison avec une extraction à chaud a permis de conclure quant à la validité du procédé. Les différentes étapes d'extraction à l'échelle pilote sont présentées ainsi que les caractérisations aromatiques et colorantes des extraits. Des premiers essais de néo-pigments à base d'extraits de fleurs et de feuilles ont été obtenus par fixation des molécules colorantes par voie thermique sur un support argileux. Une étude préliminaire de photodégradation a été menée sur ces poudres en vue d'applications colorantes dans le domaine de la cosmétique.

### **IV.1. ETUDE PRELIMINAIRE A L'ECHELLE LABORATOIRE**

Une étude préliminaire à l'échelle laboratoire a permis d'évaluer le pouvoir aromatique des extraits réalisés dans un solvant compatible avec un procédé industrialisable et d'optimiser les paramètres d'extraction (temps et rapport matière végétale/solvant, cf. V.3.3.4).

#### **IV.1.1. Macération dans l'hexane à froid**

Les macérations à l'échelle industrielle sont effectuées principalement dans l'hexane, solvant toxique mais très utilisé dans le domaine de la parfumerie car il permet d'extraire efficacement les molécules aromatiques, souvent apolaires.

##### **IV.1.1.1. Les fleurs**

Les fleurs de *Crocus sativus*, (70 g), ont été extraites par macération dans l'hexane. Quatre temps de macérations ont été testés, 15 min, 30 min, 60 min et 120 min, temps requis pour des fleurs fragiles comme celles du jasmin ou de la rose (cf. V.3.3.4.1.1). Les rendements d'extraction des concrètes dépendent du temps de macération et du solvant utilisé (Tableau 1).

**Tableau 1. Rendements d'extraction moyens des concrètes de fleurs (n=3) par rapport à la matière sèche (Hr = 85,5%) en fonction du temps de macération dans l'hexane, 15 min, 30 min, 60 min et 120 min.**

Solvant et Temps d'extraction (min)	Hexane 15 min	Hexane 30 min	Hexane 60 min	Hexane 120 min
Rendements moyens d'extraction (%)	1,70	1,80	2,10	2,04
Ecart type	0,30	0,10	0,20	0,02

Le rendement moyen d'extraction augmente légèrement avec le temps de macération pour se stabiliser à 60 min. Cependant, cette variation est peu significative aux vues des valeurs des écarts types. Les rendements d'extractions dans l'hexane sont légèrement inférieurs à ceux obtenus dans l'éther diéthylique (cf. III.2.2.2.3, Tableau 8). Cette différence peut provenir de la polarité du solvant et du mode de concentration de l'extrait. L'éther diéthylique étant plus polaire (index de polarité de 2,8, (Burdick et Jackson, 1982)) que l'hexane (0), il solubiliserait à la fois des molécules apolaires et polaires. Le séchage sous azote, effectué sur les extraits éthérés, étant moins poussé que celui sous pression réduite à T=48°C, réalisé sur les extraits dans l'hexane, limiterait la perte de composés volatils.

Une étude du pouvoir aromatique des concrètes a été menée sur des extraits provenant de fleurs récoltées en 2003, les temps de macérations étant de 15 min, 30 min et 60 min (cf. V.3.3.4.1.1). Une évaluation sensorielle globale a été menée par le parfumeur Pierre BERDOUES, caractérisant ces concrètes par des notes de "chaud" et "verte", cette dernière, potentiellement intéressante, croissant avec le temps de macération. Un temps de macération d'au moins 60 min est alors nécessaire afin d'obtenir une concrète suffisamment "verte". La note de "chaud" provient de la concentration de l'extrait effectué sous pression réduite mais à une température de 48°C.

Une fois repris dans de l'éthanol absolu afin d'éliminer les cires, les extraits ont été analysés par CPG-SM/ODP. Les zones odorantes des absolues ont été déterminées par un juge qualifié. Des descripteurs ont été attribués pour chaque pic odorant dont l'intensité a été évaluée sur une échelle allant de 0 à 5.

La caractérisation de la fraction volatile des concrètes (composés dont le temps de rétention est inférieur à celui du C<sub>18</sub>) a été effectuée par CPG-SM. Les extraits ont été réalisés à partir de trois lots de fleurs, récoltées en 2004, pour chaque temps de macération (15 min, 30 min, 60 min et 120 min, cf. V.3.3.4.1.2).

Les profils chromatographiques obtenus sont illustrés sur la Figure 1. Les résultats analytiques ont été regroupés dans le Tableau 2.

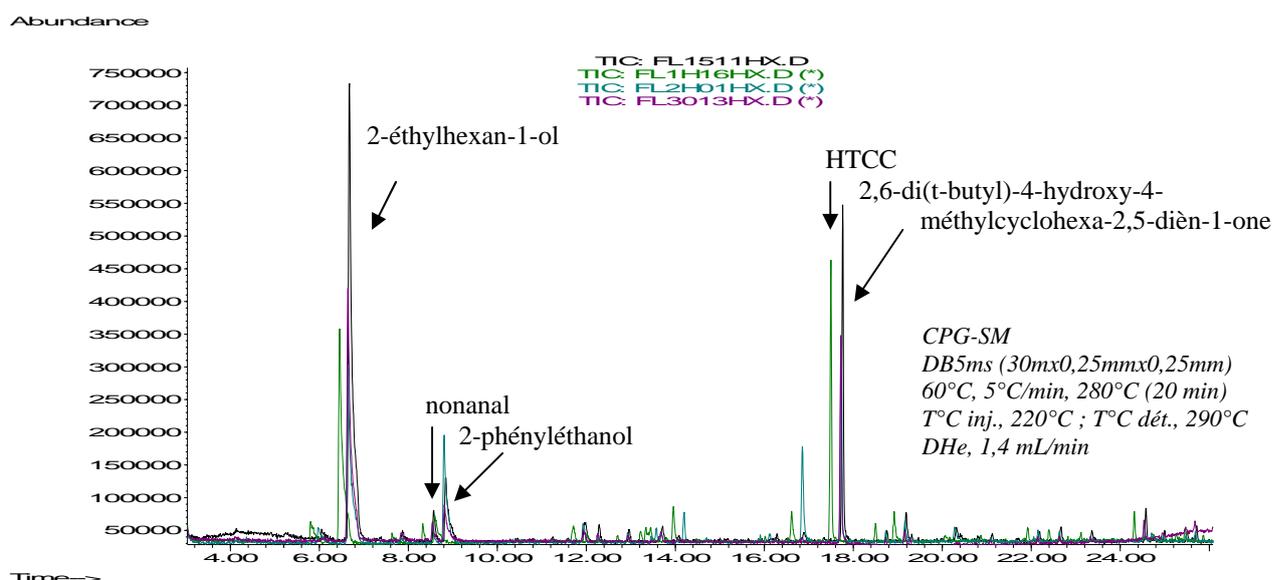


Figure 1. Chromatogrammes CPG-SM d'extraits issus des macérations de fleurs à froid dans l'hexane ( $t = 15$  min (noir), 30 min (violet), 60 min (vert) et 120 min (bleu)).

Tableau 2. Résultats des analyses par CPG-SM/ODP ( $n=3$ ) de la fraction volatile présente dans les concrètes de fleurs issues de macérations à l'hexane (15 min, 30 min, 60 min et 120 min).

Pics odorants <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Fragments de masse [m/z(%)]	Odeurs perçues <sup>d</sup>	% A. 15 min	% A. 30 min	% A. 60 min	% A. 120 min
Pic 1	hexanal [66-25-2]	810	44(100),56(80),57(60),72(35),82(20),67(15)	verte	- <sup>e</sup>	-	-	-
Pic 2	-	826	-	grillée	nd <sup>f</sup>	nd	nd	nd
Pic 3	-	880	-	cacahouète	nd	nd	nd	nd
Pic 4	heptanal [111-71-7]	906	44(100),70(70),55(60),57(45),81(20),86(10),96(5)	animale	-	-	-	-
Pic 5	oct-1-èn-3-ol [4312-99-6]	978	-	champignon	-	-	-	-
-	hepta-2,4-diéнал [4313-03-5]	1000	28(100),81(45),39(5),53(3),79(1),91(1),110(1)	-	-	-	0,09	0,06
Pic 6	-	1024	-	brûlée	-	-	-	-
-	2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]	1032	57(100),41(25),43(25),70(20),83(20),112(1),149(1)	-	<b>1,56</b>	<b>2,15</b>	<b>1,98</b>	<b>2,69</b>
Pic 7	undécane [1120-21-4]	1097	57(100),43(80),71(70),85(40),70(5),84(3),99(2),156(2)	brûlée	-	-	-	-
Pic 8	nonanal [124-19-6]	1113	57(100),41(70),69(40),82(35),98(35)	miellée, piquante	<b>0,05</b>	<b>0,09</b>	<b>0,11</b>	<b>0,08</b>
Pic 9	2-phényléthanol [60-12-8]	1121	91(100),122(25),65(15),39(5),77(2),103(1)	florale, miellée	<b>0,35</b>	<b>0,43</b>	<b>0,34</b>	<b>1,15</b>
Pic 10	-	1142	-	miellée, piquante	nd	nd	nd	nd
Pic 11	-	1164	-	miellée, fraîche	nd	nd	nd	nd
Pic 12	formiate de 2-phényléthyle [104-62-1]	1172	104(100),91(75),51(25),105(15),92(10),103(5),122(2)	verte, piquante	-	-	-	-
-	dihydrocarvéol [38049-26-2]	1236	93(100),55(98),107(95),41(85),141(45),16(25)	-	-	0,05	0,07	0,17
-	carvone [99-49-0]	1245	82(100),93(40),108(39),54(30),150(10),77(5)	-	0,04	0,03	-	-
-	déca-2,4-diéнал [2363-88-4]	1322	81(100),67(20),41(18),55(15),95(5),121(2),152(1)	-	0,02	-	0,10	0,11
-	4-hydroxy-2,6,6-triméthyl-cyclohex-1-èнал (HTCC) [35692-94-5]	1423	28(100),135(8),107(5),43(3),55(3),91(2),168(2),153(1)	-	-	0,05	0,16	0,37

-	2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-méthylcyclohexa-2,5-diène-1-one [10396-80-2]	1462	165(100),57(60),180(60),137(25),221(20),151(3),236(3)	-	0,99	1,02	0,95	0,95
-	1510	1510	72(100),45(45),170(45),127(10),56(3)	-	0,15	0,04	0,13	0,09
-	acide dodécanoïque [143-07-7]	1534	73(100),60(85),41(50),85(30),157(27),115(25),200(10)	-	-	0,04	0,05	0,04
-	1575	1575	108(100),119(60),149(45),192(20),91(15)	-	-	-	-	0,03
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>					<b>3,2</b>	<b>3,9</b>	<b>4,0</b>	<b>5,8</b>

<sup>a</sup> pics odorants perçus lors du sniffing.

<sup>b</sup> identification, des composés détectés lors du sniffing et de l'analyse CPG-SM, réalisée à partir des indices de rétention, des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France), de la littérature et des odeurs perçues.

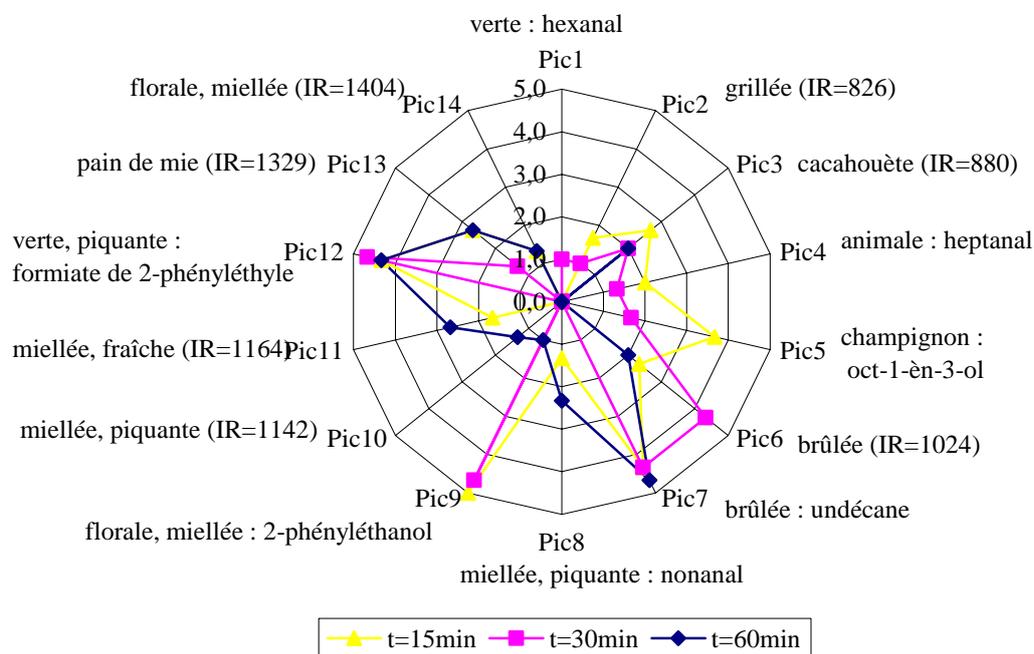
<sup>c</sup> indice de rétention calculé à partir des alcanes, sur un pic détecté par CPG-SM ou par CPG-ODP.

<sup>d</sup> descripteurs attribués pour chaque pic odorant lors du sniffing.

<sup>e</sup> - composé dont le pourcentage est inférieur au seuil de quantification fixé.

<sup>f</sup> nd, composé perçu lors du sniffing mais non-détecté en CPG-SM.

Les molécules ayant une activité odorante ont des indices de rétention faibles (IR < 1172) et sont particulièrement volatiles. Le 2-éthylhexan-1-ol, composé majoritairement extrait (de 1,6 à 2,7%) et responsable de notes "florale", de "rose" (Arctander, 1994a), n'a pas été perçu lors du sniffing son pouvoir olfactif massique étant faible (5,88, pour comparaison, celui du 2-phényléthanol est de 7,06, (Devos, 1990)). 14 pics odorants ont été détectés olfactivement, l'intensité perçue variant en fonction du temps de macération (Figure 2).



**Figure 2.** Profils aromatiques des absolues de fleurs issues de macération dans l'hexane, obtenus par CPG-SM/ODP (n=3). (L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétentions et des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France). Seules les notes dont l'intensité moyenne perçue  $\geq 0,7$  ont été prises en compte).

Les pics odorants les plus intenses sont "brûlée" (pic 7, undécane), "verte piquante" (pic 12, formiate de 2-phényléthyle) et "florale miellée" (pic 9, 2-phényléthanol). Cette dernière note a été perçue moins intensément dans la macération de 60 min. La note "brûlée" (pics 6 et 7) pourrait contribuer à la note de "chaud", décrite par le parfumeur, et le formiate de 2-phényléthyle (pic 12), décrite dans la littérature comme ayant des notes "puissante", "verte" et "herbacée", (Arctander, 1994a), à la note "verte". Cette dernière, très intense, constitue une note de queue susceptible d'être plus persistante que la note de tête "verte" générée par l'hexanal. La note "miellée" est présente dans plusieurs zones odorantes consécutives (pics 8, 9, 10 et 11). Le 2-phényléthanol donne une note "miellée" très intense, son pouvoir olfactif massique étant élevé, 7,06 (Devos, 1990) - et persiste donc en note de fond.

L'étude de ces concrètes en fonction du temps de macération montre peu d'évolution aromatique. La somme de l'intensité des notes perçues est décroissante (33,0 pour 15 min, 26,0 pour 30 min et 24,0 pour 60 min) tandis que le nombre de notes varie peu (10 pour 15 et 30 min et 12 pour 60 min). Les notes de tête, provenant de composés légers, ( $IR \leq 906$ , pics 2, 3 et 4, heptanal) sont intensément présentes dans l'extrait de 15 min, tandis que les notes de queues, données par des composés lourds (pic 10,  $IR = 1142$  et pic 11,  $IR = 1164$ ), le sont plus dans l'extrait de 60 min. La fraction volatile, constituant un faible pourcentage des composés visibles par CPG-SM, varie légèrement avec le temps de macération. Sa proportion croît faiblement. Elle représente 3,2% pour l'extrait issu de la macération de 15 min, 3,9% pour celui de 30 min, 4,0% pour celui de 60 min et 5,8% pour la macération de 120 min (Tableau 2). Le nombre de composés volatils extraits varie également peu avec le temps de macération. Il est de 7, 9, 10 et 11, respectivement pour chaque temps de macération.

Les concrètes obtenues dans l'hexane semblent être différentes de celles réalisées dans l'éther diéthylique. Les pourcentages de la fraction volatile des concrètes (de 3,9 à 5,8%) sont bien inférieurs à ceux obtenus pour les macérations dans l'éther diéthylique (de 12,1 à 28,6%). Cette différence pourrait provenir de la différence de polarité des deux solvants. Les deux composés majoritairement extraits par l'éther diéthylique, la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone et la 2-[5H]-furanone, sont polaires et n'ont pas été extraites à l'hexane. L'hexane extrait plutôt des composés apolaires, types alcanes, présents parmi les composés lourds. Le mode de concentration des deux types d'extraits ainsi que le point d'ébullition des deux solvants pourraient être également à l'origine de cette différence, la fraction volatile étant

partiellement éliminée lors de l'évaporation du solvant sous pression réduite à une température de 48°C. En comparaison avec les macérations effectuées dans l'éther diéthylique (cf. III.2.2.2.3), les macérations à l'hexane, possèdent un plus grand nombre de pics odorants (14 contre 11), dont sept sont en communs, pics, 1 (hexanal), 3 (IR = 880), 5 (oct-1-èn-3-one), 7 (undécane), 9 (2-phényléthanol), 12 (formiate de 2-phényléthyle), 13 (IR = 1329) et 14 (IR = 1404). Les extraits dans l'hexane possèdent des notes dominantes vertes, miellées et pyrogénées alors que les extraits dans l'éther diéthylique possèdent une dominance aromatique essentiellement miellée.

L'étude précédente montre l'intérêt aromatique d'une concrète de fleur issue d'une macération à l'hexane. L'extrait obtenu paraît globalement "chaud" et "vert", notes également données par des zones odorantes distinctement perçues en CPG-ODP. Les composés odorants les plus intenses sont le nonanal ("miellée piquante"), le 2-phényléthanol ("florale miellée"), le formiate de 2-phényléthyle ("verte piquante") et le undécane ("brûlée").

Le suivi cinétique d'extraction des fleurs à froid a montré:

- Une dégradation des fleurs et la formation d'une phase aqueuse dans le milieu à partir de 60 min, son volume augmentant à 120 min.
- Une augmentation du rendement d'extraction jusqu'à 60 min.
- Peu d'évolution aromatique des extraits, les notes "miellée", "verte", "piquante" et "brûlée" étant majoritairement présentes.
- Une faible évolution des pourcentages, 60 min étant un temps suffisant pour extraire le nonanal et 120 min pour le 2-phényléthanol.
- Un composé majoritairement détecté en CPG-SM, le 2-éthylhexan-1-ol, quelque soit le temps de macération.

En conclusion, il est préférable d'envisager un temps de macération de 60 min pour appliquer ce procédé à l'échelle pilote car il n'implique pas d'étape supplémentaire de décantation (milieu monophasique). Il permet également d'obtenir un extrait aromatique riche en notes "miellée" et "verte", valorisable en parfumerie.

#### IV.1.1.2. Les feuilles

Des macérations dans l'hexane ont été réalisées à partir de feuilles de *Crocus sativus* (70g). Trois temps de macération ont été testés, 3 jours, 5 jours et 7 jours (cf. V.3.3.4.2.1). Les rendements d'extraction de concrètes de trois lots de feuilles pour chaque type de macération, sont indiqués dans le Tableau 3.

**Tableau 3. Rendements d'extraction moyens des concrètes de feuilles (n=3) par rapport à la matière sèche (Hr = 73,8%) en fonction du temps de macération dans l'hexane, 3 jours, 5 jours et 7 jours.**

Solvant et temps d'extraction (jours)	Hexane 3 jours	Hexane 5 jours	Hexane 7 jours
Rendements moyens d'extraction (%)	0,84	1,10	1,00
Ecart type	0,02	0,20	0,70

Le rendement moyen d'extraction augmente jusqu'à 5 jours puis diminue légèrement à 7 jours. Cette variation reste peu significative aux vues des valeurs des écarts types. Néanmoins, cette observation avait été faite sur les concrètes réalisées dans l'éther diéthylique. La formation d'une phase aqueuse par dégradation de la matière végétale pour un temps de macération long, engendre la solubilisation et/ou la dégradation de composés hydrosolubles, diminuant la masse d'extrait obtenu. En comparaison avec les extraits réalisés dans l'éther diéthylique (cf. III.2.3.3, Tableau 13), les rendements d'extraction sont nettement inférieurs quelque soit le temps de macération (les rendements d'extraction à l'éther diéthylique allant de 1,4 à 1,8%). L'éther diéthylique permettait d'extraire une plus large gamme de composés, de part sa polarité et son point d'ébullition ( $T_{eb}=35^{\circ}C$ ), la concentration des extraits étant plus douce (sous azote).

Les concrètes donnent globalement des notes "vertes" et "grasses". Les trois extraits les plus riches en composés volatils, de 3, 5 et 7 jours, ont été analysés par CPG-SM/ODP (cf. V.3.3.4.2.2). Les zones odorantes des absolues ont été déterminées par un juge qualifié. Des descripteurs ont été attribués pour chaque pic odorant dont l'intensité a été évaluée sur une échelle allant de 0 à 5.

L'ensemble des concrètes diluées dans du dichlorométhane, a été analysé par CPG-SM. Seule l'identification des composés volatils (dont le temps de rétention est inférieur à celui du  $C_{18}$ ) a été étudiée. Le bruit de fond du signal chromatographique, lié à la complexité de l'extrait, étant important, l'analyse s'est avérée délicate.

Les profils CPG-SM des concrètes de feuilles sont illustrés sur la Figure 3. Les résultats analytiques ont été regroupés dans le Tableau 4.

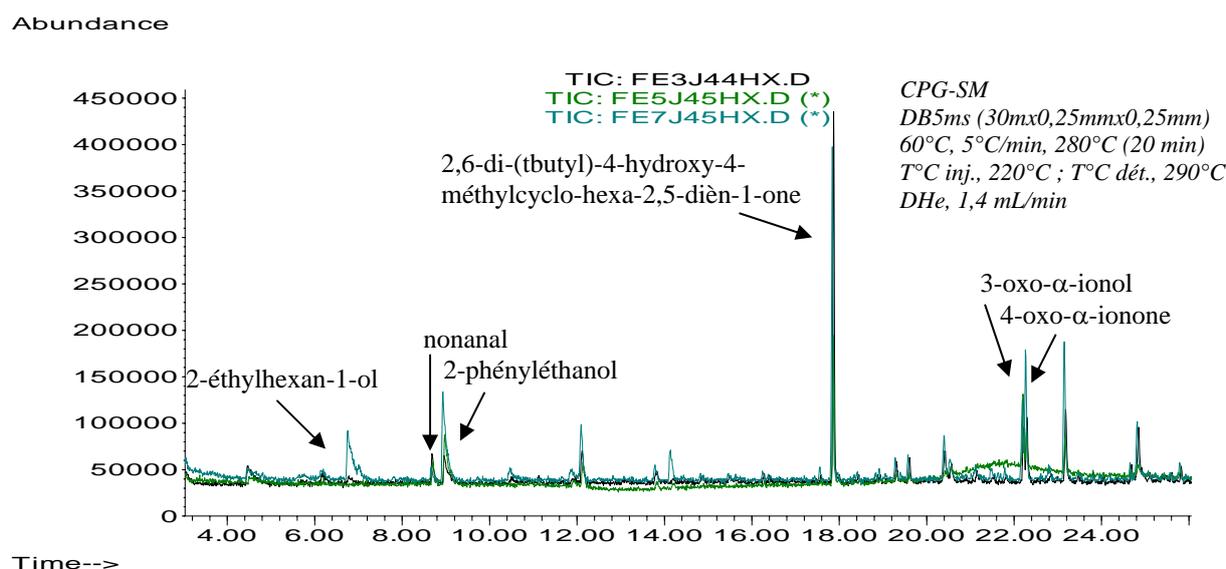


Figure 3. Chromatogrammes CPG-SM d'extraits de feuilles issus des macérations à froid dans l'hexane ( $t = 3$  jours (noir), 5 jours (vert) et 7 jours (bleu)).

Tableau 4. Résultats des analyses par CPG-SM/ODP ( $n=3$ ) de la fraction volatile présente dans les extraits de feuilles issus de macérations dans l'hexane (3 jours, 5 jours et 7 jours).

Pics odorants <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Fragments de masse [m/z(%)]	Odeurs perçues <sup>d</sup>	% A. 3j	% A. 5j	% A. 7j
Pic 1	-	911	-	cacahouète	nd <sup>e</sup>	nd	nd
Pic 2	2-[5H]-furanone [497-23-4]	926	55(100),84(60),27(20),39(15),57(1)	animale, cacahouète	0,07	0,00	0,04
Pic 3	-	992	-	champignon, terreux	nd	nd	nd-
-	hepta-2,4-dièneal [5910-85-0]	1005	81(100),28(35),39(30),53(25),110(15),120(1)	-	0,00	0,00	0,04
-	2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]	1043	28(100),57(65),41(7),70(5),18(2),83(1),98(1)	-	0,00	0,00	0,05
<b>Pic 4</b>	<b>nonanal [124-19-6]</b>	1120	57(100),43(90),41(87),68(48),82(40),119(20),109(1)	<b>miellée, piquante</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>
<b>Pic 5</b>	<b>2-phényléthanol [60-12-8]</b>	1132	91(100),28(80),122(20),65(7),51(2),103(1),123(1)	<b>miellée, florale</b>	<b>0,08</b>	<b>0,28</b>	<b>0,22</b>
Pic 6	-	1142	-	miellée douce	nd	nd	nd
Pic 7	acide octanoïque	1170	44(100),40(80),60(78),73(75),84(50),122(40),105(10)	florale, verte	- <sub>f</sub>	-	-
Pic 8	α-terpinéol	1194	59(100),93(98),81(95),121(90),67(60),136(40),43(38)	miellée, florale	-	-	-
Pic 9	coumaran	1217	120(100),91(50),65(10),94(5),121(2)	miellée, florale	-	-	-
-	1248	1248	55(100),67(90),139(95),41(60),83(75),110(1)	-	0,08	0,13	0,11
-	(E)-dec-2-èneal [3913-81-3]	1268	28(100),18(30),2(30),43(30),137(1)	-	0,00	0,00	0,01
-	1296	1296	28(100),79(70),67(45),41(45),55(30),92(30),12(5)	-	0,00	0,00	0,01
-	1325	1325	81(100),28(65),41(30),55(15),121(5),152(2),166(1)	-	0,00	0,00	0,02
-	1315	1328	28(100),150(30),135(20),107(5),77(3),40(1),51(1)	-	0,00	0,00	0,03

-	2,6-di-(tbutyl)-4-hydroxy-4-méthylcyclo-hexa-2,5-dièn-1-one [10396-80-2]	1474	165(100),57(75),137(25),221(15),91(5),193(5),236(3)	-	<b>0,51</b>	<b>0,38</b>	<b>0,38</b>
-	1534	1534	28(100),72(10),170(2),124(1),180(1)	-	0,04	0,00	0,01
-	dihydroactinidiolide [17092-92-1]	1545	111(100),43(55),137(45),67(30),180(25),152(5),95(5)	-	0,04	0,03	0,05
-	acide dodécanoïque [143-07-7]	1579	73(100),60(95),41(60),129(30),157(20),97(2),171(1)	-	0,07	0,02	0,12
-	1586	1586	127(100),99(5),55(5),128(2),28(2),43(3),16(1)	-	0,04	0,04	0,04
-	3-oxo- $\alpha$ -ionol [97-07-5]	1658	108(100),28(70),43(40),109(20),152(18),135(5)	-	0,13	0,14	0,10
-	4-oxo- $\alpha$ -ionone [27185-77-9]	1660	43(100),108(70),119(60),150(30),159(28),192(10)	-	0,09	0,13	0,18
-	1667	1667	55(100),41(70),70(70),83(68),98(50),208(2),171(1)	-	0,00	0,00	0,03
-	1-(3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,4,7a-triméthyl-2-benzofuranyl)-éthanone	1676	43(100),57(50),81(45),95(30),125(30),208(3),166(1)	-	0,00	0,00	0,01
-	1699	1699	193(100),43(70),175(20),123(20),147(15),55(5)	-	0,14	0,14	0,20
-	acide tétradécanoïque [544-63-8]	1780	73(100),60(90),43(60),129(50),185(25),228(20),27(3)	-	0,08	0,07	0,17
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>					<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,8</b>

<sup>a</sup> pics odorants perçus lors du sniffing.

<sup>b</sup> identification, des composés détectés lors du sniffing et de l'analyse CPG-SM, réalisée à partir des indices de rétention, des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France), de la littérature et des odeurs perçues.

<sup>c</sup> indice de rétention calculé à partir des alcanes, sur un pic détecté par CPG-SM ou par CPG-ODP.

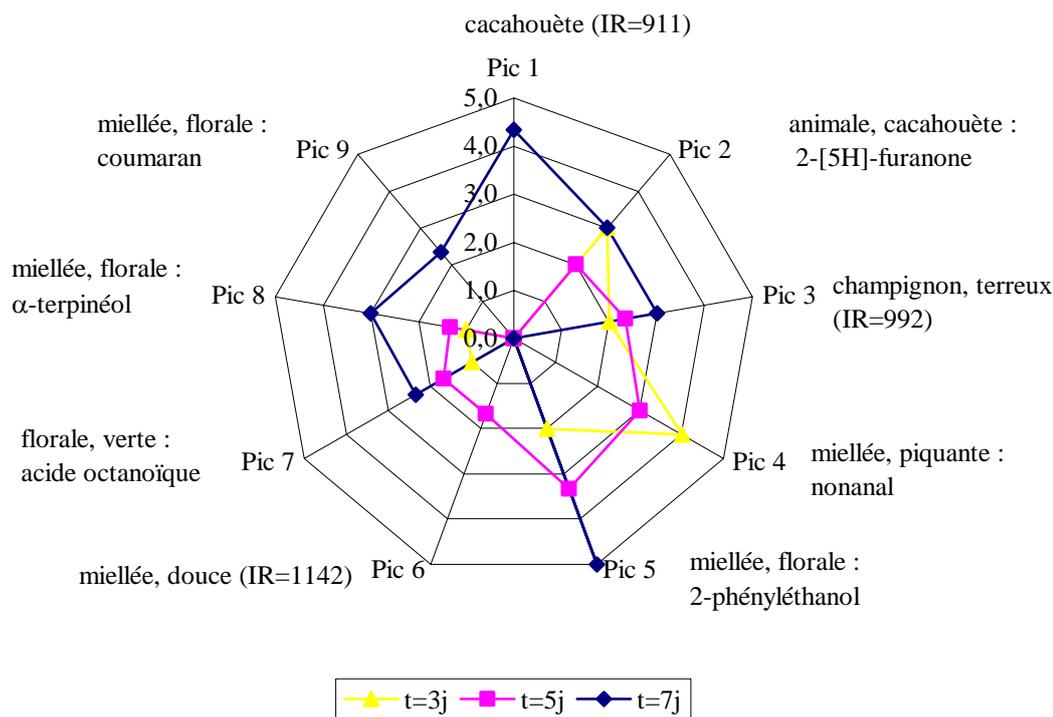
<sup>d</sup> descripteurs attribués pour chaque pic odorant lors du sniffing.

<sup>e</sup> nd, composé perçu lors du sniffing mais non-détecté en CPG-SM.

<sup>f</sup> - composé dont le pourcentage est inférieur au seuil de quantification fixé.

Comme dans le cas des fleurs, les molécules ayant une activité odorante ont des indices de rétention faibles ( $IR \leq 1217$ ) et sont des molécules particulièrement volatiles. Le 2,6-di-(tbutyl)-4-hydroxy-4-méthylcyclohexa-2,5-dièn-1-one, composé majoritairement extrait (de 0,5 à 0,4%), n'a pas été détecté olfactivement.

Les zones odorantes sont de type "cacaouète" et "miellée", notes générées essentiellement par le nonanal et le 2-phényléthanol, avec des notes "verte" (acide octanoïque). Leur intensité varie selon le temps de macération (Figure 4). Le nonanal est perçu comme "miellée piquante". Cependant, l'odeur "miellée" pourrait provenir du 2-phényléthanol, ayant une activité odorante très intense et les zones odorantes étant contiguës.



**Figure 4. Profils aromatiques des extraits de feuilles issus de macérations dans l'hexane, obtenus par CPG-SM/ODP (n=3). (L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétentions et des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France). Seules les notes dont l'intensité moyenne perçue  $\geq 0,7$  ont été prises en compte).**

Le nombre de notes perçues est quasiment le même pour les trois temps de macération (6 pour 3 jours et 7 pour 5 et 7 jours). Cependant, l'intensité globale des zones odorantes est croissante avec le temps de macération (13,0 pour 3 jours, 15,3 pour 5 jours et 23,0 pour 7 jours). Les extraits s'appauvrissent en note de tête (composés légers  $IR \leq 1142$ , pics 4 et 5 donnant des notes "miellée piquante" et "miellée florale") et s'enrichissent en note de queue (composés lourds  $IR \geq 1142$ , pics 6, 7, 8, 9 donnant des notes "miellée douce", "florale verte" et "miellée florale"). Le nombre de composés volatils détectés, indiqués dans le Tableau 4, est de 13 pour les macérations de 3 jours, de 11 pour celles de 5 jours et de 21 pour celles de 7 jours. Une augmentation notable a été constatée pour la macération la plus longue. La fraction volatile constitue 1,4% des composés détectés pour les macérations de 3 et 5 jours et 1,8% pour celle de 7 jours (Tableau 4). Ces valeurs sont très faibles, les extraits sont donc composés essentiellement de composés lourds.

Les pourcentages de la fraction volatile des concrètes de feuilles obtenues par macération dans l'hexane (de 1,4 à 1,8%) sont bien inférieurs à celles réalisées dans l'éther

diéthylique (de 66,0% à 69,3%). Cette différence pourrait provenir, comme précédemment dans le cas des fleurs, de la polarité du solvant (les deux composés majoritairement extraits par l'éther étant deux molécules polaires (la 2-[5H]-furanone et la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone) et du mode de concentration des extraits. Les extraits obtenus dans l'éther diéthylique (cf. III.2.3.3, Tableau 14) et ceux dans l'hexane comportent le même nombre de pics (9), dont quatre sont en communs : pics 2, 3, 5 et 9, donnant des notes "animale cacahouète" (2-[5H]-furanone), "champignon terreux" (IR = 992) et "miellée florale" (2-phényléthanol et coumaran).

Les extraits issus de macérations de feuilles donnent des notes "cacahouète" (2-[5H]-furanone), "miellée" (2-phényléthanol,  $\alpha$ -terpinéol et coumaran), "verte" (acide octanoïque) et "piquante" (nonanal).

L'étude de la cinétique d'extraction des feuilles par macération dans l'hexane à froid a montré :

- Une dégradation des feuilles et la formation d'une phase aqueuse dans le milieu à partir de 5 jours de macération.
- Une faible augmentation du rendement d'extraction jusqu'à 5 jours de macération.
- Un accroissement de l'intensité des zones odorantes avec l'augmentation du temps de macération et une évolution aromatique de l'extrait vers des notes de queue.
- Une faible fraction volatile due à la polarité et à la température d'ébullition du solvant
- La fraction volatile correspondant à la macération de 5 jours est la plus riche en nonanal et 2-phényléthanol, ces deux composés ayant une forte activité odorante.

Une extraction de 5 jours est nécessaire et suffisante pour obtenir un extrait aromatique valorisable. Le procédé d'extraction en est simplifié d'une étape : la décantation, n'étant nécessaire qu'à partir de 7 jours de macération.

#### **IV.1.2. Comparaison avec une extraction dans du cyclohexane à chaud**

Une extraction à chaud, à l'aide d'un soxhlet, a été réalisée sur les fleurs et les feuilles afin de comparer le rendement et la nature des composés volatils extraits à ceux obtenus par extraction à froid lors d'une macération dans l'hexane. Le cyclohexane, moins toxique que l'hexane, a été utilisé pour réaliser une extraction à température d'ébullition du solvant. Les temps d'extraction ont été déterminés par les données bibliographiques (cf. Annexe I, 2.1.2) et par les observations réalisées en cours de manipulation, lors de la mise au point du protocole (cf. V.3.3.5).

#### IV.1.2.1. Les fleurs

Le rendement moyen d'extraction des fleurs (sur 160,4 g de matière, cf. V.3.3.5.1.1), après 7h30 de soxhlet, est de 1,9% (E.T. = 0,2) par rapport à la matière sèche, correspondant au rendement d'une macération à froid dans l'hexane comprise entre 30 et 60 min (cf. IV.1.1.1, Tableau 1). Une extraction à chaud d'une durée importante devrait permettre d'extraire une plus grande quantité de composés lourds (cires, phospholipides et acides gras), situés au cœur de la matière végétale, qu'une extraction à froid. Cependant, les fleurs étant constituées de pétales fins et fragiles, le solvant, même à froid, diffuse à priori facilement à l'intérieur de la matière végétale et extrait les composés dans un temps relativement bref (entre 30 et 60 min). Le rendement, en fonction du temps de macération, tend vers une valeur limite. Les macérations dans l'hexane des fleurs de safran montrent que le rendement d'extraction en concrète augmente avec le temps de macération jusqu'à 60 min pour ensuite se stabiliser.

L'hexane et le cyclohexane, ont des polarités très proches, respectivement, 0 et 0,2, (Burdick et Jackson, 1982), et extraient le même type de composés peu polaires.

Les extraits végétaux obtenus ont été caractérisés par CPG-SM (Figure 5 et Tableau 5). Le dédoublement des pics sur la superposition des chromatogrammes est dû à l'injection manuelle des échantillons.

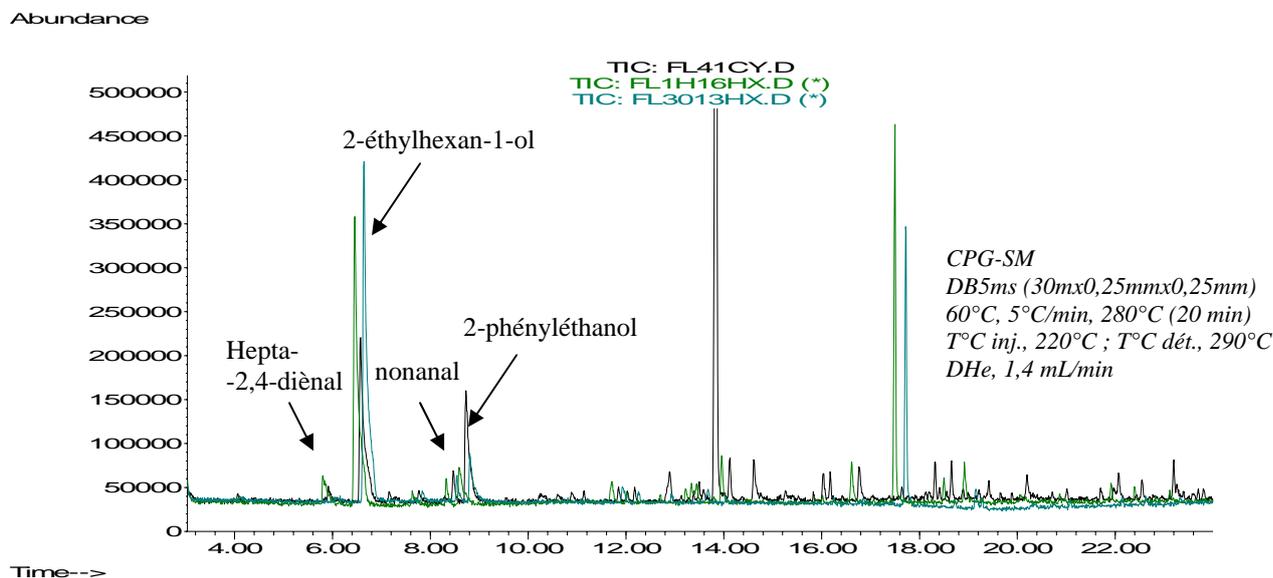


Figure 5. Chromatogrammes CPG-SM d'extraits de fleurs, issus de macération à froid dans l'hexane (30 min (bleu) et 60 min (vert)) et d'une extraction à chaud au soxhlet dans du cyclohexane (noir).

**Tableau 5. Résultats des analyses CPG-SM (n=3) des composés volatils présents dans les extraits de fleurs issus de macérations à froid dans l'hexane (30 min et 60 min) et dans les extraits issus du soxhlet à chaud (7h30).**

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments de masse [m/z(%)]	% A.	% A.	% A.
			mac. <sup>c</sup> 30min	mac. <sup>c</sup> 60min	sox. <sup>d</sup> 7h30
hepta-2,4-diéнал [4313-03-5]	1000	28(100),81(45),39(5),53(3),79(1),91(1),110(1)	-	0,09	-
<b>2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]</b>	1032	57(100),41(25),43(25),70(20),83(20),112(1),149(1)	<b>2,15</b>	<b>1,98</b>	<b>2,83</b>
1,2,3-triméthylcyclopentane [2815-57-8]	1086	57(100),70(75),41(50),83(25),29(20),112(2),16(1),97(1)	-	-	0,21
<b>nonanal [124-19-6]</b>	1113	57(100),41(70), 69(40),82(35),98(35)	<b>0,09</b>	<b>0,11</b>	<b>0,18</b>
<b>2-phényléthanol [60-12-8]</b>	1121	91(100),122(25),65(15),39(5),77(2),103(1)	<b>0,43</b>	<b>0,34</b>	<b>1,13</b>
acide benzoïque [65-85-0]	1183	104(100),91(60),77(20),60(25),122(15),119(1)	-	-	0,09
dihydrocarvéol [38049-26-2]	1236	93(100),55(98),107(95),41(85),141(45),16(25)	0,05	0,07	0,05
carvone [99-49-0]	1245	82(100),93(40),108(39),54(30),150(10),77(5)	0,03	-	0,04
acide nonanoïque [112-05-0]	1280	57(100),73(80),41(80),115(50),29(45),129(15),146(5)	-	-	0,09
déca-2,4-diéнал [2363-88-4]	1322	81(100),67(20),41(18),55(15),95(5),121(2),152(1)	-	0,10	0,05
1345	1345	71(100),43(20),55(10),67(2),96(2),109(1),121(1)	-	-	0,13
4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-1-éнал (HTCC) [35692-94-5]	1423	28(100),135(8),107(5),43(3),55(3),91(2),168(2),153(1)	0,05	0,16	0,20
2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-méthylcyclohexa-2,5-dièn-1-one [10396-80-2]	1462	165(100),57(60),180(60),137(25),221(20),151(3),236(3)	1,02	0,95	-
1510	1510	72(100),45(45),170(45),127(10),56(3)	0,04	0,13	-
1524	1524	73(100),60(85),129(25),115(15),157(20),200(10),17(1)	-	-	0,07
acide dodécanoïque [143-07-7]	1534	73(100),60(85),41(50),85(30),157(27),115(25),200(10)	0,04	0,05	0,05
heptadécane [629-78-7]	1710	71(100),57(99),43(80),85(75),99(40),113(30),127(20)	-	-	0,11
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>			<b>3,8</b>	<b>4,0</b>	<b>5,9</b>

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et de la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>macération à froid dans l'hexane (t = 30 min et t = 60 min).

<sup>d</sup>extraction à chaud au soxhlet dans le cyclohexane (t = 7h30).

La fraction volatile (composés dont le temps de rétention est inférieur à celui du C<sub>18</sub>) représente 5,2% des composés détectés en CPG-SM, ce qui est légèrement supérieur aux valeurs obtenues pour les macérations à froid de 30 et de 60 min (3,9 et 4,0% respectivement).

Le profil des composés volatils est comparable pour les deux types d'extraits, le composé majoritaire est le 2-éthylhexan-1-ol dans les deux cas (2,0 et 2,2% pour les macérations de 30 et 60 min et 2,8% pour l'extraction à chaud). Le nonanal et le 2-phényléthanol, donnant des notes "miellée piquante" et "miellée florale" (cf. IV.1.1.1, Tableau 2) sont également présents dans des quantités relatives proches (respectivement (0,09 et 0,11%) et (0,43 et 0,34%) pour les macérations de 30 et 60 min et 0,18 et 1,13 pour l'extraction à chaud). La présence d'acides supplémentaires a été constatée dans les extraits réalisés au soxhlet. L'acide benzoïque (0,09%) et l'acide nonanoïque (0,09%), proviendraient de réactions de dégradations thermiques, l'extraction étant réalisée à chaud et sur une durée prolongée (7h30).

#### IV.1.2.2. Les feuilles

Le rendement moyen d'extraction des feuilles (40 g, cf. V.3.3.5.1.2) à chaud, à l'aide d'un soxhlet pendant 8h00, est de 1,4% (E.T. = 0,3) par rapport à la matière sèche, ce qui est légèrement supérieur à celui obtenu lors de l'extraction à froid dans l'hexane pendant 5 jours (1,1%, E.T. = 0,2). Les feuilles, très minces et légèrement rigides, sont constituées d'une faible proportion de cellulose (23,9%), de lignine (5,7%) et d'hémicellulose (5,5%), (cf. III.1.2, Tableau 2). Ces fibres, responsables de la rigidité de la matière, peuvent partiellement empêcher la diffusion du solvant au cœur de la feuille. A chaud, l'extraction est alors facilitée par éclatement des cellules.

Les extraits aromatiques végétaux ont été caractérisés par CPG-SM (Figure 6 et Tableau 6). La fraction volatile (composés volatils dont le temps de rétention est inférieur à celui du C<sub>18</sub>) représente 3,0% des composés détectés en CPG-SM, valeur supérieure à celles déterminées pour les macérations de 5 et 7 jours (1,4% et 1,8% respectivement).

Les profils des composés volatils extraits à chaud et à froid sont relativement différents. Parmi les deux composés détectés en CPG-ODP dans les extraits de feuilles à froid dans l'hexane (cf. IV.1.1.2, Tableau 4, 2-phényléthanol et nonanal), seul le nonanal est présent dans les extraits issus du soxhlet et dans des proportions comparables (0,05 et 0,01% pour les macérations de 5 et 7 jours et 0,06% pour l'extraction à chaud). La présence d'acides tel que l'acide octanoïque (0,09%) et l'absence de certains composés volatils comme le 2-phényléthanol pourraient être expliquées par des réactions de dégradations thermiques.

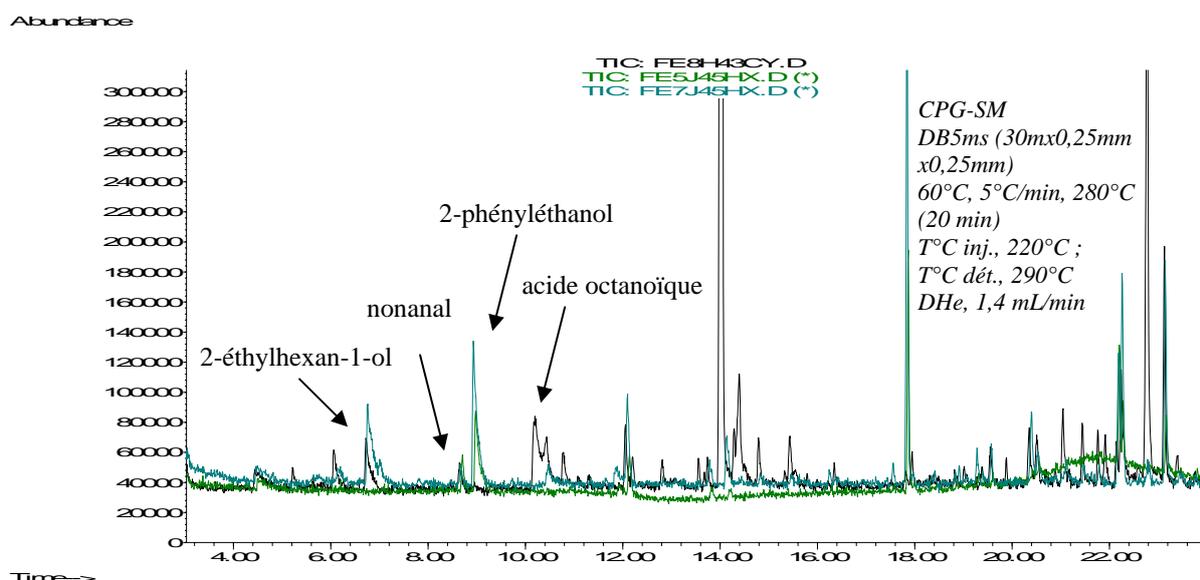


Figure 6. Chromatogrammes CPG-SM d'extraits de feuilles, issus de macérations à froid dans l'hexane (5 jours (vert) et 7 jours (bleu)) et d'une extraction à chaud au soxhlet dans du cyclohexane (noir).

**Tableau 6. Résultats des analyses CPG-SM (n=3 pour les macérations et 4 pour les soxhlets) des composés volatils présents dans les extraits de feuilles issus de macérations à froid dans l'hexane (5 jours et 7 jours) et dans les extraits issus du soxhlet à chaud (8h00).**

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments de masse [m/z(%)]	% A. mac. <sup>c</sup> 5j	% A. mac. <sup>c</sup> 7j	% A. sox. <sup>d</sup> 8h00
2-[5H]-furanone [497-23-4]	926	55(100),84(60),27(20),39(15),57(1)	0,00	0,04	-
hepta-2,4-diène [5910-85-0]	1005	81(100),28(35),39(30),53(25),110(15),120(1)	0,00	0,04	0,10
2-éthylhexan-1-ol [104-76-7]	1043	28(100),57(65),41(7),70(5),18(2),83(1),98(1)	0,00	0,05	0,11
nonanal [124-19-6]	1120	57(100),43(90),41(87),68(48),82(40),119(20),109(1)	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,06</b>
2-phényléthanol [60-12-8]	1132	91(100),28(80),122(20),65(7),51(2),103(1),123(1)	<b>0,28</b>	<b>0,22</b>	-
dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone [5469-16-9]	1178	28(100),44(70),32(27),42(10),74(10),57(7),102(2)	-	-	0,14
acide octanoïque [124-07-2]	1186	60(100),43(75),73(70),55(40),84(20),101(20),115(1)	-	-	0,09
2-(2-butoxyéthoxy)-éthanol	1199	45(100),57(82),29(15),41(20),75(8),87(3),101(1)	-	-	0,05
3-éthyl-4-méthyl-1H-pyrrole-2,5-dione [20189-42-8]	1238	139(100),67(80),53(45),124(35),39(20),96(13),121(1)			0,32
1248	1248	55(100),67(90),139(95),41(60),83(75),110(1)	0,13	0,11	
hexylcyclohexane [4292-75-5]	1253	83(100),55(70),67(45),28(30),41(30),139(2),168(2)	-	-	0,03
(E)-dec-2-ène [3913-81-3]	1268	28(100),18(30),2(30),43(30),137(1)	0,00	0,01	-
1296	1296	28(100),79(70),67(45),41(45),55(30),92(30),12(5)	0,00	0,01	-
1325	1325	81(100),28(65),41(30),55(15),121(5),152(2),166(1)	0,00	0,02	-
1315	1328	28(100),150(30),135(20),107(5),77(3),40(1),51(1)	0,00	0,03	-
2,6-diméthyl-octa-2,7-diène-1,6-diol [64142-78-5]	1379	48(100),71(80),67(65),55(50),82(40),137(4),125(2)	-	-	0,03
2,6-di-(tbutyl)-4-hydroxy-4-méthylcyclohexa-2,5-diène-1-one [10396-80-2]	1474	165(100),57(75),137(25),221(15),91(5),193(5),236(3)	0,38	0,38	-
1534	1534	28(100),72(10),170(2),124(1),180(1)	0,00	0,01	-
dihydroactinidiolide [17092-92-1]	1545	111(100),43(55),137(45),67(30),180(25),152(5),95(5)	0,03	0,05	-
acide dodécanoïque [143-07-7]	1579	73(100),60(95),41(60),129(30),157(20),97(2),171(1)	0,02	0,12	-
1586	1586	127(100),99(5),55(5),128(2),28(2),43(3),16(1)	0,04	0,04	-
3-oxo- $\alpha$ -ionone [79734-43-3]	1643	108(100),43(70),119(20),77(10),150(15),159(1),192(1)	-	-	0,44
3-oxo- $\alpha$ -ionol [97-07-5]	1658	108(100),28(70),43(40),109(20),152(18),135(5)	0,14	0,10	0,04
4-oxo- $\alpha$ -ionone [27185-77-9]	1660	43(100),108(70),119(60),150(30),159(28),192(10)	0,13	0,18	0,16
1667	1667	55(100),41(70),70(70),83(68),98(50),208(2),171(1)	0,00	0,03	-
1-(3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,4,7a-triméthyl-2-benzofuranyl)-éthanone	1676	43(100),57(50),81(45),95(30),125(30),208(3),166(1)	0,00	0,01	-
2-hydroxy- $\beta$ -ionone	1682	123(100),43(85),193(80),109(8),175(7),208(1)	-	-	0,58
1683	1683	137(100),182(50),119(40),108(40),43(40),149(5),192(2)	-	-	0,54
1699	1699	193(100),43(70),175(20),123(20),147(15),55(5)	0,14	0,20	
acide tétradécanoïque [544-63-8]	1780	73(100),60(90),43(60),129(50),185(25),228(20),27(3)	0,07	0,17	0,16
1797	1797	28(100),73(50),147(12),221(5),281(5),295(1),341(1)	-	-	0,15
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>			<b>1,4</b>	<b>1,8</b>	<b>3,0</b>

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et de la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>macération à froid dans l'hexane (t = 30 min et t = 60 min).

<sup>d</sup>extraction à chaud au soxhlet dans le cyclohexane (t = 8h00).

### IV.1.3. Conclusions

Les pourcentages des fractions volatiles des macérations de fleurs et de feuilles dans l'hexane sont bien inférieurs à ceux obtenus par des macérations réalisées dans l'éther diéthylique (Tableau 7), ces différences pouvant provenir de la nature des solvants. La teneur en composés volatils de l'extrait de fleur est supérieure à celle de l'extrait de feuilles dans le cas des macérations à l'éther diéthylique, phénomène inversé lors des macérations à l'hexane.

*Tableau 7. Fractions volatiles (%) des extraits de fleurs et de feuilles (issus de macérations à froid dans l'hexane et dans l'éther diéthylique et d'extraction à chaud au soxhlet dans du cyclohexane).*

Solvant	Hexane				Cyclohexane	Ether diéthylique		
	15 min	30 min	60 min	120 min	7h30	15 min	30 min	60 min
Fleurs (%)	3,2	3,9	4,0	5,8	5,2	12,1	28,6	24,0
Feuilles (%)	3 jours	5 jours	7 jours	-	8h00	3 jours	5 jours	7 jours
	1,4	1,4	1,8	-	3,0	68,4	69,3	66,0

Dans le cas des fleurs, l'extraction à chaud n'apporte aucune amélioration du rendement et n'extrait pas de composés volatils supplémentaires ayant une activité odorante. Ce résultat est en totale cohérence avec l'aspect fragile de la matière végétale. Il est préférable d'envisager un temps de macération de 60 min dans l'hexane afin d'obtenir un extrait aromatique riche et dont l'extraction est facilement extrapolable à plus grande échelle. L'extraction à chaud des feuilles améliore légèrement le rendement et le pourcentage de la fraction volatile. Cependant, l'extrait obtenu diffère de celui provenant de la macération à froid et ne contient pas de 2-phényléthanol. Une extraction à froid de 5 jours des feuilles dans l'hexane est donc à envisager afin d'obtenir des notes dominantes miellées (2-phényléthanol,  $\alpha$ -terpinéol, coumaran et nonanal) et d'utiliser un procédé d'extraction simplifié.

L'extraction des fleurs et des feuilles a donc été réalisée à l'échelle pilote, sur la base des protocoles déterminés dans la partie IV.1.1.

## IV.2. MACERATION A L'ECHELLE PILOTE

L'étude préliminaire précédente à l'échelle laboratoire a permis de mettre au point le procédé d'extraction par solvant organique des feuilles et des fleurs. La macération à froid dans l'hexane semble être la méthode la mieux indiquée pour valoriser les molécules volatiles et colorantes présentes dans les fleurs et les feuilles, évitant ainsi toute dégradation de la matière et des composés la constituant. Le passage à l'échelle pilote a nécessité l'utilisation d'un solvant moins toxique que l'hexane et ayant des propriétés extractantes proches : le cyclohexane.

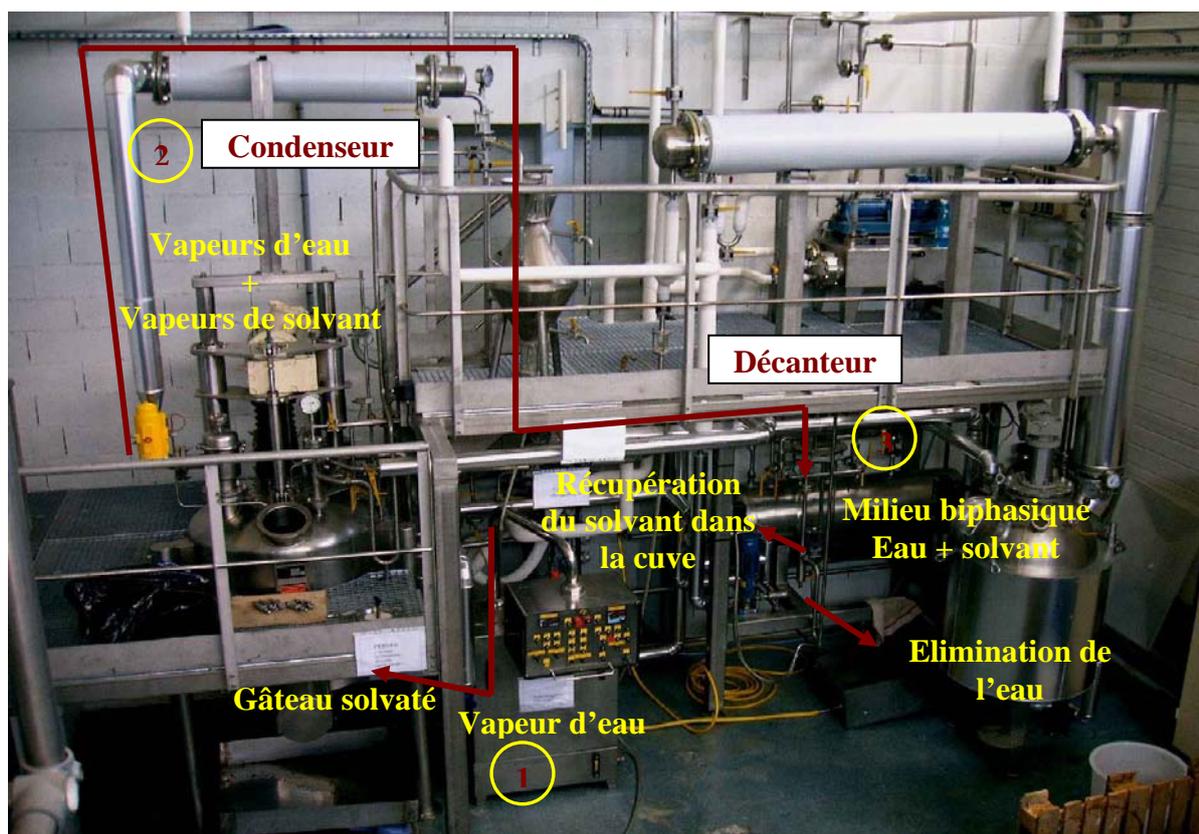


Figure 8. Etapes de dessolvation du gâteau de matière végétale par stripping à l'échelle pilote.

#### IV.2.1.1. Les fleurs

Les fleurs fraîches provenant de la récolte de 2004 ont été extraites à l'échelle pilote selon les conditions déterminées lors de l'étude à l'échelle laboratoire (cf. IV.1.1.1 et V.3.3.4.1.2). 7,1 kg de matière végétale ( $H_r = 85,5\%$ ), ainsi que 80 L de cyclohexane, ont été introduits dans un réacteur, les fleurs étant totalement recouvertes par le solvant.

Le milieu a été agité mécaniquement, par une canne d'agitation, en mode "lissage/débatissage" à 10 tr/min afin d'éviter la formation d'un gâteau en surface et de permettre la diffusion du solvant dans les pétales de fleurs. Après 1h00 d'extraction, le solvant enrichi, de couleur jaune, a été filtré sur toile filtrante et introduit dans un évaporateur à l'aide d'une pompe (Figure 7). Le gâteau restant a été séché par pression d'azote afin de récupérer le solvant résiduel imbibant la matière végétale. L'extrait a été concentré sous pression réduite ( $P = -0,7$  bars), pendant 45 min, ce qui permet d'abaisser la température d'ébullition du solvant à  $40^\circ\text{C}$ , évitant ainsi la dégradation de molécules fragiles et la perte de composés volatils. Le chauffage du milieu a été régulé par le débit de vapeur d'eau envoyé dans la double enveloppe de l'évaporateur. Les vapeurs de solvant sont condensées en tête de

colonne, puis récupérées dans une cuve hermétique, permettant le recyclage du solvant. Le débit du reflux de solvant, la température au sein de l'évaporateur et celle en tête de colonne ainsi que l'aspect du milieu (moussant légèrement) ont été contrôlés au cours de cette étape. Le chauffage et le vide ont été constants jusqu'à l'obtention d'une pâte visqueuse au fond de l'appareillage d'environ 5 kg (~ 4 L). Après arrêt du chauffage, remise du milieu à pression atmosphérique et refroidissement pendant une nuit, l'extrait liquide a été récupéré par le fond de l'évaporateur qui a été rincé par 2 L de solvant.

Le milieu est biphasique, révélant un début de dégradation de la matière végétale qui pourrait être due au mode d'agitation plus efficace qu'à l'échelle laboratoire, lors des essais préliminaires. Après décantation, la phase organique (5 L), rouge intense, a été évaporée à sec sous pression réduite à 40°C. La masse d'extrait, d'aspect cireux, orangé-rouge intense et à l'odeur "miellée", est de 26,11g. Le gâteau de matière végétale, de couleur violette foncée, a été dessolvaté par stripping, puis éliminé.



**Figure 9. Matière végétale (fleurs fraîches) introduite dans le réacteur et extrait végétal obtenu après macération, filtration et concentration à sec.**

Le rendement de cette extraction est de 2,55% par rapport à la matière sèche, valeur légèrement supérieure à celle obtenue à l'échelle laboratoire lors d'une macération de 60 min dans l'hexane (2,1%).

#### IV.2.1.2. Les feuilles

Les feuilles vertes, coupées sur les safranières en mai 2004 lors de pluies importantes, ont été séchées sur des claies à l'étuve à 50°C pendant 7h00, afin de les conserver. Le taux d'humidité résiduelle, Hr, est de 8,7%.

Ces feuilles, après un broyage partiel (5 cm, grille de 15 mm, broyeur à marteaux Electra, France), ont été extraites à l'échelle pilote selon les conditions déterminées lors de l'étude à l'échelle laboratoire (cf. IV.1.1.2 et V.3.3.4.2.1). La matière végétale (5,5 kg), ainsi que 100 L de cyclohexane, ont été introduits dans un réacteur, les feuilles étant totalement recouvertes par le solvant. La structure longue, fine et fibreuse des feuilles a empêché toute agitation mécanique, même après broyage. La matière végétale aurait pu endommager l'axe d'agitation en s'enroulant autour de celui-ci. Les feuilles ont donc formé un gâteau en surface, limitant la diffusion du solvant à l'intérieur de la matière.

Après 5 jours de macération, le milieu a été filtré sur toile filtrante et le solvant enrichi, de couleur jaune, introduit dans l'évaporateur à l'aide d'une pompe. La matière imbibée, restante dans le réacteur, a été séchée partiellement par pression d'azote. La totalité de l'extrait récupéré, a été concentré pendant 2h00 sous pression réduite ( $P = - 0,7$  bars). Le chauffage du milieu a été régulé par le débit de vapeur d'eau envoyé dans la double enveloppe de l'évaporateur. Les vapeurs de solvant en tête de colonne de distillation ont été condensées et le solvant a été stocké dans la cuve de récupération. Le débit du reflux, la température du milieu et celle en tête de colonne ainsi que la pression et l'aspect du milieu (formation d'une mousse en surface) ont été contrôlés tout au long de cette étape qui a conduit à un volume de concentra verdâtre d'environ 5 L.

Après remise à pression atmosphérique de l'appareillage et une nuit de refroidissement, l'extrait ainsi que 2 L de solvant de rinçage ont été récupérés. Le milieu a été concentré à sec sous pression réduite à 43°C. La concrète, verte-jaune à l'odeur "verte" intense, a une masse de 69,0 g. Le gâteau de matière végétale, jaunâtre, a été ensuite déssolvaté par stripping, puis éliminé.

### IV.2.1. Procédés d'extraction

L'extraction à l'échelle pilote des fleurs et des feuilles a été réalisée dans un réacteur de 300 L (TSA, K9955, Tournaire SA, Grasse, France) afin de simuler un passage à l'échelle industrielle et d'obtenir des extraits en quantité supérieure, en vue d'une valorisation. Le réacteur et la toile filtrante ont été nettoyés au préalable par de l'eau puis par des vapeurs d'eau qui ont entraîné les derniers résidus d'extractions antérieures. Les conduites et le réacteur ont également été rincés. Le procédé nécessite trois étapes : l'extraction par macération à froid de la matière végétale dans le réacteur, la filtration du milieu et la concentration sous pression réduite de l'extrait dans l'évaporateur (Figure 7). Lors de la dernière étape, le solvant est régénéré et stocké dans une cuve de récupération. Lorsque l'extraction est terminée, le gâteau de matière végétale est déssolvaté et le réacteur nettoyé pendant 5h00 par stripping, i.e. entraînement du solvant par de la vapeur d'eau, la température du réacteur étant de 54°C (Figure 8). La matière végétale est alors éliminée et le filtre rincé à l'eau. Le solvant (~ 4 L) est stocké dans la cuve de récupération, puis vidangé dans un fût à l'aide d'une canne. L'évaporateur est également rincé. Le schéma du procédé d'extraction est illustré en Annexe III.

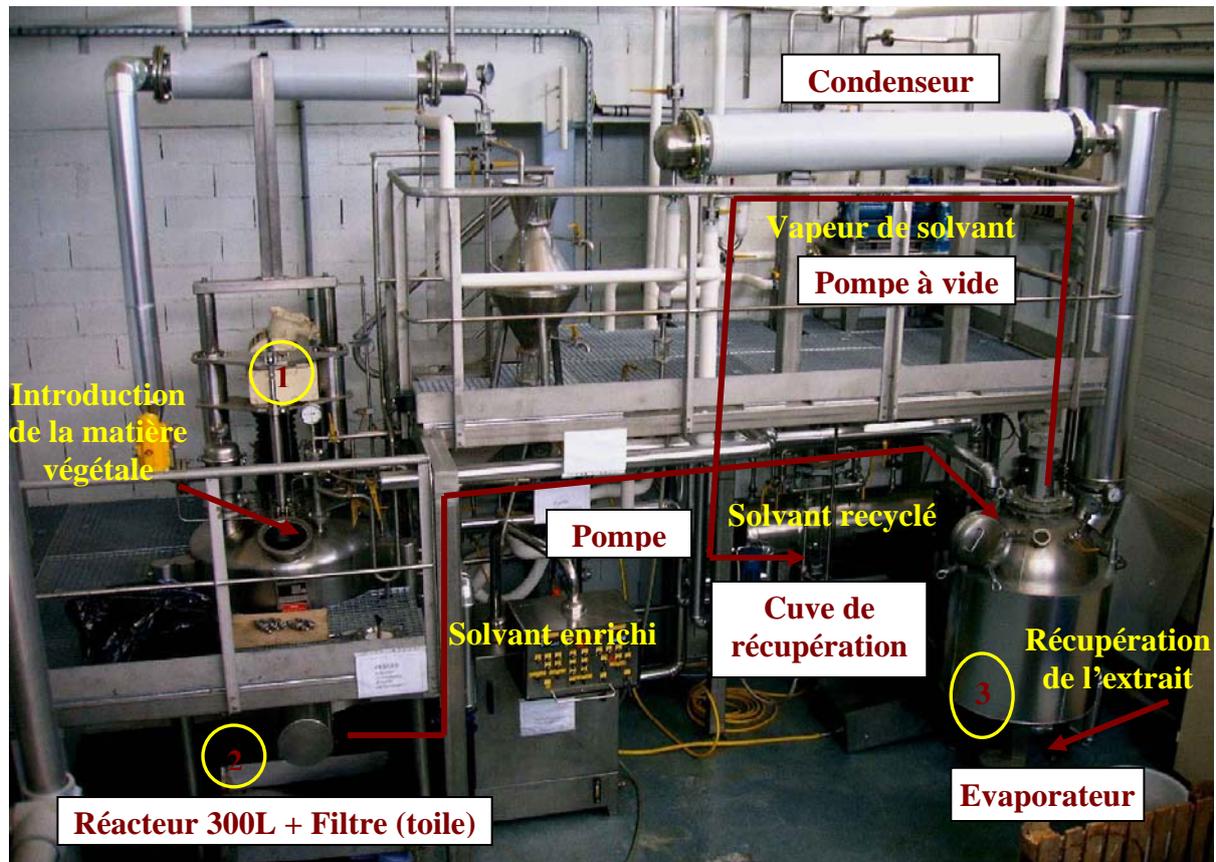
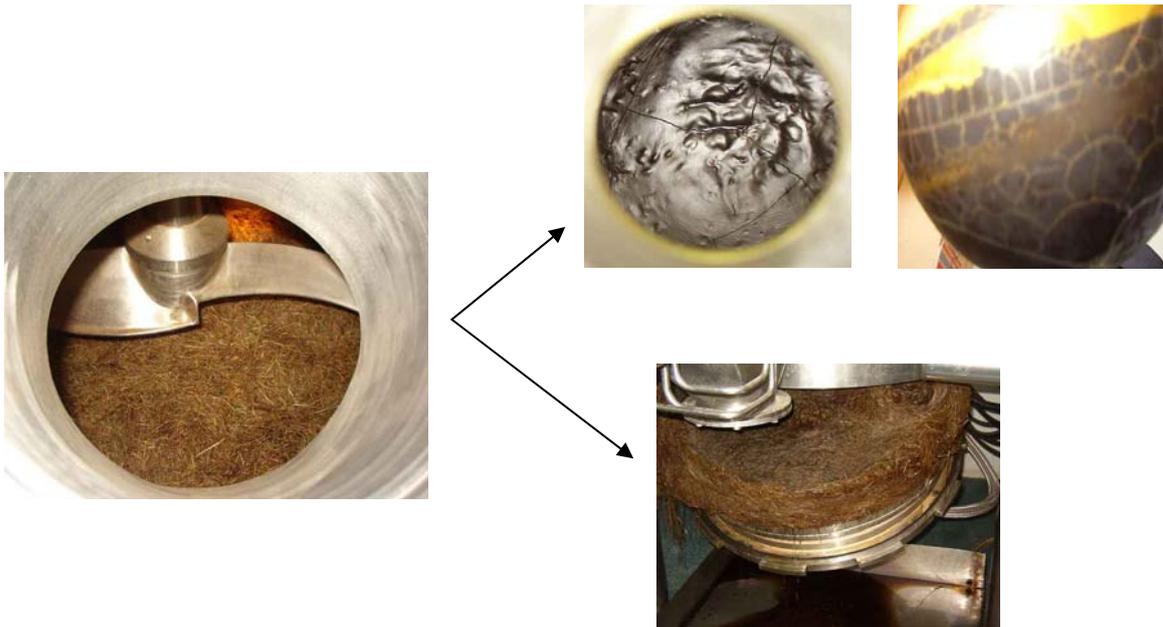


Figure 7. Différentes phases d'extraction et de concentration de la concrète.



**Figure 10.** Matière végétale (feuilles séchées) introduite dans le réacteur, extrait obtenu après macération, filtration et concentration, et gâteau de feuilles épuisées après extraction.

Le rendement de cette extraction est de 1,38% par rapport à la matière sèche, valeur légèrement supérieure à celle obtenue lors de l'extraction à l'échelle laboratoire de 5 jours dans l'hexane (1,1%).

#### **IV.2.1.3. Conclusions**

Les deux procédés d'extraction mis au point à l'échelle laboratoire ont donné des résultats concluant à l'échelle pilote. Il n'a été constaté aucun problème de filtration du milieu, étape délicate du procédé. Une amélioration de l'agitation mécanique (mode d'agitation et réduction de la vitesse de rotation de l'axe de la canne) dans le cas des fleurs permettrait l'obtention d'un milieu monophasique dont le traitement serait alors facilité. Avec un broyage plus fin des feuilles (grille < 15 mm) une agitation mécanique pourrait être envisagée ce qui permettrait peut être d'accroître le rendement d'extraction.

Les rendements d'extraction sont satisfaisants (2,55% pour les fleurs et 1,38% pour les feuilles) puisqu'ils sont légèrement supérieurs à ceux obtenus à l'échelle laboratoire (2,1% pour les fleurs et 1,1% pour les feuilles) et comparables à ceux donnés par la littérature. Il est de 0,25% par rapport à la matière fraîche dans le cas par exemple de la rose, (Arctander, 1994b), ce qui est légèrement inférieur à celui des fleurs de *Crocus sativus* qui est de 0,37%.

## IV.2.2. Caractérisation aromatique et colorante des extraits

Les extraits obtenus ont été analysés par CPG-SM afin de connaître la composition de leur fraction volatile (temps de rétention des composés inférieur à celui du C<sub>18</sub>) et par CLHP afin d'identifier les molécules colorantes liposolubles présentes de types caroténoïdes.

### IV.2.2.1. Fraction volatile

#### IV.2.2.1.1. Les fleurs

La concrète, issue de la macération à l'échelle pilote, a été analysée en CPG-SM, après dilution dans du dichlorométhane (cf. V.4.2). Seule l'identification de la fraction volatile (composés dont le temps de rétention est inférieur à celui du C<sub>18</sub>) a été étudiée. Son profil chromatographique est illustré par la Figure 11. Elle représente 21,7% des composés détectés en CPG-SM, cette valeur étant très supérieure à celle obtenue à l'issue de la macération à froid de 60 min dans l'hexane à l'échelle laboratoire (4,0%). Cette extraction a donc permis d'extraire plus de composés volatils par rapport aux composés lourds. Les molécules identifiées et présentes dans la fraction volatile, sont indiquées dans le Tableau 8.

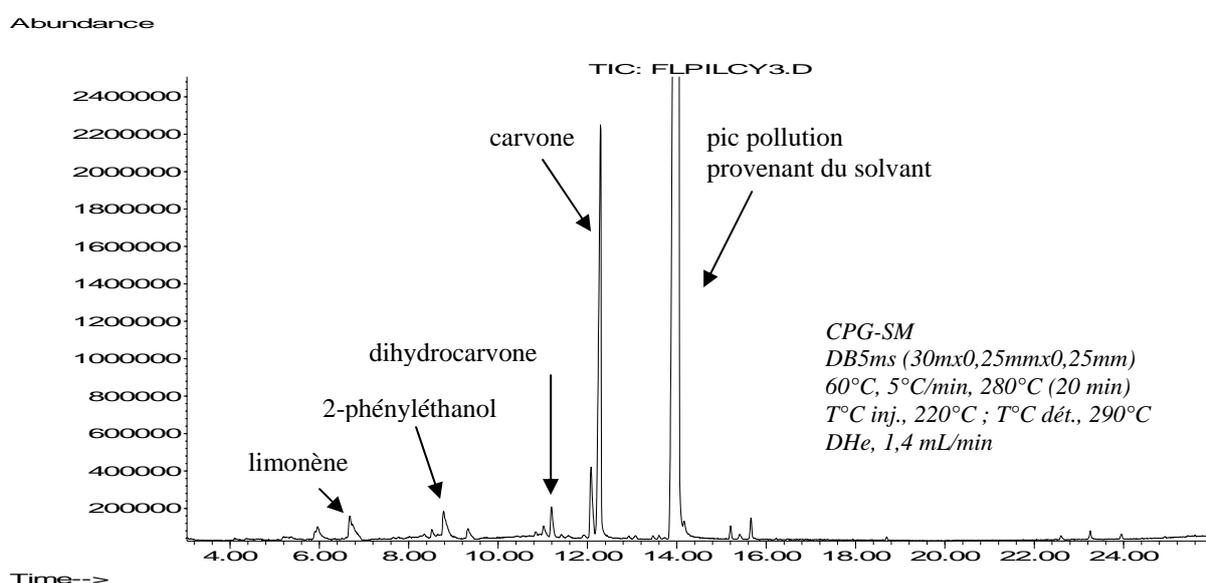


Figure 11. Chromatogramme CPG-SM d'extrait de fleurs issu de la macération à froid dans le cyclohexane réalisée à l'échelle pilote.

Tableau 8. Composés volatils (obtenus par CPG-SM) présents dans l'extrait de fleurs issu de la macération réalisée dans du cyclohexane à l'échelle pilote (60 min).

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments de masse [m/z(%)]	% A. / Extrait <sup>c</sup>	E.T.	% A. / P. M. <sup>d</sup>	E.T.
hepta-2,4-diène [4313-03-5]	1008	28(100),81(70),32(45),105(45),120(15),110(10),67(3)	0,89	0,06	7,34	0,11
limonène [138-86-3]	1039	68(100),93(70),53(17),41(20),107(12),121(12),136(10)	<b>1,72</b>	0,15	<b>14,14</b>	0,27
nonanal [124-19-6]	1115	57(100),41(75),43(55),29(45),70(30),98(25)	<b>0,28</b>	0,06	<b>2,28</b>	0,32
2-phényléthanol [60-12-8]	1125	91(100),122(25),65(15),51(2),77(2),123(1)	<b>1,66</b>	0,15	<b>13,67</b>	0,22
pentylcyclohexane [4292-92-6]	1145	28(100),82(70),83(70),55(65),41(10),154(6),97(1)	0,43	0,04	3,58	0,18
cyclopentylcyclohexane [1606-08-2]	1202	28(100),55(2),41(1),68(3),82(5),96(1),109(1),152(1)	0,16	0,27	1,34	2,32
dihydrocarvone [7764-50-3]	1212	67(100),95(70),41(65),81(60),55(50),109(45),152(5)	<b>1,35</b>	0,10	<b>10,80</b>	0,30
hexylcyclohexane [4292-75-5]	1249	83(100),82(85),55(75),41(300),28(15),168(7),97(1)	2,08	0,11	17,17	0,32
carvone [99-49-0]	1257	82(100),54(50),39(40),93(35),108(35),67(10),150(5)	<b>12,13</b>	0,88	<b>100,00</b>	0,00
1-méthyl-2-cyclohexyl-cyclohexane [50991-08-7]	1367	55(100),82(70),97(68),67(40),41(35),180(45),39(5)	0,27	0,03	2,21	0,07
dicyclohexylméthane [3178-23-2]	1384	82(100),55(95),67(50),96(40),180(30),39(5),109(1)	0,50	0,02	4,13	0,08
1713	1713	57(100),43(80),71(75),85(50),112(1),155(1)	0,22	0,01	1,82	0,06
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>			21,7	0,3	-	-

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et de la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

<sup>c</sup>pourcentages par rapport à la totalité des pics présents sur le chromatogramme CPG-SM de l'extrait.

<sup>d</sup>pourcentages par rapport au pic majoritaire (P.M., carvone) de la fraction volatile.

Le composé majoritairement extrait est la carvone (12,2%), responsable de notes "herbacée et épicée", (Arctander, 1994a). Le limonène, libéré par la plante et seulement extrait par SPME (cf. III.2.2.1.1, Figure 4), est présent à 1,7% dans l'extrait. Cette molécule donne des notes "fraîche" et "citronnée", cependant son pouvoir olfactif massique est faible (5,67, (Devos, 1990)). Le nonanal et le 2-phényléthanol, ayant une forte activité odorante et possédant des notes "miellée piquante" et "florale miellée", sont également présents respectivement à 0,3% et 1,7% dans l'extrait. La dihydrocarvone, représentant 1,4% des composés extraits, est responsable de notes puissantes "chaude" et "herbacée". Dans cette fraction volatile, plusieurs composés tels que le pentylcyclohexane, le cyclopentylcyclohexane, l'hexylcyclohexane, le 1-méthyl-2-cyclohexylcyclohexane et le dicyclohexylméthane, semblent provenir du solvant dont la pureté est de 99,9% (cf. V.1.1, Tableau 1). Ces molécules ne représentent que 3,5% de l'extrait total soit 15,8% de la fraction volatile. Les pourcentages ont été alors recalculés par rapport au pic majoritaire de la fraction volatile afin de s'affranchir de ces composés dont on ignore la provenance.

Le profil des composés volatils de cet extrait est légèrement différent de celui obtenu par macération à froid dans l'hexane durant 60 min (Figure 12).

La carvone est extraite en quantité importante (12,2%) et le limonène en quantité non négligeable (1,7%) alors que ces deux molécules étaient absentes de l'extrait à l'échelle laboratoire. Le 2-éthylhexan-1-ol (coélué avec le limonène) se trouve désormais à l'état de traces alors qu'il était présent à 2,0%.

Néanmoins, l'extrait issu de l'échelle pilote est aromatiquement très riche, la fraction volatile étant très importante (21,7%) et les composés extraits particulièrement odorants.

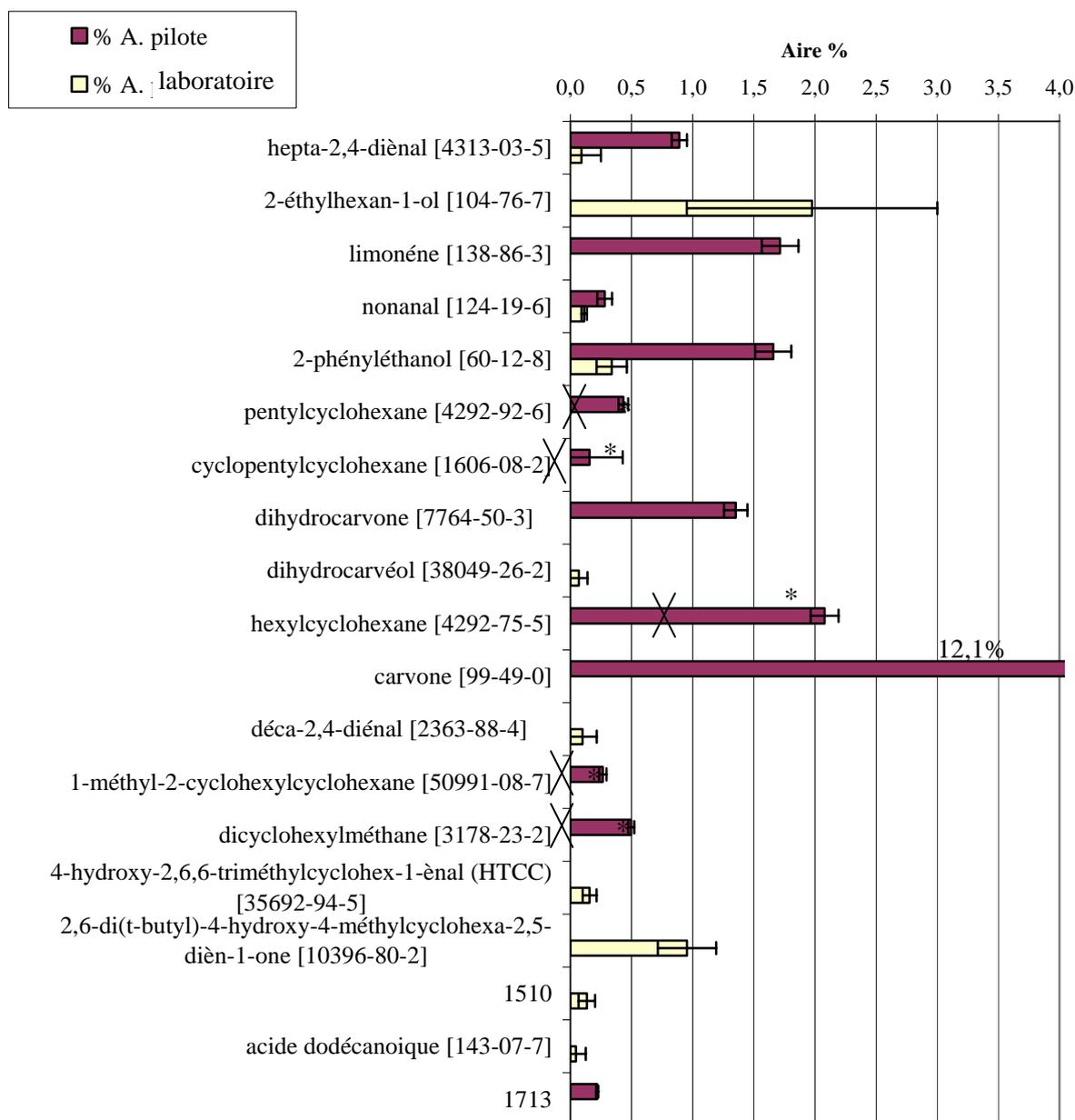


Figure 12. Comparaison de l'extrait de fleurs réalisé à l'échelle laboratoire dans l'hexane avec celui réalisé à l'échelle pilote dans le cyclohexane. \* contaminations.

IV.2.2.1.2. Les feuilles

La concrète de feuilles, issue de la macération à froid à l'échelle pilote, a été analysée par CPG-SM, après dilution dans du dichlorométhane (cf. V.4.2). La fraction volatile (composés dont le temps de rétention est inférieur à celui du C<sub>18</sub>) représente 4,1% des composés détectés en CPG-SM (Tableau 9), valeur supérieure à celle obtenue lors de la macération à froid dans l'hexane de 5 jours (1,4%). Cependant, ce résultat est surestimé, les composés tels que l'hexylcyclohexane, le 1-méthyl-2-cyclohexylcyclohexane et le dicyclohexylméthane, pouvant provenir du solvant et étant présents en quantité non négligeable. Par soustraction des pourcentages de ces composés, la fraction volatile est de 2,0%.

**Tableau 9. Composés volatils (obtenus par CPG-SM) présents dans l'extrait de feuilles issu de la macération dans le cyclohexane de 5 jours à l'échelle pilote.**

Identification <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Fragments de masse [m/z(%)]	% A.	E.T.
hepta-2,4-dièneal [4313-03-5]	1015	81(100),39(30),110(27)53(22),95(1)	0,59	0,10
hexylcyclohexane [4292-75-5]	1256	83(100),55(70),67(45),28(30),41(30),139(2),168(2)	1,49	0,32
1310	1310	67(100),81(80),92(60),77(60),55(50),121(50),107(20)	0,03	0,06
déca-2,4-dièneal [2363-88-4]	1315	81(100),41(25),55(10),95(10),67(12),152(3),109(1)	0,35	0,05
1-méthyl-2-cyclohexyl- -cyclohexane [50991-08-7]	1372	55(100),82(80),97(80),180(50),67(40),41(35),77(1)	0,22	0,07
dicyclohexylméthane [3178-23-2]	1394	82(100),55(80),67(45),96(30),180(25),41(25),109(1)	0,32	0,09
1403	1403	28(100),32(30),41(15),55(15),69(10),83(10),97(6)	0,23	0,06
dodécanoate d'éthyle [106-33-2]	1659	28(100),88(50),32(30),55(13),101(15),157(3),183(1)	0,43	0,26
3-oxo- $\alpha$ -ionone [79734-43-3]	1666	108(100),43(70),119(20),77(10),150(15),159(1),192(1)	0,14	0,12
1692	1692	87(100),57(90),41(70),69(70),109(30),151(28),222(10)	0,25	0,07
1749	1749	57(100),82(95),43(75),68(65),97(50),111(10),136(6)	0,07	0,12
<b>Fraction volatile de l'extrait (%)</b>			<b>4,1</b>	<b>0,1</b>

<sup>a</sup>identification réalisée à partir des indices de rétention, des bibliothèques (NIST, Agilent, France ; WILEY, Hewlett Packard, France) et de la littérature.

<sup>b</sup>indice de rétention calculé à partir des alcanes.

En comparaison avec les concrètes obtenues par macération des feuilles dans l'hexane, cet extrait est pauvre en composés volatils odorants (Figure 13). Ces deux concrètes n'ont en commun aucun composé volatil. Seul le déca-2,4-dièneal, présent à 0,4% dans l'extrait, donne des notes puissantes "orange", "sucrée" et "citronnée", (Arctander, 1994a).

La pauvreté aromatique de cette concrète pourrait être due au séchage des feuilles réalisé avant extraction qui rappelons-le a été indispensable à leur conservation (cf. IV.2.1.2).

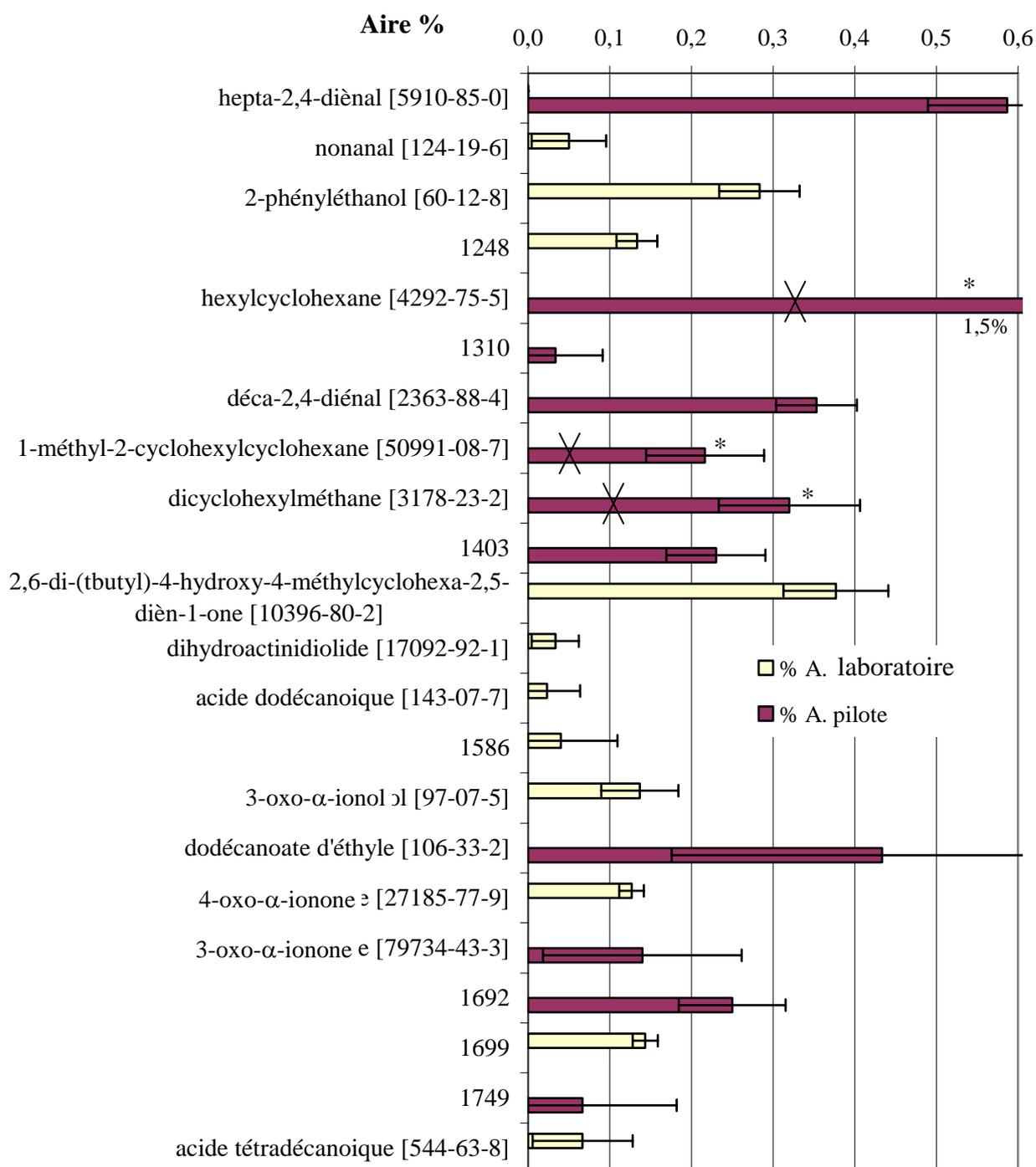


Figure 13. Comparaison de l'extrait de feuille à l'échelle laboratoire dans l'hexane avec celui réalisé à l'échelle pilote dans le cyclohexane. \* contaminations.

#### IV.2.2.1.3. Conclusions

La valorisation aromatique de l'extrait de fleur est très intéressante de part sa fraction volatile importante (21,7%) et les molécules odorantes qui la composent (limonène notes "fraîche" et "citronnée", nonanal et 2-phényléthanol notes "florale", "miellée" et "piquante", dihydrocarvone notes "chaude" et "herbacée" et carvone notes "herbacée" et "épice"). Le

procédé d'extraction est concluant et permet d'obtenir des concrètes qui pourraient être utilisables en parfumerie.

La concrète de feuille est pauvre en composés volatils odorants (déca-2,4-diène notes "orange", "sucrée" et "citronnée"). Les concrètes de feuilles à l'échelle laboratoire étant aromatiquement plus riches, seul le procédé d'extraction peut être mis en cause et notamment le séchage des feuilles avant extraction. Un séchage moins poussé permettrait une bonne conservation des feuilles tout en évitant la perte de molécules odorantes.

#### **IV.2.2.2. Molécules colorantes liposolubles de type caroténoïde**

Les concrètes de fleurs et de feuilles obtenues à l'échelle pilote possèdent chacune une coloration intense. L'extrait de fleurs est orangé-rouge tandis que celui provenant des feuilles est vert-jaune. La valorisation de ces extraits nécessite l'identification des molécules colorantes et notamment des caroténoïdes liposolubles, responsables des couleurs jaune, orangé et rouge. Les extraits de feuilles et de fleurs, issus de la macération à l'échelle pilote, ont été analysés par CLHP, puis par CLHP-SM et par TOF afin de déterminer le profil analytique, la masse et la structure des molécules liposolubles et colorantes. Cette étude porte plus particulièrement sur les caroténoïdes présents dans ces deux organes de la plante (cf. III.3).

##### **IV.2.2.2.1. Profil analytique**

Les extraits, dilués dans l'acétonitrile, ont été analysés par CLHP muni d'un détecteur à barrette de diodes à la longueur d'onde caractéristique des caroténoïdes,  $\lambda = 450$  nm (cf. V.4.3.1), selon la méthode d'élution déterminée précédemment pour l'analyse des extraits sélectifs de caroténoïdes (cf. V.3.4.2.1).

##### **IV.2.2.2.1.1. Extrait de fleurs**

Le profil chromatographique de l'extrait de fleurs ne présente aucun pic à la longueur d'onde  $\lambda = 450$  nm. Les molécules extraites seraient donc différentes de celles analysées précédemment dans l'extrait sélectif de caroténoïdes, hypothèse confirmée par les données bibliographiques. Selon la littérature, (Harborne, 1984), les caroténoïdes présents dans les fleurs des végétaux supérieurs apparaissent souvent sous formes combinées de xanthophylles estérifiées par des acides gras (acides palmitique, oléique ou linoléique). Or, le procédé d'extraction sélectif des caroténoïdes implique une étape de saponification. Les caroténoïdes analysés précédemment se trouvaient sous forme saponifiée tandis que ceux analysés dans l'extrait de fleurs issu de la macération à l'échelle pilote seraient estérifiés. Ce dernier a alors

été saponifié puis analysé (cf. V.4.3.1). Le rendement de cette étape est de 43,1%. Le profil analytique obtenu, illustré Figure 14, est similaire à celui de l'extrait sélectif des caroténoïdes, avec sept pics présents dans les mêmes proportions et donnant les mêmes spectres UV (cf. III.3.2.1.1, Figure 12 et 13 et Tableau 18).

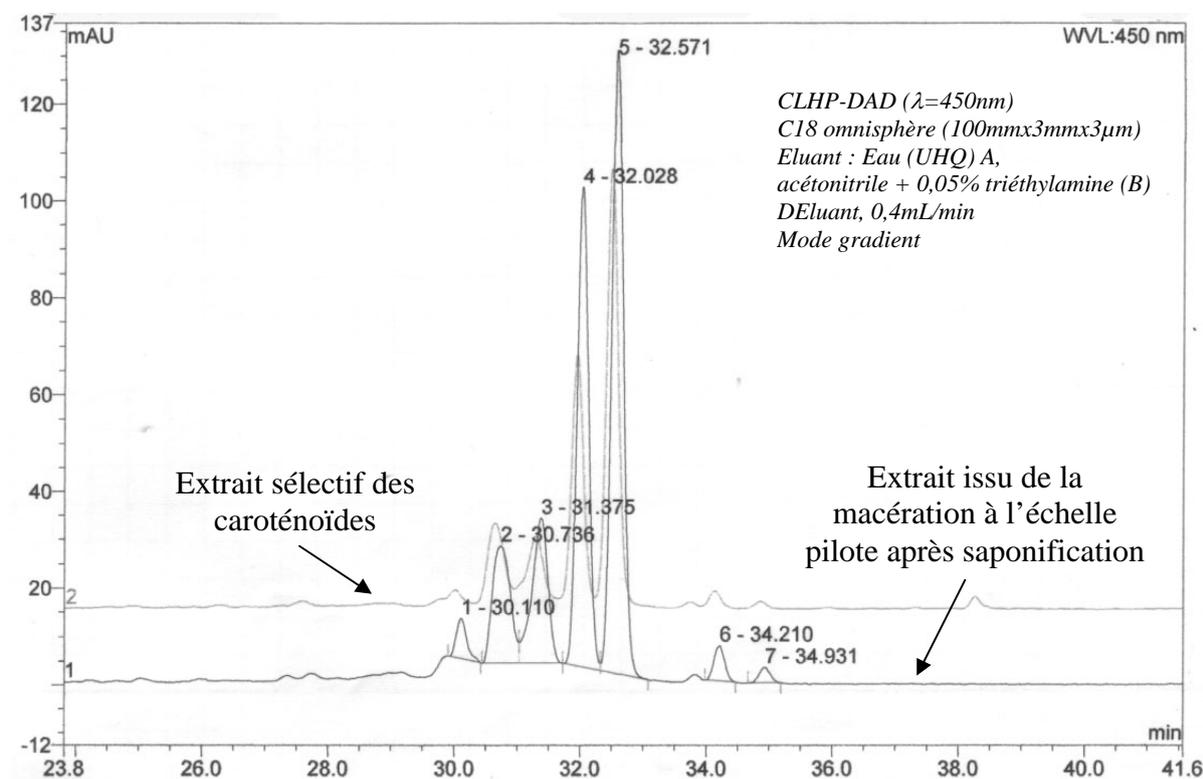


Figure 14. Chromatogramme CLHP à  $\lambda = 450 \text{ nm}$  de l'extrait de fleurs, issu de la macération à l'échelle pilote dans du cyclohexane, après saponification (1) et celui de l'extrait sélectif des caroténoïdes présents dans les fleurs (2).

Les caroténoïdes présents dans la concrète de fleur auraient le même squelette que ceux extraits sélectivement, mais sous formes estérifiés. Le rendement d'extraction des caroténoïdes saponifiés (macération à l'échelle pilote suivie d'une saponification) par rapport à la matière sèche est de 1,1%, valeur supérieure à celle obtenue lors de l'extraction sélective (0,2%) qui nécessitait un plus grand nombre d'étape (cf. V.3.4.1.1). Un des acides gras présents en bout de chaîne pourrait être l'acide palmitique, ce dernier étant présent dans la fleur (cf. III.2.2.2.1, extrait par hydrodistillation des fleurs de *Crocus sativus* à 0,8%).

#### IV.2.2.2.1.2. Extrait de feuilles

L'extrait de feuilles a été analysé selon la même méthode d'éluion que celle utilisée pour l'extrait sélectif des caroténoïdes. Le profil chromatographique et les spectres UV des molécules, détectées à  $\lambda = 450 \text{ nm}$ , sont similaires en ce qui concerne la fin du

chromatogramme (du pic 4 au pic 8, cf. III.3.2.1.2, Figure 14 et 15 et Tableau 19). Les molécules les plus polaires, présentes dans l'extrait sélectif des caroténoïdes, sont absentes de l'extrait issu de la concrète de feuilles (Figure 15).

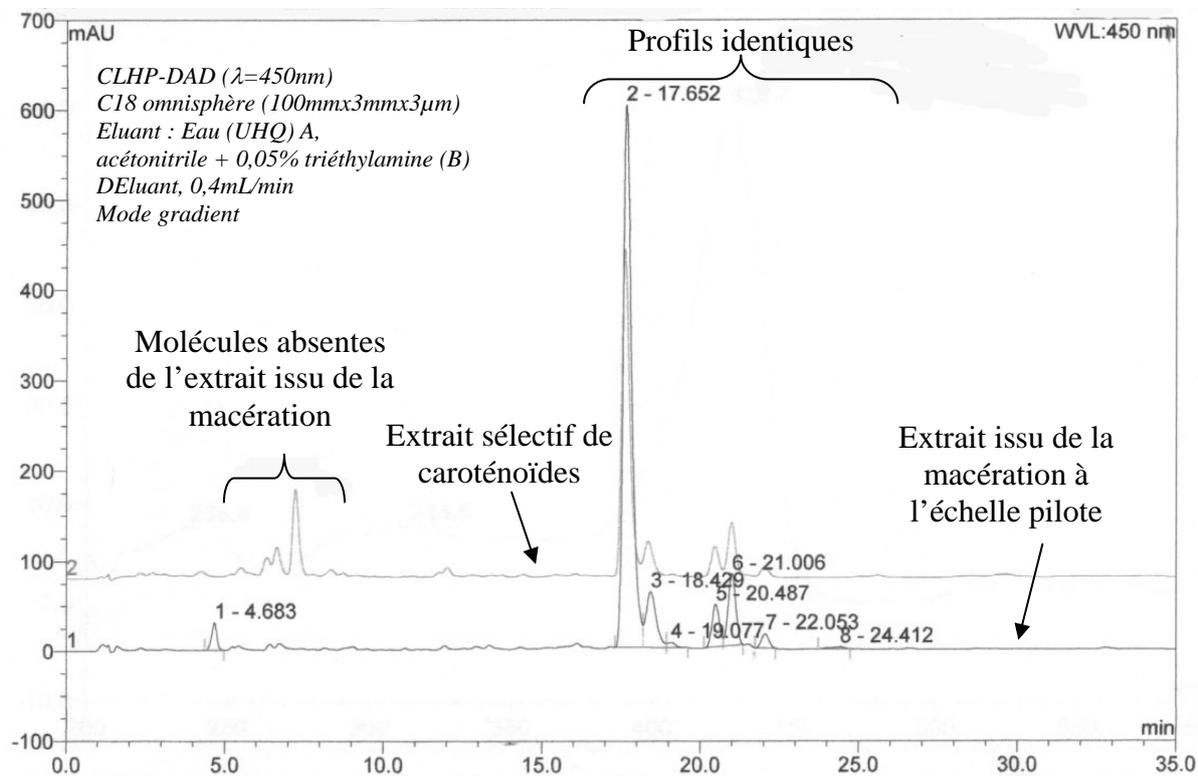


Figure 15. Chromatogrammes CLHP à  $\lambda = 450 \text{ nm}$  de l'extrait de feuilles issu de la macération à l'échelle pilote dans du cyclohexane (1) et celui de l'extrait sélectif de caroténoïdes présents dans les feuilles (2).

Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence : la présence de ces molécules sous formes estérifiées et/ou la polarité du solvant. Le cyclohexane, étant moins polaire que l'éther diéthylique, n'extrairait pas ce type de molécules. L'extrait de feuilles a alors été saponifié et analysé (cf. V.4.3.1). Le rendement de cette étape est de 68,8% et permet d'éliminer la chlorophylle présente en quantité importante et donnant une couleur verte à l'extrait. Aucune modification du profil chromatographique n'a été observée (Figure 16, pas de pic en début de chromatogramme), ce qui confirme la seconde hypothèse, selon laquelle, les caroténoïdes les plus polaires présents dans l'extrait sélectif des caroténoïdes n'ont pas été extraits par le cyclohexane.

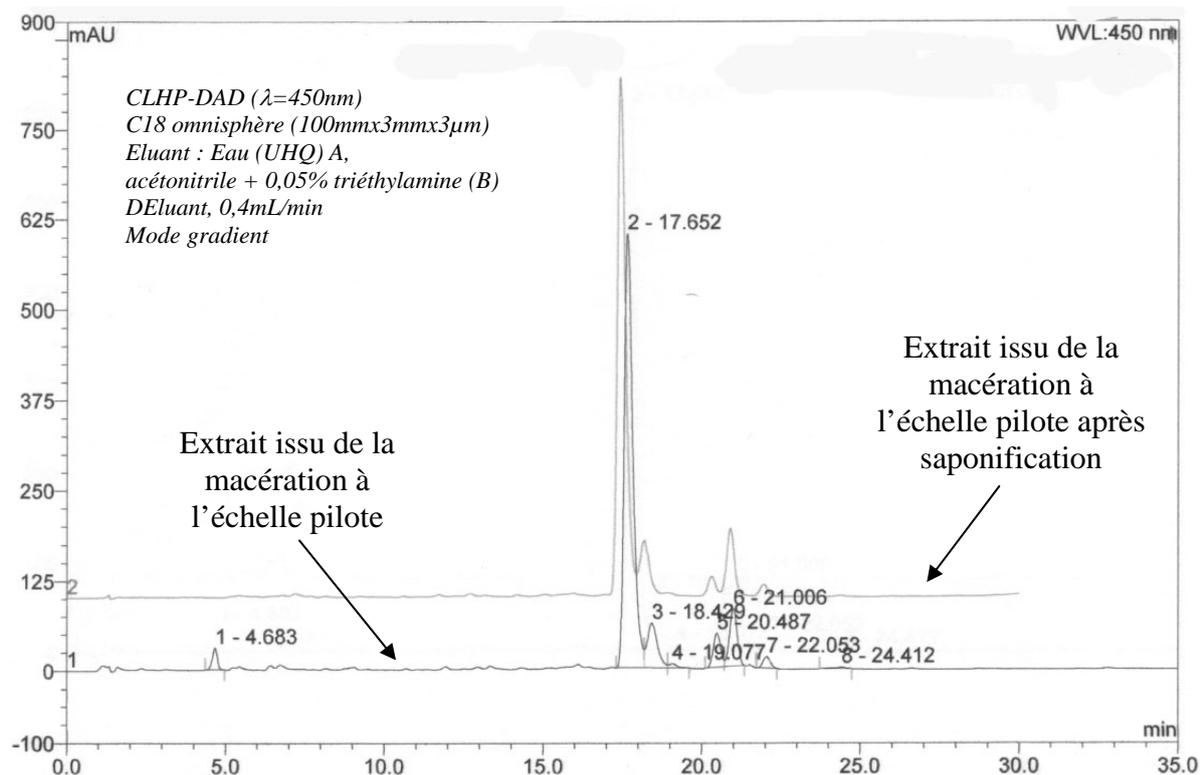


Figure 16. Chromatogrammes CLHP à  $\lambda = 450 \text{ nm}$  de l'extrait de feuilles issu de la macération à l'échelle pilote dans du cyclohexane avant (1) et après (2) saponification.

Les caroténoïdes présents dans les feuilles se trouvent sous forme simple. Le rendement d'extraction de ces caroténoïdes (macération à l'échelle pilote suivie d'une saponification) par rapport à la matière sèche est de 1,0%, valeur similaire à celle obtenue pour l'extraction sélective (1,1%).

#### IV.2.2.2.1.3. Conclusions

Les profils analytiques et les spectres UV, montrent que les caroténoïdes présents dans les fleurs seraient sous formes estérifiées par des acides gras de type acide palmitique, car après saponification de l'extrait issu de la macération à l'échelle pilote, le profil chromatographique obtenu est identique à celui de l'extrait sélectif de caroténoïdes.

Les caroténoïdes présents dans l'extrait de feuille issu de la macération à l'échelle pilote auraient également une structure proche de ceux présents dans l'extrait sélectif des caroténoïdes. Cependant, seuls les moins polaires ont été extraits, au vue de la polarité du solvant.

Ces données ont été confirmées par l'analyse CLHP-SM, réalisée dans la partie suivante.

#### IV.2.2.2.2. Spectre de masse

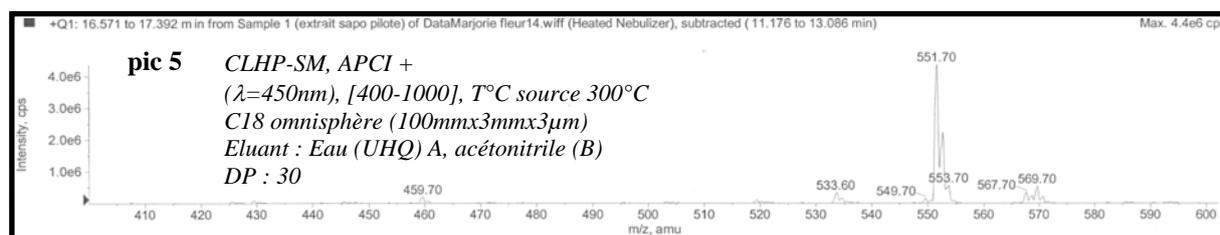
Les extraits ont été analysés par CLHP-SM afin de connaître les fragments caractéristiques de ces caroténoïdes (cf. V.4.3.2).

##### IV.2.2.2.2.1. Extrait de fleurs

Seul l'extrait saponifié a été analysé, l'extrait issu de la concrète ne donnant aucun pic (cf. IV.2.2.2.1.1). Le pic 7 n'a pas pu être détecté, le signal étant trop faible. Pour tous les pics, le fragment majoritaire est (M+H) 551 (Tableau 10 et Figure 17).

**Tableau 10. Fragments de masse (obtenus par CLHP-SM) des molécules colorantes, (pics de 1 à 7), détectées à  $\lambda = 450$  nm, présentes dans l'extrait saponifié, issu de la macération de fleurs dans du cyclohexane à l'échelle pilote.**

Pics	Temps de rétention	Fragments de masse [(m+H)/z]
1	13,59	459, 533, <b>551</b> , 569
2	14,49	459, 533, <b>551</b> , 569
3	15,22	459, 533, <b>551</b> , 469
4	16,12	425, 459, 533, <b>551</b> , 569
5	16,90	459, 533, <b>551</b> , 569
6	20,16	421, 459, 533, <b>551</b> , 569
7	-	-



**Figure 17. Spectre de masse (obtenu par CLHP-SM) du pic 5 majoritaire présent dans l'extrait de fleurs, issu de la macération à l'échelle pilote dans du cyclohexane, après saponification.**

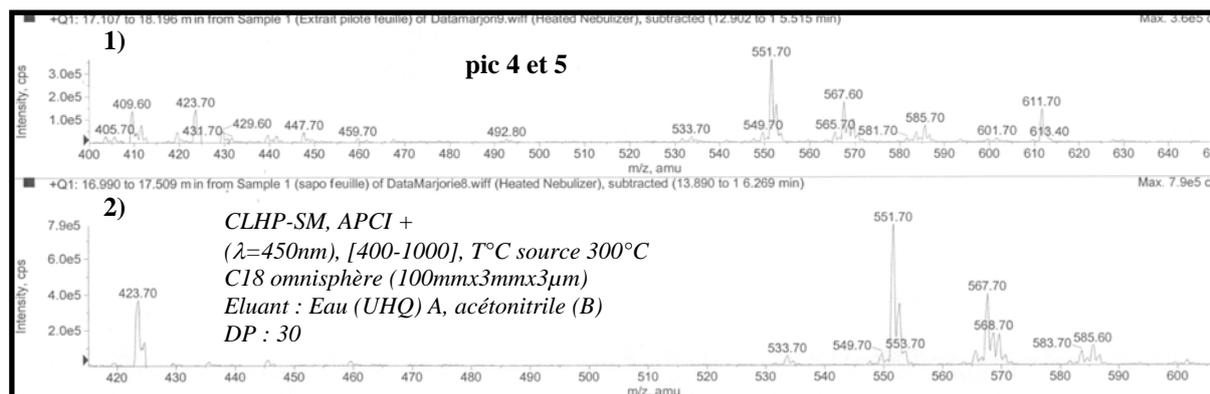
Les fragments de masse sont les mêmes pour les différents pics et sont identiques à ceux obtenus dans l'extrait sélectif des caroténoïdes (cf. III.3.2.2.1, Tableau 21 et Figure 17).

##### IV.2.2.2.2.2. Extrait de feuilles

L'extrait de feuilles a été analysé avant et après saponification. Seuls les pics 4 et 5 coélus et le pic 7 ont été détectés, les pics 6 et 8 ayant un signal trop faible. Le fragment majoritaire, commun à tous les pics, est (M+H) 551 (Tableau 11 et Figure 18).

Tableau 11. Fragments de masse (obtenus par CLHP-SM) des molécules colorantes (pics de 4 à 8), détectées à  $\lambda = 450$  nm, présentes dans l'extrait de feuilles, issu de la macération dans du cyclohexane à l'échelle pilote avant et après saponification.

Pics	Temps de rétention	Fragments de masse [(m+H)/z] dans l'extrait de feuille	Fragments de masse [(m+H)/z] dans l'extrait de feuille saponifié
4	17,40	423, 492, 533, <b>551</b> , 567, 611	423, 533, <b>551</b> , 567, 585
5			
6	-	-	-
7	19,70	419, 445, <b>551</b> , 613	419, <b>551</b> , 557, 567, 585
8	-	-	-



Ces fragments sont similaires à ceux obtenus dans l'extrait sélectif des caroténoïdes (cf. III.3.2.2.2, Tableau 22 et Figure 18).

#### IV.2.2.2.3. Conclusions

Le fragment caractéristique de ces caroténoïdes, déterminé par CLHP-SM, est 551. Le profil analytique, les spectres UV et le fragment de masse majoritaire, étant les mêmes, les caroténoïdes présents dans l'extrait de fleur issu de la macération à l'échelle pilote, après saponification, et ceux obtenus par extraction sélective, seraient identiques. Il en est de même pour les caroténoïdes les moins polaires présents dans les feuilles.

Cependant, une analyse par TOF, évaluant la masse exacte d'un fragment moléculaire donné et déterminant sa formule brute, permet de confirmer ces données. De plus, un dosage approximatif du fragment majoritaire a pu être réalisé par cette même technique.

#### IV.2.2.2.3. Masse exacte et dosage

De nombreuses molécules donnent le fragment de masse (m+H) 551, (Britton et al., 2004). L'analyse des échantillons par TOF permet de conclure sur la formule brute, correspondant à ce fragment de masse, et de doser de manière approximative la ou les

molécules correspondantes si le fragment caractéristique est suffisamment intense. La recherche de masse exacte et le dosage des molécules correspondantes ont été effectués sur les extraits de feuilles et de fleurs issus de la macération à l'échelle pilote après saponification, la fraction insaponifiable obtenue étant plus riche en caroténoïdes par élimination de la chlorophylle dans le cas des feuilles et d'acides gras dans celui des fleurs (cf. V.4.3.3.1 et V.4.3.3.2).

#### **IV.2.2.2.3.1. Extrait de fleurs**

##### **IV.2.2.2.3.1.1. Formule brute**

L'analyse de l'extrait, issu de la macération à l'échelle pilote, saponifié a pu être réalisé par TOF car le bruit de fond du signal pour cet extrait était faible. La recherche de la masse exacte 551,4183 a été réalisée avec une marge d'erreur de 50 ppm. Au vues de la parité de l'ion et de l'abondance isotopique mesurée en spectrométrie de masse, seules deux formules sur sept peuvent être retenues avec une marge d'erreur de 10 ppm :  $C_{40}H_{55}O$  et  $C_{36}H_{55}O_4$ . Compte tenu de la polarité des molécules (polarité proche des étalons, lutéine et zéaxanthine, cf. III.3.2.1.4), seule la formule (M-H<sub>2</sub>O+H)  $C_{40}H_{55}O$  correspondrait. Elle équivaut à la formule brute  $C_{40}H_{56}O_2$ .

##### **IV.2.2.2.3.1.2. Dosage d'un des caroténoïdes majoritaires**

Le dosage du fragment majoritaire, 551, a été réalisé par calibration externe à l'aide de la lutéine. L'effet matrice (impact des autres molécules présentes dans l'extrait sur la réponse de la lutéine) n'a pas pu être mesuré dans cet extrait car le fragment 551 était très abondant. La réponse du fragment sur 10 scans est de 854. L'ordre de grandeur de ce type de caroténoïdes  $C_{40}H_{56}O_2$  est de 0,568 mg dans l'extrait saponifié réalisé à partir de 9,5 mg d'extrait sec. Ces caroténoïdes sont présents à 5,98% dans l'extrait saponifié de fleurs. La masse de ces caroténoïdes sous forme saponifiée présents dans l'extrait végétal issu du pilote (26,11 g) est de 0,67 g, soit 2,6% de l'extrait.

#### **IV.2.2.2.3.2. Extrait de feuilles**

##### **IV.2.2.2.3.2.1. Formule brute**

La recherche de la masse exacte 551,4373 a pu être effectuée avec une marge d'erreur de 50 ppm dans l'extrait saponifié de feuilles, le bruit de fond étant peu intense. Dix réponses ont été obtenues pour cet échantillon. Selon la parité de l'ion et l'abondance isotopique, une seule formule correspond avec une marge d'erreur de 10 ppm : (M-H<sub>2</sub>O+H)  $C_{40}H_{55}O$ , soit les molécules de formule brute  $C_{40}H_{56}O_2$ .

#### IV.2.2.2.3.2.2. Dosage d'un des caroténoïdes majoritaires

Le dosage du fragment majoritaire, 551, a été réalisé comme précédemment par calibration externe à l'aide de la lutéine. L'effet matrice (influence des autres molécules présente dans l'extrait sur la réponse du fragment) augmente de 50% le signal. La réponse du fragment sur 10 scans étant de 194, la masse approximative des caroténoïdes,  $C_{40}H_{56}O_2$ , dans l'extrait, préparé à partir de 13,8 mg d'extrait sec, est de 0,0568 mg. Ces caroténoïdes sont présents à 0,41% dans l'extrait de feuille saponifié. La masse de ces caroténoïdes dans l'extrait végétal (69,0 g) est de 0,20 g, soit 0,29% de l'extrait.

#### IV.2.2.2.4. Conclusions

Une partie des caroténoïdes présents dans les fleurs seraient sous formes estérifiées par des acides gras, de type acide palmitique. Après saponification, ces caroténoïdes présents dans l'extrait végétal ont une masse de 568 et une formule brute de  $C_{40}H_{56}O_2$  et seraient identiques à ceux extraits sélectivement. Ils sont présents approximativement à 5,98% dans l'extrait saponifié de fleurs. Le rendement d'extraction de ces caroténoïdes par rapport à la matière sèche est d'environ  $65,7 \cdot 10^{-3}\%$ , soit de  $9,5 \cdot 10^{-3}\%$  par rapport à la matière humide.

L'extrait végétal de feuille contient des caroténoïdes de masse 568 et de formule brute  $C_{40}H_{56}O_2$ , identiques à ceux peu polaires présents dans l'extrait sélectif de caroténoïdes. L'extrait saponifié de feuille comporte 0,41% de ces caroténoïdes, soit un rendement d'extraction par rapport à la matière sèche de  $3,9 \cdot 10^{-3}\%$  et de  $3,5 \cdot 10^{-3}\%$  par rapport à la matière humide.

Ces caroténoïdes présents dans les extraits saponifiés de feuilles et de fleurs sont identiques, leurs teneurs étant largement supérieures dans les fleurs. D'après les données bibliographiques, (Harborne, 1984), les molécules envisageables pourraient être la lutéine et/ou la zéaxanthine. La teneur des fleurs en ces caroténoïdes est proche de celle des épinards, produit riche en lutéine et zéaxanthine ( $11,9 \cdot 10^{-3}\%$ ) et celle des feuilles, des brocolis ( $2,4 \cdot 10^{-3}\%$ ), (USDA-NCI, 1998).

### **IV.2.3. Fixation par voie thermique des molécules colorantes et étude de la photodégradation des néo-pigments à base de safran**

Les extraits végétaux obtenus par macération à l'échelle pilote possèdent des couleurs intenses (orangée-rouge pour les fleurs et verte-jaune pour les feuilles) dues essentiellement aux caroténoïdes mais aussi à la chlorophylle dans le cas des feuilles. Les caroténoïdes étant sensibles à la photodégradation, une étude de la fixation des molécules colorantes sur de l'argile par voie thermique (formation de néo-pigments) a été réalisée afin de tenter d'augmenter la résistance de ces composés et de les utiliser dans des formulations dans le domaine cosmétique (cf. Annexe I, 3.3). Deux argiles ont été testées : l'attapulgite et la bentonite.

#### **IV.2.3.1. Mise au point du protocole de fixation des pigments sur l'argile**

##### **IV.2.3.1.1. Protocole général**

Le mélange d'extrait de feuilles ou de fleurs et d'argile a été réalisé à 30% par rapport à l'argile sèche. L'ajout d'alun à 5% (mordant) a été effectué afin de permettre une meilleure fixation des molécules colorantes sur le support. Le mélange a été homogénéisé puis chauffé dans un four (FCV 61 EDM, Angelo PO, Italie), à une température de 120°C et un temps compris entre 30 et 120 min. Les néo-pigments obtenus ont été broyés au mortier afin d'obtenir une fine poudre. La tenue des molécules colorantes sur le support argileux a été testée par lavage du néo-pigment avec de l'eau puis avec de l'éthanol, la coloration du solvant étant dépendante de la fixation des molécules sur le support. Les protocoles expérimentaux ont été détaillés dans la partie expérimentale (cf. V.4.4.1).

##### **IV.2.3.1.2. Influence de l'eau**

Les pigments étant liposolubles, la difficulté a résidé dans l'homogénéisation du mélange et la pénétration des molécules colorantes dans les zones libérées par l'eau (canaux pour l'attapulgite, cf. Annexe I, 3.3.1.1, et inter-feuillets pour la bentonite, cf. Annexe I, 3.3.1.2), lors du chauffage. Le mélange des pigments, de l'argile et de l'alun a été effectué par ajout d'eau et/ou d'éthanol (cf. V.4.4.1). Les poudres obtenues par homogénéisation dans l'eau ou dans un mélange eau/éthanol à 50% ont révélé une faible résistance lors du chauffage (par rapport à celles obtenues par homogénéisation dans de l'éthanol seul), engendrant des poudres de couleur très pâles (dégradation de la couleur). De plus, un prétraitement de l'argile par déshydratation (chauffage de 2h00 à 200°C) avant ajout d'alun et d'extrait végétal,

(Littmann, 1982), semble avoir une influence positive sur la couleur finale de la poudre. La présence d'eau paraît être nuisible à une bonne fixation des caroténoïdes sur l'argile. Des réactions d'hydrolyse des molécules colorantes (réactivités des doubles liaisons présentes sur les caroténoïdes de type  $C_{40}H_{56}O_2$ , cf. Figure 13, Annexe I, 3.1) pourraient avoir lieu au cours du chauffage entraînant une perte de couleur. L'homogénéisation du milieu a été réalisée par ajout d'éthanol.

#### **IV.2.3.1.3. Influence du substrat**

Deux types d'argiles ont été testés : l'attapulgite (cf. Annexe I, 3.3.1.1) et la bentonite (cf. Annexe I, 3.3.1.2). Les poudres obtenues par fixation des molécules colorantes sur l'attapulgite sont moins colorées que celles obtenues à partir de la bentonite, notamment dans le cas des néo-pigments à base d'extrait de fleurs, et les tests de stabilité de fixation révèlent une tenue très faible des molécules colorantes sur ce support. Les caroténoïdes sont des molécules à haut poids moléculaires, notamment dans le cas des fleurs (ex : caroténoïdes estérifiés par l'acide palmitique,  $M = 1048 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Les sites libérés par la déshydratation de l'attapulgite seraient moins accessibles aux molécules colorantes que ceux de la bentonite, la distance inter-feuillet de la bentonite ( $18 \text{ \AA}$ ) étant supérieure aux dimensions des canaux présents dans l'attapulgite ( $3,7 \times 12 \text{ \AA}$ ). La fixation des molécules colorantes serait meilleure dans le cas de la bentonite. Cette argile a été retenue pour fixer les molécules colorantes issues des extraits de feuilles et de fleurs.

#### **IV.2.3.2. Etude colorimétrique et résistance à la lumière**

Cinq types d'échantillons, réalisés selon l'étude précédente, ont été analysés dans cette partie. Les molécules colorantes ont été fixées sur de la bentonite ou sur de la bentonite déshydratée avec un temps de chauffage variant de 30 à 120 min jusqu'à l'obtention d'une poudre sèche.

##### **IV.2.3.2.1. Mesure de la couleur**

La couleur des poudres a été mesurée à l'aide d'un spectrocolorimètre (CM-508i, Minolta) en prenant pour référence l'argile avant fixation des molécules colorantes. L'écart de couleur a été calculé (cf. V.4.4.2).

**Tableau 12. Couleur des néo-pigments, à base d'extrait de fleurs et de feuilles, donnée dans le référentiel  $L^*a^*b^*$  et l'écart de couleur ( $\Delta E$ ) par rapport à l'argile seule (bentonite), mesurée par spectrocolorimétrie.**

	Argile et temps de chauffage	L*	a*	b*	$\Delta E$
Référence (bentonite)	-	81,50	1,07	16,36	-
Néo-pigments d'extrait de fleurs	Bentonite déshydratée, 30 min	53,21	11,33	62,49	55,08
	Bentonite, 60 min	56,71	10,59	58,72	50,02
	Bentonite, 30 min	50,58	9,24	52,96	48,60
Nép-pigments d'extrait de feuilles	Bentonite déshydratée, 90 min	30,57	2,18	27,58	52,16
	Bentonite, 120 min	43,54	0,44	25,34	30,01

Selon les résultats indiqués dans le Tableau 12, les néo-pigments à base d'extrait de fleurs possèdent une clarté légèrement supérieure à la moyenne ( $> 50$ ), une couleur jaune intense (les valeurs de  $b^*$  sont élevées) et légèrement rouge ( $a^* > 0$ ), confirmant les constations visuelles selon lesquelles les poudres semblent être jaune-orangé, très vif. L'écart de couleur, ainsi que la valeur donnée par  $b^*$ , sont plus importants par fixation sur support déshydraté, l'eau n'induisant pas de réactions de dégradations des molécules colorantes.

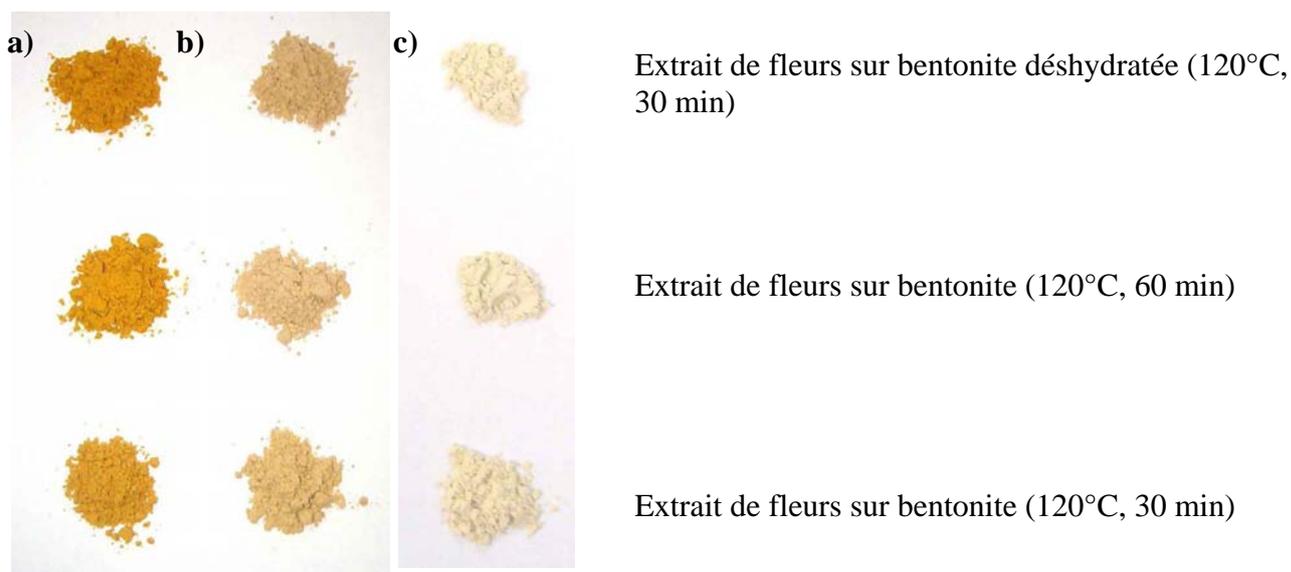
Les néo-pigments à base d'extraits de feuilles possèdent des valeurs de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  et  $\Delta E$  plus faibles que celles obtenues pour les néo-pigments à base d'extrait de fleurs. Les poudres sont vertes-jaunes. L'écart de couleur, comme précédemment, est plus important pour les néo-pigments réalisés sur l'argile déshydratée.

La résistance à la lumière de ces néo-pigments a été testée afin d'étudier la possibilité de les inclure dans des formulations.

#### **IV.2.3.2.2. Etude de la photodégradation**

Les néo-pigments à base d'extraits de fleurs ou de feuilles et de bentonite ont été exposés à la lumière, pendant 8h00 (équivalent à 10 jours d'exposition au soleil), dans les mêmes conditions d'illuminations, de température et d'humidité dans un appareil Suntest CPS+ (Atlas Materials, cf. V.4.4.3). Lors de l'exposition, des mesures de la couleur ont été effectuées toutes les heures à l'aide d'un spectrocolorimètre afin d'évaluer la photodégradation des échantillons. Une même masse de néo-pigment a été introduite dans l'appareil pour chaque type d'échantillons.

A l'œil nu, les poudres tendent à blanchir notamment dans le cas des néo-pigments fleurs (Figure 19), ceux à base d'extraits de feuilles, devenant verdâtres (Figure 20).



**Figure 19.** Néo-pigments à base d'extraits de fleurs et de bentonite *a)* avant suntest, *b)* après suntest (8h00) et *c)* argile seule, bentonite.



**Figure 20.** Néo-pigments à base d'extraits de feuilles et de bentonite *a)* avant suntest, *b)* après suntest (8h00) et *c)* argile seule, bentonite.

La Figure 21, présente la dégradation à la lumière des molécules tinctoriales de fleurs et de feuilles, extraites par macération à l'échelle pilote, fixées par méthode thermique sur la bentonite et sur la bentonite déshydratée.

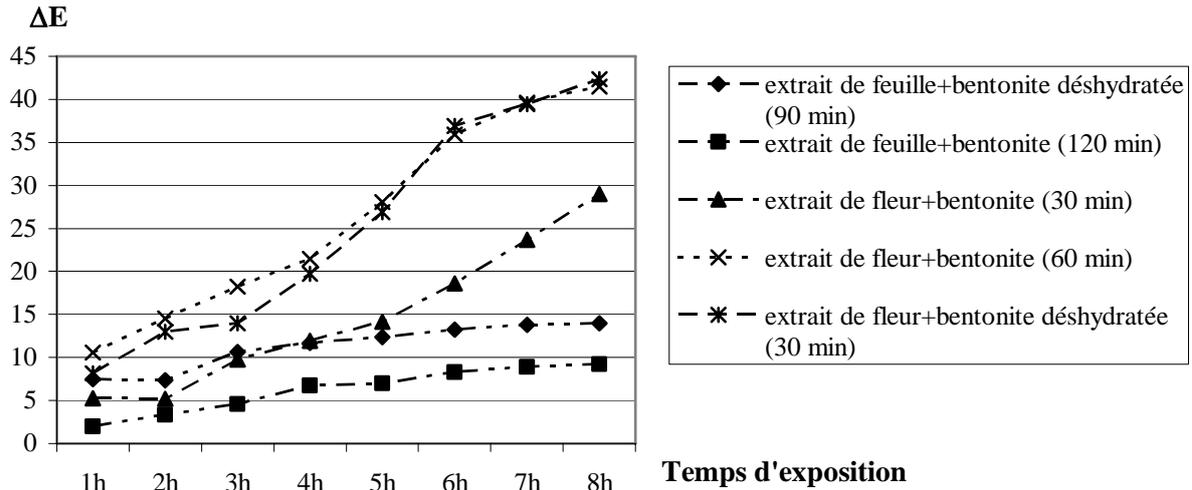


Figure 21. Écarts de couleur ( $\Delta E$ ) mesurés, lors de l'exposition à la lumière (suntest) des néo-pigments à base d'extrait de fleurs ou de feuilles et de bentonite, par spectrocolorimétrie.

Dés la première heure d'exposition, les néo-pigments à base d'extrait de fleurs présentent globalement des écarts de couleur supérieurs aux valeurs déterminées pour ceux à base de feuilles. Dans le cas « extrait de fleur + bentonite (30 min) », l'écart de couleur initial (par rapport à l'argile) est du même ordre de grandeur que ceux des néo-pigments à base de feuille (cf. IV.2.3.2.1, Tableau 12). La dégradation pour les néo-pigments « fleurs » est alors visible à l'œil nu ( $\Delta E \geq 3$ ) contrairement aux poudres réalisées à partir de l'extrait de feuilles et de bentonite. Après 3h00 d'exposition (équivalent à 90h00 de soleil), la dégradation s'accélère légèrement dans le cas des fleurs tandis que pour les feuilles elle semble se stabiliser. Après 8h00 d'exposition, les néo-pigments à base de fleurs sont totalement décolorés ( $\Delta E$  fleurs  $> 28$ ) et les néo-pigments à base de feuilles sont vert pâle ( $\Delta E$  feuilles  $< 14$ ).

Une diminution du paramètre  $b^*$  a été constatée pour tous les néo-pigments jusqu'à une valeur proche de 20 ( $b^*$  de la bentonite seule étant de 16,36), (Figure 22). Les pentes des droites de dégradation sont supérieures dans le cas des fleurs.

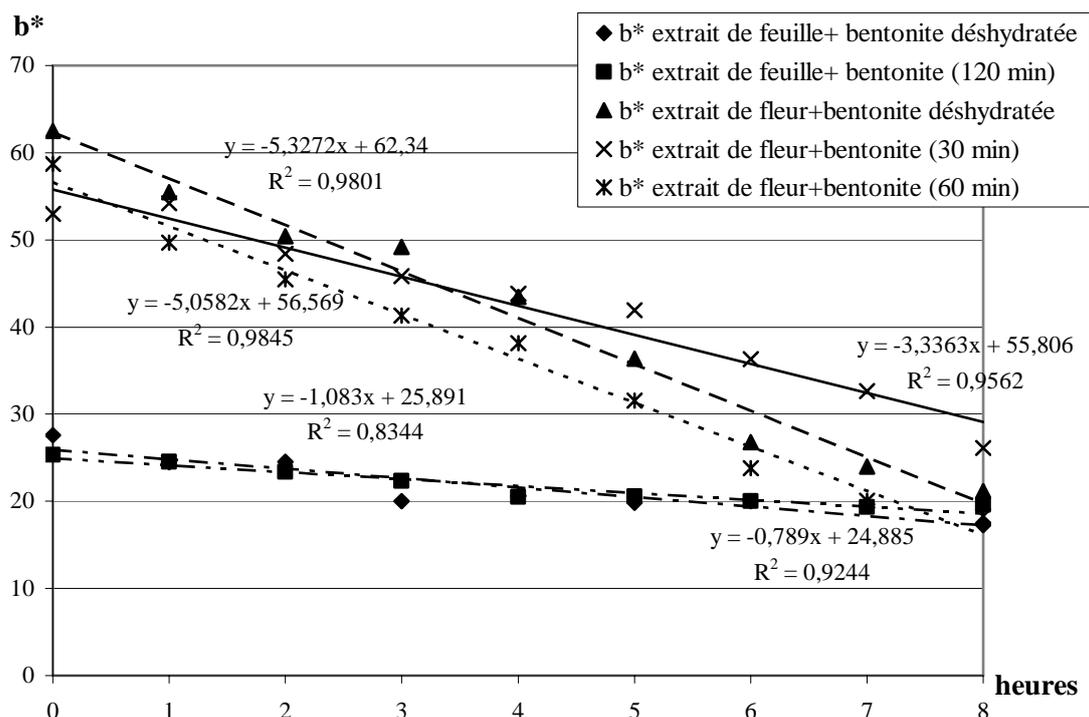


Figure 22. Représentation du paramètre  $b^*$ , dans le référentiel  $L^*a^*b^*$ , des néo-pigments à base d'extraits de fleurs ou de feuilles et de bentonite, en fonction du temps d'exposition (en heure) au suntest, obtenu par spectrocolorimétrie.

La couleur des poudres, en fonction du temps d'exposition, indique également une diminution du paramètre  $a^*$ , les néo-pigments à base d'extrait de fleurs tendant vers la valeur de l'argile seule (1,07) et ceux provenant des feuilles vers  $-a^*$  (de 2,18 à -1,61 pour l'extrait de feuille sur bentonite déshydratée et de 0,44 à -2,43 pour l'extrait de feuille sur bentonite (120 min)).

Les molécules colorantes présentes dans l'extrait de feuilles sont des caroténoïdes non estérifiés ( $C_{40}H_{56}O_2$ ,  $M = 568 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et de la chlorophylle (chlorophylle a,  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  et  $M_{\text{chlorophylle a}} = 893,5 \text{ g.mol}^{-1}$  et chlorophylle b,  $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$  et  $M_{\text{chlorophylle b}} = 907,5 \text{ g.mol}^{-1}$ ) donnant respectivement une couleur jaune et verte. Celles présentes dans l'extrait de fleurs sont des caroténoïdes estérifiés ( $C_{40}H_{56}O_2$  + par ex :  $2 \times C_{16}H_{33}O$ ,  $M=1048 \text{ g.mol}^{-1}$ ), donnant une couleur jaune vif. La diminution des paramètres  $b^*$  et  $a^*$  indique une perte de couleur jaune et rouge et donc la photodégradation des caroténoïdes, qui est plus importante dans le cas des néo-pigments issus de fleurs, ces poudres étant jaune-orangé vif initialement. Les poudres issus des extraits de feuilles tendent alors vers une couleur verte ( $-a^*$ ) donnée par la chlorophylle.

Les caroténoïdes se dégraderaient préférentiellement face à la chlorophylle, hypothèse confirmée par les données bibliographiques qui indiquent que les caroténoïdes sont instables de part leur chaîne polyénique - ils s'oxydent facilement à l'air et s'isomérisent sous l'action de la lumière, (Britton et al., 1995) - mais agissent en agent protecteur contre la photooxydation des autres molécules, (Young et Britton, 1993), en évitant la formation d'oxygène sous forme singulet.

L'accélération de l'écart de couleur constatée après 3h00 d'exposition pourrait être due au temps d'initiation nécessaire au processus de dégradation des caroténoïdes, notamment dans le cas des fleurs.

#### **IV.2.3.3. Conclusions**

Les néo-pigments possèdent des couleurs, jaune-orangé pour ceux obtenus à partir d'extrait de fleurs et jaune-vert pour les extraits de feuilles, les poudres les plus intenses étant réalisées à l'aide de bentonite déshydratée et d'éthanol.

Selon les essais de résistance à la lumière, les néo-pigments se dégradent significativement à partir de 3h00 d'exposition, soit 90h00 de soleil intense, pour tendre, après 8h00 d'exposition soit 10 jours de soleil, vers une couleur verte (chlorophylle) pour les poudres à base d'extrait de feuilles et vers un blanchiment totale pour celles à base d'extrait de fleurs. Les caroténoïdes se dégradent préférentiellement face à la chlorophylle. Cependant, la réalisation de néo-pigments a permis une augmentation de la résistance de ces molécules face à la lumière qui sans support les avaient entièrement détruite en moins d'1h00 d'exposition.

Une amélioration de la résistance à la lumière pourrait être envisagée par ajout d'additifs tels que des antioxydants ou des absorbeurs UV, (cf. Annexe I, 3.3).

Ces néo-pigments végétaux, possédant des notes "verte" et "miellée", pourraient être éventuellement valorisés dans des formulations de produits cosmétiques de type fonds de teint. L'emballage de la poudre ou de la crème devra être parfaitement opaque afin d'éviter l'initiation de la photodégradation des caroténoïdes. De plus, ces produits seraient riches en caroténoïdes, agissant contre la photooxydation, chez les végétaux mais aussi chez l'homme, (Borel, 2004).



L'étude préliminaire à l'échelle laboratoire a permis de déterminer les conditions optimales d'extraction des molécules aromatiques présentes dans les fleurs et dans les feuilles. L'extraction à froid de 60 min des fleurs dans l'hexane est la méthode la plus efficace pour extraire des notes "miellée" (nonanal, 2-phényléthanol) et "verte, piquante" (formiate de 2-phényléthyle). Le rendement d'extraction est de 2,1%. Dans le cas des feuilles, l'extraction des notes dominantes miellées nécessite un temps de macération dans l'hexane de 5 jours.

Ces extractions ont été effectuées à l'échelle pilote dans le cyclohexane (solvant de toxicité inférieure à l'hexane). Le procédé d'extraction nécessite trois étapes : la macération, la filtration du milieu et l'évaporation du solvant et permet le recyclage de ce dernier. Le rendement d'extraction des fleurs a été de 2,55% par rapport à la matière sèche, soit 0,37% par rapport à la matière humide - rendement comparable à celui obtenu dans l'industrie pour la concrète de rose (0,25%) - et de 1,38% pour les feuilles. L'extrait de fleurs est de couleur orangé-rouge, d'aspect cireux et d'odeur "miellée" et celui de feuilles est vert-jaune à l'odeur intense "verte". L'amélioration du procédé d'extraction résiderait dans l'optimisation de l'agitation mécanique qui était trop importante dans le cas des fleurs (obtention d'un milieu biphasique) et nulle dans celui des feuilles (entrave de la canne par la matière végétale).

L'extrait de fleur présente une fraction volatile importante (21,7%) et aromatiquement riche mais légèrement différente de celle obtenue à l'échelle laboratoire. La carvone (notes "herbacée" et "épicée") est le composé majoritaire (12,1%) mais d'autres composés participent à l'arôme global tels que le limonène (notes "fraîche" et "citronnée"), le nonanal et le 2-phényléthanol (notes "miellée", "florale" et "piquante") et la dihydrocarvone (notes "chaude" et "herbacée").

La concrète de feuille quant à elle est pauvre en composés volatils odorants. Un séchage moins poussé des feuilles permettrait une bonne conservation des feuilles tout en limitant la perte en composés volatils et en se rapprochant du profil aromatique très prometteur obtenu lors des essais réalisés à l'échelle laboratoire.

La concrète de fleurs est riche en caroténoïdes de types  $C_{40}H_{56}O_2$  et de masse 568, estérifiés par des acides gras tels que l'acide palmitique. Le rendement d'extraction de ce caroténoïde saponifié est de  $65,7 \cdot 10^{-3}\%$  par rapport à la matière sèche. Dans l'extrait de

feuilles, sont présents des caroténoïdes de masse 568 et de formule  $C_{40}H_{56}O_2$  non estérifiés, le rendement d'extraction de ces molécules colorantes étant bien inférieur :  $3,89.10^{-3}\%$ . Les teneurs en caroténoïdes des fleurs et des feuilles se rapprochent de celles des brocolis et des épinards, matière végétale riche en lutéine et zéaxanthine.

La valorisation colorante de ces extraits pourrait passer par la réalisation de néo-pigments à base de concrète de fleurs ou de feuilles et de bentonite, augmentant la résistance des molécules colorantes présentes, face aux agressions extérieures. La photodégradation des pigments, jaune-orangé dans le cas des fleurs et vert-jaune dans celui des feuilles, est de l'ordre de 10h au soleil. Elle pourrait être améliorée par l'ajout d'additifs tels que des antioxydants et des absorbeurs UV. Une application potentielle serait la formulation de produits cosmétiques de type fonds de teint à l'aide de ces néo-pigments, possédant des notes "miellée" pour ceux issus des fleurs et "verte" pour ceux issus des feuilles. Un emballage spécifique protégeant de la lumière devra être employé. De plus, ces poudres colorantes pourraient agir par l'intermédiaire des caroténoïdes contre la photooxydation des tissus de la peau. Ces néo-pigments doivent faire l'objet d'études complémentaires portant sur l'ajout d'additifs, la formulation de produits cosmétiques et les effets éventuels au contact de la peau.

## **Références bibliographiques**

- Arctander S. (1994a). "Perfume and Flavor chemicals". Ed.Stream C. Allured Publishing Corporation. USA.
- Arctander S. (1994b). "Perfume and Flavor Materials of Natural Origin". Ed.Stream C. Allured Publishing Corporation. USA.
- Borel P. (2004). "<http://www.ceiv.org/presse/presse/pdf/ResumePBorel.pdf>".
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (1995). "Carotenoids. Isolation and Analysis". Birkhauser Verlag. Boston.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (2004). "Handbook : Carotenoids". Ed.Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Burdick et Jackson (1982). "High Purity Solvent Guide". Burdick and Jackson Laboratories. Muskegon, Michigan USA.
- Devos M. (1990). "Standardized Human Olfactory Thresholds". Ed.Devos M., Patte F., Rouault J., Laffort P. et Van Gemert L. J. Oxford University Press. New York.
- Harborne J. B. (1984). "Phytochemical Methods". Chapman & hall. New York.
- Littmann E. R. (1982). "Maya Blue - further perspectives and the possible use of indigo as the colorant." *Am. Antiq.*, 47 (2): 404-408.
- USDA-NCI (1998). "USDA-NCI Carotenoid Database", Nutrient Data Laboratory Agricultural Research Service.
- Young A. et Britton G. (1993). "Carotenoids in Photosynthesis". Ed.Young A. et Britton G. Chapman & Hall. London.

## **Conclusion générale**



Nos objectifs scientifiques ont été d'une part de trouver de nouvelles techniques de caractérisation des stigmates du *Crocus sativus* afin d'avoir une connaissance plus approfondie des composés volatils du safran frais et sec, la norme internationale ISO/TS 3632 évaluant uniquement le safranal et de manière peu précise. Les limites de la norme dans la détermination de la qualité du safran ont ainsi été démontrées dans ces travaux. L'impact du taux d'humidité sur la qualité organoleptique de l'épice et la typicité du safran du Quercy a également été étudié. D'autre part, le potentiel moléculaire des co-produits issus de la culture du safran : fleur, feuille et bulbe, a été évalué afin de proposer des voies possibles de valorisations, en particulier dans le domaine des arômes et des colorants.

Le safran frais libère majoritairement du linalool (59,1%). Cette molécule est présente en faible quantité dans la plante (80 ppm). Après torréfaction, le principal composé est le safranal (62,0%), caractéristique de l'odeur "safranée" de cette épice. La méthode d'extraction SPME semble être la plus adaptée pour caractériser ces composés volatils.

Une teneur en eau résiduelle importante des stigmates (Hr > 12%) entraîne une modification des composés volatils présents dans le safran, avec notamment des taux élevés d'HTCC (jusqu'à 3,8%). L'analyse Sensorielle Quantitative Descriptive du safran du Quercy a montré qu'il est perçu comme étant plus "marron" et "épicé". Il contient, en effet, un taux de safranal légèrement supérieur (80,0%). Cependant, d'autres notes, potentiellement indésirables, apparaissent telles que la note "animale", provenant de l'acide 3-méthylbutanoïque ou la note "piquante", donnée par l'acide acétique, sous-produit de la fermentation alcoolique. Les safrans secs étaient décrits comme "beurré", "grillé" et "rouge". Le traitement statistique des données instrumentales a permis de montrer qu'une analyse par SPME/CPG-SM du safran pouvait prédire le taux d'humidité des échantillons ainsi que le taux de crocine, directement liés à l'arôme et à l'aspect du safran.

Les bulbes de *Crocus sativus* possèdent une teneur en amidon de 56,4%, valeur supérieure à celle de certaines céréales. Ce constituant pourrait être utilisé, après extraction et traitement, dans la co-constitution de plastiques biodégradables. La fraction lipidique du bulbe représente 1% de la matière sèche. Bien qu'ils soient largement répandus dans la matière végétale, les acides gras de type oméga-6, tel que l'acide linoléique présent à 36,0% dans cette fraction, sont recherchés dans les formulations de produits cosmétiques pour leur effet régénérant sur les tissus de la peau.

La caractérisation chimique des extraits de fleurs et de feuilles a permis de juger ces derniers globalement très intéressants pour les domaines des industries des parfums, de la cosmétique et des arômes en particulier par les notes "rondes" et "miellée" qu'ils libèrent. Les composés jouant un rôle déterminant dans les fractions volatiles obtenues par différents modes d'extraction : fleur in vivo (living plant), SPME, hydrodistillation, Likens-Nickerson (éther diéthylique, pentane et hexane) et macération (éther diéthylique et hexane) ont été mis en évidence.

La fleur libère essentiellement le 2-éthylhexan-1-ol, responsable de la note "florale de rose" (79,2% dans les extraits par SPME), composé majoritairement présent au sein de la fraction volatile de l'organe (55,7% dans l'huile essentielle et respectivement 77,0 et 81,5% dans les extraits Likens-Nickerson à l'éther et à l'hexane). Les concrètes de fleurs, réalisées à l'éther diéthylique, possèdent des notes "miellée" et "florale" intenses, données par le 2-phényléthanol et le 4-hydroxyphényléthanol. Le rendement d'extraction pour un temps de macération de 60 min est de 2,9% et la fraction volatile représente 24,0% de l'extrait. Les concrètes de fleurs issues de macération dans l'hexane libèrent également des notes "miellées" (nonanal et 2-phényléthanol), mais aussi une note de queue "verte", (formiate de 2-phényléthyle), très intense et persistante. Le rendement d'extraction en concrète hexanique, de 60 min, est de 2,1% et la fraction volatile ne représente que 4,0% de l'extrait.

La fraction volatile de l'huile essentielle de feuilles, représentant 23,0% de l'extrait, est riche en 2-[5H]-furanone, note "cacahouète grillée" et en hex-2-énal, note "verte puissante", présente aussi dans les extraits Likens-Nickerson éther et pentane respectivement à 38,7 et 52,2 %. Les concrètes de feuilles, réalisées dans l'éther diéthylique, possèdent des notes dominantes "miellée verte", générées par la dihydro-4-hydroxy-2-[3H]-furanone et un composé inconnu (I.R. = 1190), et "miellée piquante", par le 2-phényléthanol. La fraction volatile représente 69,3% de la concrète dont le rendement d'extraction après 5 jours de macération est de 1,6%. Les macérations dans l'hexane donnent quant à elles des notes "miellée" (2-phényléthanol,  $\alpha$ -terpinéol, coumaran et nonanal) et "verte" (acide octanoïque). Le rendement d'extraction d'une macération de 5 jours est de 1,1%, la fraction volatile de l'extrait représentant, 1,4%.

En résumé, les concrètes de fleurs et de feuilles sont "miellées" et "vertes", la note "miellée" provenant notamment du 2-phényléthanol, qui est un composé mineur dans l'extrait. La note verte, quant à elle, est générée par des molécules différentes selon le type d'extraction et de matière végétale.

L'extraction à l'échelle pilote, par du cyclohexane, a permis de produire des quantités d'extraits suffisantes afin d'envisager une application des concrètes dans le domaine aromatique et de proposer une valorisation colorante de ces extraits. Le procédé d'extraction a nécessité trois étapes : la macération, la filtration du milieu et l'évaporation du solvant, celui-ci étant recyclé lors de la dernière étape. Le rendement d'extraction des feuilles est de 1,38% et celui des fleurs de 2,55%, valeur comparable à celle obtenue dans le cas de concrètes de rose. L'extrait de fleurs est riche en composés volatils (21,7%) qui sont responsables des notes "fraîche" et "citronnée" (limonène, 1,7%), "miellée", "florale" et "piquante" (2-phényléthanol, 1,7% et nonanal, 0,3%) et "chaude" et "herbacée" (dihydrocarvone, 1,4%, carvone, 12,1%). L'extrait de feuilles est quant à lui peu odorant et plus pauvre en composés volatils (2,0%).

Le fort pouvoir colorant des extraits obtenus, aussi bien à partir des fleurs que des feuilles, suggère une application, dans le domaine cosmétique qui est actuellement fortement intéressée par l'utilisation de teintures d'origine végétale. Une partie des molécules colorantes liposolubles présentes dans les fleurs et les feuilles, sont des caroténoïdes de couleur jaune-rouge, de type xanthophylles  $C_{40}H_{56}O_2$ . Il pourrait s'agir de lutéine et/ou de zéaxanthine. Dans les fleurs, ces caroténoïdes sont présents sous formes estérifiées par des acides gras tels que l'acide palmitique. Des caroténoïdes plus polaires, de formule brute  $C_{40}H_{56}O_4$ , ont été identifiés dans les feuilles, pouvant correspondre à la violaxanthine et/ou à la néoxanthine. Les extraits obtenus à l'échelle pilote sont riches en xanthophylles de types  $C_{40}H_{56}O_2$ , les plus polaires n'ayant pas été extraites des feuilles par le cyclohexane. Le rendement des ces molécules colorantes est de  $66.10^{-3}\%$  dans le cas des fleurs et de  $4.10^{-3}\%$  dans celui des feuilles, ces valeurs étant proches, respectivement, de celles des épinards et des brocolis, matières végétales alimentaires riches en lutéine et zéaxanthine. L'extrait de feuilles, de couleur jaune-verte, contient également une proportion importante de chlorophylle.

Ces molécules colorantes pourraient être valorisées par la réalisation de néo-pigments à base de concrète de fleurs ou de feuilles et de bentonite. Cette formulation spécifique devrait permettre une meilleure résistance à la lumière et des formulations plus aisées. L'étude de la photodégradation des poudres, jaunes orangées dans le cas des fleurs et vertes jaunes dans celui des feuilles, a montré qu'elles résistent à 10h00 d'exposition intense au soleil contre moins d'1h00 sans fixation sur de l'argile. Ces néo-pigments pourraient être utilisés dans la formulation de produits cosmétiques de type fonds de teint qui posséderaient alors des notes "miellée" dans le cas des fleurs et "verte" dans celui des feuilles, l'emballage devant être soigneusement étudié afin de limiter l'exposition du produit à la lumière avant et au cours de

son utilisation. Les caroténoïdes pourraient également avoir une action contre la photooxydation des tissus de la peau.

Des études complémentaires pourront être envisagées dans plusieurs domaines.

Des travaux devront être réalisés sur la norme internationale afin que les critères d'évaluation de la qualité aromatique de cette épice soient plus exhaustifs.

L'obtention des concrètes de fleurs et de feuilles à l'échelle pilote devra être optimisée par l'étude du rapport matière végétale/solvant et celle de l'agitation mécanique. Une unité d'extraction transportable permettrait, par un rapprochement géographique des safraniers, de pallier aux problèmes liés à la conservation de la matière végétale avant extraction et d'optimiser ainsi la qualité et la quantité des extraits végétaux.

La résistance des néo-pigments pourrait être augmentée par l'ajout d'additifs tels que des antioxydants et des absorbeurs UV. Des formulations cosmétiques compatibles avec ce types de pigments devront être mises au point et testées afin d'en évaluer l'effet sur l'épiderme.

## Chapitre V

### Partie Expérimentale

<b>Chapitre V</b>	<b>Partie Expérimentale .....</b>	<b>235</b>
<b>V.1.</b>	<b>REACTIFS ET SOLVANTS .....</b>	<b>235</b>
V.1.1.	Solvants d'extraction.....	235
V.1.2.	Solvants analytiques.....	235
V.1.3.	Étalons .....	235
<b>V.2.</b>	<b>CARACTERISATION DES STIGMATES .....</b>	<b>236</b>
V.2.1.	Echantillonnage .....	236
V.2.2.	Séchage des stigmates.....	236
V.2.3.	Détermination de la teneur en humidité et en métabolites secondaires selon la norme ISO/TS 3632 (Hr).....	237
V.2.3.1.	Humidité et matières volatiles.....	237
V.2.3.2.	Métabolites secondaires .....	237
V.2.4.	Extraction et analyse des composés volatils des stigmates frais et sec par HD/CPG-SM.....	238
V.2.4.1.	Stigmates frais .....	238
V.2.4.2.	Stigmates secs .....	239
V.2.5.	Extraction et analyse des composés volatils des stigmates frais et secs par Likens-Nickerson et CPG-SM.....	239
V.2.5.1.	Evaluation de la teneur en eau et en composés volatils selon la norme ISO/TS 3632 (Hr).....	239
V.2.5.2.	Séchage des stigmates .....	239
V.2.5.3.	Extraction des composés volatils des stigmates frais et secs .....	240
V.2.5.4.	Analyse des composés volatils des stigmates frais et sec .....	240
V.2.6.	Extraction et analyse des composés volatils des stigmates secs par SPME/CPG-SM/ODP .....	241
V.2.6.1.	Choix de la fibre SPME .....	241
V.2.6.2.	Extraction et analyse des composés volatils .....	241
V.2.6.3.	Analyse olfactométrique .....	242
V.2.7.	Analyse sensorielle du safran .....	245
V.2.7.1.	La préparation des échantillons.....	245
V.2.7.2.	Les juges.....	245
V.2.7.3.	L'analyse .....	246
<b>V.3.</b>	<b>CARACTERISATION DES FEUILLES, DES FLEURS ET DES BULBES.....</b>	<b>251</b>
V.3.1.	Echantillonnage .....	251
V.3.2.	Composition de la matière végétale .....	251
V.3.2.1.	Détermination de la matière sèche (MS).....	251
V.3.2.2.	Détermination de la matière minérale (MM) .....	251
V.3.2.3.	Dosage des éléments pariétaux .....	252
V.3.2.4.	Détermination de la teneur en hydrosolubles.....	253
V.3.2.5.	Détermination de la teneur en amidon .....	254
V.3.2.6.	Détermination de la teneur en lipides.....	254
V.3.2.7.	Détermination de la teneur en protéines.....	255
V.3.2.8.	Détermination de la teneur en sucres .....	256
V.3.3.	Caractérisation des composés volatils des fleurs, des feuilles et des bulbes.....	257
V.3.3.1.	Etude des composés volatils libérés par la fleur (par SPME et HD).....	257
V.3.3.2.	Hydrodistillation.....	258

V.3.3.3.	Likens-Nickerson (Figure 2) .....	260
V.3.3.4.	Macération dans l'éther diéthylique et dans l'hexane .....	262
V.3.3.5.	Extraction à chaud au soxhlet.....	266
<b>V.3.4.</b>	<b>Caractérisation des colorants liposolubles de type caroténoïde.....</b>	<b>268</b>
V.3.4.1.	Extraction sélective des caroténoïdes.....	268
V.3.4.2.	Analyse des extraits.....	269
<b>V.4.</b>	<b>MACERATION A L'ECHELLE PILOTE .....</b>	<b>272</b>
<b>V.4.1.</b>	<b>Extraction (cf. IV.2.1) .....</b>	<b>272</b>
<b>V.4.2.</b>	<b>Analyse par CPG-SM de la fraction volatile .....</b>	<b>272</b>
<b>V.4.3.</b>	<b>Analyse de la fraction colorante.....</b>	<b>272</b>
V.4.3.1.	Par CLHP .....	272
V.4.3.2.	Par CLHP-SM (cf. V.3.4.2.2).....	272
V.4.3.3.	Par TOF .....	273
<b>V.4.4.</b>	<b>Valorisation de la fraction colorante : les néo-pigments .....</b>	<b>273</b>
V.4.4.1.	Fixation des molécules colorantes sur support argileux par voie thermique .....	273
V.4.4.2.	Analyse par spectrophotométrie.....	273
V.4.4.3.	Photodégradation accélérée.....	275



## Chapitre V Partie Expérimentale

### V.1. REACTIFS ET SOLVANTS

#### V.1.1. Solvants d'extraction

Tableau 1. Solvants utilisés pour extraire la matière végétale.

Solvant	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Numéro CAS	Fournisseur	Pureté
dichlorométhane	84,93	[75-09-2]	Sigma	99,6%
hexane	86,18	[110-54-3]	Sigma	≥ 95%
cyclohexane	84,16	[110-82-7]	Sigma	99,5%
éther diéthylique	74,12	[60-29-7]	Sigma	99,0%
pentane	72,15	[109-66-0]	Sigma	99%
Echelle Pilote				
cyclohexane	84,16	[110-82-7]	Univar	99,9%

#### V.1.2. Solvants analytiques

Tableau 2. Solvants utilisés pour analyser les extraits obtenus à partir de la matière végétale.

Solvant	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Numéro CAS	Fournisseur	Pureté
acétonitrile	41,04	[75-05-8]	Acros Organics	HPLC grade
triéthylamine	101,19	[121-44-8]	Fluka	≥ 99,5%
dichlorométhane	84,93	[75-09-2]	Aldrich	≥ 99,5%
Éthanol absolu (anhydre)	46,07	[64-17-5]	API	-

#### V.1.3. Etalons

Tableau 3. Etalons utilisés pour identifier et/ou caractériser les molécules extraites à partir de la matière végétale.

Etalon	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Numéro CAS	Fournisseur	Pureté
zéaxanthine	568,89	[144-68-3]	Extrasynthèse	-
lutéine	568,89	[127-40-2]	Extrasynthèse	-
carvacrol	150,22	[499-75-2]	Aldrich	≥ 98%
linalool	154,25	[78-70-6]	Fluka	≥ 95%
safranal	150,22	[116-26-7]	Aldrich	≥ 88%
2-phényléthanol	122,16	[60-12-8]	Fluka	≥ 99%
méthional	104,17	[3268-49-3]	Fluka	-
acide isovalérique	102,13	[503-74-2]	Fluka	≥ 98%
acide acétique	60,05	[64-19-7]	Commercial alimentaire	-
acide isobutyrique	88,11	[79-31-2]	Aldrich	99%
4-nonanol	144,26	[5932-79-6]	Sigma-Aldrich	-

## V.2. CARACTERISATION DES STIGMATES

### V.2.1. Echantillonnage

Vingt-cinq échantillons, provenant du Quercy, ont été analysés, 13 issus de la production de 2002 et 12 de celle de 2003. Le séchage a été effectué en laboratoire (L) ou chez les producteurs (P), pour les échantillons de 2002 et exclusivement par les producteurs en 2003. Quatre types de séchage ont été réalisés sur les stigmates issus de quatre safranières (A), (B), (C) et (D): dans un four électrique ventilé (L), dans un déshydrateur électrique (A), dans un four classique à chaleur tournante (B) et sur une grille dans un four ventilé classique (C). Les deux premiers chiffres correspondent à la date de récolte (jour du mois d'octobre), la première lettre à la safranière d'origine et au séchage correspondant (A, B, C ou D) et la deuxième au type de séchage, par le producteur (P) ou par le laboratoire (L), pour les échantillons issus de la production de 2002.

*Tableau 4. Echantillons de safrans*

2002													
Prod.	C						D						
Séch.	Laboratoire						Séchage C				Laboratoire		
Ech. <sup>a</sup>	14CL	17CL	21CL	24CL	28CL	30CL	14CP	17CP	21CP	24CP	28CP	24DL	28DL
2003													
Prod.	A						B						
Séch.	Séchage A						Séchage B						
Ech. <sup>a</sup>	21A	22A	23A	24A	25A	26A	21B	23B	24B	26B	28B	30B	

Les safrans secs ( $\simeq$  2g) et frais ( $\simeq$  11g), avant d'être analysés, ont été conservés dans des flacons étanches à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Les safrans étrangers, espagnol, grec et marocain ont été fournis par M. Algrech (conservatoire du safran "Le Safranario"), assurant ainsi leur provenance. L'iranien est un safran commercial.

### V.2.2. Séchage des stigmates

Les séchages effectués par les producteurs sont de trois types. Le séchage A a été réalisé dans un déshydrateur électrique sur une durée de 30 à 60 min et à une température comprise entre 55°C et 60°C, le B, dans un four classique à chaleur tournante pendant 30 min à 60°C et le C, sur une grille dans un four ventilé classique à 60°C.

En laboratoire (L), les échantillons frais ont été séchés dans un four ventilé par chauffage à convection (FCV 61 EDM, Angelo PO, Italie) à 50°C, entre 25 et 115 min selon la quantité et l'humidité initiale des stigmates.

### **V.2.3. Détermination de la teneur en humidité et en métabolites secondaires selon la norme ISO/TS 3632 (Hr)**

La caractérisation de l'humidité et des métabolites secondaires a été effectuée selon la norme internationale, (ISO/TS, 2003) sur les échantillons de safrans issus de productions de 2002 et 2003 (cf. V.2.1, Tableau 4).

#### **V.2.3.1. Humidité et matières volatiles**

Les stigmates secs ( $m_i \simeq 0,1\text{g}$ ) sont placés dans des coupelles en aluminium préalablement tarées. Après avoir été pesés, les échantillons sont introduits dans une étuve ventilée à 103°C pendant 16h. Dès la sortie de l'étuve, les coupelles sont recouvertes par des boîtes de pétris et introduites dans un dessiccateur le temps de leur refroidissement. Après 20 min, une pesée,  $m_f$ , est effectuée sur les coupelles. Trois mesures ont été effectuées sur le même échantillon lorsque les quantités étaient suffisantes. Le calcul de la teneur en eau et en composés volatils est le suivant :  $Hr(\%) = (m_f - m_i) / m_i \times 100$

#### **V.2.3.2. Métabolites secondaires**

##### **V.2.3.2.1. Broyage**

Le safran ( $1\text{g} \leq m \leq 2\text{g}$ ) est broyé dans un mixer (Moulinex super junior) sur une courte durée afin d'éviter les échauffements dus aux frottements. Une poudre fine et rouge sang est obtenue.

##### **V.2.3.2.2. Tamisage**

Lorsque la poudre est assez fine, elle est passée sur un tamis de 500  $\mu\text{m}$ . Le tamisat doit constituer plus de 95% de la masse initiale de la poudre. Le tamisat et le refus ont été regroupés.

##### **V.2.3.2.3. Mise en solution**

La poudre (500 mg) est introduite dans une fiole de 1 L, munie d'un barreau aimanté, ainsi que l'eau distillée (900 mL). La fiole est recouverte de papier d'aluminium et le milieu est maintenu sous agitation à l'abri de la lumière pendant 1h. La solution a une couleur orange foncée et est non homogène (matière organique en suspension provenant des stigmates). Après avoir complété la fiole jusqu'au trait de jauge par de l'eau distillée et homogénéisé, une partie de la solution (20 mL) a été prélevée et introduite dans une fiole de 200 mL. La fiole est complétée jusqu'au trait de jauge par de l'eau distillée et la solution est homogénéisée. La solution jaune est filtrée sur une membrane de filtration en acétate de cellulose (0,45  $\mu\text{m}$ ,

Fisher Bioblock Scientific). La solution jaune limpide obtenue est analysée en spectrophotométrie. Deux échantillons de poudre ont été mis en solution.

#### V.2.3.2.4. Analyse spectrophotométrique

La cuve utilisée est en quartz. La solution témoin est de l'eau distillée. Le domaine de longueur d'onde est  $220\text{nm} \leq \lambda \leq 480\text{nm}$ . Les valeurs ont été mesurées au maximum d'absorbance se situant vers 250 nm pour la microcrocine, vers 330 nm pour le safranal et vers 440 nm pour la crocine à l'aide d'un spectrophotomètre (Hewlett Packard, 8452A). Deux mesures ont été effectuées pour chaque solution. La formule utilisée pour le calcul de la teneur en métabolites secondaires est la suivante :  $E(\% / \text{cm}) = 10 / C \times (100 / (100 - Hr)) \times D$

C : concentration de la solution à analyser

Hr : teneur en eau et en composés volatils

D : absorbance spécifique

### V.2.4. Extraction et analyse des composés volatils des stigmates frais et sec par HD/CPG-SM

#### V.2.4.1. Stigmates frais

Les stigmates frais (11 g), provenant de la production de 2002 (7 échantillons, 17CL à 30CL, 24DL et 28DL, cf. V.2.1, Tableau 4) sont placés, le jour suivant leur réception, dans une cellule en verre de 350 mL (préalablement lavée à l'eau chaude), balayée par un courant d'hélium de 30 mL/min. Les composés volatils sont piégés sur du tenax TA (130 mg) pendant 15 min, l'adsorbant ayant été préalablement conditionné dans un four à 240°C sous un débit d'azote de 60 mL/min pendant 2h30 (Figure 1).

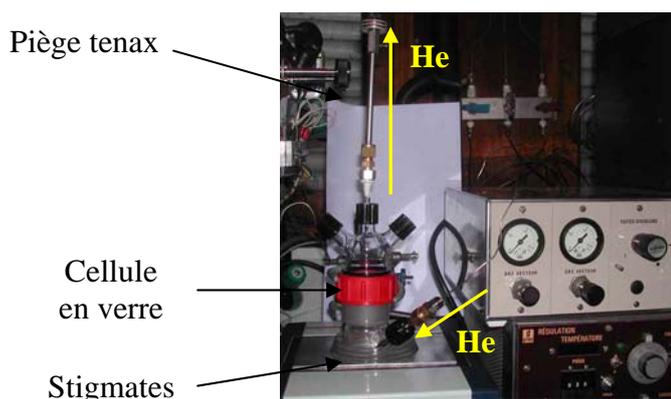


Figure 1. Piégeage et concentration des composés volatils libérés par les stigmates.

Le piège est introduit dans un injecteur chisa (SGE) dans un chromatographe en phase gazeuse (HP 5890, Hewlett Packard, France), muni d'une colonne apolaire (BPX5 60 m, 0,32 mm d.i., 1  $\mu\text{m}$  e., SGE, France), couplé à un spectromètre de masse (HP 5971, Hewlett

Packard, France), le temps de désorption étant de 3 min. L'ionisation est réalisée par impact électronique à 70eV. La température de l'injecteur était de 210°C, celle du détecteur de 300°C. La température du four débutait à 40°C et augmentait jusqu'à 290°C à 5°C/min (20 min). La pression en tête de colonne était de 1,5 bars.

Les n-alcane ( $C_5-C_{18}$ ) ont été piégés puis injectés dans les mêmes conditions chromatographiques. L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

#### **V.2.4.2. Stigmates secs**

Le safran ( $\approx 0,2$  g,  $m_{\min}=0,17$  g,  $m_{\max}=0,20$  g, variations dues à la quantité d'échantillon fournie par le producteur), provenant de la production de 2002, (12 échantillons : de 14CL à 30CL, de 14CP à 28CP et 28DL, cf. V.2.1, Tableau 4), est introduit dans une cellule en verre de 70 mL, préalablement lavée à l'eau chaude. Les temps d'équilibrage et de piégeage sont de 15min, le débit d'hélium étant de 30 mL/min (Figure 1). Le même piège a été utilisé pour des safrans récoltés le même jour. Le piège est introduit dans l'injecteur chisa du CPG-SM et désorbé pendant 3 min. La température de l'injecteur était de 240°C, celle du détecteur de 300°C. Le four était initialement à 40°C (1 min) puis sa température augmentait de 5°C/min jusqu'à 140°C et de 3°C/min jusqu'à 240°C. La pression en tête de colonne était de 1,5 bars.

Les n-alcane ( $C_5-C_{18}$ ) ont été piégés puis injectés dans les mêmes conditions chromatographiques. L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

### **V.2.5. Extraction et analyse des composés volatils des stigmates frais et secs par Likens-Nickerson et CPG-SM**

#### **V.2.5.1. Evaluation de la teneur en eau et en composés volatils selon la norme ISO/TS 3632 (Hr)**

Les stigmates ( $\approx 3$  g), provenant de la récolte de 2003, ont été analysés dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe V.2.3.

#### **V.2.5.2. Séchage des stigmates**

Les stigmates (3 g) ont été répartis dans une boîte de pétri, en plastique tapissée par du papier sulfurisé, préalablement tarée. La boîte a été placée dans une étuve non ventilée à 35°C. Après une nuit, l'échantillon avait un aspect très sec.

### V.2.5.3. Extraction des composés volatils des stigmates frais et secs

Les stigmates (3294,84 mg pour le frais et 1089,62 mg pour le sec) ainsi que de l'eau distillée (60 mL) sont introduits dans un ballon de 100 mL. De l'éther diéthylique (50 mL) ainsi que quelques grains de pierre ponce sont introduits dans le second ballon de 100 mL. Le montage est fermé (Figure 2).

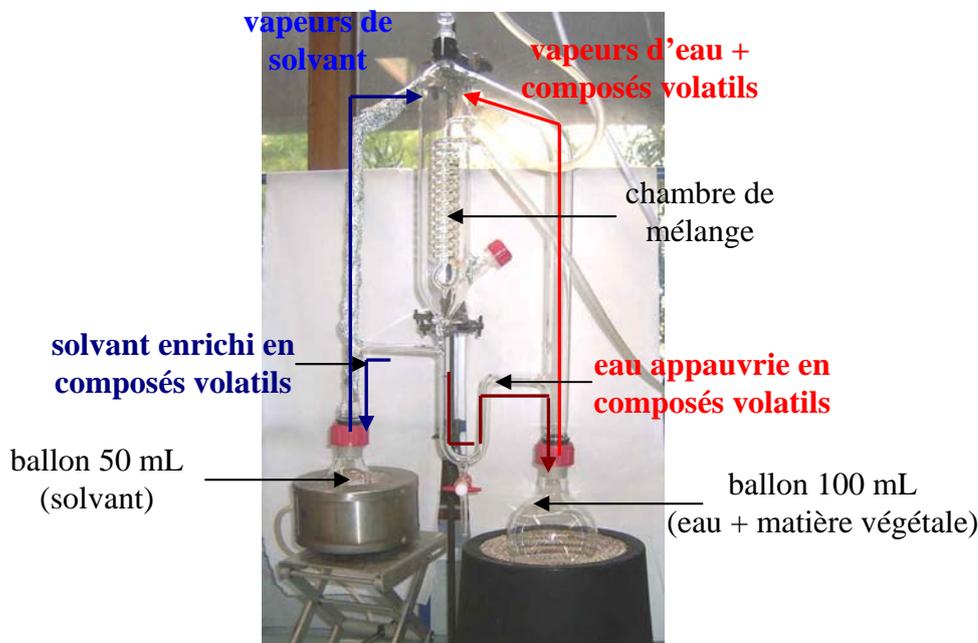


Figure 2. Appareillage de type Lickens-Nikerson.

Le milieu eau/stigmates a été chauffé jusqu'à ébullition de l'eau. Le deuxième ballon contenant l'éther a alors été mis en chauffe. L'ébullition et le reflux sont régulés afin que les vapeurs d'éther ne soient pas en excès par rapport à celles de l'eau dans la chambre de mélange. Après 3h de reflux, le chauffage est arrêté. Lorsque les ballons sont froids, le système est remis à pression atmosphérique. L'éther présent dans le système, (environ 5 mL) a été récupéré dans le ballon d'éther initial auquel est ajouté à l'aide d'une pipette man l'étalon interne, (Cadwalader et al., 1997), le carvacrol ([499-75-2], Adrich,  $\geq 98\%$ , 200  $\mu\text{L}$  d'une solution étherée à  $C = 1,026 \text{ g/L}$ ). L'extrait est évaporée sous azote à l'aide d'un Kuderna-Danish, jusqu'à 1 mL puis analysé par CPG-SM.

### V.2.5.4. Analyse des composés volatils des stigmates frais et sec

Les extraits (2  $\mu\text{L}$ ) ont été injectés en CPG-SM (HP 5890/5971, France) muni d'une colonne apolaire (BPX5, 50 m, 0,25 mm d.i., 1  $\mu\text{m}$  e., SGE, France). La température de l'injecteur était de 220°C (split de 10mL/min), celle du détecteur de 250°C. Le four était à 90°C et sa température augmentait de 9°C/min jusqu'à 260°C. Le débit d'hélium était de 1,5 mL/min. Les n-alcane ( $\text{C}_5\text{-C}_{18}$ , 0,1  $\mu\text{L}$ ) ont été injectés dans les mêmes conditions

chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

## **V.2.6. Extraction et analyse des composés volatils des stigmates secs par SPME/CPG-SM/ODP**

### **V.2.6.1. Choix de la fibre SPME**

Les stigmates secs (0,17 g, 28CP de 2002, cf. V.2.1, Tableau 4), ont été placés dans un flacon en verre (10 mL), fermé hermétiquement par un septum en téflon. Les différentes fibres (Tableau 5), après avoir été conditionnées selon les indications mentionnées par le fabricant, ont été introduites dans l'espace de tête (en anglais : headspace) du safran. Les composés volatils ont été piégés à des temps, *t*, compris entre 0 et 3h, à température ambiante.

*Tableau 5 Type de fibres SPME.*

<b>Fibre (supelco)</b>	<b>Polymère</b>	<b>Type</b>	<b>Polarité</b>
100µm PDMS	Polydiméthylsiloxane	Absorbant	Apolaire
75µm CAR-PDMS	Carboxen-PDMS	Adsorbant	Bipolaire
65µm PDMS-DVB	Divinylbenzene	Adsorbant	Bipolaire
65µm CW-DVB	Carbowax	Adsorbant	Polaire

La fibre est désorbée, pendant 3 min, dans l'injecteur du CPG-SM (Agilent 6980/5973N, France) muni d'une colonne apolaire (DB5ms, 30 m, 250 µm d.i., 0,25 µm e., SGE, France). La température de l'injecteur était de 240°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation du four débutait à 40°C (1 min) puis augmentait de 5°C/min jusqu'à 140°C et de 3°C/min jusqu'à 240°C. Le débit d'hélium était de 1,5 mL/min.

### **V.2.6.2. Extraction et analyse des composés volatils**

Les stigmates secs (0,2 g), provenant de la production de 2003 (12 échantillons, cf. V.2.1, Tableau 4) et de l'étranger (Espagne, Maroc, Grèce et Iran, cf. V.2.1), ont été placés dans un flacon de verre (10 mL), fermé hermétiquement par un septum en téflon. Après introduction de la fibre SPME CAR-PDMS 75 µm (supelco) dans l'headspace du safran, préalablement conditionnées, les composés volatils ont été piégés pendant une heure à température ambiante.

La fibre est désorbée, pendant 3 min, dans l'injecteur du CPG-SM (Agilent 6980/5973N, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne apolaire (DB5ms, 30 m, 250 µm d.i., 0,25 µm e., SGE, France) et couplée à l'ofactométrie (1/2, Gerstel-ODP<sub>2</sub>, RIC, France). La température de l'injecteur (split 7,2 :1) était de 260°C celle

du détecteur était de 280°C. La programmation du four débutait à 40°C (1 min) puis augmentait de 5°C/min jusqu'à 100°C et de 3°C/min jusqu'à 125°C et de 6°C/min pour atteindre 240°C. Le débit d'hélium était de 1,4 mL/min.

Les n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, 0,1 µL) ont été piégés sur la fibre CAR-PDMS puis injectés dans les mêmes conditions chromatographiques. L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature. De 3 à 10 répétitions ont été effectuées pour chaque échantillon. Les traitements statistiques des données ont été effectués à l'aide du logiciel Unistat (Microsoft) et de Unscrambler (Camo, France).

### **V.2.6.3. Analyse olfactométrique**

#### **V.2.6.3.1. Les échantillons**

Les échantillons de safran du Quercy utilisés pour caractériser les odeurs clés de l'épice ont été sélectionnés par un juge entraîné. Les huit échantillons, les plus représentatifs, ont été retenus : 21A, 22A, 24A, 25A, 23B, 24B, 26B et 28B (cf. V.2.1, Tableau 4).

#### **V.2.6.3.2. Les juges**

Treize sujets, neuf femmes et quatre hommes présents dans notre laboratoire et de moyenne d'âge 25 ans, se sont portés volontaires pour participer à deux séances de CPG-ODP par semaine. Il a été précisé au panel de ne pas se parfumer le jour de l'analyse et de s'abstenir, pendant au moins une heure précédant la séance, de toute prise de nourriture, de tabac et de boissons autres que de l'eau.

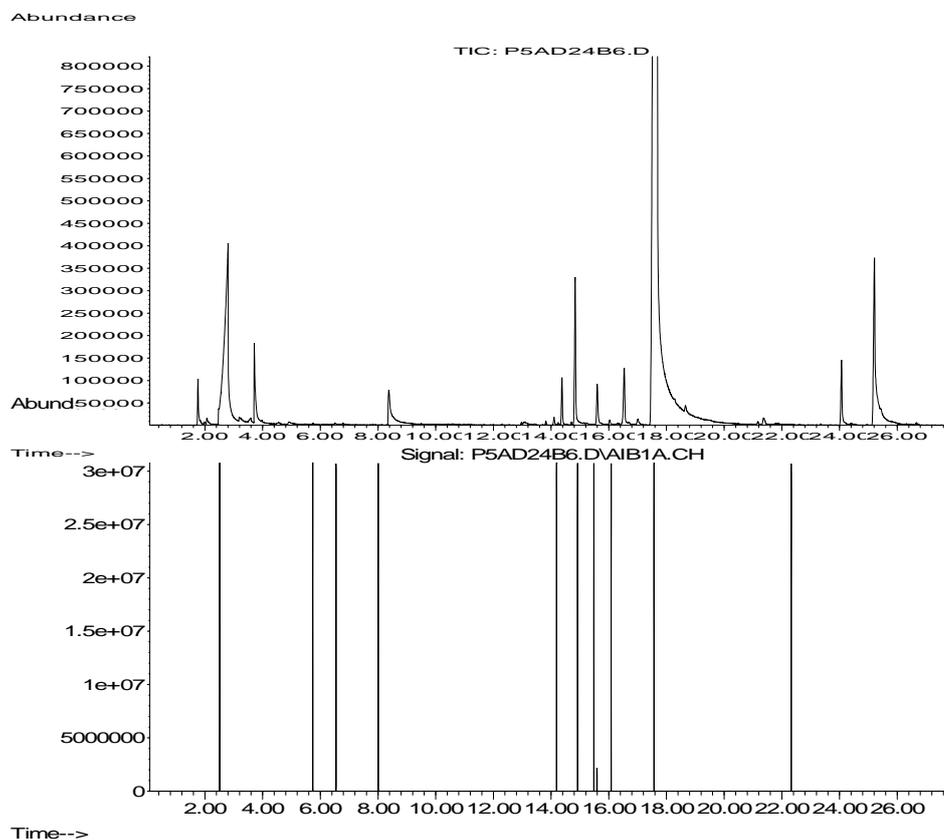
#### **V.2.6.3.3. L'analyse**

La méthode CPG-O choisie est la fréquence de détection. Elle ne nécessite pas d'entraînement particulier des juges, ces derniers étant alors facilement interchangeables, (Van Ruth et Roozen, 2004).

##### **V.2.6.3.3.1. Familiarisation et génération des pôles descriptifs**

Néanmoins, deux séances préparatoires ont permis aux juges de se familiariser à la technique de respiration (sortie olfactive), au logiciel d'acquisition, (Janssens et Roozen, 1991) et à l'OID. Le logiciel d'acquisition utilisé est SNIF (SNIF software, Wageningen University) qui permet d'indiquer, à l'aide du clavier d'ordinateur, le début et la fin d'une zone odorante. L'OID (Olfactory Intensity Device) est un bouton poussoir permettant de marquer le chromatogramme par un trait au début de la zone odorante, Figure 3, et facilite ainsi l'identification du composé responsable de l'odeur sur le chromatogramme CPG-SM.

Les juges devaient appuyer simultanément sur une touche du clavier d'ordinateur, afin de déclencher le logiciel SNIF, et sur le bouton poussoir, pour marquer le chromatogramme, lorsqu'ils détectaient une zone odorante. Les juges ont analysé l'effluent (cf. V.2.6.2) entre 0 et 26 min (sortie de la colonne et détection SM du dernier composé).



**Figure 3. Chromatogramme d'un échantillon de safran et son marquage à l'aide de l'OID.**

Au cours de ces deux séances d'analyses, réalisées sur des échantillons de safran riches en notes aromatiques (24B et 28B, cf. V.2.1, Tableau 4), une liste de termes descriptifs a été générée par les juges pour chaque zone odorante perçue. Lors d'une réunion de groupe des juges, des standards leur ont été présentés (Tableau 6) et l'ensemble des attributs ont été regroupés par consensus en 15 pôles descriptifs : "beurrée", "piquant/âcre", "végétale", "animale", "grillée", "terreuse", "épicée", "florale", "fruitée", "agrume/fraîche", "foin", "boisée", "douce", "pain cuit", "soufrée" et "indéterminée", tout en laissant aux juges la possibilité de qualifier une odeur d'"interminée", si elle ne correspondait à aucun pôle descriptif prédéfini.

Tableau 6. Odeurs perçues par les juges et l'odeur de référence proposée.

Odeurs perçues par les juges	Odeurs de références/Produit <sup>a</sup>	Odeurs perçues par les juges	Odeurs de références/Produit <sup>a</sup>
Epicé (safran poivré)	Safranal ([116-26-7], Aldrich, ≥ 88%) Poivre <sup>b,c,d</sup>	Animale	Acide isobutyrique ([79-31-2], Aldrich ≥ 99%)
Piquant/Acre	Acide acétique (commercial alimentaire)	Grillé/Brûlé/Fumé	Amande grillée <sup>b</sup> Cacahouète grillée <sup>b</sup> Café grillé <sup>b</sup> Noisette grillée <sup>b</sup> Fumé <sup>b</sup>
Terreux (moisi sous-bois)	géosmine <sup>a</sup>	Sucré (doux)	Caramel <sup>b</sup> Vanille <sup>d</sup>
Beurré (gras)	Butan-2,3-dione <sup>a</sup> Beurre frais <sup>b</sup>	Foin	Paille <sup>b</sup>
Herbe/Végétal	Cis-hex-3-èno <sup>a</sup> Odeur complexe de verdure <sup>c</sup>	Fruité	Butyrate d'éthyle <sup>a</sup>
Florale	Linalool <sup>a</sup>	Pain grillé	Acétyl-2-pyrazine <sup>b</sup>
Pomme de terre bouillie (soufflé)	Méthional <sup>a</sup>	agrûme	Citron <sup>b</sup>
Boisé	$\alpha$ -pinène <sup>a</sup> Cédre <sup>b,c</sup>		

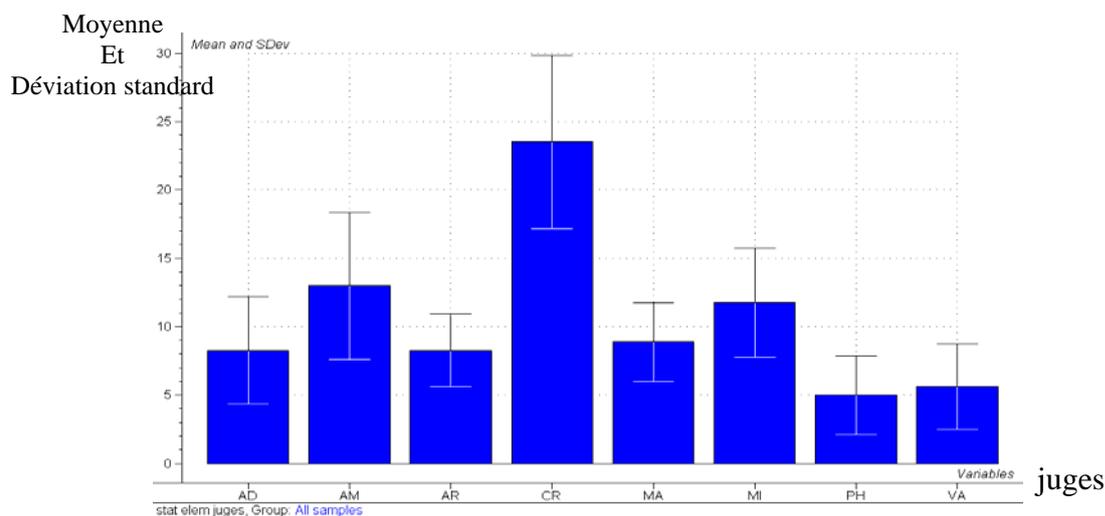
<sup>a</sup>Le champ des odeurs (Jaubert et al., 1987b; a)

<sup>b</sup>Le nez du café, <sup>c</sup>Le nez des champignons, <sup>d</sup>Le nez des épices, (Lenoir, 1997c; a; b)

#### V.2.6.3.3.2. L'analyse

Lors des séances d'analyse, les juges signalaient la détection olactive en appuyant sur un bouton poussoir et au moyen du logiciel SNIF. Ce dernier demandait également aux juges d'attribuer, en fin de détection, un des 15 pôles descriptifs définis précédemment selon leur perception. Chaque échantillon (8) a été senti par dix juges, trois juges de réserve ayant été entraînés en cas d'indisponibilité.

Une étude statistique élémentaire du nombre moyen de réponses (odeurs senties) par juge, tous échantillons confondus, a montré une homogénéité correcte (Figure 4).



**Figure 4. Moyenne et déviation standard du nombre de réponses (odeurs senties) pour chaque juge, tout échantillons confondus.**

Après la construction des aromagrammes par addition des détections, seules les odeurs dont la fréquence de détection était supérieure à deux ont été prises en compte (2/10 réponses). Les traitements statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel Unscrambler (Camo, France).

## **V.2.7. Analyse sensorielle du safran**

### **V.2.7.1. La préparation des échantillons**

Le développement du vocabulaire a été effectué sur des safrans du Quercy récoltés en 2001. L'analyse sensorielle a été réalisée sur des safrans du Quercy récoltés en 2003 : 21A, 22A, 23A, 24A, 25A, 26A, 23B, 24B, 26B, 28B, 30B (cf. V.2.1, Tableau 4) auxquels a été ajouté un safran étranger provenant d'Iran. Les échantillons de safran se présentaient sous forme de stigmates entiers, longs et fins, conservés depuis leurs récoltes, à l'abri de la lumière, dans des flacons hermétiques.

Les échantillons (0,25 g) ont été introduits dans des piluliers en verre transparent (30 mL) d'ouverture assez large (diamètre 3 cm), fermés hermétiquement par un bouchon en polyéthylène. Les piluliers ont été recouverts de papier d'aluminium afin d'éviter toute exposition à la lumière entre chaque séance d'analyse et ont été conservés à 20°C dans la salle d'analyse sensorielle.

### **V.2.7.2. Les juges**

Huit femmes et trois hommes, âgés entre 20 et 40 ans (31 en moyenne), appartenant au panel sensoriel du LCAI mais novices dans l'évaluation sensorielle du safran, constituaient le jury. Il a été précisé au panel de ne pas se parfumer le jour de l'analyse et de s'abstenir

pendant au moins une heure précédant la séance de toute prise de nourriture, de tabac et de boissons autres que de l'eau.

### **V.2.7.3. L'analyse**

L'analyse sensorielle de type Analyse Quantitative Descriptive a été réalisée avec 11 juges, qui ont évalué l'intensité de descripteurs, définis au préalable, sur des échelles d'intensité non structurées, afin de déterminer le profil sensoriel des échantillons de safrans. La procédure, suivie lors de cette étude, est présentée ci-dessous.

#### **V.2.7.3.1. Procédure d'évaluation sensorielle des échantillons**

La salle d'analyse sensorielle est fermée, en surpression par rapport à l'extérieur, à température constante, et peut accueillir quatre sujets simultanément dans des cabines séparées. Les essais analytiques ont été effectués sur papier et les échantillons ont été accompagnés systématiquement d'un verre d'eau.

Les échantillons de safran, codés, ont été présentés aux juges sur un plateau par 2 ou 4 selon les essais (Figure 5).



***Figure 5. Échantillons de safran***

L'évaluation, d'une durée de 15 min environ, a été réalisée en deux étapes :

- **l'évaluation de l'arôme** : les panélistes agitaient doucement le flacon afin de ne pas casser les longs stigmates puis enlevaient le bouchon afin de sentir l'intensité aromatique globale suivie des notes odorantes distinctes émanant du safran.
- **L'évaluation de la couleur** : les panélistes déterminaient la couleur à travers le flacon.

Entre chaque évaluation, les piluliers ont été rebouchés hermétiquement et recouverts de papier d'aluminium.

#### **V.2.7.3.2. Déroulement de l'étude sensorielle**

Une première réunion a été réalisée dans le but d'informer les panélistes du sujet d'évaluation. Puis l'analyse s'est déroulée en quatre phases : une phase de familiarisation puis de développement de vocabulaire et d'entraînement et une dernière d'analyse. L'échantillon iranien a été introduit uniquement au moment de l'épreuve analytique.

#### **V.2.7.3.2.1. Familiarisation**

Deux tests ont été réalisés afin de familiariser les panélistes avec la salle et les procédures de l'analyse sensorielle : un test de classement d'intensité et un test d'apprentissage d'échelle.

Le test de classement d'intensité odorante a été réalisé sur deux produits le linalool ([78-70-6], Fluka,  $\geq 95\%$ ) et le safranal ([116-26-7], Aldrich,  $\geq 88\%$ ), composés majoritaires dans le safran frais et sec, à des dilutions de 10, 100, 500 et 1000 % dans du propan-1,2-diol. Chaque solution (4 gouttes) a été déposée sur un coton dans un flacon en verre fumé, fermé hermétiquement. Les 4 solutions diluées et un blanc devaient être classés en fonction de leur intensité croissante.

Le test d'apprentissage d'échelle a été réalisé sur quatre produits, le 2-phényléthanol ([60-12-8], Fluka  $\geq 99\%$ ), le méthional ([3268-49-3], Fluka), l'acide isovalérique ([503-74-2], Fluka  $\geq 98\%$ ) et l'acide acétique (commerciale alimentaire), composés présents dans les extraits headspace de safran, à des dilutions de 10, 100, 500 et 1000 % dans du propan-1,2-diol. Chaque solution (4 gouttes) a été déposée sur un coton dans un flacon en verre fumé, fermé hermétiquement. L'intensité de chaque dilution et d'un blanc devaient être notées sur des échelles structurées allant de 0 à 5.

Les résultats ont permis d'évaluer la sensibilité des panélistes aux notes proposées et leur aptitude à classer des échantillons en fonction de leur intensité.

#### **V.2.7.3.2.2. Développement du vocabulaire**

Après cette familiarisation, la phase de développement du vocabulaire a été réalisée en deux séances effectuées en cabine. Lors de cette évaluation, deux échantillons différents et représentatifs du safran du Quercy ont été présentés en même temps à chaque juge afin qu'ils puissent les comparer entre eux. Les juges ont senti et observé les échantillons selon la procédure établie précédemment et ont développé une liste de termes relatifs à l'odeur perçue et à l'apparence du safran. L'odeur a été définie comme étant une propriété organoleptique perceptible par l'organe olfactif en flairant certaines substances volatiles et l'apparence comme étant l'ensemble des perceptions visuelles du produits : aspect et couleur. Les panélistes pouvaient utiliser des qualificatifs de leur libre choix.

#### **V.2.7.3.2.3. Réduction des descripteurs et entraînement**

Tous les termes décrits ont été regroupés. Les descripteurs les plus fréquemment employés (50) ont été sélectionnés et regroupés par catégories. Les juges ont été réunis et 17 termes caractérisant l'odeur ont été sélectionnés. A ceux issus de la littérature, (Cadwallader,

2002), ont été ajoutés, par consensus, ceux décrits par les juges ainsi que "l'intensité odorante" et les deux descripteurs relatifs à la couleur, "rouge" et "marron". Au cours de cette réunion, des références d'odeurs ont été présentées afin d'aider les sujets dans le choix des termes (Tableau 7).

Tableau 7. Odeurs perçues par les panélistes et l'odeur de référence proposée.

Odeur perçue par les panélistes	Odeur de références/Produit <sup>a</sup>	Odeur perçue par les panélistes	Odeur de références/Produit <sup>a</sup>
Epicé (safran poivré)	Safranal ([116-26-7], Aldrich, ≥ 88%) Poivre <sup>b,c,d</sup>	Grillé/Brûlé/Fumé	Amande grillée <sup>b</sup> Cacahouète grillée <sup>b</sup> Café grillé <sup>b</sup> Noisette grillée <sup>b</sup> Fumé <sup>b</sup>
Piquant/Acre	Acide acétique (commercial alimentaire)	Sucré (doux)	Caramel <sup>b</sup> Vanille <sup>d</sup>
Terreux (moisi sous-bois)	géosmine <sup>a</sup>	Foin	Paille <sup>b</sup>
Beurré (gras)	Butan-2,3-dione <sup>a</sup> Beurre frais <sup>b</sup>	Champignon	Champignon <sup>c</sup> Moisi <sup>c</sup>
Herbe/Végétal	Cis-hex-3-ènol <sup>a</sup> Odeur complexe de verdure <sup>c</sup>	Miellé	Miellé <sup>b,c</sup>
Florale	Linalool <sup>a</sup>	Fruité (citronné agrûme)	Citron <sup>b</sup>
Pomme de terre bouillie	Méthional <sup>a</sup>	Régλισse	Régλισse <sup>b</sup>
Boisé	α-pinène <sup>a</sup> Cédre <sup>b,c</sup>	Aigre/Fermenté	-
Mentholé/Camphré	Camphre <sup>a</sup> Menthe poivrée <sup>d</sup>		

<sup>a</sup>Le champ des odeurs (Jaubert et al., 1987b; a)

<sup>b</sup>Le nez du café, <sup>c</sup>Le nez des champignons, <sup>d</sup>Le nez des épices, (Lenoir, 1997c; a; b)

Suite à cette réunion de groupe, un essai de notation a été réalisé sur deux séances en cabine. Pour les deux évaluations, les quatre mêmes échantillons, représentatifs du safran du Quercy, ont été présentés aux juges, randomisés selon un plan équilibré utilisant les matrices définies par MacFie, (MacFie et al., 1989). Les sujets ont évalué l'intensité de chacun des descripteurs de la liste générée en traçant une marque sur une échelle non structurée de 10 cm encochée aux deux extrémités par les indications « peu » et « beaucoup ».



L'intensité odorante globale a été évaluée en premier, à l'ouverture du flacon, puis ont été notées les intensités des odeurs perçues et celle de la couleur en dernier. Une analyse

statistique, ANOVA et ACP, réalisée à l'aide des logiciels Unistat (Microsoft) et Unscrambler (Camo, France), ainsi qu'une nouvelle réunion de groupe des juges ont permis de réduire le nombre de descripteurs en éliminant les termes redondants et corrélés entre eux. (Les deux descripteurs "pomme de terre bouillie" et "champignon" ne sont pas discriminant ( $p = 0,89$  et  $0,88$  respectivement)). Au cours de cette réunion de groupe, les références ont été à nouveau présentées aux sujets. Dix descripteurs ont finalement été retenus : "épicé", "terreux", "renfermé", "grillé", "fumé", "piquant", "boisé", "sucré", "beurré" et "foin/Herbe/Végétal", auxquels ont été ajoutés l'"intensité odorante" et les couleurs "rouge" et "marron".

Suite à cette réunion en groupe, un essai de notation a été réalisé sur deux séances en cabine avec deux répétitions de deux échantillons, représentatifs du safran du Quercy. Les sujets ont utilisé la liste des 13 descripteurs sélectionnés et ont procédé comme précédemment pour l'évaluation. Un traitement statistique par ANOVA et ACP a été établi afin de déterminer la pertinence des descripteurs et la répétabilité des juges. Une définition a été attribuée par consensus des juges, pour chaque descripteur (Tableau 8) à l'aide des références d'odeurs déjà sélectionnées, Tableau 7.

**Tableau 8. Définition des descripteurs de l'analyse sensorielle du safran du Quercy.**

<b>Descripteurs</b>	<b>Définition</b>
Intensité globale	Intensité odorante des stigmates perçue juste après ouverture du flacon.
Epicé	Odeur de mélange d'épices regroupant les notes "poivrée", "vieille herbe de provence" et "camphrée".
Terreux	Odeur de serpillière humide, de terre humide et de sous-bois.
Renfermé	Odeur de cave et de poussière.
Grillé	Odeur de pain grillé ou de viande grillée.
Fumé	Odeur de cendre froide dans la cheminée.
Piquant	Acide acétique, vinaigre. Sensation physique de pénétration dans les cavités nasales. Odeur irritante.
Boisé	Odeur de planche, de bois fraîchement coupé, de menuiserie et d'encaustique.
Sucré	Odeur douce, de barbe à papa, de bonbons ou de miel.
Beurré	Odeur de gras, lourde et de beurre fondu.
Foin/Végétal/Herbe	Odeur d'herbe sèche fraîchement coupée (ni vert ni sec)
Rouge	-
Marron	-

Les panélistes ont été conviés à deux séances en cabine ayant pour but de les familiariser avec les définitions établies précédemment. Une feuille, sur laquelle étaient inscrites les définitions, a été présentée aux juges en cabine avec les références d'odeurs associées.

Un essai de notation a été réalisé en cabine sur deux séances. Lors des deux évaluations, les quatre mêmes échantillons ont été présentés aux juges, randomisés à chaque session selon un plan équilibré défini par MacFie, (MacFie et al., 1989), avec la liste des définitions. Des courbes de répétabilité des juges sur la notation de l'intensité des

descripteurs, au cours de deux séances (sur des répétitions d'échantillons), ont été établies afin de déterminer leur performance. Tous les panélistes ont été jugés répétables.

La réduction du nombre de descripteurs et l'entraînement des juges a nécessité trois réunions de groupe des juges, 6 essais de notations en cabine ainsi que 2 familiarisation en cabine avec les définitions des descripteurs, et deux traitements statistiques d'ANOVA et d'ACP.

#### **V.2.7.3.2.4. L'Analyse Descriptive Quantitative**

La dernière étape correspond à l'analyse réelle des échantillons sur la base de la liste des descripteurs d'odeurs (11) et de couleur (2) générée. Les 12 échantillons ont été analysés deux fois. Quatre échantillons ont été présentés aux juges à chaque séance. Chaque échantillon a été évalué indépendamment l'un après l'autre de façon monadique. L'analyse des 24 échantillons (4 x 6) a nécessité 6 séances, réalisées sur une semaine. L'ordre de présentation des safrans, sur l'ensemble des 6 séances, a été tiré au hasard. Ainsi, à la différence des séances d'entraînement précédentes, un même échantillon a pu être présenté deux fois lors d'une même séance d'évaluation. Au sein d'une même séance, les échantillons sont évalués par les juges dans un ordre judicieusement choisi de sorte qu'aucun juge ne sente jamais les échantillons dans le même ordre (MacFie et al., 1989). L'analyse a été réalisée en cabine individuelle selon la procédure établie précédemment. L'évaluation d'intensité a été réalisée sur l'échelle non structurée définie lors de l'entraînement.

#### **V.2.7.3.2.5. Traitements des données**

L'intensité de chaque descripteur est donnée par la distance, en cm, entre l'extrémité gauche de l'échelle et la marque inscrite par le sujet. L'échelle mesurant 10 cm, les notes peuvent varier de 0 à 10. Cependant, le bruit de fond a été évalué entre 0 et 1 cm et la saturation entre 9 et 10 cm. Les valeurs ont été ramenées à 100 en vue d'une meilleure lisibilité des résultats.

Sur les données sensorielles ainsi obtenues, des traitements statistiques ont été effectués :

- L'analyse de variance, ANOVA, par les logiciels Unistat (Microsoft) et XLSTAT (Microsoft) afin de déterminer l'effet juge, l'effet produit et les interactions juges × produits.
- L'analyse en composante principale par le logiciel Unscrambler (Camo, France) afin de représenter les variables sur un minimum d'axes.

- L'analyse PLS par le logiciel Unscrambler (Camo, France) afin de représenter les variables actives (descripteurs) en présence d'une ou plusieurs variables illustratives (Hr, taux d'humidité résiduelle, C, crocine).

### **V.3. CARACTERISATION DES FEUILLES, DES FLEURS ET DES BULBES**

#### **V.3.1. Echantillonnage**

Les feuilles, encore vertes mais jaunes sur la pointe, ont été récoltées à leur base en 2003 (le 29/04/03) et en 2004 (le 10/05/04 et le 11/05/04). Lorsque cela a été nécessaire, elles ont été conditionnées dans des sacs en aluminium fermés hermétiquement sous azote stockés en chambre froide (-24°C).

Les fleurs ont été récoltées après émondage en 2002 (le 14/10/02), en 2003 (le 27/10/04) et en 2004 (le 18/10/04 et le 26/10/04). Les fleurs ne se conservent pas correctement par congélation, leur taux d'humidité étant trop important.

Les bulbes, arrachés aux mois de juin, ont été reçus en août 2003 et en septembre 2004. Lorsque cela a été nécessaire, les bulbes ont été conditionnés dans des sacs en aluminium, fermés hermétiquement, sous azote et en chambre froide (-24°C). Avant toute manipulation, les bulbes ont été débarrassés de leur filasse.

#### **V.3.2. Composition de la matière végétale**

##### **V.3.2.1. Détermination de la matière sèche (MS)**

Une masse  $m$  d'échantillon a été placée dans une coupelle en aluminium ou dans un creuset, préalablement séché et refroidit dans un dessiccateur, de tare  $t$ . L'ensemble a été mis à l'étuve à 103°C, jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Après refroidissement dans un dessiccateur, l'ensemble de masse  $M_0$  a été pesé. Le pourcentage de matière sèche a été déterminé par le rapport :  $MS(\%) = 100 \times (M_0 - t) / m$  et l'humidité relative :  $Hr(\%) = 100 - MS$

Pour chaque détermination suivante, la matière analysée a été préalablement séchée jusqu'à un taux d'humidité < 10% (étuve à 103°C) puis broyée à l'aide d'un broyeur Cyclotec (1093 Sample mill, Foss Tecator) jusqu'à une granulométrie de 1 mm.

##### **V.3.2.2. Détermination de la matière minérale (MM)**

L'échantillon sec préalablement obtenu et son creuset (de tare  $t$ ) ont été placés dans un four et portés à 550°C pendant 3h. Après refroidissement dans un dessiccateur, l'ensemble de

masse  $M_m$  a été pesé. Le pourcentage de matière minérale a été déterminé par le rapport :  
 $MM = 100 \times (Mm - t) / (Mo - t)$ .

### **V.3.2.3. Dosage des éléments pariétaux**

La méthode utilisée est celle décrite par Van Soest and Wine, encore appelée méthode ADF/NDF. Il s'agit d'une méthode gravimétrique basée sur la différence de solubilité des différents constituants dans deux types de détergents.

D'une part le détergent neutre ou NDF (Neutral Detergent Fiber), à base d'EDTA, solubilise l'ensemble des constituants non pariétaux, notamment les protéines et les pectines. Le résidu insoluble N représente la somme des constituants hémicelluloses + lignine + cellulose. D'autre part, le détergent acide ou ADF (Acid Detergent Fiber), à base de CTAB et d'acide sulfurique dilué, solubilise l'ensemble des composés non-pariétaux et les hémicelluloses. Le résidu insoluble A correspondant est donc constitué de lignine + cellulose. L'attaque des lignines du résidu A par un oxydant puissant, le permanganate de potassium, permet de récupérer un résidu C ne contenant dans sa fraction organique que de la cellulose.

L'obtention de ces différents résidus permet, après calcination des échantillons de ne tenir compte que de la fraction organique et de calculer, par différence, le pourcentage massique de chacun des composés pariétaux. L'hypothèse émise est que le pourcentage de matière minérale après ADF est égal à celui après attaque NDF.

Teneur en cellulose = C

Teneur en lignine = A-C

Teneur en hémicellulose = N-A

Les réactions d'attaque de la matière végétale ont été effectuées dans des frittés spéciaux de porosité 2, prévus pour s'adapter sur un système Fibertec M2 (Fibertec SystemM, 1017 hot extractor, FOSS) équipé d'un dispositif de chauffage et de reflux, et qui permet de faire l'ensemble des manipulations sans avoir à transvaser l'échantillon. La matière végétale finement broyée (1g) a été introduite dans un fritté. Le réactif ADF ou NDF (100 mL) a été introduit puis l'ensemble a été porté à ébullition pendant 1h. A l'issue, après filtration, la matière a été abondamment rincée à l'eau bouillante, jusqu'à disparition de la mousse. Après séchage et pesée, le fritté ayant subi l'attaque ADF, a été soumis à une deuxième attaque par une solution mixte, à froid, pendant 90 min, afin de solubiliser les lignines. Après filtration, le rinçage a été effectué à l'aide d'une solution déminéralisante, jusqu'au blanchiment total des

fibres restantes (30 min maximum). Le résidu a ensuite été lavé à l'éthanol 80% puis à l'acétone.

Préparation du réactif NDF :

60 g de lauryl sulfate de sodium + 37,22 g d'EDTA + 9,12 g de phosphate disodique + 13,72 g de borate de sodium décahydraté + 18,6 g d'éthylène glycol monoéthyl éther.

Ces composés ont été introduits dans une fiole de 2L. Après ajout d'1L d'eau distillée, le milieu a été agité à l'aide d'un barreau aimanté. Quelques gouttes d'octanol permettaient d'éviter l'apparition de mousse. La fiole a ensuite été complétée jusqu'au trait de jauge.

Préparation du réactif ADF :

40g de CTAB + 53,6g d'acide sulfurique concentré.

L'acide a été ajouté, goutte à goutte, dans une fiole de 2L, remplie à moitié d'eau distillée. Le CTAB a été introduit dans la fiole qui a alors été complétée jusqu'au trait de jauge.

Préparation de la solution de permanganate de potassium saturé :

Le  $\text{KMnO}_4$  (50g) a été dissout dans 1L d'eau distillée dans une fiole jaugée.

Préparation de la solution mixte :

2 volumes de solution de  $\text{KMnO}_4$  saturée (50g/L), préparée précédemment, ont été ajoutés à 1 volume de solution tampon (6 g de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  + 0,15 g de  $\text{AgNO}_3$  dans 100 mL d'eau distillée + 500 mL d'acide acétique glacial + 5 g d'acétate de potassium + 400 mL de tert-butanol)

Préparation de la solution déminéralisante :

50 g d'acide oxalique dihydrate + 700 mL d'éthanol à 95% + 50 mL d'HCl 12N + 250 mL d'eau distillée ont été introduits dans un flacon et homogénéisés.

**V.3.2.4. Détermination de la teneur en hydrosolubles**

L'échantillon ( $m_i \simeq 1\text{g}$ , dont la matière sèche, MS, est déterminée comme précédemment, V.3.2.1) a été introduit dans un fritté spécial de porosité 2 et de tare  $t$ , prévu pour s'adapter sur un système Fibertec M2, (Fibertec SystemM, 1017 hot extractor, FOSS), équipé d'un dispositif de chauffage et de reflux, et qui permet de faire l'ensemble des manipulations sans avoir à transvaser l'échantillon. Après ajout d'eau distillé (100 mL), le milieu a été porté à ébullition pendant 1h puis a été filtré. L'échantillon a été séché à l'étuve à 103°C pendant 12h puis pesé,  $m_f$ . La teneur en hydrosoluble est calculée selon la formule suivante:  $TH(\%) = (((m_i - t) \times MS) - (m_f - t)) / ((m_i - t) \times MS) \times 100$ . Cette manipulation a été réalisée en duplicat.

### V.3.2.5. Détermination de la teneur en amidon

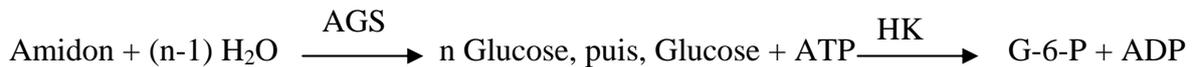
#### V.3.2.5.1. Visualisation microscopique

Une fine lamelle de bulbe congelé, provenant de la récolte de juin 2004, a été découpée à l'aide de moëlle de sureau puis déposé sur une lame. Une goutte de réactif de Gazet a été ajoutée afin de mettre en évidence les grains d'amidon par coloration violette de ceux-ci. La coupe a été visualisée au microscope (x 40, Nikon Eclipse E 600, Subra, Japan).

#### V.3.2.5.2. Dosage

Ce dosage a été réalisé par le laboratoire "Lara Europe Analyses" à Toulouse. La détermination de ce taux a été réalisée par mesure de l'absorbance du glucose libéré par action d'une enzyme, l'amyloglucosidase, sur l'amidon (Kit 207748, Boehringer Mannheim, (Boehringer, 1997)).

L'amyloglucosidase (AGS) catalyse l'hydrolyse de l'amidon en glucose à pH=4,6.



Dans une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6P-DH), le glucose-6-phosphate formé (G-6-P) est oxydé spécifiquement en gluconate-6-phosphate en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (NADPH).



La formation de NADPH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 334, 340 ou 365 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose libéré par hydrolyse de l'amidon.

Le dosage de l'amidon présent dans la poudre de crocus a été réalisé sur 0,3 g (Hr = 9,8%). Un témoin a permis de certifier la validité de la réponse.

#### V.3.2.5.3. Température de gélatinisation

L'échantillon (2 g) ainsi que de l'eau distillée (20 mL) ont été introduits dans un tricol muni d'un réfrigérant et d'une sonde de température. Le milieu, sous agitation magnétique, a été chauffé à l'aide d'un chauffe ballon régulé, à raison de 2°C/min, jusqu'à la prise en masse irréversible de la matière, déterminée par l'aspect du milieu lors de prélèvements réguliers.

### V.3.2.6. Détermination de la teneur en lipides

L'échantillon (8,5 g) a été placé dans une cartouche adapté à l'appareil « accelerated solvent extractor » (ASE200, Dionex) qui permet d'extraire les lipides de la matière végétale, de façon automatisée, à chaud et sous pression. Quatre cycles d'extraction de 10 min ont été

effectués à 105°C sous 100 bars. Le solvant utilisé a été le cyclohexane moins toxique que l'hexane, recommandé par la norme NF V 03-908, (NF V 03-908, 1988). Le filtrat a été évaporé à sec sous pression réduite. L'extrait obtenu était orangé et gras.

L'identification des acides gras libres présents dans l'extrait est obtenue par transformation de ces derniers en esters méthyliques suivie d'une analyse chromatographique en phase gazeuse.

L'extrait lipidique, type huile (0,02 g) a été dilué dans du TBME (tertiobutylméthyléther, 1 mL). La solution (100 µL) ainsi que du TMSH (hydroxyde de triméthylsulphonium, 50 µL à 0,5 M dans le méthanol) ont été introduits dans un flacon. La solution a été homogénéisée puis injectée (1 µL) en chromatographie en phase gazeuse en mode split 1:100.

Le chromatographe (Varian 3800) est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme ainsi que d'une colonne polaire CP (en anglais Cyano-propyl modified Phases) - select CB (en anglais Chemically Bonded) for FAME (en anglais Fatty Acid Methyl Esters) fused silica WCOT (en anglais Wall Coated Open Tubular) 50m, 0,25 d.i., 0,25 e. Le gaz vecteur était l'hélium (1,2 mL/min). Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient de 250°C et le four était en isotherme à 185°C (40 min) puis augmentait de 15°C/min jusqu'à 250°C (10,6 min). L'injection a été réalisée en triplicat. Les acides gras sont identifiés par injection d'un mélange d'étalons d'acides gras estérifiés allant du C<sub>8</sub> au C<sub>22</sub>, (Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix, supelco).

#### **V.3.2.7. Détermination de la teneur en protéines**

Les protéines sont dosées selon la méthode Kjeldahl (Kjeltec<sup>TM</sup> 2200, FOSS), (Bradstreet, 1965). L'azote organique présent dans la matière végétale est transformé en sulfate d'ammonium par minéralisation à haute température, en milieu acide et en présence d'un catalyseur. Les vapeurs d'ammoniac, obtenues par action d'une base sur l'ammonium, sont ensuite récupérées et titrées par un acide.

L'échantillon ( $m_i = 200$  mg, Hr = 97,2%) a été introduit avec deux pastilles de catalyseur CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O dans un tube de minéralisation, puis imprégnés par 12 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 97%. Après une nuit à température ambiante, la minéralisation a été effectuée à 400°C jusqu'à disparition totale des vapeurs d'acide (45 min). Le milieu était devenu bleu. Une fois refroidi, et après ajout de 80 mL d'eau distillée et 60 mL d'une solution de soude à 40%, le milieu a été distillé. Le distillat a été récupéré par bullage dans 30 mL d'une solution d'acide

borique à 4%, additionné de vert de bromocrésol et de rouge de méthyle. L'ammoniac a alors été titré par une solution d'acide chlorhydrique à 0,106 N, préalablement étalonné par de la soude à 0,1 N. Le virage est déterminé par le changement de coloration de la solution du bleu au violet.

Le taux d'azote est calculé par la formule suivante :

$$N(\%) = ((V - V_0) \times 0,2 \times 14,007 / ms \times 100$$

avec

V : volume d'acide utilisé pour la titration de l'échantillon en mL

V<sub>0</sub> : volume d'acide utilisé pour la titration des blancs

ms : masse d'échantillon sec en mg (=m<sub>i</sub> x MS, matière sèche)

Le taux de protéines est donné par le produit du pourcentage total, ainsi déterminé, et d'un facteur de conversion, dans cette étude, égal à 6,25 (valeur classiquement utilisée dans le cas de matière riche en protéine).

#### **V.3.2.8. Détermination de la teneur en sucres**

Les sucres totaux sont déterminés par la méthode colorimétrique de Dubois, (Dubois et al., 1956). Chaque solution à analyser (0,6 mL ou 0,6 mL d'eau pour le blanc), introduite dans un tube à essai, a été additionnée d'une solution phénolique (0,6 mL à 5% (m/m) dans l'eau) et d'acide sulfurique (3 mL à 97%), donnant une couleur jaune-orangée au milieu. Les tubes ont été agités vigoureusement au vortex puis conservés à l'obscurité jusqu'à l'obtention d'une coloration stable. La densité optique de chaque produit a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Hewlett Packard, 8452A) à 490 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des hexoses.

Des étalons externes sont utilisés selon la nature du produit à analyser. L'amidon étant majoritairement présent au sein des bulbes, une gamme étalon de D-glucose a été réalisée sur un intervalle de concentrations de 0 mg/L à 100 mg/L. L'échantillon (10,4 mg de poudre de bulbe, Hr = 2,8%) a été introduit dans une fiole de 100 mL avec de l'eau distillée (97 mL) et de l'acide sulfurique concentrée (3 mL à 97%). Cette solution a été placée au Ultrasons pendant 1h à 60°C afin d'obtenir une solution homogène. Un aliquot de la solution obtenue (0,6 mL) a été introduit dans un tube à vis ainsi que 600µL de phénol à 5% et 3 mL d'acide sulfurique concentré. Le milieu a ensuite été traité comme un échantillon classique, méthode décrite ci-dessus.

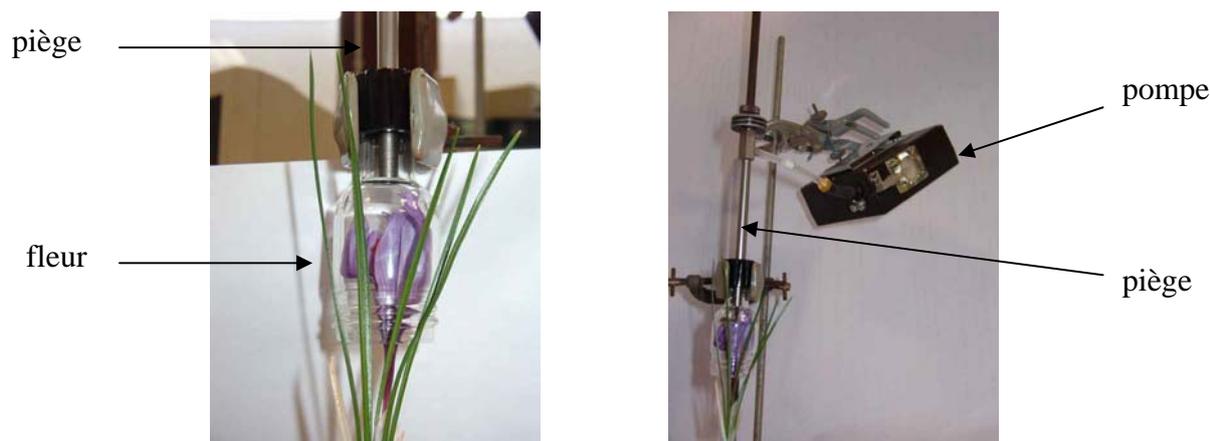
### **V.3.3. Caractérisation des composés volatils des fleurs, des feuilles et des bulbes**

#### **V.3.3.1. Etude des composés volatils libérés par la fleur (par SPME et HD)**

##### **V.3.3.1.1. SPME/CPG-SM**

Les fleurs fraîches et émondées (40 g et 100 g, lot de 2004) ont été insérées dans une cellule en verre (5 L, préalablement lavée à l'eau chaude). Le piègeage de l'headspace par une fibre SPME, PDMS 100  $\mu\text{m}$  (Supelco), sans équilibrage, a duré de 1h à 2h. La fibre a été désorbée pendant 3 min dans l'injecteur du CPG-SM (Agilent 6980/5973N, France, ionisation par impact électronique, 70eV) muni d'une colonne apolaire DB5ms, (30 m, 250  $\mu\text{m}$  d.i., 0,25  $\mu\text{m}$  e., SGE, France). La température de l'injecteur était de 200°C et celle du détecteur de 300°C. Le débit d'hélium était de 1,4 mL/min. La température du four débutait à 40°C puis augmentait de 3°C/min jusqu'à 85°C (1min) puis de 2°C/min jusqu'à 105 et de 30°C/min jusqu'à la température finale de 200°C.

##### **V.3.3.1.2. HD/CPG-SM sur plante in vivo**



**Figure 6. Extraction des volatils par HD à l'aide d'une pompe.**

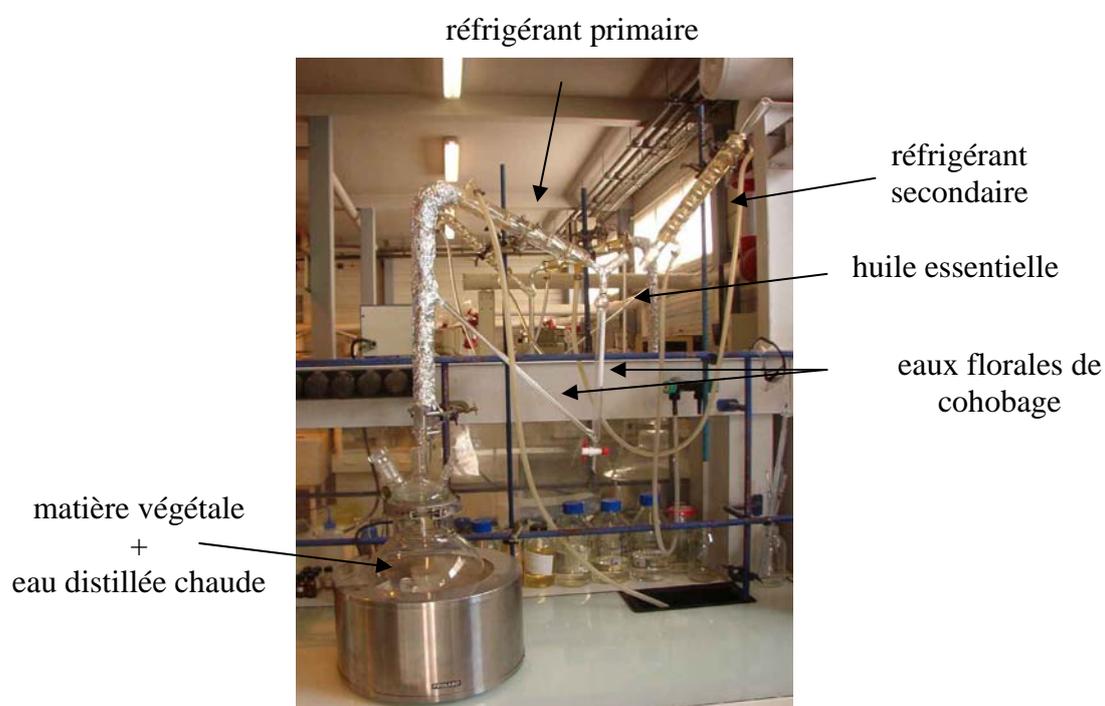
La fleur sur pied (2004), est insérée dans une petite cellule (20 mL) munie d'un piège en tenax TA (130 mg) et d'une pompe (Gerstel GS1, Agilent Technologies) dont le débit était de 300 mL/min afin de concentrer les effluves. Deux temps de piègeage ont été testés : 20 min et 45 min. Le piège est désorbé pendant 3 min dans un injecteur chisa (SGE) du CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique, 70eV) muni d'une colonne apolaire DBO5 (30 m, 25 mm d.i., 0,25  $\mu\text{m}$  e). La température de l'injecteur était de 240°C et celle du détecteur de 300°C. La température du four débutait à 40°C puis augmentait de 5°C/min jusqu'à 240°C (10 min). La pression en tête de colonne était de 1 bar.

Les n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, 0,2 µL déposé sur un papier) ont été piégés puis injectés dans les mêmes conditions chromatographiques. L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

### V.3.3.2. Hydrodistillation

#### V.3.3.2.1. Hydrodistillation des bulbes

Les bulbes (2003), débarrassés de leur filasse, ont été décongelés et broyés dans un mixer (Moulinex super junior) la veille de l'extraction. Le broyat ayant été conservé sous azote, en chambre froide (-24°C) pendant la nuit, (80 g, Hr = 68,7%), a été introduit dans un ballon de 1 L avec de l'eau distillée chaude (600 mL) dans un appareil de type Clevenger (Figure 7).



*Figure 7. Appareil à hydrodistiller de type Clevenger.*

Après 8h d'hydrodistillation, (Mariotti et al., 1993), l'huile essentielle, étant solide à température ambiante, a été extraite par 3 x 20 mL de dichlorométhane de l'appareillage et de l'eau de cohobage. L'extrait, concentré sous un courant d'azote à l'aide d'un Kuderna-Danish jusqu'à 1 mL, est limpide et possède une forte odeur de châtaigne. L'hydrodistillation a été réalisée en triplicat. Les extraits (1 µL) ont été analysés par CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne DB5ms (30 m, 0,25 mm d.i., 250 µm, e.). La température de l'injecteur était de 200°C (split 10

mL/min) et celle du détecteur de 250°C. Le débit d'hélium dans la colonne était de 0,78 mL/min. La température du four débutait à 50°C et augmentait de 2°C/min jusqu'à 100°C puis de 4°C/min jusqu'à 250°C (20 min).

Les n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, 0,1 µL) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

#### **V.3.3.2.2. Hydrodistillation des fleurs**

Les fleurs fraîches et émondées (400 g, lot de 2004, Hr = 85,5%) ont été introduites dans un ballon (5 L) avec de l'eau distillée chaude (3,6 L) dans un appareil de type Clevenger (Figure 7). Après 3h d'hydrodistillation, (Eddaouiri et al., 1993), l'huile essentielle, étant présente en très petite quantité et sous forme solide, a été extraite par 3 x 20 mL de dichlorométhane de l'appareillage et de l'eau de cohobage. L'extrait, concentré sous un courant d'azote à l'aide d'un Kuderna-Danish jusqu'à 1 mL, est limpide et possède une odeur florale très intense. L'hydrodistillation a été réalisée en triplicat. Les extraits (1 µL) ont été analysés par CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne DB5ms (30 m, 0,25 mm d.i., 250 µm, e.). La température de l'injecteur était de 200°C (split 10 mL/min) et celle du détecteur de 250°C. Le débit d'hélium dans la colonne était de 1,3 mL/min. La température du four débutait à 50°C et augmentait de 2°C/min jusqu'à 100°C puis de 4°C/min jusqu'à 250°C (20 min).

Les n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, 0,1 µL) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

#### **V.3.3.2.3. Hydrodistillation des feuilles**

##### **V.3.3.2.3.1. Extraction de 2x8h**

Les feuilles congelées à -24°C (800 g, récolte de 2003, Hr = 70,7%), fractionnées en morceaux de 2 cm, ont été introduites dans un ballon de 10 L avec de l'eau chaude (5 L) dans un appareil de type Clevenger (Figure 7). Après 8h d'hydrodistillation, temps requis pour certaines plantes (Mariotti et al., 1993), la présence d'une huile essentielle est constatée. Très visqueuse et peu abondante, elle a été récupérée avec l'eau de cohobage. L'appareil a été rincé par du dichlorométhane afin de récolter l'huile essentielle adhérente aux parois. La solution aqueuse a été extraite par du dichlorométhane (3 x 20 mL). La phase organique a été évaporée

par bullage à l'azote à l'aide d'un Kuderna-Danish afin d'obtenir un extrait de 1 mL. Il était très odorant (note "verte") et de couleur légèrement verte. Les feuilles, immergées dans l'eau, ont été conservées en l'état jusqu'au jour suivant. Après une nuit, l'hydrodistillation a été reprise pendant 8h supplémentaire. L'huile essentielle, verte et solide à température ambiante, et l'eau de cohobage ont été récupérées et l'huile essentielle a été extraite comme précédemment. L'hydrodistillation a été réalisée en triplicat.

#### **V.3.3.2.3.2. Cinétique d'extraction**

Les feuilles congelées à -24°C (800 g, récolte de 2003, Hr = 70,9%) ont été hydrodistillées comme précédemment. Après une heure d'hydrodistillation puis toutes les heures pendant 6h, l'eau de cohobage ainsi que l'huile essentielle ont été récupérées et l'huile essentielle a été extraite par du dichlorométhane comme indiqué précédemment. Les extraits sont évaporés à l'aide d'un Kuderna-Danish, sous azote jusqu'à 1 mL.

#### **V.3.3.2.3.3. Analyse par CPG-SM**

Les extraits (1 µL) ont été analysés par CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne apolaire (DB5ms, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 mm e.). La température de l'injecteur était de 200°C (split 10 mL/min) et celle du détecteur de 250°C. Le four débutait à 50°C puis augmentait de 2°C/min jusqu'à 100°C puis de 4°C/min jusqu'à 250°C (20 min). Le débit d'hélium était de 1,3 mL/min pour les extraits 2 x 8h et de 0,78 mL/min pour les extraits du suivi d'hydrodistillation.

Les n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, 0,1 µL) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

### **V.3.3.3. Likens-Nickerson (Figure 2)**

#### **V.3.3.3.1. Extraction des fleurs**

Les fleurs fraîches émondées (40,3 g, Hr = 85,5%) ont été introduites dans un ballon (1 L) ainsi que de l'eau distillée (600 mL). Deux types de solvants ont été testés : l'éther diéthylique et l'hexane. Le solvant (30 mL) a été introduit dans un petit ballon (50 mL). Le milieu eau/fleur a été chauffé jusqu'à ébullition de l'eau, puis le ballon contenant le solvant a été mis en chauffe. Le chauffage des deux ballons doit être équilibré afin que les vapeurs de solvant ne soient pas en excès par rapport à celles de l'eau dans la chambre de mélange. Le temps d'extraction a été d'1h30, temps déterminé par les données bibliographiques (cf.

Annexe I, 2.1.1). Le solvant présent dans le ballon et dans la boucle de l'appareillage a été récupéré. L'extrait a été concentré sous courant d'azote à l'aide d'un Kuderna-Danish jusqu'à 1 mL. Il est limpide et très odorant. Une solution de 4-nonanol ([5932-79-6], Sigma-Aldrich), étalon interne, a été ajoutée à l'aide d'une pipette man (5 µL) à l'extrait concentré. Un blanc d'extraction a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires décrites précédemment sans ajout de matière végétale dans le ballon.

#### **V.3.3.3.2. Extraction des feuilles**

Dans un ballon (1 L) ont été introduites des feuilles décongelées et coupées en morceaux de 2 cm (50 g, Hr = 71,4%) et de l'eau distillée (600 mL). Le second ballon (50 mL) contenait le solvant (30 mL). La boucle de l'appareillage a été remplie par du solvant (10 mL). Le milieu eau/feuille a été chauffé jusqu'à ébullition de l'eau, puis le ballon contenant le solvant a été mis en chauffe. Le chauffage des deux ballons doit être équilibré afin que les vapeurs de solvant ne soient pas en excès par rapport à celles de l'eau dans la chambre de mélange. Deux temps d'extraction ont été testés et préalablement déterminés selon les données bibliographiques (cf. Annexe I, 2.1.1), 1h30 et 3h, avec deux types de solvant, de l'éther diéthylique et du pentane. Le solvant présent dans le ballon et dans la boucle de l'appareillage a été récupéré. Les extraits ont été concentrés à l'aide d'un Kuderna-Danish jusqu'à 1 mL sous courant d'azote. Les extraits obtenus sont limpides et très odorants. Un blanc d'extraction a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires décrites précédemment sans ajout de matière végétale dans le ballon.

#### **V.3.3.3.3. Analyse des extraits**

L'extrait obtenu a été injecté (1 µL), en mode splitless, en CPG-SM (Agilent 6980/5973N, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne DB5ms (30 m, 0,25 mm d.i., 250 µm, e.). La température de l'injecteur était de 250°C et celle du détecteur de 290°C. Le débit d'hélium était de 1,4 mL/min. La température du four débutait à 40°C et augmentait de 5°C/min jusqu'à 280°C (10 min).

Les n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, 0,1 µL) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

### V.3.3.4. Macération dans l'éther diéthylique et dans l'hexane

#### V.3.3.4.1. Les fleurs

##### V.3.3.4.1.1. Extraction et étude par CPG-SM/ODP

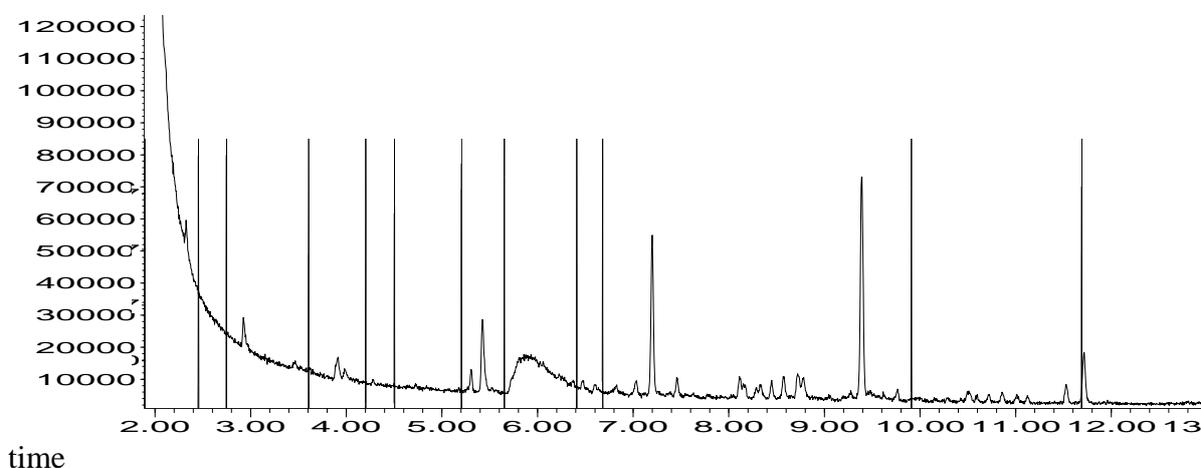
Les fleurs (70 g, récolte de 2003, Hr = 84,3%) et le solvant (750 mL) sont introduits dans un réacteur de 2 L muni d'une agitation mécanique. Les solvants utilisés sont l'éther diéthylique et l'hexane. Le solvant se colore en jaune, les fleurs devenant violette foncée. Trois temps de macération ont été testés : 15 min, 30 min et 60 min. L'extrait est filtré sur un filtre en polyamide. Pour les macérations dans l'éther, le solvant est évaporé à l'air libre puis sous courant d'azote, pour celles réalisées dans l'hexane, le solvant est évaporé sous pression réduite à 48°C. L'extrait obtenu est solide, orangé et gras. Les masses obtenues sont indiquées dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Masses de concrètes de fleurs (récolte de 2003) obtenues lors des macérations dans l'éther diéthylique et dans l'hexane.**

Solvant	Ether diéthylique			Hexane		
Durée (min)	15	30	60	15	30	60
m (g)	0,32	0,23	0,29	0,22	0,19	0,22

Les cires ont été enlevées à froid par dilution de la concrète (10 mg) dans de l'éthanol absolu (750 mg). Les extraits ont été filtrés à l'aide d'un filtre en PTFE (polytétrafluoroéthylène) 0,45 µm avant toutes analyses en CPG-SM/ODP (Agilent, 6980/5973N, ODP2, Gerstel GmbH, RIC, France). L'ionisation a été réalisée par impact électronique (70eV). En sortie de la colonne apolaire (DB5ms, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm e., JW Agilent technologies, USA), l'effluent était séparé en proportion 1 : 2 vers le spectromètre de masse et vers le nez (sortie olfactive). Le débit d'hélium était de 1,4 mL/min. Le four débutait à 90°C et augmentait de 5°C/min jusqu'à 280°C (20 min). Les absolues (2 µL) ont été injectées (split 10 mL/min ; température de l'injecteur 200°C et celle du détecteur 290°C). Un juge expert, entraîné sur des stigmates de *Crocus sativus* et sur les techniques du sniffing et de l'OID, a évalué les extraits en triplicat (Figure 8). Les odeurs ont été décrites et leurs intensités déterminées sur une échelle de 0 à 5. Les scores ont été moyennés afin d'établir un profil aromatique. Les notes dont l'intensité était inférieure à 0,7 n'ont pas été prises en compte (bruit de fond). Treize catégories ont été définies : "verte", "cacaïouète", "champignon", "brûlée", "florale miellée", "pain de mie", "florale", "miellée piquante", "fruitée", "miellée fraîche", "grillée", "verte piquante" et "animale". Le sniffing a été effectué sur 15 min, aucune note odorante n'étant sentie après ce temps de rétention. Le bouton

poussoir (OID : Olfactory Intensity Device) a été utilisé pour marquer les pics sur le chromatogramme.



**Figure 8.** Chromatogramme d'une absolue de fleur réalisée dans l'hexane ( $t = 15$  min) et son marquage à l'aide de l'OID.

Les n-alcanes ( $C_5$ - $C_{18}$ ,  $0,1 \mu\text{L}$ ) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split  $100 \text{ mL/min}$ ). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

#### V.3.3.4.1.2. Extraction et étude par CPG-SM

Les fleurs ( $70 \text{ g}$ , récolte de 2004, Hr =  $85,5\%$ ) ainsi qu'un solvant ( $500 \text{ mL}$ ) sont introduits dans un flacon en verre de  $5 \text{ L}$ . Deux types de solvants ont été testés : l'hexane et l'éther diéthylique. Après une agitation vigoureuse manuelle, une agitation à l'aide d'un barreau aimanté a permis l'homogénéisation de la macération au cours du temps. Trois temps de macération ont été réalisés sur trois lots de fleurs, avec les deux types de solvants,  $15 \text{ min}$ ,  $30 \text{ min}$  et  $60 \text{ min}$ , et un temps supplémentaire,  $120 \text{ min}$ , a été testé avec l'hexane. Le milieu est filtré sur un filtre en polyéthylène et l'extrait est récupéré dans un flacon de  $1 \text{ L}$  en verre fumé. L'extrait obtenu est jaune intense et d'aspect gras et les fleurs sont violette foncée. Les solutions éthérées sont évaporées à l'air libre puis sous azote. Les solutions hexaniques sont évaporées sous vide. Les extraits à l'hexane de  $60 \text{ min}$  et  $120 \text{ min}$  présentent un milieu biphasique, une phase hexanique, jaune, et une phase aqueuse, violette (les anthocyanines étant hydrosolubles), produite par la dégradation des fleurs et augmentant avec le temps de macération. Il faut alors procéder à une décantation avant toute évaporation. Les concrètes obtenues étaient grasses et orangées. Les masses obtenues sont indiquées dans le Tableau 10.

**Tableau 10. Masses de concrètes de fleurs (récolte de 2004) obtenues lors des macérations dans l'éther diéthylique et dans l'hexane.**

Solvant	Ether diéthylique			Hexane			
	15	30	60	15	30	60	120
<b>m moyenne (g)</b>	0,19	0,22	0,29	0,17	0,18	0,21	0,21
<b>Ecart type</b>	0,04	0,02	0,13	0,03	0,01	0,02	0,01

Les concrètes (20 mg) ont été diluées dans du dichlorométhane (1 mL). La dissolution étant difficile, les échantillons ont été placés dans un bain à ultrasons pendant 10 min puis filtré sur un filtre PTFE (0,45 µm). Les extraits limpides obtenus (1 µL) ont été analysés par CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne apolaire (DB5ms, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 mm e.). Le four a été porté à 60°C puis jusqu'à 280°C à 5°C/min (20 min). La température de l'injecteur était de 220°C (split 10 mL/min) et celle du détecteur de 290°C. Le débit d'hélium dans la colonne était de 1,4 mL/min.

Les n-alcanes (C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, 0,1 µL) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

#### **V.3.3.4.2. Les feuilles**

##### **V.3.3.4.2.1. Extraction**

Les feuilles décongelées et morcelées (70 g, récolte de 2003, Hr = 73,8%) ont été immergées dans un solvant (400 mL) contenu dans un flacon en verre teinté et bouché. Deux types de solvants ont été testés, l'éther diéthylique et l'hexane. Les temps de macération ont été de 3, 5 et 7 jours. Chaque type et temps de macération ont été effectués sur trois lots de feuilles. Les flacons ont été régulièrement agités au cours du temps. Le milieu a été filtré sur un filtre en polyéthylène. Une phase aqueuse est observée pour les macérations de 7 jours, provenant de la dégradation des feuilles, nécessitant une étape supplémentaire de décantation. La coloration des extraits est croissante avec le temps de macération. Les extraits éthérés, de couleur verte, sont évaporés sous azote. Les extraits hexaniques, jaunes, sont concentrés sous pression réduite à 48°C. Les concrètes obtenues étaient plutôt d'aspect très sec, vertes foncées pour celles réalisées à l'éther diéthylique et jaunes-vertes pour celles réalisées dans l'hexane. Les masses obtenues sont indiquées dans le Tableau 11. Les gâteaux de feuilles épuisés sont de couleur jaune pâle.

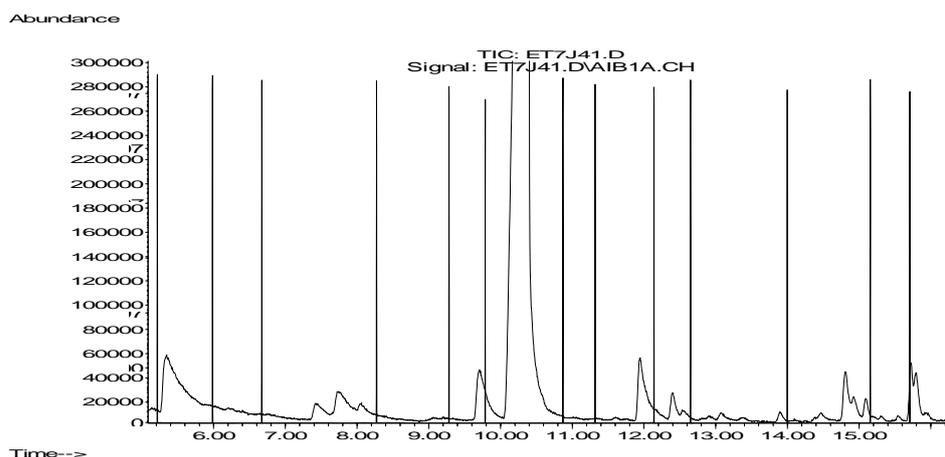
**Tableau 11. Masses de concrètes de feuilles obtenues lors des macérations dans l'éther diéthylique et dans l'hexane.**

Solvant	Ether diéthylique			Hexane		
	3	5	7	3	5	7
<b>Durée (jours)</b>						
<b>m moyenne (g)</b>	0,26	0,30	0,34	0,15	0,21	0,18
<b>Ecart type</b>	0,01	0,00	0,13	0,00	0,03	0,04

Les concrètes (20 mg) ont été diluées dans du dichlorométhane (1 mL). La dissolution étant difficile, les échantillons ont été placés dans un bain à ultrasons pendant 10 min puis filtré sur un filtre PTFE (0,45 µm).

#### V.3.3.4.2.2. Analyse par CPG-SM/ODP

Les trois extraits (1,5 µL), ayant une fraction volatile la plus représentative des macérations de 3, 5 et 7 jours, ont été injectés en CPG-SM/ODP (Agilent, 6980/5973N, ODP2, Gerstel GmbH, RIC, France). L'ionisation a été réalisée par impact électronique (70eV). En sortie de la colonne apolaire (30m, 0,25 d.i., 1µm e., JW Agilent technologies, USA), l'effluent était séparé en proportion 1 : 2 vers le spectromètre de masse et vers le nez (sortie olfactive). Le débit d'hélium était de 1,4 mL/min. La température de l'injecteur était de 250°C (split de 0,1 mL/min) et celle du détecteur de 290°C. Le four débutait à 100°C puis augmentait de 5°C/min jusqu'à 250°C puis de 10°C/min jusqu'à 290°C (30 min). Un juge expert, entraîné sur des stigmates de *Crocus sativus* et sur les techniques de sniffing et d'OID, a évalué les extraits en triplicat. Les odeurs ont été décrites et leurs intensités déterminées sur une échelle de 0 à 5. Les scores ont été moyennés afin d'établir un profil aromatique. Les notes dont l'intensité était inférieure à 0,7 n'ont pas été prises en compte (bruit de fond). Quinze descripteurs ont permis de définir les notes odorantes déterminées par le juge. Elles ont été attribuées seules ou en combinaisons : "cacahouète", "grillée", "champignon", "terreux", "miellée", "florale", "piquante", "verte", "foin", "sucré", "animal", "brûlé", "douce", "citronnée", "fraîche". Le bouton poussoir (OID) a été utilisé pour marquer les pics sur le chromatogramme (Figure 9). Les sniffing ont été réalisés pendant 25 min, temps de rétention de la dernière note aromatique perçue.



**Figure 9.** Chromatogramme d'une concrète de feuille dans du dichlorométhane réalisée dans l'éther diéthylique ( $t = 7$  jours) et son marquage à l'aide de l'OID.

Les n-alcanes ( $C_5$ - $C_{18}$ ,  $0,1 \mu\text{L}$ ) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split  $100 \text{ mL/min}$ ). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

#### **V.3.3.4.2.3. Analyse par CPG-SM**

Les extraits lipidiques obtenus ( $1 \mu\text{L}$ ) ont été analysés par CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique,  $70\text{eV}$ ) sur une colonne apolaire (DB5ms,  $30 \text{ m}$ ,  $0,25 \text{ mm d.i.}$ ,  $0,25 \text{ mm e.}$ ). Le four a été porté à  $60^\circ\text{C}$  puis jusqu'à  $280^\circ\text{C}$  à  $5^\circ\text{C/min}$  ( $20 \text{ min}$ ). La température de l'injecteur était de  $220^\circ\text{C}$  (split  $10 \text{ mL/min}$ ) et celle du détecteur de  $290^\circ\text{C}$ . Le débit d'hélium dans la colonne était de  $1,4 \text{ mL/min}$ .

Les n-alcanes ( $C_5$ - $C_{18}$ ,  $0,1 \mu\text{L}$ ) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split  $100 \text{ mL/min}$ ). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

#### **V.3.3.5. Extraction à chaud au soxhlet**

##### **V.3.3.5.1.1. Extraction des fleurs**

Les fleurs fraîches (récolte de 2004, Hr =  $85,5\%$ ) ont été extraites à chaud à l'aide d'un soxhlet ( $1 \text{ L}$ ). La matière végétale ( $160,4 \text{ g}$ ) a été introduite dans une cartouche réalisée dans du papier filtre adaptée à la dimension de l'appareillage. Le solvant utilisé était le cyclohexane ( $1,3 \text{ L}$ ), moins toxique que l'hexane pour réaliser une extraction à température d'ébullition du solvant. Au cours de l'extraction, une coloration jaune orangé du solvant a été observée lorsque le solvant était au contact de la matière dans la cartouche. La durée moyenne

d'un cycle était de 60 min. Après 7h30 d'extraction, aucune coloration n'a plus été constatée. L'extraction a alors été considérée comme complète. L'extrait a été évaporé sous pression réduite à  $T = 45^{\circ}\text{C}$ , puis à sec sous courant d'azote. Cette extraction a été réalisée en triplicat. L'extrait obtenu est cireux orangé de masse moyenne de 0,432 g, soit un rendement moyen de 1,9% par rapport à la matière sèche.

#### **V.3.3.5.1.2. Extraction des feuilles**

Les feuilles (récolte de 2003, Hr = 69,2%), décongelées et morcelées (2 cm), ont été extraites à chaud à l'aide d'une batterie de quatre soxhlets (125 mL). La matière végétale (40 g) a été introduite dans une cartouche réalisée en papier filtre à la dimension de l'appareillage. Le cyclohexane (200 mL), moins toxique que l'hexane pour réaliser une extraction à chaud a été placé dans le ballon. Au cours du passage du solvant sur la matière, une coloration jaune du milieu était observable. Après 8h d'extraction, aucune coloration n'a plus été constatée. L'extraction a été considérée comme complète. La durée moyenne d'un cycle était de 15 min. L'extrait a été concentré sous pression réduite à une température de  $45^{\circ}\text{C}$ , puis à sec sous courant d'azote. L'extrait obtenu est vert jaune, de masse moyenne de 0,172 g, soit un rendement par rapport à la matière sèche de 1,4%.

#### **V.3.3.5.1.3. Analyse par CPG-SM**

Les extraits (20 mg) ont été dilués dans du dichlorométhane (1 mL). La dissolution étant difficile, les échantillons ont été placés dans un bain à ultrasons pendant 10 min puis filtré sur un filtre PTFE (0,45  $\mu\text{m}$ ). Les extraits limpides obtenus (1  $\mu\text{L}$ ) ont été analysés par CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne apolaire (DB5ms, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 mm e.). Le four a été porté à  $60^{\circ}\text{C}$  puis jusqu'à  $280^{\circ}\text{C}$  à  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (20 min). La température de l'injecteur était de  $220^{\circ}\text{C}$  (split 10 mL/min) et celle du détecteur de  $290^{\circ}\text{C}$ . Le débit d'hélium dans la colonne était de 1,4 mL/min.

Les n-alcane ( $\text{C}_5\text{-C}_{18}$ , 0,1  $\mu\text{L}$ ) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

### **V.3.4. Caractérisation des colorants liposolubles de type caroténoïde**

#### **V.3.4.1. Extraction sélective des caroténoïdes**

##### **V.3.4.1.1. Fleurs**

L'extraction sélective des caroténoïdes a été réalisée selon le protocole préconisé par Britton et Harborne, (Britton et al., 1995), (Harborne, 1984). Les fleurs fraîches (35 g, récolte de 2003, Hr = 85%) ont été introduites dans un erlenmeyer avec de l'acétone (400 mL). L'homogénéisation de l'extraction a été réalisée manuellement pendant 15 min. Une coloration orange du solvant a été observée. L'extrait a été filtré sur papier filtre à l'aide d'un entonnoir. De l'éther diéthylique (200 mL) et de l'eau distillée (100 mL) ont été ajoutés à la solution acétonique précédente. La phase inférieure aqueuse, orange-marron, a été écartée et la phase supérieure étherée, jaune, a été récupérée, séchée par du MgSO<sub>4</sub> et filtrée sur büchner. L'extrait a été concentré par évaporation sous courant d'azote.

L'extrait sec a été repris dans de l'éthanol (20 mL) afin de saponifier les cires et les caroténoïdes présents sous forme estérifiée. Une solution de KOH à 60% dans l'eau distillée a été introduite dans un flacon fermé ainsi que l'extrait (5 mL). Après une nuit, l'extrait est de couleur jaune-orange. De l'eau distillée (15 mL) a été ajoutée. Le milieu a été introduit dans une ampoule à décanter et a été extrait trois fois par de l'éther diéthylique (jusqu'à ce que l'éther ne se colore plus). Les phases étherées, de couleur jaune, ont été regroupées puis lavées avec de l'eau distillée (3 x 10 mL). Le dernier lavage n'étant pas coloré, la saponification a été complète. La phase étherée a été séchée par du MgSO<sub>4</sub> et filtrée sur büchner puis évaporée sous courant d'azote.

L'extrait sec a été repris dans de l'éther de pétrole (10 mL) et placé au congélateur (-15°C) afin de faire précipiter les stérols présents dans l'extrait. Après une nuit à basse température et une centrifugation à 2000G pendant 1 min, la solution était jaune limpide avec présence d'un amas au fond du tube. Le surnageant a été évaporé sous courant d'azote. L'extrait obtenu (11,7 mg) est jaune-orangé. Le rendement de l'extraction a été de 0,22% par rapport à la matière sèche.

##### **V.3.4.1.2. Feuilles**

L'extraction sélective des caroténoïdes a été réalisée selon le protocole préconisé par Britton et Harborne, (Britton et al., 1995), (Harborne, 1984). Les feuilles congelées (100 g, récolte de 2003, Hr = 72,0%) et morcelées (2 cm) ont été introduites dans un erlenmeyer avec de l'acétone (1 L). L'homogénéisation de l'extraction a été réalisée manuellement pendant 15 min. Une seconde extraction a été effectuée avec de l'acétone (500 mL), le solvant

d'extraction étant peu coloré. Les deux extraits ont été regroupés et filtrés sur papier filtre. Une solution jaune-verte est obtenue. Une partie de l'acétone (environ 250 mL) a été évaporée sous pression réduite. Dans une ampoule à décanter ont été introduits, l'extrait, de l'éther diéthylique (250 mL) et une solution saturée en NaCl (250 mL). L'extraction a été réalisée par une faible agitation afin de minimiser les risques d'émulsion. La phase organique a été lavée avec de l'eau distillée (3 x 150 mL). La phase aqueuse, jaune-orange et rouge a été écartée et la phase étherée, de couleur jaune-verte a été récupérée, séchée par du MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous courant d'azote. L'extrait obtenu est vert, noir.

L'extrait a été repris dans de l'éthanol (20 mL) et de l'éther diéthylique (2 mL) afin de solubiliser complètement l'extrait, avant de réaliser la saponification de la chlorophylle et des cires présentes dans les feuilles. Une solution de KOH à 60% dans de l'eau distillée (2,2 mL) a été introduite dans un flacon fermé contenant l'extrait. Après une nuit, l'extrait est vert et non homogène. L'extrait et de l'éther diéthylique (25 mL) ont été introduit dans une ampoule à décanter. L'interphase étant difficilement discernable, de l'eau distillée a été ajoutée (10 mL). La phase étherée a été rincée par de l'eau distillée (3 x 10 mL). Elle est passée d'une couleur verte et d'une consistance épaisse à un jaune limpide. La phase aqueuse est verte, non homogène et épaisse. Le dernier lavage est limpide, la saponification a été complète. La phase aqueuse a été extraite à nouveau par de l'éther diéthylique (10 mL). Les phases organiques ont été regroupées, séchées par du MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées sous courant d'azote. L'extrait obtenu (307 mg) est jaune cireux. Le rendement de l'extraction a été de 1,1% par rapport à la matière sèche.

#### **V.3.4.2. Analyse des extraits**

##### **V.3.4.2.1. Par CLHP**

Les extraits (12 mg) ont été dilués dans de l'acétonitrile (1,5 mL). La solubilisation étant difficile, les extraits ont été plongés pendant 10 min dans un bain à ultrasons, puis filtrés sur du PTFE (0,45 µm) avant d'être analysés par CLHP-DAD (Solvent Rack SOR-100, P680 HPLC pump, ASI-100 automated sample injector, thermostatted column compartment, UVD 340V, Dionex) sur une colonne C18 omnisphère (100 mm x 3 mm x 3 µm). La boucle d'injection était de 20 µL et le débit d'éluant de 0,4 mL/min. Le détecteur à barrette d'iode était placé à  $\lambda = 450$  nm, longueur d'onde d'absorbance des caroténoïdes. Les deux éluants étaient, l'eau UHQ (A) et l'acétonitrile avec 0,05% de triéthylamine (B). Les programmations de l'éluant étaient les suivantes (Tableau 12) :

**Tableau 12. Programmes de la pompe CLHP pour l'analyse des extraits issus des feuilles et des fleurs.**

Programmation pour les feuilles		Programmation pour les fleurs	
Temps (min)	% B	Temps (min)	% B
0	80	0	60
5	90		
15	95		
30	100		
35	80		
		40	100
		80	100
		85	60

La triéthylamine permet, d'éluer tous les caroténoïdes présents dans la colonne et d'obtenir une meilleure intensité des pics.

#### **V.3.4.2.2. Par CLHP-SM**

L'analyse des caroténoïdes a été réalisée par CLHP-SM (passeur automatique et pompe, Perkin Helmer serie 200, détecteur UV, Perkin Helmer 785A, analyseur quadropole, API 365, Applied Biosystems) en mode APCI (en anglais : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation), en positif ( $400 \leq (m+H)/z \leq 1000$ ). La température de la source (Turbo Ionspray) était de 300°C.

##### **V.3.4.2.2.1. Optimisation des conditions opératoires**

L'optimisation des conditions d'analyse a été effectuée par injection directe de deux étalons de caroténoïdes, la lutéine ([127-40-2], extrasynthèse) et la zéaxanthine ([144-68-3], extrasynthèse). Une pointe de spatule de poudre d'étalon a été introduite dans un eppendorf avec 1 mL d'acétonitrile. La solution a été passée aux ultrasons pendant 5 min puis à la centrifugeuse afin d'éliminer le culot non solubilisé. Le volume injecté était de 1 µL et le DP (en anglais Declustering Potentiel) de 30. Les étalons ont ensuite été injectés à l'aide de la colonne dans laquelle le débit d'éluant était de 0,5 mL/min.

##### **V.3.4.2.2.2. Analyse des extraits**

Les extraits (12 mg) ont été dilués dans de l'acétonitrile (1,5 mL) et passés au vortex avant d'être analysés par CLHP-SM. Les injections ont été réalisées dans les conditions déterminées ci-dessus. La programmation de la pompe est donnée dans le Tableau 13. Les

éluants utilisés ont été l'eau UHQ (A) et l'acétonitrile (B). La détection a été réalisée à  $\lambda = 450$  nm et par spectrométrie de masse.

**Tableau 13. Programmmations de la pompe CLHP pour l'analyse des extraits issus des feuilles et des fleurs.**

Programmation pour les feuilles		Programmation pour les fleurs	
Temps (min)	% B	Temps (min)	% B
0	80	0	90
5	90		
15	95		
30	100	30	90
35	80		

### V.3.4.2.3. Par TOF

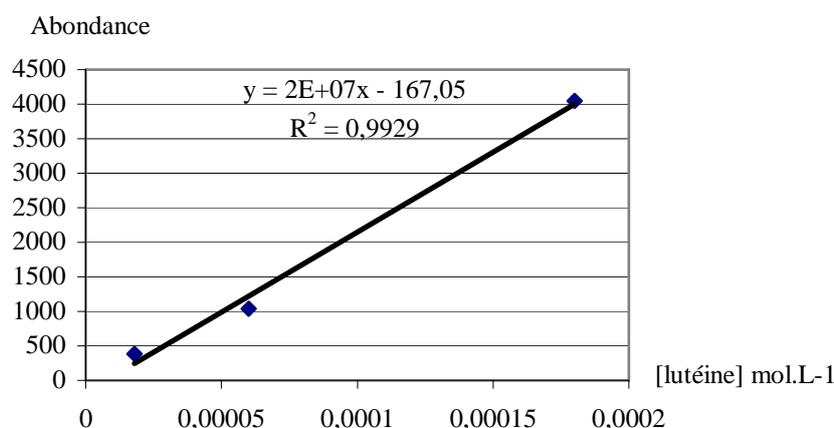
#### V.3.4.2.3.1. Recherche de masse exacte

Les extraits ont été analysés par un appareil ESI-Q-TOF (Ultima, Waters). La tension de cône était de 60V. Les échantillons ( $m = 20$  mg dans un mélange méthanol/acétonitrile 1/9) ont été dilués 5 fois dans un mélange méthanol/acétonitrile 1/1 avec 1% d'acide acétique.

Les masses exactes ont été réalisées à l'aide d'un calibrant  $H_3PO_4$  donnant des clusters avec une différence de masse de 92. Les recherches de masse exacte de 551 et de 583 ont été effectuées avec une marge d'erreur de 50 ppm.

#### V.3.4.2.3.2. Dosage

Le dosage des caroténoïdes, types  $C_{40}H_{56}O_2$ , a été réalisé par calibration externe avec de la lutéine.



**Figure 10. Réponse de la lutéine (abondance) en fonction de sa concentration (mol.L<sup>-1</sup>).**

L'extrait de feuille (16,6 mg dans 1 mL d'acétonitrile/méthanol 9/1) a été dilué par trois avant analyse dans un mélange méthanol/acétonitrile 1/1, avec 1% d'acide acétique. L'effet matrice a pu être évalué, le fragment de la lutéine était présent en très faible quantité dans l'extrait.

#### **V.4. MACERATION A L'ECHELLE PILOTE**

##### **V.4.1. Extraction (cf. IV.2.1)**

##### **V.4.2. Analyse par CPG-SM de la fraction volatile**

Les extraits obtenus à l'échelle pilote (20 mg) ont été dilués dans du dichlorométhane (1 mL). La dissolution étant difficile, les échantillons ont été placés dans un bain à ultrasons pendant 10 min puis filtré sur un filtre PTFE (0,45 µm). Les extraits limpides obtenus (1 µL) ont été analysés par CPG-SM (HP 5890/HP5971, Hewlett Packard, France, ionisation par impact électronique, 70eV) sur une colonne apolaire (DB5ms, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 mm e.). Le four a été porté à 60°C puis jusqu'à 280°C à 5°C/min (20 min). La température de l'injecteur était de 220°C (split 10 mL/min) et celle du détecteur de 290°C. Le débit d'hélium dans la colonne était de 1,4 mL/min. Ces extraits ont été analysés en triplicat.

Les n-alcane ( $C_5$ - $C_{18}$ , 0,1 µL) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques (split 100 mL/min). L'identification a été réalisée à l'aide des indices de rétention, des bibliothèques NIST 98 (Agilent, France) et WILEY (Hewlett Packard, France) et de la littérature.

##### **V.4.3. Analyse de la fraction colorante**

###### **V.4.3.1. Par CLHP**

Les extraits de fleurs et de feuilles, issus de la macération à l'échelle pilote ont été analysés par CLHP selon la méthode décrite précédemment (cf. V.3.4.2.1). Les concrètes de fleurs (2032 mg) et de feuilles (1865 mg), après avoir été reprise dans de l'éthanol, ont été saponifiées par de la potasse selon le protocole décrit précédemment (cf. V.3.4.1). La masse d'extrait orange-rouge obtenu est de 875 mg pour les fleurs et de 1284 mg pour les feuilles. Les extraits saponifiés ont également été analysés par CLHP (cf. V.3.4.2.1).

###### **V.4.3.2. Par CLHP-SM (cf. V.3.4.2.2)**

Trois extraits ont été analysés par CLHP-SM : l'extrait de fleurs issu de la macération à l'échelle pilote après saponification et les extraits de feuilles issus de la macération avant et après saponification.

### **V.4.3.3. Par TOF**

Les deux extraits issus de la macération à l'échelle pilote de fleurs et de feuilles après saponification ont été analysés par TOF.

#### **V.4.3.3.1. Recherche de masse exacte (cf. V.3.4.2.3.1)**

#### **V.4.3.3.2. Dosage**

Le dosage des caroténoïdes, types  $C_{40}H_{56}O_2$ , a été réalisé par calibration externe avec de la luéine (cf. V.3.4.2.3.2, Figure 10). Les extraits de fleurs (9,5 mg dans 1 mL d'acétonitrile/méthanol 9/1) et de feuilles (13,8 mg dans 1 mL d'acétonitrile/méthanol 9/1) ont été dilués respectivement par 20 et par 10 dans un mélange acétonitrile/méthanol 1/1, avec 1% d'acide acétique. L'effet matrice a pu être évalué pour l'extrait de feuilles, le caroténoïde dont la structure est proche de la lutéine étant en faible quantité dans l'extrait.

### **V.4.4. Valorisation de la fraction colorante : les néo-pigments**

#### **V.4.4.1. Fixation des molécules colorantes sur support argileux par voie thermique**

Les extraits de feuilles et de fleurs issus de la macération à l'échelle pilote (0,3 g) ont été mélangés à de l'argile (attapulgite ou bentonite, 1 g) et à de l'alun (0,05 g). Le milieu a ensuite été homogénéisé par ajout d'eau, ou d'éthanol ou un mélange eau/éthanol à 50%. Le mélange ainsi obtenu a été placé dans un four à balayage d'azote (FCV61EDM, Angelo PO, Italie), à une température comprise entre 100 et 120°C et un temps variant de 7 à 180 min selon l'échantillon. Les néo-pigments ainsi obtenus ont été broyés au mortier. La stabilité de la fixation a été testée par introduction de la poudre obtenue dans deux tubes à essai contenant respectivement, 1 mL d'éthanol et 1 mL d'eau.

Ces poudres ont été réalisées à plus grande échelle afin d'effectuer des tests de photodégradation. Elles ont été obtenues par mélange de 5 g d'argile avec 1,5 g d'extrait et 0,25 g de mordant.

#### **V.4.4.2. Analyse par spectrocolorimétrie**

La colorimétrie permet de caractériser une couleur par des valeurs numériques, conformes aux normes internationales, et d'exprimer ainsi avec plus de facilité et de précision cette dernière. Différents espaces couleurs sont utilisés pour exprimer la coloration,  $L^*a^*b^*$ ,  $Y_{xy}$  et  $L^*C^*h$ .

L'espace couleur  $L^*a^*b^*$  (le CIELAB) est un système adopté par la CIE (Commission Internationale d'éclairage) en 1976. Il est actuellement l'un des plus utilisés pour mesurer la couleur des objets dans pratiquement tous les domaines. Il a été mis au point pour réduire l'un

des principaux problèmes de l'espace Yxy, à savoir que les distances égales sur le diagramme de chromaticité x, y ne représentent pas les différences égales de couleurs perçues.

Dans l'espace  $L^*a^*b^*$  (Figure 11),  $L^*$ , indique la clarté tandis que ( $a^*$  et  $b^*$ ) sont les coordonnées de chromaticité, indiquant le sens des couleurs :  $+a^*$  va vers le rouge,  $-a^*$  vers le vert,  $+b^*$  vers le jaune et  $-b^*$  vers le bleu. La valeur de  $L^*$  s'échelonne de 0, pour le noir, à +100, pour le blanc. Plus on s'éloigne du centre, plus la saturation augmente.

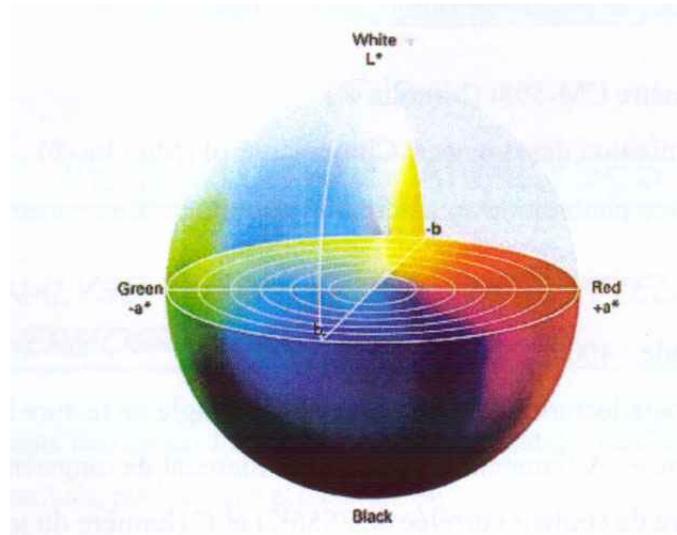


Figure 11. L'espace  $L^*a^*b^*$ .

Les coefficients  $L^*a^*b^*$  sont obtenus à partir des valeurs tri stimulus XYZ d'après les équations suivantes :

$$L^* = 116(Y / Y_n)^{1/3} - 16$$

$$a^* = 500[(X / X_n)^{1/3} - (Y / Y_n)^{1/3}]$$

$$b^* = 200[(Y / Y_n)^{1/3} - (Z / Z_n)^{1/3}]$$

où  $X_n$ ,  $Y_n$  et  $Z_n$  sont les valeurs tri stimulus pour l'observateur standard d'un diffuseur par réflexion idéale et  $X$ ,  $Y$  et  $Z$  celles de l'échantillon.

A partir des valeurs  $L^*a^*b^*$ , l'écart de couleurs peut être calculé par la formule suivante :

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

où  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ , sont les valeurs d'écart de couleurs entre l'échantillon et la référence.

Les poudres obtenues par fixation des molécules colorantes par voie thermique sur un support argileux, ont été analysées par un spectrocolorimètre (CM-508i, Minolta), le logiciel d'acquisition étant Chromacontrol (Minolta) et le capteur, une matrice photodiode au silicium avec une matrice de fibre spectrale. Les longueurs d'ondes sont comprises entre 400 et 700 nm. Le système d'éclairage/lecture est d/2 (éclairage diffuse/angle de lecture 2°). La source

lumineuse est la lumière du jour moyenne sans la zone des ultraviolets avec une température de couleur corrélée de 6774K.

Les mesures ont été effectuées en plaçant l'échantillon dans une capsule en plastique de 3 cm de diamètre.

#### **V.4.4.3. Photodégradation accélérée**

Les échantillons (1,5 g), placés en couche fine et régulière dans des boîtes de Pétri en verre, ont été introduits dans un suntest (Figure 12, CPS+, Atlas, GmbH Vogelsber gstr.22, Linsengericht, logiciel 1,4) muni d'une lampe à Xénon et d'un système de filtrage (couple en verre quartzé sans revêtement de réflexion des IR, verre spécial UV et verre à vitres spéciales).



*Figure 12. Appareil SUNTEST (CPS+, Atlas).*

L'illumination a été réalisée à  $550 \text{ W/m}^2$ , à une température de  $30^\circ\text{C}$  sur une période de 8h.

## Références bibliographiques

- Boehringer (1997). "Enzymatic bioanalysis". *Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis using test-combinations*. Boehringer Mannheim GmbH Biochemicals. Mannheim, Germany. 159.
- Bradstreet R. B. (1965). "The Kjeldahl method for organic nitrogen". Academic Press. New York.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (1995). "Carotenoids. Isolation and Analysis". Birkhauser Verlag. Boston.
- Cadwallader K. R. (2002). "Flavor chemistry of saffron". *Carotenoid-derived aroma compounds*. Winterhalter P. et Rouseff R. L. ACS Symposium Series. San Francisco, 802. 220-239.
- Cadwallader K. R., Baek H. H. et Cai M. (1997). "Characterization of saffron flavor by aroma extract dilution analysis". *Spices : Flavor Chemistry and antioxydant Properties*. Risch S. J. et Ho C. T. ACS Symposium Series. Washington, 660. 66-79.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. et Smith F. (1956). "Colorimetric method for the determination of sugars and related substances." *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Eddaouiri M., Belanger A. et Benjilali B. (1993). "La verveine : effet de séchage du matériel végétal sur le rendement en huile essentielle et sa composition chimique". *2èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Dignes-Les-Bains, Instituto Tetrahedron. 713-726.
- Harborne J. B. (1984). "Phytochemical Methods". Chapman & hall. New York.
- ISO/TS (2003). "Safran (*Crocus sativus* L.)- Partie 1 : spécifications, Partie 2 : Méthodes d'essai." *Norme Européenne ISO/TS 3632-1 3632-2*.
- Janssens A. et Roozen J. P. (1991). "SNIF software". Laboratory of Food Chemistry.
- Jaubert J. N., Gordon G. et Dore J. C. (1987a). "Une organisation du champ des odeurs, 2ème partie : modèle descriptif de l'organisation de l'espace odorant." *Parfums, cosmét. arômes*, 78: 71-82.
- Jaubert J. N., Gordon G. et Dore J. C. (1987b). "Une organisation du champs des odeurs." *Parfums, cosmét., arômes*, 77: 53-56.
- Lenoir J. (1997a). "Le nez des champignons". Edition Jean Lenoir.
- Lenoir J. (1997b). "Le nez des épices". Edition Jean Lenoir.
- Lenoir J. (1997c). "Le nez du café". Edition Jean Lenoir.
- MacFie H. J., Bratchell N., Greenhoff L. V. et Vallis L. V. (1989). "Designs to balance the effect of order presentation and first-order carry-over effects in hall tests." *J. sens. stud.*, 4: 129-48.
- Mariotti J. P., Tomi F., Bernardini A. F., Costa J. et Casanovan J. (1993). "Etudes d'huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* L, cultivé en Corse". *12èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Digne-Les-Bains. 615-620.
- NF V 03-908 (1988). "Détermination de la teneur en huile".
- Van Ruth S. M. et Roozen J. P. (2004). "Gas chromatography-olfactometry analysis and its importance in food quality control: influence of assessors' training and sampling methods on gas chromatography-olfactometry data." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 542: 155-165.

## Annexes

<b>Annexe I. Caractérisation d'une plante .....</b>	<b>279</b>
<b>Annexe II. Matrices de données .....</b>	<b>311</b>
<b>Annexe III. Schéma du procédé d'extraction à l'échelle pilote .....</b>	<b>313</b>
<b>Annexe IV. Références bibliographiques .....</b>	<b>315</b>
<b>Annexe V. Publications et participations aux congrès.....</b>	<b>329</b>



## Annexe I : Caractérisation d'une plante

<b><u>1. LA MATIERE VEGETALE .....</u></b>	<b><u>280</u></b>
<b>1.1. Les éléments pariétaux.....</b>	<b>280</b>
1.1.1. La cellulose ( <i>Barnoud, 1980</i> ).....	280
1.1.2. L'hémicellulose ( <i>Joseleau, 1980</i> ) .....	281
1.1.3. La lignine ( <i>Monties, 1980</i> ) .....	281
1.1.4. Dosage des éléments pariétaux .....	282
<b>1.2. Les protéines .....</b>	<b>282</b>
<b>1.3. L'amidon .....</b>	<b>283</b>
<b><u>2. LES COMPOSES VOLATILS .....</u></b>	<b><u>285</u></b>
<b>2.1. Techniques d'extractions.....</b>	<b>285</b>
2.1.1. Caractérisation.....	285
2.1.2. Valorisation .....	287
<b>2.2. Impact olfactif.....</b>	<b>288</b>
<b><u>3. LES CAROTENOÏDES ET DERIVES.....</u></b>	<b><u>290</u></b>
<b>3.1. Généralités .....</b>	<b>290</b>
<b>3.2. Extraction et Analyse .....</b>	<b>293</b>
<b>3.3. Les "néo-pigments".....</b>	<b>294</b>
3.3.1. Les argiles .....	294
3.3.2. Exemple de néo-pigments .....	297
<b><u>4. L'ANALYSE SENSORIELLE .....</u></b>	<b><u>300</u></b>
<b>4.1. Les différentes méthodes d'évaluation sensorielle .....</b>	<b>300</b>
<b>4.2. Déroulement de l'analyse sensorielle descriptive .....</b>	<b>301</b>
<b>4.3. Traitement des données .....</b>	<b>301</b>
4.3.1. L'analyse de variance ou analysis of variance (ANOVA).....	301
4.3.2. L'analyse en composantes principales ACP .....	302
4.3.3. L'analyse PLS .....	302

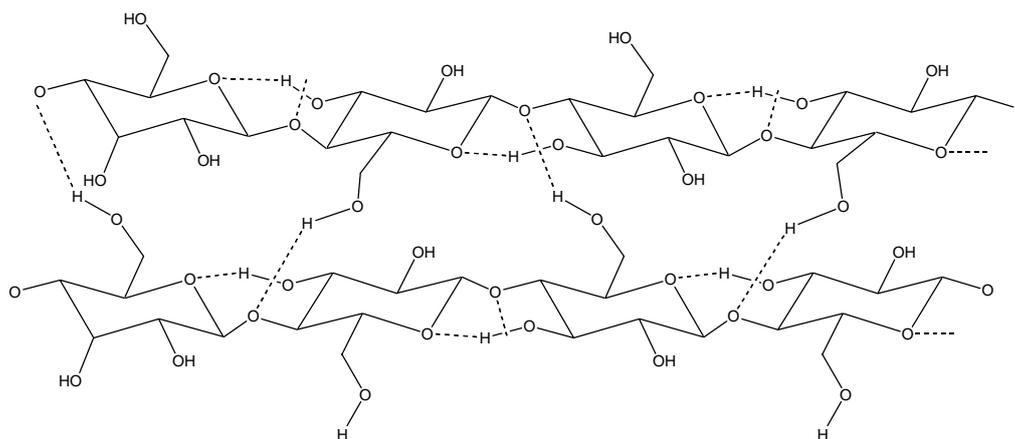
## 1. LA MATIERE VEGETALE

La matière végétale, telle que les feuilles et les bulbes de plante, est constituée d'éléments pariétaux tels que la lignine, la cellulose et l'hémicellulose, mais également de protéines et d'amidon, dans des proportions différentes selon l'organe.

### 1.1. Les éléments pariétaux

#### 1.1.1. La cellulose (Barnoud, 1980)

La cellulose constitue le matériel structural des parois cellulaires des végétaux supérieurs. Elle est la macromolécule la plus abondante et la plus largement synthétisée sur la terre, soit environ 50 milliards de tonnes par an. La structure de la cellulose se présente sous forme d'un homopolymère linéaire d'unités D-glucopyranose en conformation  ${}^4C_1$ . D'autres sucres tels que le galactose, l'arabinose et le xylose, peuvent être présents dans la chaîne. Ces monomères sont liés en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) avec un degré de polymérisation variant entre 100 et 14 000 en fonction de l'organisme d'origine.



*Figure 1. Représentation schématique de la cellulose.*

L'enchaînement des molécules de glucose de la cellulose forme une hélice à deux résidus par tour, stabilisée par des liaisons hydrogènes entre deux glucoses successifs (Figure 1). Les chaînes polymères forment des rubans, qui grâce à l'absence de substituants latéraux peuvent s'arranger parallèlement entre eux en une structure microcristalline (micelles cristallines). Cette structure, stabilisée par des liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires, représentées par des pointillés sur la Figure 1, pouvant s'établir entre les groupes hydroxyles grâce à leur position équatoriale par rapport au plan du cycle de glucose, est d'une grande rigidité. Elles forment des microfibrilles de 3,5 nm de diamètre et de quelques douzaines de nm de longueur (en fonction du degré de polymérisation, DP), qui s'assemblent à leur tour

pour former des fibres de 15 à 20 nm de diamètre et quelques microns de long. L'organisation unidirectionnelle de ces fibres dans les parois cellulaires constitutives du végétal forme les fibres ultimes. Ainsi, la cellulose est insoluble dans les solvants aqueux et est assez résistante aux dégradations chimiques. Son hydrolyse nécessite le recours à des températures élevées et la présence d'acide. Les microfibrilles de la cellulose sont assemblées à leur tour dans une matrice hémicellulosique et ligneuse, pour former la fibre dite lignocellulosique.

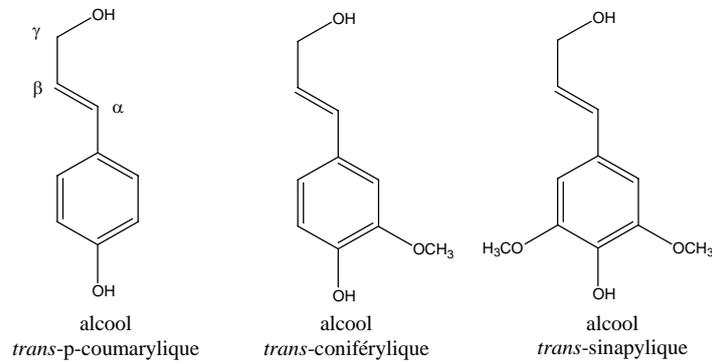
### **1.1.2. L'hémicellulose (Joseleau, 1980)**

Les hémicelluloses sont localisées dans les parois cellulaires de la plante et sont définies comme étant l'ensemble des polysaccharides autres que la cellulose et les substances pectiques. La concentration de ce polymère et sa structure dépendent du type de plante et de la localisation des cellules dans la plante. Les hémicelluloses représentent entre 20 et 30% de la matière sèche des parois cellulaires. Elles participent avec les autres composés pariétaux au maintien de l'intégrité des tissus de la plante. D'une grande variété de compositions et de structures, elles sont constituées de polymères mixtes d'oses neutres et d'acides uroniques, plus ou moins substitués qui peuvent être regroupés en trois classes en fonction de la nature de la chaîne principale : les glucanes, les xylanes et les mannanes. De part leur structure, les hémicelluloses présentent peu de ponts hydrogènes et sont peu cristallines, elles sont donc facilement solubilisées en milieu alcalin.

### **1.1.3. La lignine (Monties, 1980)**

La lignine est un polymère tridimensionnel de structure aromatique, réticulé par des liaisons covalentes, de haut poids moléculaire, qui confèrent leur rigidité aux parois cellulaires des végétaux terrestres. La lignification des tissus est un processus graduel, qui continue jusqu'à la maturité de la plante. Pendant sa croissance, seules les parois des racines se lignifient, puis à l'âge adulte, elle entre dans une période de lignification rapide. Cette lignification est plus importante à la base du végétal. La lignine est formée, de façon aléatoire, par la polycondensation et par déshydrogénation enzymatique de trois alcools phénylpropénoïques en configuration *trans*, alcools : coumarylique, sinapylique et coniférylique, représentés sur la Figure 2. Les variations dans la composition monomérique de la lignine caractérisent les différentes matières végétales. L'hétérogénéité des lignines résulte de la fréquence des liaisons intermonomères et de l'existence de copolymérisation avec les autres composés pariétaux. La lignine a pour rôle de donner la résistance mécanique aux plantes et de leur permettre de résister aux agressions extérieures de type biologique, en

faisant barrière aux enzymes cellulolytiques, chimique ou atmosphérique et par ses propriétés antioxydantes et hydrophobes.



**Figure 2. Monomères constitutifs de la lignine.**

#### **1.1.4. Dosage des éléments pariétaux**

La méthode de Van Soest, connue sous le nom ADF-NDF, (Van Soest, 1963; Van Soest et Wine, 1967; 1968), permet de déterminer par gravimétrie la composition en hémicelluloses, lignines et cellulose de la matière végétale. L'attaque NDF (en anglais : Neutral Detergent Fiber) élimine tout composé autre que la lignine, la cellulose et l'hémicellulose. Par action du réactif ADF (en anglais : Acid Detergent Fiber) la fraction lignocellulosique est obtenue. Une attaque au permanganate de potassium sur le résidu ADF permet d'isoler la fraction cellulosique par élimination des lignines. Les éléments pariétaux du blé, (Marechal, 2001) ont été dosés, par exemple, par cette méthode. Il est constitué de 13% en masse par rapport à la matière sèche de lignines, 30% d'hémicelluloses et 40% de cellulose.

#### **1.2. Les protéines**

Les protéines sont en proportions variables dans la matière végétale et jouent un rôle différent en fonction de leur structure, (Marechal, 2001). Les protéines sont des polymères d'acides aminés, reliés par une liaison peptidique, qui réagissent entre eux par leur radical, interactions aboutissant aux structures secondaire, tertiaire et quaternaire. Les protéines se classent en deux groupes, les protéines solubles dans l'eau ou dans d'autres solvants : les albumines, les globulines, les glutélines, les prolamines, les histones et les protamines et celles insolubles : les albuminoïdes ou scléroprotéines.

### 1.3. L'amidon

L'amidon est, après la cellulose, la principale substance glucidique synthétisée et mise en réserve par les végétaux supérieurs à partir de l'énergie solaire. Les principales sources d'amidon, selon Makoumbou, (Makoumbou, 1988), sont : les graines de céréales (30 à 40 % de leur poids sec), les graines de légumineuses, (30 à 70 %) et les tubercules (65 à 85 %). L'amidon est constitué d'au moins trois composantes glucosydiques : l'amylose, l'amylopectine et le matériel intermédiaire. Ces éléments polysaccharidiques sont des glucosanes organisés pour former un polymère macromoléculaire de D-glucose : le grain d'amidon.

L'amylose est une macromolécule linéaire, constituée de résidus de D-anhydroglucopyrannose associés entre eux par la liaison  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figure 3). La chaîne principale présente des ramifications de type  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) à raison d'une liaison pour plusieurs résidus de glucose. L'amylose native présente un degré de polymérisation moyen (DP) qui varie entre 200 et 6 000, suivant l'origine botanique, le mode et les conditions d'extraction. L'amylopectine est une macromolécule ramifiée, formée par l'association de résidus de D-anhydroglucopyrannose reliés entre eux par la liaison  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) en des chaînons linéaires (ramifications), greffés les uns sur les autres par des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). Le nombre de liaison  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) représente 5 à 6 % de l'ensemble des liaisons.

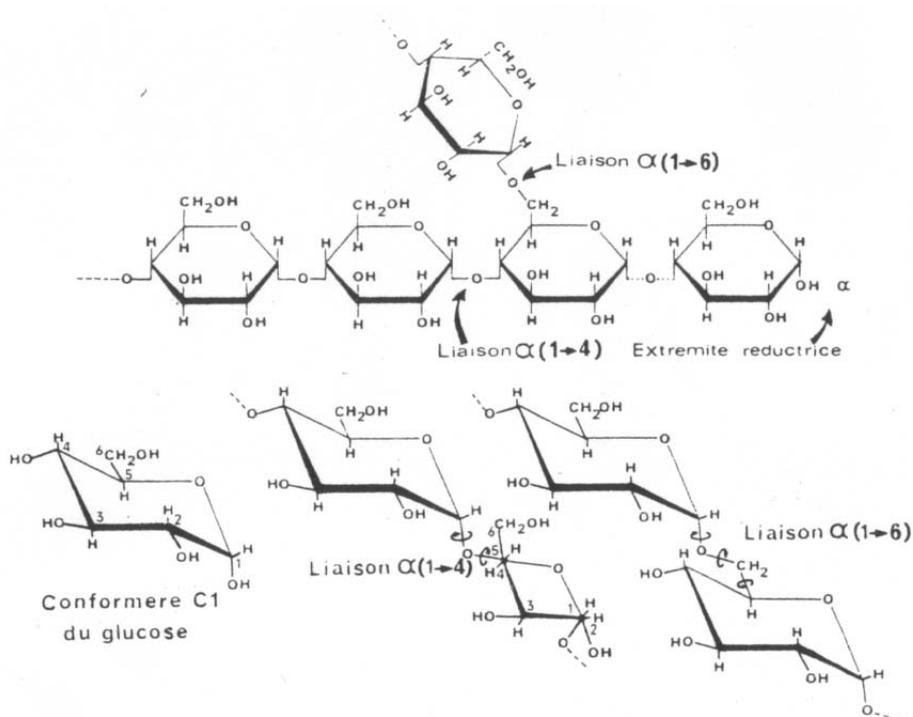
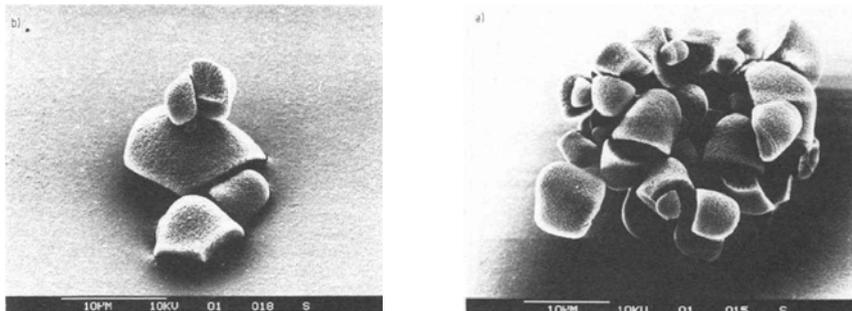


Figure 3. Structure chimique primaire de l'amidon, (Duprat et al., 1980).

L'amylopectine forme des grappes avec un degré de polymérisation pouvant atteindre 100 000. Le matériel intermédiaire est nommé « amylose ou amylopectine anormale » en raison de son taux de ramifications intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine.

Les grains d'amidon, illustrés Figure 4, sont organisés par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes intermoléculaires en faisceaux cristallins, orientés radialement et appelés micelles. Celles-ci maintiennent la structure du grain et lui permettent de gonfler dans l'eau chaude sans rupture complète et sans solubilisation des molécules individuelles d'amidon. Les liaisons hydrogènes qui conditionnent la résistance physique et la solubilité des molécules peuvent être rompues, par traitement thermique ou à l'aide de réactifs chimiques. Une hausse de température induit un gonflement de la structure par désorganisation des liaisons et insertion des molécules d'eau, qui s'accompagne d'un accroissement de la viscosité. Ce phénomène appelé gélatinisation est cependant réversible jusqu'à une valeur moyenne de température de 65 à 80°C selon le type d'amidon, (Raynal-Ioualalen, 1996). Au-delà, le processus est irréversible.



**Figure 4. Grains d'amidon de *Crocus sativus* observés au microscope électronique à balayage, (Craig et al., 1985).**

Selon Raynal-Ioualalen, l'extraction de l'amidon doit être réalisée à une température inférieure à celle de la gélatinisation. Un temps de 15 min puis de deux fois 10 min est nécessaire pour assurer le gonflement de l'amidon et permettre un lavage efficace de la matière végétale.

## **2. LES COMPOSES VOLATILS**

Les volatils sont des molécules organiques de masse molaire comprise entre 50 et 300 g.mol<sup>-1</sup> et le plus souvent entre 150 et 250 g.mol<sup>-1</sup>. La fraction volatile au sein d'une plante représente un très faible pourcentage, souvent très inférieure à 1%. Ils peuvent être générés par dégradation thermique des caroténoïdes, par hydrolyse de précurseurs glycosidiques, par la réaction de Maillard ou l'oxydation des lipides, (Zuhang et Barth, 2002). L'extraction des molécules volatiles est réalisée soit en vue d'une caractérisation soit en vue d'une valorisation.

### **2.1. Techniques d'extractions**

#### **2.1.1. Caractérisation**

Likens et Nickerson, (Likens et Nickerson, 1964; Nickerson et Likens, 1966), ont mis au point une technique de distillation et extraction simultanée afin d'obtenir la fraction volatile d'une matière organique. Les solvants couramment utilisés sont le pentane, l'éther diéthylique, (Sinyinda et Gramshaw, 1998; Jerkovic et Mastelic, 2003) et le dichlorométhane, (Dirinck et Van Opstaele, 1998; Vallet et al., 2002; Siano et al., 2003; Stashenko et al., 2004), le rapport solvant/eau étant de 1/10. Cette méthode d'extraction est rapide, le temps d'extraction moyen est de 2h00. Basée sur une extraction en phase gazeuse des volatils entraînés par la vapeur d'eau, cette méthode a tendance à former des artéfacts provenant d'altération thermique et d'oxydation des analytes les plus délicats. Ce mode d'extraction ne convient pas aux molécules très polaires et fortement solubles dans l'eau.

A l'inverse, l'analyse de l'espace de tête (headspace) constitue une approche directe et non destructive de la matière. Cette technique a été mise au point, (Bovjin et al., 1958), en mode statique en s'appuyant sur le prélèvement d'effluves dégagées par une matrice dans une cellule hermétique. Cette méthode est adaptée pour l'étude des composés majoritaires les plus volatils.

L'extraction de l'espace de tête en mode dynamique consiste à balayer la phase gazeuse, entourant la matrice, par un débit de gaz inerte. Les composés volatils sont entraînés sur un piège ad- ou absorbant. L'équilibre reste dynamique dans la cellule et permet de piéger des composés volatils mineurs. Ce procédé peut être employé dans la nature sur des plantes vivantes, (Guentert et Werkhoff, 1996). Le charbon actif a été pendant longtemps le piège le plus utilisé pour ses excellentes propriétés adsorbantes. A partir des années 1980, il a été remplacé par des polymères de synthèse poreux, plus doux, tels que le Porapak et le Tenax, qui conviennent pour des composés fragiles ou à l'état de traces. Ces polymères, du fait de

leur inertie, ne génèrent que peu d'artéfacts, (Macleod et Ames, 1986). L'extraction d'arôme est améliorée par une augmentation de température ou par une réduction de pression. La première peut induire des dégradations thermiques tandis que la deuxième, selon Guentert, (Guentert et Werkhoff, 1996; Guentert et al., 1998), est plus appropriée pour l'extraction d'arômes.

Ces techniques, l'extraction-distillation simultanée à pression atmosphérique et sous vide, l'headspace dynamique et l'headspace sous vide, ont été comparées lors de l'extraction aromatique de fruits frais, (Guentert et Werkhoff, 1996). Il en résulte une différence significative entre les méthodes. L'headspace sous vide représente fidèlement la composition de la fraction volatile et permet d'obtenir des extraits de haute qualité organoleptique. Cependant, sa mise en œuvre est très délicate. Dans les concentrés obtenus par headspace dynamique, les composés les plus volatils sont sur-représentés par rapport aux composés à haut point d'ébullition. L'extraction distillation simultanée, en raison de l'influence thermique, génère des notes de cuisson, perçues comme négatives d'un point de vue qualitatif.

Une autre méthode d'extraction a été inventée au début des années 1990 par Pawliszyn : la micro-extraction en phase solide (anglais, Solid Phase Micro-Extraction, SPME). Les composés volatils sont absorbés, ou adsorbés selon le type de polymère greffé, sur une fibre de silice fondue portée par une seringue. L'échantillon étant enfermé dans une cellule hermétique lors du piégeage, l'headspace est appauvri en analytes jusqu'à atteindre la capacité maximale de la fibre. Cette technique comme l'headspace statique et dynamique permet de ne pas utiliser de solvant, ni de chauffer, (Boyd-Boland et al., 1994; Pawliszyn, 1999). La SPME, type PDMS, a été testés par Yang, (Yang et Peppard, 1994), sur différents échantillons liquides afin d'en analyser la fraction volatile. L'addition de sels augmente l'adsorption de la fibre. Le volume d'headspace doit être le plus petit possible et le liner doit avoir un faible diamètre. Les avantages et les limites de la SPME ont été discutés. La fibre est très facile à mettre en œuvre, l'extraction ne durant que quelques minutes, mais la quantification des analytes est difficile. Dans le cas de matrices solides, des températures élevées permettent aux analytes de se dissocier plus facilement de la matrice pour aller dans la partie de l'espace de tête. Cependant, le coefficient de distribution de la couche de la fibre décroît avec la température. Pour empêcher cette perte en sensibilité, la couche de la fibre peut être refroidie en même temps que l'échantillon est chauffé, (Pawliszyn, 1997). La SPME est utilisée dans de nombreux domaines afin d'extraire les composés volatils ou semi-volatils de l'air, de l'eau ou d'un solide, (Zhang et Pawliszyn, 1993) : jus d'orange, (Steffen et Pawliszyn, 1996), cola, (Elmore et al., 1997), pommes, (Matich et al., 1996 ; Song et al.,

1997), fromage, (Frank et al., 2004), et tabac, (Clark et Bunch, 1997). Plusieurs études ont été réalisées afin de comparer cette technique, plus simple à mettre en œuvre, à l'headspace dynamique. Il en résulte que la SPME est comparable en matière de fidélité aromatique, (Elmore et al., 1997; Marsili et Miller, 2000; Marsili, 2002) : les principaux odorants sont extraits. L'optimisation de cette technique passe par le choix de la fibre, le temps de piégeage, la masse d'échantillon nécessaire et le temps de désorption.

### **2.1.2. Valorisation**

Les composés volatils ne représentant qu'une infime fraction des molécules présentes au sein de la plante, d'autres techniques permettent de les extraire moins sélectivement afin d'obtenir un rendement plus important en extrait aromatique.

L'hydrodistillation est une technique qui date de l'Antiquité : les Perses l'aurait découverte pour fabriquer de l'eau de rose. Diffusée en Europe par les Arabes, elle consiste à entraîner l'huile essentielle lipophile présente dans les plantes par la vapeur d'eau. Elle peut être réalisée avec ou sans recyclage de l'eau obtenue lors de la décantation de l'huile essentielle, le premier cas nécessitant un appareillage de type Clevenger, (Ganou, 1993). Les eaux aromatiques de cohobage sont appelées eaux florales. La durée d'extraction est variable suivant la matière hydrodistillée, 2h00 pour la verveine, (Eddaouiri et al., 1993), et 8h00, (Mariotti et al., 1993), pour le *Cistus Ladaniferus*. L'hydrodistillation, basée sur l'entraînement à la vapeur des composés peut entraîner des dégradations thermiques, des réactions d'hydrolyses et d'oxydations des analytes et extrait également des composés à haut point d'ébullition, (Tarantilis et Polissiou, 1997).

L'extraction à chaud par solvant, dans un appareillage appelé soxhlet, est utilisée pour caractériser les composés volatils et semi-volatils présents dans les plantes. Cette méthode permet d'extraire une grande quantité de matière, le solvant étant recyclé après chaque passage sur la matière. Elle est composée en majeure partie de composés lipophiles, type acides gras, phospholipides et cires, de molécules colorantes et de composés volatils, imbriqués dans la matrice. Le temps d'extraction est compris entre 4h00, (Scalia et al., 1999), et 20h00, (De Vasconcelos et al., 2000), ou plus selon la nature de la plante. Les solvants utilisés sont l'éthanol, (Vagi et al., 2005), qui permet d'extraire une large gamme de composés du fait de sa polarité, (index de polarité 5,2, (Burdick et Jackson, 1982)), et l'hexane, (Vilegas et al., 1997), extrayant essentiellement les molécules apolaires, majoritaires

parmi les composés aromatiques. Cette méthode donne un bon rendement. Cependant, le chauffage prolongé de l'extrait peut entraîner des dégradations thermiques.

La macération à froid est une technique très ancienne. Basée sur le principe de l'extraction solide-liquide, elle consiste à isoler dans un solvant les composés présents dans la plante. La concrète obtenue après évaporation du solvant possède une qualité olfactive plus proche de la réalité que des extraits réalisés à chaud. Le solvant doit solubiliser les composés volatils et avoir un point d'ébullition assez bas pour être éliminé facilement. Les solvants utilisés sont l'hexane, (Vilegas et al., 1997; De Vasconcelos et al., 2000) et l'éthanol, (Scalia et al., 1999), le temps de macération pouvant être court pour des fleurs fragiles (fleurs de jasmin ou roses) ou longs pour des feuilles, 3 à 4 jours ou plus.

## **2.2. Impact olfactif**

La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à l'Olfactométrie (CPG-O), appelée CPG – sniffing, consiste à employer le nez humain en tant que détecteur en sortie de colonne chromatographique. Cette méthode a été proposée par Fuller, (Fuller et al., 1964), le nez humain étant plus sensible que les détecteurs chimiques pour certains composés odorants. Les effluves sont divisées en deux ; une partie est dirigée vers le sujet humain et l'autre vers un détecteur classique, DIF ou SM. Les composés odorants, participant à l'arôme global de l'échantillon, sont repérés et parfois identifiés. Le passage de la simple détection d'une région odorante dans un chromatogramme à une réelle évaluation olfactométrique est délicat. La quantification de l'impact d'un composé odorant et l'attribution d'un descriptif sont sujettes à la subjectivité de la perception humaine.

Afin d'apprécier le pouvoir odorant d'une molécule, quatre mesures peuvent être prises en considération :

- la dilution progressive de l'extrait aromatique afin de déterminer le seuil de détection olfactif et la puissance aromatique de l'extrait
- la durée de la perception
- la mesure directe de l'intensité de l'odeur détectée par évaluation du sujet sur une échelle d'intensité
- la fréquence de détection de l'odeur par les sujets d'un jury olfactif (CPG-O)

Les méthodes d'évaluation ont été répertoriées, (Van Ruth, 2001): l'analyse par dilution, la méthode de fréquence de détection, la méthode d'intensité postérieure et celle de

temps-intensité. Les valeurs des données de CPG-O dépendent de la méthode employée, de la préparation des échantillons et des conditions analytiques.

*L'analyse par dilution* permet de donner une valeur potentiométrique basée sur la dilution de l'extrait jusqu'au seuil de perception. La méthode d'analyse par dilution des extraits aromatiques (en anglais Aromatic Extraction Dilution Analysis AEDA), (Grosch, 1993), permet de déterminer le Facteur de Dilution, FD, à partir duquel l'odeur est perçue. Cette mesure, selon la méthode CHARM (en anglais : Combined Hedonic Analysis Response Measurement), (Acree et Barnard, 1994), peut être combinée avec une réponse hédonique.

*La méthode par fréquence de détection*, donne l'intensité de l'odeur par la mesure du nombre de réponses du groupe de juges, (Lee, 2003). Les données, enregistrées par le logiciel "GC-SNIF", (Debonneville et al., 2002), sont présentées sous forme d'un aromagramme. Selon Van Ruth, (Van Ruth et Roozen, 2004), cette méthode est souvent utilisée car elle ne nécessite pas d'entraînement du panel et est reproductible dans les réponses. Des comparaisons de profils peuvent être établies, (Van Ruth et al., 1995; Pollien et al., 1997).

*La méthode intensité postérieure* enregistre l'intensité perçue sur une échelle après élution du pic. Une variation importante est observée entre deux panélistes.

*La méthode temps-intensité*, ou Osme, (MacDaniel et al., 1990), donne l'intensité perçue, enregistrée en même temps que l'élution du pic. Les juges entraînés, au moins quatre, donnent la durée et l'intensité du pic mais aussi le descripteur qui lui correspond, (Van Ruth, 2001). Quatre répétitions sont nécessaires.

Les données CPG-O sont analysées par des traitements statistiques, (Lee, 2003), et ne donnent que des informations sur les composés seuls et non sur la synergie des composés entre eux. La recombinaison biomimétique permettrait de juger de la représentativité des notes aromatiques au sein d'une formulation.

### **3. LES CAROTENOÏDES ET DERIVES**

De nombreux caroténoïdes sont présents dans les stigmates, en quantités minimales pour les C<sub>40</sub>-caroténoïdes - le phytoène, le phytofluène, le tétrahydro-lycopène, le β-carotène et la zéaxanthine - et en quantité plus importante pour les C<sub>20</sub>-caroténoïdes - les crocines. Les feuilles des végétaux supérieurs et les fleurs contiennent également ces molécules colorantes.

#### **3.1. Généralités**

Le rôle des caroténoïdes au sein de la photosynthèse a été largement étudié par Britton, (Young et Britton, 1993). Ils ont trois fonctions principales dans les plantes. Ils participent à la photosynthèse en milieu oxygéné ; excités par la lumière, ils assurent le transfert d'énergie vers la chlorophylle initiant le processus de photosynthèse. Ils agissent également en agent protecteur contre la photooxydation des autres molécules présentes dans la plante et apportent de la couleur aux fruits et aux fleurs. Ces C<sub>40</sub>-tétraterpénoïdes, constituent une famille très large de pigments liposolubles allant du jaune au rouge. Ils sont synthétisés dans les plantes à partir d'un précurseur, C<sub>5</sub>-terpénoïde, le diphosphate isopentenyle converti en géranyle géranyle diphosphate qui par une suite de réactions de dimérisation et de déshydrogénation conduit au lycopène (Figure 5), (Rubio Moraga et al., 2003). Il existe plus de 600 caroténoïdes connus, répertoriés dans le Handbook des caroténoïdes, (Britton et al., 1995), dont seulement quelques-uns sont communs au sein des plantes. En général, les problèmes d'identification des caroténoïdes peuvent être résolus en faisant référence à ces composés. Les caroténoïdes les plus connus sont les hydrocarbures insaturés basés sur la molécule du lycopène C<sub>40</sub>H<sub>56</sub> et leurs dérivés oxygénés, les xanthophylles. Le lycopène est constitué de deux chaînes de 4 isoprènes jointes tête-bêche ce qui donne un système entièrement conjugué lui conférant son caractère chromophore et donc coloré.

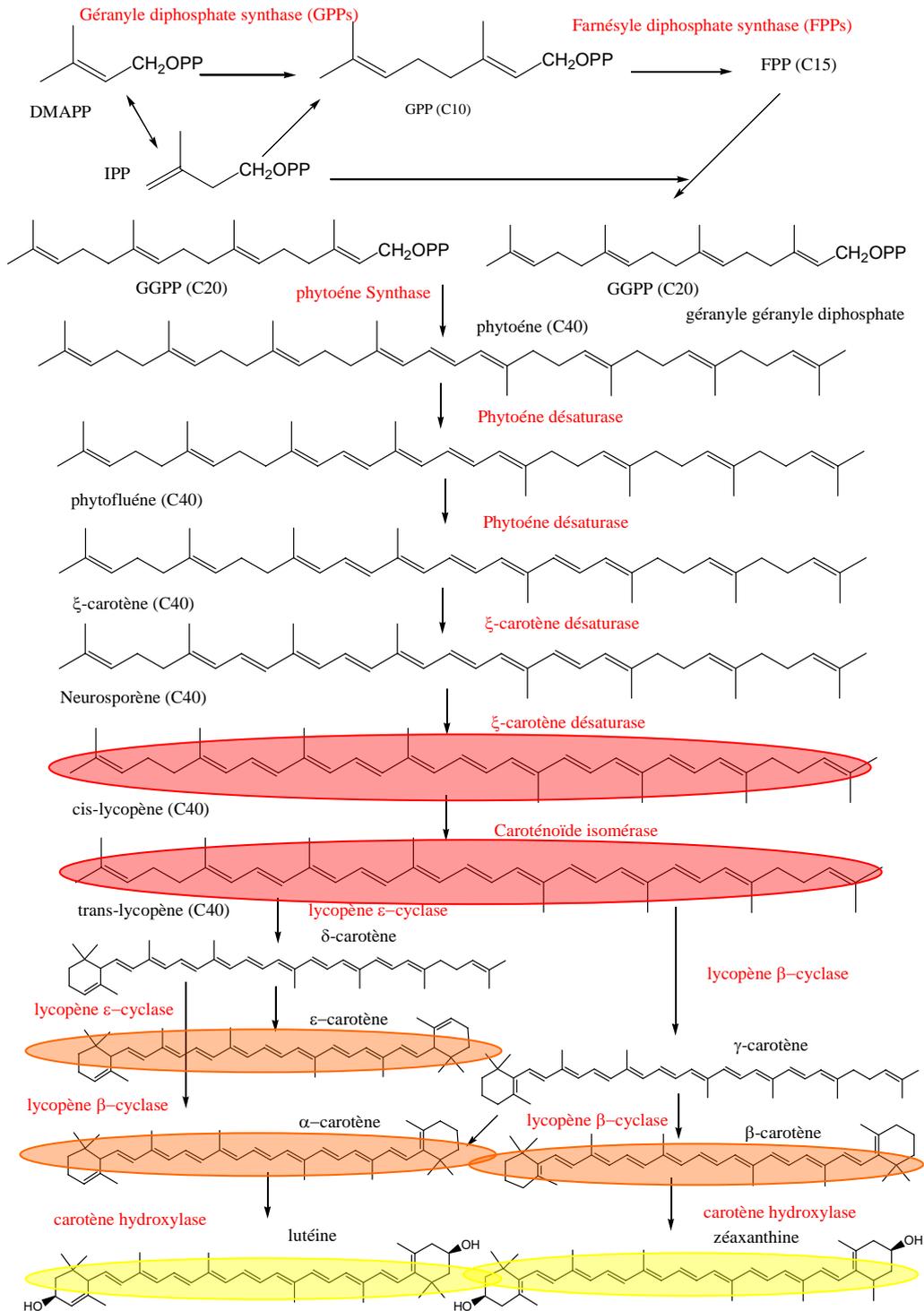
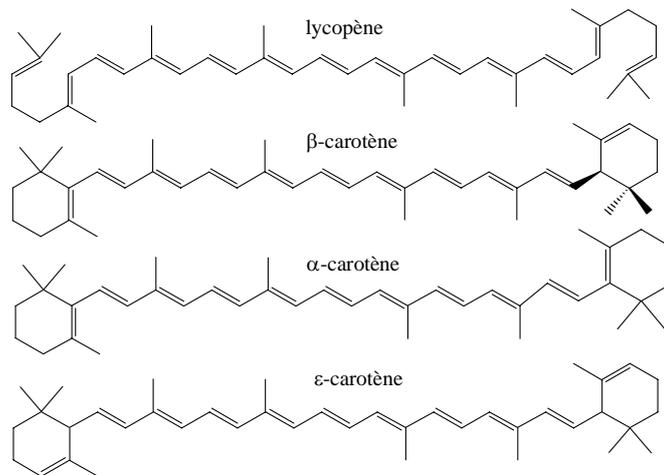
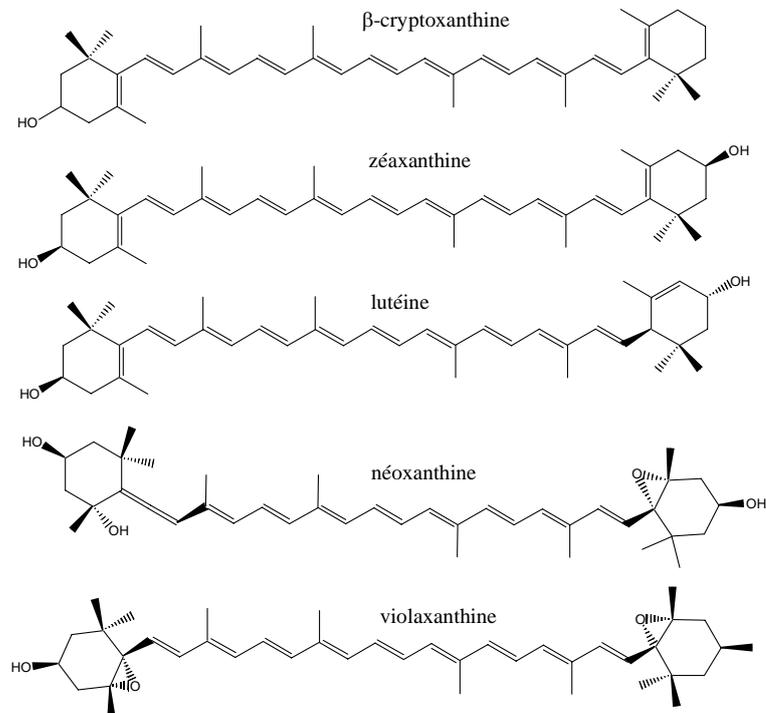


Figure 5. Photosynthèse des caroténoïdes, (Rubio Moraga et al., 2003).

Par hydrogénation, déshydrogénation, cyclisation ou oxydation, tous les caroténoïdes peuvent être obtenus à partir du lycopène. Les xanthophylles, les plus communes, sont les monohydroxycarotènes (β-cryptoxanthine), les dihydroxycarotènes (zéaxanthine) et les dihydroxyépoxy-carotènes (violaxanthine), représentées sur la Figure 6.

Les hydrocarburesLes xanthophylles**Figure 6. Caroténoïdes les plus communs.**

Les caroténoïdes, les plus rares, ont généralement des structures complexes : plus hydroxylés (groupement cétonique), plus insaturés (allénique ou acétylénique) ou plus longs avec des isoprènes supplémentaires (donnant des C<sub>45</sub>- ou C<sub>50</sub>-caroténoïdes). Les fonctions les plus fréquentes sont « hydroxy », « méthoxy », « carboxy », « oxo » et « époxy ». Ce type de caroténoïdes est, en général, naturellement présent sous forme *trans* mais peut s'isomériser par exposition à la lumière.

Dans les plantes, le  $\beta$ -carotène est le caroténoïde le plus largement répandu, mais d'un point de vue quantitatif, les xanthophylles sont plus importantes. La production annuelle de caroténoïdes par les plantes est de l'ordre de 108 tonnes. Dans les extraits liposolubles des feuilles de végétaux supérieurs, sont généralement présents : la lutéine, la violaxanthine, la néoxanthine et le  $\beta$ -carotène et à l'état de traces l' $\alpha$ -carotène, la cryptoxanthine et la zéaxanthine. Souvent leur couleur, masquée par le vert de la chlorophylle, est révélée en automne, (Harborne, 1984; Young et Britton, 1993).

Les formes combinées de caroténoïdes sont plutôt présentes dans les fleurs et les fruits des végétaux supérieurs et apparaissent sous forme de xanthophylles estérifiées par des acides gras (acides palmitique, oléique ou linoléique), (Harborne, 1984). Les pigments floraux sont souvent fortement oxydés avec des groupements époxydes et des traces de carotènes sont parfois présentes. Dans les fruits, il faut tenir compte du fait que les caroténoïdes acycliques tendent à s'accumuler (lycopène dans la tomate) et que des composés spécifiques peuvent être synthétisés par certaines plantes (par exemple la rubixanthine par la famille des *Rosa*, ou la capsanthine par celle des *Capsicum*), (Harborne, 1984).

### **3.2. Extraction et Analyse**

L'extraction de composés dans les plantes, et notamment des caroténoïdes, a été étudiée, par Harborne, (Harborne, 1984), puis spécifiquement par Britton, (Britton et al., 1995). L'isolement des caroténoïdes est délicat car ces molécules sont peu stables : oxydation par l'air, isomérisation E/Z par la chaleur et la lumière et dégradation en présence d'acide ou de base. Les caroténoïdes sont solubles dans l'acétone et l'éther diéthylique, les hydrocarbures, types carotènes, dans des solvants de faibles polarités comme l'hexane et le toluène, et les xanthophylles dans des solvants plus polaires comme l'éthanol.

Les caroténoïdes sont extraits de la plante par de l'acétone et isolés dans de l'éther diéthylique. L'extrait sec obtenu est saponifié afin d'éliminer les lipides et la chlorophylle, détruisant également les esters de caroténoïdes.

Les caroténoïdes sont analysés en CLHP-DAD - car ces molécules possèdent un haut poids moléculaire et sont généralement dégradables thermiquement - sur des colonnes en phases inverses. La séparation est souvent difficile car les structures des caroténoïdes sont parfois très proches comme la zéaxanthine et la lutéine qui diffèrent par la seule position d'une double liaison, (Pfander et al., 1994). L'identification des caroténoïdes est réalisée par CLHP-SM. Les fragments de masses obtenus et les spectres UV ont été répertoriés dans la littérature, (Maoka et al., 2002 ; Britton et al., 2004). La méthode d'ionisation la plus utilisée

est l'APCI (en anglais : Atmospheric Pressure Chemical Ionization), (Clarke et al., 1996; Van Breemen et al., 1996; Glaser et al., 2003 ; Maoka, 2003), qui est une technique plus douce en terme d'ionisation et de fragmentation que l'électrospray.

### **3.3. Les "néo-pigments"**

Les néo-pigments, formés à base d'argile et de pigments ou de molécules colorantes, proviennent d'un concept développé par Vilarem et Cristea (Cristea, 2003). Ils présentent une résistance particulière vis-à-vis des agressions extérieures. Les caroténoïdes ayant une faible résistance à la lumière, leur fixation sur support permettrait de les protéger et de les utiliser dans des formulations cosmétiques.

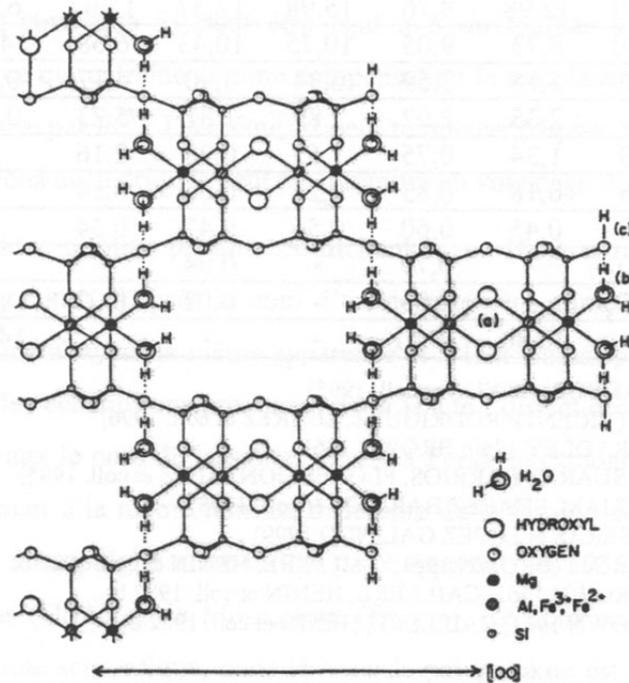
#### **3.3.1. Les argiles**

Deux types d'argile sont présentés dans cette partie: l'attapulgite et la montmorillonite.

##### **3.3.1.1. L'attapulgite**

L'attapulgite a pour formule générale (pour la demi-maille) :  $\text{Si}_8\text{Mg}_5\text{O}_{20}(\text{OH})_2(\text{OH H}^+)_4, 4\text{H}_2\text{O}$ . Sa composition chimique paraît liée aux types de gisement. Dans les gîtes hydrothermaux une substitution du Si par Al peut apparaître, cette tendance étant moins marquée dans les formations sédimentaires.

Elle fait partie de la classe des silicates et de la sous-classe des phyllosilicates. Sa structure est de type, pseudo-feuillets à couche octaédrique discontinue en bandes parallèles (Figure 7). Les quatre molécules d'eau, zéolithiques, sont logées dans des canaux apparaissant dans la structure. Il en est de même pour les ions  $\text{H}^+$  qui, placés dans ces canaux, compensent les déficits de charges dûs aux effets de bordure, (Caillere et al., 1982). Le départ de l'eau zéolithique et de coordination forme des canaux de dimensions approximatives respectives de  $3,7 \times 6,0 \text{ \AA}$  et de  $3,7 \times 12 \text{ \AA}$ , (Barrer et Mackenzie, 1952). Les molécules d'eau sont généralement coordonnées aux cations de Mg localisés dans les canaux et aux bords des couches octaédriques. La majorité des groupements OH associés sont généralement perpendiculaires au plan [100], les autres étant orientés vers les canaux. Aux bords des feuillets, les liaisons Si-OH sont perpendiculaires sur le plan [100] car il existe un effet de répulsion dû aux protons de l'eau de coordination. Les groupements hydroxyles qui se trouvent aux bords des feuillets participeraient aux réactions de protonation-déprotonation, (Cao et al., 1996).



**Figure 7. Structure de l'attapulgite, modifiée pour démontrer le caractère dioctahédrique (a) et la position des protons dans l'eau de coordination (b) et dans les groupements SiOH (c), (Serna et al., 1977).**

L'étude thermique de l'attapulgite montre que l'eau zéolithique et hygroscopique est éliminée à des températures inférieures à 200°C, puis entre 250 et 400°C, il s'agit de l'eau de cristallisation et à des températures supérieures à 400°C, la perte des hydroxyles est observée, (Caillere et al., 1982).

L'attapulgite est une argile de couleur blanche, jaunâtre, verdâtre ou grise, souvent fibreuse. Sa capacité d'échange cationique est d'environ 20 méq pour 100 g d'argile. Elle possède un pH de 7,8 à 8,4, (Galan et al., 1994).

Elle est présente dans de nombreux produits et domaines, (Galan, 1996; Murray, 2000): les boues de forages, les peintures et les adhésifs (pour ses propriétés gélifiantes et épaississantes), l'industrie pharmaceutique et cosmétique (lait, masque, fonds de teint et poudre - propriétés gélifiantes, épaississantes et opacifiantes), les produits phytosanitaires, agents de catalyseur et décolorants (surface d'adsorption), traitement de rejets toxiques, l'industrie des cigarettes, les plastiques et l'alimentation animale.

### 3.3.1.2. La montmorillonite (ou bentonite)

La montmorillonite a pour formule générale (pour la demi-maille) :  $\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{Al}_{2-x}\text{R}_x^{2+})(\text{OH})_2\text{CE}_x\text{nH}_2\text{O}$ ,  $\text{R}^{2+}$  étant Mg dans les montmorillonites de type minéral dont la localité originelle est Montmorillon (Vienne). Dans de très nombreuses variétés chimiques R est remplacé par différents cations divalents (Fe, Mn, Cr ou V).

Elle fait partie de la classe des silicates et la sous-classe des phyllosilicates. Sa structure est de type feuillets continus, couche octaédrique continue et monophyllite (Figure 8).

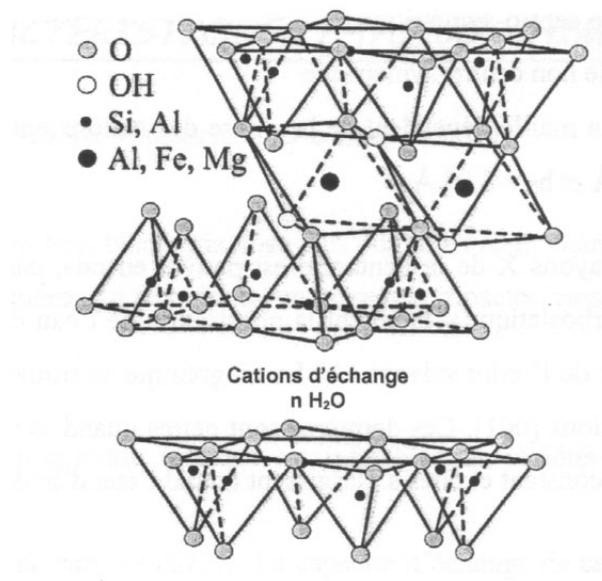


Figure 8. Structure de la montmorillonite (Cristea, 2003).

La caractéristique essentielle de ce minéral est de posséder, entre des feuillets, un certain nombre de couches d'eau, variant au sein d'un même échantillon. Le diffragramme des rayons X est alors celui de minéraux stratifiés. Bradley, (Bradley, 1945), a étudié, par la technique des rayons X, les complexes formés par cette argile et différents liquides organiques polyfonctionnels (amines polyaliphatiques, glycols, polyglycols et éthers de polyglycols). En général, la montmorillonite traitée avec des amines présente une distance interfeuillets de 13-13,5 Å, et avec des composés oxygénés de 17-18 Å.

L'étude thermique de la montmorillonite montre que l'eau d'hydratation est éliminée à des températures inférieures à 200°C, puis vers 650°C la déshydratation du minéral est observée et enfin la perte des hydroxyles se situe vers 850°C.

La montmorillonite, de couleur blanche verdâtre, gris-rose plus ou moins clair ou chamois, est d'aspect onctueux et se présente en masses compactes ressemblant à la paraffine

ou au savon. Elle possède une capacité d'échange cationique de 100 à 130 méq pour 100 g d'argile calcinée à 900°C.

Elle est utilisée dans plusieurs domaines et produits, (Caillere et al., 1989; Cravero et al., 2000; Murray, 2000) : les plastiques, les peintures et le papier, la décoloration des huiles, l'industrie du vin, les nanocomposites, les produits phytosanitaires, les catalyseurs, les produits pharmaceutiques, l'industrie pétrolière, l'industrie minière et l'industrie agroalimentaire.

### **3.3.2. Exemple de néo-pigments**

#### **3.3.2.1. Le «Bleu Maya »**

Le Bleu Maya, mélange d'attapulgite et d'indigo, est un ancien pigment présentant une extraordinaire résistance aux solvants, aux agents chimiques et aux températures allant jusqu'à 250 à 300°C.

Au cours des années, de nombreux chercheurs ont essayé d'expliquer les secrets du Bleu Maya et de reproduire sa méthode d'obtention. Plusieurs voies ont été explorées, basées sur le même principe : le mélange d'une solution de pigment et d'attapulgite suivi d'un chauffage stabilisant le produit, (Van Olphen, 1966; Littmann, 1980; 1982; Torres, 1988). Dans ses études Litmann utilise un prétraitement de l'argile avant fixation : un préchauffage pour éliminer l'eau zéolithique ou un lavage acide pour éliminer les cations d'échange. Torres disperse directement le pigment dans de l'acétone avant de mélanger le milieu obtenu à l'attapulgite.

D'après les observations de Kleber et de Jose-Yacaman, (Kleber et al., 1967; Jose-Yacaman et Ascencio, 2000), il semble que la fixation irréversible de l'indigo sur l'attapulgite coïncide avec le départ de l'eau zéolithique. Selon les dimensions de la molécule d'indigo et celle des canaux, l'hypothèse d'une pénétration partielle et même profonde des molécules d'indigo dans les canaux d'argile n'est pas à rejeter, les sites de coordination les plus probables étant les atomes d'aluminium de la couche octaédrique.

La reproduction de ces techniques pourrait conduire à la production de nouveaux pigments à base végétale présentant une bonne résistance aux agressions extérieures.

#### **3.3.2.2. Autres néo-pigments**

Des recherches récentes ont été réalisées sur les molécules tinctoriales de Garance, de Gaude, de Genet, de Nerprun et de Pastel, (Cristea, 2003), afin de réaliser des formulations de peintures d'intérieur.

### **3.3.2.2.1. Protocoles de fixation**

Des protocoles de fixation, par voie thermique, de ces molécules ont été mis au point sur l'attapuligite, la bentonite et la kaolinite, (Cristea, 2003). Les extraits végétaux atomisés ont été mélangés à l'argile à l'aide d'une faible quantité d'eau. Un mordant de faible toxicité, l'alun ( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ), a été ajouté afin de permettre une meilleure fixation (plus homogène) des molécules colorantes. Le mélange a ensuite été chauffé afin d'engendrer le départ de l'eau d'hydratation de l'argile (eau de coordination et zéolithique) et de fixer les molécules colorantes.

Les molécules organiques forment avec les cations d'échange, ou avec les groupements OH situés aux bords des feuillets octaédriques ou avec les atomes d'oxygène de la couche tétraédrique, des coordinations directes ou par l'intermédiaire du mordant. L'eau zéolithique est partiellement remplacée par les molécules colorantes. Des analyses physico-chimiques ont montré que pour l'attapuligite, la fixation conduit au remplacement de molécules d'eau situées à l'intérieur des canaux présents dans la structure de l'argile. Pour la bentonite la fixation entraîne un espacement des feuillets, accompagné par le remplacement partiel des couches d'eau à ce niveau. Le kaolin présente une structure assez compacte et apparemment la fixation a lieu à la surface des plaquettes hexagonales de l'argile. Cristea s'est alors intéressée à l'influence de la structure de l'argile (et par extension au mécanisme de fixation) sur la résistance à la lumière des néo-pigments.

### **3.3.2.2.2. Résistance à la lumière**

#### **3.3.2.2.2.1. La photodégradation**

Les réactions photochimiques sont des réactions extrêmement complexes. Lorsqu'une molécule absorbe de la lumière à une fréquence appropriée, l'énergie du photon absorbé est transmise à cette molécule. Elle passe alors de son état électroniquement neutre et stable à un état excité, de niveau énergétique plus élevé, chimiquement instable, qui est généralement un état singulet. Le singulet peut alors passer à un état excité triplet, état généralement impliqué dans les réactions photochimiques. Bien qu'en général la réactivité de l'état singulet soit plus importante que celle de l'état triplet (due à une énergie plus importante de l'état singulet), la durée de vie de l'état singulet est nettement plus courte que celle de l'état triplet. A cet état, la diffusion du réactif jusqu'à la molécule se trouve favorisée qui possède alors plus de temps pour subir la réaction photochimique.

Les réactions de photodégradation incluent des ruptures de chaînes, des oxydations introduisant des groupements carbonyles, carboxyles ou peroxydes, des réactions

d'élimination qui engendrent des insaturations et des hydrolyses de groupements esters ou amides. Cependant, la détermination des mécanismes est délicate, les produits de dégradation formés étant souvent difficilement analysables. De plus, des réactions de dégradation non photochimiques suivent souvent les réactions photochimiques. L'auto-oxydation est une des réactions secondaires les plus communément observées.

Les dégradations observées après l'absorption de photons sont directement liées à la quantité d'énergie absorbée : si la quantité d'énergie absorbée est supérieure à celle des liaisons d'unité structurale de la molécules absorbante, ces liaisons peuvent être rompues. L'énergie d'un photon étant inversement proportionnelle à sa longueur d'onde, l'absorption de radiations ultraviolettes se révèle par conséquent particulièrement destructrice, (Giles et McKay, 1963).

La résistance à la lumière des colorants a été particulièrement étudiée sur des supports de type fibres (laine, soie, coton...). La dégradation de la couleur dépend de la structure chimique du colorant, de sa concentration, de la nature de la fibre, du type de liaison, de l'effet du mordant et de la présence de substances étrangères dans la fibre, mais aussi de la température et de l'humidité, de l'atmosphère ambiante et de la nature de la lumière incidente. L'emploi d'additifs, d'antioxydants ou d'absorbants UV, permet d'augmenter la résistance à la lumière. Les antioxydants (tocophérols, dérivés flavonoïques, benzoïques et de l'acide cinnamique) peuvent agir sur la formation de radicaux libres, en piégeant l'oxygène ou en chélatant les métaux catalyseurs d'oxydation. Les absorbants UV (dérivés du 2-hydroxybenzophénone et du 2-(2H-benzotriazole-2-yl)phénol), ralentissent la photodégradation en absorbant la radiation UV et en la réémettant en fluorescence ou en radiation infrarouge.

#### 3.3.2.2.2.2. Résistance des néo-pigments

La résistance à la lumière dépend du couple molécule colorante/argile. Pour la Gaude, la Garance et le Nerprun, la fixation sur le kaolin semble être la combinaison la plus résistante à la lumière. Pour le Pastel et le Genêt, la fixation sur la bentonite est plus efficace. Pour les néo-pigments à base de Pastel, la bentonite permettrait par écartement de ses feuillets, la fixation d'agrégats stables (de 5 molécules) d'indigo. L'ajout d'additifs, différents selon la plante, a permis une amélioration de la résistance à la lumière. Les antioxydants, notamment l'acide gallique, sont efficaces pour les extraits tinctoriaux de Gaude, de Genêt, de Nerprun et de Garance tandis que les absorbants UV le sont plus dans le cas du Pastel.

Des néo-pigments à base de caroténoïdes extraits du *Crocus sativus* pourraient être envisagés afin de tenter d'augmenter leur résistance à la lumière et de les utiliser dans différents types de formulations cosmétiques.

#### **4. L'ANALYSE SENSORIELLE**

L'analyse sensorielle permet d'étudier les caractéristiques sensorielles des produits de manière unique puisqu'elle fait intervenir l'*Homme* comme instrument de mesure et met en relation directe le *produit* et le *consommateur*. Cette méthode d'analyse, (Barthélémy et al., 1998; Cougant, 1999), repose sur l'évaluation des produits par un panel de sujets humains. Les systèmes sensoriels stimulés sont la vision, l'audition, la somesthésie, l'olfaction ou le goût.

##### **4.1. Les différentes méthodes d'évaluation sensorielle**

L'épreuve choisie sera spécifique à l'objectif initial posé. Deux démarches existent : l'approche hédonique par l'évaluation du plaisir procuré par le produit et celle analytique par la caractérisation du produit.

Les épreuves hédoniques évaluent l'effet d'un produit en faisant référence à l'acceptabilité, au plaisir et aux préférences. Ces tests sont effectués à partir d'un grand nombre de panélistes, sélectionnés, pour être représentatifs de l'ensemble de la population, et non entraînés.

Les épreuves analytiques utilisent un panel réduit mais sélectionné et entraîné afin d'éliminer les variations biologiques. Les membres du panel doivent disposer d'une sensibilité appropriée à une large gamme de types odorants et les évaluations sont réalisées à l'abri de distractions externes (bruits et odeurs), dans des conditions reproductibles et sans introduction de biais externes dans la façon dont sont présentés les échantillons. Deux types d'analyses descriptives peuvent être réalisées : les tests discriminatifs et les tests descriptifs. Les épreuves discriminatives sont utilisées pour étudier la présence de différences sensorielles, assez peu perceptibles, entre les produits : l'épreuve triangulaire, (ISO4120, 1983), duo-trio, (ISO10399, 1991), A-non A ou épreuve de conformité, (ISO8588, 1987), par paire ou épreuve de comparaison, (ISO5495, 1983), épreuve de catégorisation et de classement. Les épreuves descriptives sont utilisées pour décrire les produits par certaines de leurs catégories sensorielles en les identifiant et en les quantifiant. L'analyse descriptive quantitative permet de déterminer le profil sensoriel du produit et de le caractériser.

#### **4.2. Déroulement de l'analyse sensorielle descriptive**

Chaque individu réagissant selon sa propre sensibilité, l'évaluation d'un produit est réalisée par un panel ou jury d'individus. La constitution du panel suit un protocole sensoriel : sélection des individus (nombre, sexe, âge), nombre de séances d'entraînement, durée de la séance, nombre d'échantillons par séance, présentation et codage des échantillons, ordre de présentation des échantillons (randomisation) et contrôle (fiabilité des réponses, répétabilité). La formation du panel se déroule en deux phases : la sélection et l'entraînement. Le nombre minimal de sujets est de 10. L'entraînement vise à former les personnes à la reconnaissance de certaines odeurs ou couleurs. Il permet de définir les termes nécessaires à l'évaluation. Le choix des descripteurs est une étape cruciale. Ils doivent être pertinents, précis et discriminants. Les panélistes développent du vocabulaire sur des échantillons représentatifs. Un premier tri qualitatif est effectué afin d'éliminer les descripteurs hédoniques et non appropriés. Puis un deuxième tri par les panélistes permet d'obtenir les descripteurs dans l'ordre décroissant de pertinence et enfin une analyse statistique permet de supprimer les termes non discriminants. Les panélistes définissent chaque terme par consensus. L'entraînement permet d'évaluer l'utilisation de la liste des descripteurs et de former les sujets à la mesure de l'intensité, en utilisant les échelles de catégories, ou d'intervalle, structurées ou non structurées ou les échelles proportionnelles. Les séances de réelles évaluations débutent lorsque les panélistes sont reproductibles dans la mesure et qu'il y a consensus du panel vis-à-vis de tous les descripteurs développés et sélectionnés.

Le profil sensoriel d'un produit, en vue de sa caractérisation, peut être réalisé par analyse descriptive, à l'aide d'un panel.

#### **4.3. Traitement des données**

Les données analytiques brutes permettent de caractériser un produit, mais ne permettent pas de connaître la significativité de chaque donnée de l'évaluation de l'échantillon et l'impact de chacune d'entre elles dans la discrimination des produits. Les méthodes statistiques permettent de mieux comprendre et appréhender l'importance de chaque donnée, (Lagarde, 1983).

##### **4.3.1. L'analyse de variance ou analysis of variance (ANOVA)**

Cette méthode, (O'Mahony, 1986), est supervisée. Des classes ont été prédéfinies au sein des échantillons. Ce test est effectué lorsque l'on cherche à savoir si les différences sont uniquement dues au hasard ou s'il existe des différences significatives entre les classes imputables à un facteur, la différence entre la réponse intra-classe, devant être inférieure à

celle inter-classe. En calculant le ratio entre la variance intra-classe et inter-classe, soit la variance résiduelle par rapport à celle expliquée, le test renvoie la valeur F (coefficient de Fisher). Plus F est élevée, plus la variable est discriminante. En tenant compte du nombre d'individus par classe, cette valeur est généralement transformée en valeur p. Cette dernière exprime la probabilité que la variance de la variable soit due au hasard ou à d'autres facteurs que celui ayant servi pour le classement. Le seuil est fixé généralement à 5% ( $p \leq 0,05$ ) pour conclure quant à la significativité discriminatoire de la variable par rapport au facteur de classement.

#### **4.3.2. L'analyse en composantes principales ACP**

L'analyse en composantes principales ou ACP, (Piggott et Sharman, 1986), constitue un puissant outil pour évaluer la discrimination de  $n$  individus, non classés, lorsque le nombre de variables,  $x$  est très important. Elle permet de réduire ce nombre  $x$  de variables, ayant toutes le même poids, par la définition de nouveaux axes appelés « composantes principales ». Les données de la matrice sont centrées puis réduites et les composantes principales sont déterminées par combinaisons linéaires du système précédent afin d'avoir le plus d'informations sur les premiers axes. A partir de ces composantes principales, des représentations graphiques des individus et des variables peuvent être réalisées. La pertinence de ce schéma dépend du taux de variance expliquée par les composantes principales utilisées pour la représentation.

Les variables étant représentées sur un cercle allant de -1 à 1, plus la valeur absolue de la variable est grande, plus elle est significative. Seule la direction de la variable a de l'importance. Lorsque deux variables sont proches, elles sont « corrélées » et discriminent les individus de façon similaire. La représentation des variables permet d'expliquer les axes factoriels : lorsqu'une variable est proche d'un axe, elle est corrélée à ce dernier et permet de l'expliquer.

#### **4.3.3. L'analyse PLS**

La méthode de régression des moindres carrées (en anglais : Partial Least Square, PLS) est une méthode prédictive (Martens et Martens, 1986), cherchant les combinaisons linéaires ou non linéaires de variables permettant de prédire les résultats d'une matrice de données Y, variables illustratives en fonction de la matrice X, variables actives.

La PLS peut être décrite comme deux ACP réalisées sur les matrices X et Y simultanément. Les deux ACP ne sont pas réellement indépendantes car les composantes principales sont calculées par ordre d'importance en maximisant la covariance existant entre

X et Y, le but étant d'obtenir le maximum de corrélation entre X et Y. La PLS1 est constituée d'une seule variable au sein de la matrice Y. La PLS2 comporte plusieurs variables dans la matrice Y. La PLS apporte une information sur les relations existant entre les individus et exprime les corrélations entre la matrice de mesure X et une matrice Y de variables à prédire.

Ces différents traitements statistiques permettent de mettre en évidence les données ayant le plus de significativité et permettent une représentation simple d'un nombre important de résultats.

## Références bibliographiques

- Acree T. E. et Barnard J. (1994). "Gas chromatography-olfactometry using CharmAnalysis". *In trends in flavour research. Proceeding of the 7th Weurman Flavour Research Symposium*, Amsterdam, Elsevier. 211-220.
- Barnoud F. (1980). "La cellulose". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 66-86.
- Barrer R. M. et Mackenzie N. (1952). "Sorption by attapulgite. Part I. Availability of intracrystalline channels." *J. Phys. Chem.*, 58: 560-568.
- Barthélémy J., Clément J. F., Danzart M., Issanchou S., Köster E. P., Mac Leod P., Nicod H., Sauvageot F., Sztrygler F. et Touraille C. (1998). "Evaluation sensorielle. Manuel méthodologique". Ed.ACTIA. Technique et Documentation - Lavoisier. Paris.
- Bovjin L., Pirotte J. et Berger A. (1958). *Gas chromatography (Amsterdam Symposium)*, London, UK. 310-320.
- Boyd-Boland A. A., Chai M., Luo Y. Z., Zhang Z., Yang M. J., Pawliszyn J. B. et Gorecki T. (1994). "New solvent-free sample preparation techniques based on fiber and polymer technologies." *Environ. Sci. Technol.*, 28 (13): 569A-574A.
- Bradley W. F. (1945). "Molecular associations between montmorillonite and some polyfunctional organic liquids." *J. Am. Chem. Soc.*, 67: 975-981.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (1995). "Carotenoids. Isolation and Analysis". Birkhauser Verlag. Boston.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (2004). "Handbook : Carotenoids". Ed.Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Burdick et Jackson (1982). "High Purity Solvent Guide". Burdick and Jackson Laboratories. Muskegon, Michigan USA.
- Caillere S., Henin S. et Rautureau M. (1982). "Minéralogie des argiles. II. Classification et nomenclature". Masson. Paris.
- Caillere S., Henin S. et Rautureau M. (1989). "Les argiles". Septima. Paris.
- Cao E., Bryant R. et Williams D. J. A. (1996). "Electrochemical properties of Na-attapulgite." *J. Colloid Interface Sci.*, 179: 143-150.
- Clark T. J. et Bunch J. E. (1997). "Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-mass spectroscopy." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3): 844-849.
- Clarke P. A., Barnes K. A., Startin J. R., Ibe F. I. et Shepherd M. J. (1996). "High performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry for the determination of carotenoids." *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10 (14): 1781-1785.
- Cougant M. (1999). "Evaluation sensorielle : Guide de bonnes pratiques". Actia.
- Craig S. A. S., Stark J. R., Dhar D. N. et Tiwari U. K. (1985). "Studies on starch from indian crocus." *Starch/Stärke*, 37 (7): 220-224.
- Cravero F., Keith K. S., Murray H. H. et Toth T. (2000). "A white bentonite from San juan province, Argentina-geology and potential industrial applications." *Appl. Clay Sci.*, 16: 31-43.

Cristea D. (2003). "Caractérisation physico-chimique de néo-pigments : Etude de la fixation de colorants végétaux sur des supports minéraux pour des applications dans l'industrie des peintures". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des agroressources. Toulouse.

De Vasconcelos E. C., Vilegas J. H. Y. et Lancas F. M. (2000). "Comparison of extraction and clean-up methods for the analysis of friedelan-3-ol and friedelin from leaves of *Maytenus aquifolium martius* ( Celastraceae)." *Phytochem. Anal.*, 11 (4): 247-250.

Debonneville C., Orsier B., Flament I. et Chaintreau A. (2002). "Improved hardware and software for quick gas chromatography-olfactometry using CHARM and GC-"SNIF" Analysis." *Anal. Chem.*, 74 (10): 2345-2351.

Dirinck P. et Van Opstaele F. (1998). "Volatile composition of southern European dry-cured hams." *Dev. Food Sci.*, 40: 233-243.

Duprat F., Gallant D., Guilbot A., Mercier C. et Robin J. P. (1980). "L'amidon". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 176-231.

Eddaouiri M., Belanger A. et Benjlali B. (1993). "La verveine : effet de séchage du matériel végétal sur le rendement en huile essentielle et sa composition chimique". *2èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Dignes-Les-Bains, Instituto Tetrahedron. 713-726.

Elmore J. S., Erbahadir M. A. et Mottram D. S. (1997). "Comparison of dynamic headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7): 2638-2641.

Frank D. C., Owen C. M. et Patterson J. (2004). "Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds." *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 37 (2): 139-154.

Fulller G. H., Steltenkamp R. et Tisserand G. A. (1964). "The gas chromatography with human sensor : perfumer model." *Annals. New York Academy*, 116: 711-724.

Galan E. (1996). "Properties and applications of palygorskite-speiolite clays." *Clays clay miner.*, 31 (4): 443-453.

Galan E., Mesa J. M. et Sanchez C. (1994). "Properties and applications of palygorskite clays from Ciudad Real, Central Spain." *Appl. Clay Sci.*, 9: 293-302.

Ganou L. (1993). "Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles". Institut National Polytechnique de Toulouse. Traitement des matières premières végétales. Toulouse.

Giles C. H. et McKay R. B. (1963). "The light fastness of dyes : a review." *Tex. Res. J.*, 33 (7): 528-577.

Glaser T., Lienau A., Zeeb D., Krucker M., Dachtler M. et Albert K. (2003). "Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling." *Chromatographia*, 57: 19-25.

Grosch W. (1993). "Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis." *Trends Food Sci. Technol.*, 4: 68-73.

Guentert M., Krammer G., Sommer H. et Werkhoff P. (1998). "The importance of the vacuum headspace method for the analysis of fruit flavors". *ACS Symposium Series*, Washington DC. 38-60.

Guentert M. et Werkhoff P. (1996). "La technique d'headspace sous vide dans la recherche des arômes." *H&R Contact*, 3: 3-16.

Harborne J. B. (1984). "Phytochemical Methods". Chapman & hall. New York.

ISO4120 (1983). "Sensory analysis-Methodology-Triangle test".

ISO5495 (1983). "Sensory analysis-Methodology-Paired comparison test".

ISO8588 (1987). "Sensory analysis-Methodology-A-Not A test".

ISO10399 (1991). "Sensory analysis-Methodology-Duo-trio test".

Jerkovic I. et Mastelic J. (2003). "Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae)." *Phytochem.*, 63 (1): 109-113.

Joseleau J. P. (1980). "Les hémicellulose". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 87-121.

Jose-Yacamán M. et Ascencio J. A. (2000). "Electron microscopy study of nanostructured and ancient materials". *Handbook of nanostructures materials and nanotechnology*. Nalwa H. S. Academic Press., 2. 385-428.

Kleber R. L., Masschelein-Kleiner L. et Thissen J. (1967). "Etude et identification du bleu maya." *Stud. Conserv.*, 12 (2): 41-56.

Lagarde J. (1983). "Initiation à l'analyse des données". Bordas. Paris.

Lee S.-J. (2003). "Finding key odorants in foods: gas chromatography olfactometry (GC/O)." *Food Science and Biotechnology*, 12 (5): 597-602.

Likens S. T. et Nickerson G. B. (1964). "Determination of certain hop oil constituents in brewing products." *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.*: 5-13.

Littmann E. R. (1980). "Maya Blue - a new perspective." *Am. Antiq.*, 45 (1): 87-100.

Littmann E. R. (1982). "Maya Blue - further perspectives and the possible use of indigo as the colorant." *Am. Antiq.*, 47 (2): 404-408.

MacDaniel M. R., Miranda-Lopez B. T., Watson B. T. et Libbey L. M. (1990). "Pinot noir aroma : a sensory/gas chromatographic approach." *Develop. Food Sci.*, 28: 23-36.

Macleod G. et Ames M. (1986). "Comparative assessment of the artefact background on thermal desorption of Tenax GC and Tenax TA." *Journal of Chromatography, A*, 355: 393-398.

Makoumbou U. (1988). "Raffinage des agroressources : la valorisation séquencée des sous-produits de conserverie de maïs-doux". Institut National Polytechnique de Toulouse. Traitement des matières premières végétales. Toulouse.

Maoka T. (2003). "Analysis of carotenoids by combined HPLC, UV-Vis absorption spectrometry and APCI mass spectrometry." *Lipid Technol.*, 15 (2): 39-42.

Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K. et Akimoto N. (2002). "Rapid identification of carotenoids in a combination of liquid chromatography / UV-visible absorption spectrometry by photodiode-array detector and

atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/PAD/APCI-MS)." *Journal of Oleo Science*, 51 (1): 1-10.

Marechal P. (2001). "Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur Bi-Vis : obtention d'agromatériaux". Institut national Polytechnique de Toulouse. Sciences des procédés. Toulouse.

Mariotti J. P., Tomi F., Bernardini A. F., Costa J. et Casanovan J. (1993). "Etudes d'huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* L, cultivé en Corse". *12èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Digne-Les-Bains. 615-620.

Marsili R. T. (2002). "SPME comparison studies and what they reveal". *Flavor, Fragrance and odor analyse*. Marsili R. New York USA, 115. 205-227.

Marsili R. T. et Miller N. (2000). "Determination of major aroma impact compounds in fermented cucumbers by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry detection." *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (7): 307-314.

Martens M. et Martens H. (1986). "Partial least squares regression". *Statistical Procedures in Food Research*. Piggott J. R. Elsevier Applied Science. London. 293-359.

Matich A. J., Rowan D. D. et Banks N. H. (1996). "Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles." *Anal. Chem.*, 68 (23): 4114-4118.

Monties B. (1980). "Les lignines". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 122-154.

Murray H. H. (2000). "Traditional and new application for kaolin, smectite, and palygorskite : a general overview." *Appl. Clay Sci.*, 17: 207-221.

Nickerson G. B. et Likens S. T. (1966). "Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer." *Journal of Chromatography, A*, 21: 1-5.

O'Mahony M. (1986). "Sensory evaluation of food : statistical methods and procedures". Dekker, M. New York.

Pawliszyn J. B., Ed. (1997). "Solid phase microextraction: theory and practice". USA, Wiley-VCH Inc.

Pawliszyn J. B., Ed. (1999). "Applications of solid phase microextraction". UK, The Royal Society of Chemistry.

Pfander H., Socaciu C. et Neamtu G. (1994). "High performance liquid chromatography in carotenoid research." *Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Chem.*, 39 (1-2): 70-77.

Piggott J. R. et Sharman K. (1986). "Statistical Procedures in Food Research". Piggott J. R. Elsevier Applied Science. London. 181-232.

Pollien P., Ott A., Montigon F., Baumgartner M., Munoz-Box R. et Chaintreau A. (1997). "Hyphenated headspace-GC-sniffing technique: the "SNIF" method." *Riv. Ital. EPPOS*: 126-135.

Raynal-Ioualalen R. (1996). "Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes.". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des Agroressources. Toulouse.

Rubio Moraga A., Fernandez J. A. et Gomez-Gomez L. (2003). "Biosynthesis of carotenoids in Saffron". *1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, Albacete, Spain, Acta Hort. 99-107.

- Scalia S., Giuffreda L. et Pallado P. (1999). "Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (3): 549-558.
- Serna C., Van Scoyoc G. E. et Ahlrichs J. L. (1977). "Hydroxyl groups and water in palygorskite." *American Mineralogist*, 62: 784-792.
- Siano F., Ghizzoni C., Gionfriddo F., Colombo E., Servillo L. et Castaldo D. (2003). "Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products." *Food Chem.*, 81 (3): 469-475.
- Sinyinda S. et Gramshaw J. W. (1998). "Volatiles of avocado fruit." *Food Chem.*, 62 (4): 483-487.
- Song J., Gardner B. D., Holland J. F. et Beaudry R. M. (1997). "Rapid analysis of volatile flavor compounds in apple fruit using SPME and GC/Time-of-Flight mass spectrometry." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (5): 1801-1807.
- Stashenko E. E., Jaramillo B. E. et Martinez J. R. (2004). "Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography." *Journal of Chromatography, A*, 1025 (1): 105-113.
- Steffen A. et Pawliszyn J. (1996). "Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction." *J. Agric. Food Chem.*, 44 (8): 2187-2193.
- Tarantilis P. A. et Polissiou M. G. (1997). "Isolation and identification of the aroma components from Saffron (*Crocus sativus*)." *J. Agric. Food Chem.*, 45: 459-462.
- Torres L. M. (1988). "Maya blue : low the mayas could have made the pigment." *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 123: 123-128.
- Vagi E., Simandi B., Suhajda A. et Hethelyi E. (2005). "Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide." *Food Research International*, 38 (1): 51-57.
- Vallet N., Piquenet E. et Michaud A. (2002). "Analysis of 12 nature yoghurts by GC-O: the data statistical tests". *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century, Proceedings of the 10th Weurman Flavor Research Symposium*, Beaune, France. 737-740.
- Van Breemen R. B., Huang C.-R., Tan Y., Sander L. C. et Schilling A. B. (1996). "Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization." *J. Mass Spectrom.*, 31 (9): 975-981.
- Van Olphen H. (1966). "Maya blue : a clay-organic pigment." *Science*, 154: 645-646.
- Van Ruth S. M. (2001). "Methods for gas chromatography-olfactometry: a review." *Biomolecular engineering*, 17 (4,5): 121-128.
- Van Ruth S. M. et Roozen J. P. (2004). "Gas chromatography-olfactometry analysis and its importance in food quality control: influence of assessors' training and sampling methods on gas chromatography-olfactometry data." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 542: 155-165.
- Van Ruth S. M., Roozen J. P. et Posthumus M. A. (1995). "Gas chromatography/sniffing port analysis evaluated for aroma release from rehydrated French beans (*Phaseolus vulgaris*)." *J. Sci. Food Agric.*, 69: 393-401.
- Van Soest P. J. (1963). "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin." *Journal of the A.O.A.C.*, 46 (5): 829-835.

Van Soest P. J. et Wine R. H. (1967). "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents." *Journal of the A.O.A.C.*, 50 (1): 50-55.

Van Soest P. J. et Wine R. H. (1968). "Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate." *Journal of the A.O.A.C.*, 51 (4): 780-785.

Vilegas J. H. Y., De Marchi E. et Lancas F. M. (1997). "Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ("guaco") leaves." *Phytochem. Anal.*, 8 (5): 266-270.

Yang X. et Peppard T. (1994). "Solid-phase microextraction for flavor analysis." *J. Agric. Food Chem.*, 42 (9): 1925-1930.

Young A. et Britton G. (1993). "Carotenoids in Photosynthesis". Ed. Young A. et Britton G. Chapman & Hall. London.

Zhang Z. et Pawliszyn J. (1993). "Headspace solid-phase microextraction." *Anal. Chem.*, 65 (14): 1843-1852.

Zuhang H. et Barth M. (2002). "Fatty acid oxidation in plant tissues". *Food lipids : chemistry, nutrition and biotechnology*. Akoh C. C. et Min D. B. Dekker M. AG, Basel. New York. 413-463.



**Annexe II : Matrices de données**

(analytiques - composés volatils, taux d'humidité et de crocine - olfactives et sensorielles sur les huit échantillons du Quercy)

**Tableau 1. Taux d'humidité (Hr) et de crocine (C) pour les huit échantillons du Quercy.**

<b>Ech.</b>	<b>Hr (%)</b>	<b>C (E<sup>1%</sup><sub>1cm</sub>)</b>
<b>24A</b>	6,4	271
<b>21A</b>	6,5	274
<b>23B</b>	6,5	236
<b>22A</b>	8,6	257
<b>25A</b>	8,9	255
<b>26B</b>	13,6	222
<b>24B</b>	18	129
<b>28B</b>	19,1	85

**Tableau 2. Composés volatils (Vn) extraits par SPME et analysés par CPG-SM (%) des 8 échantillons du Quercy les plus représentatifs.**

<b>Ech.</b>	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V12	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22
<b>24A</b>	0,34	0,74	7,32	0,00	0,00	0,00	2,88	0,00	0,00	4,35	0,63	0,21	0,00	0,26	0,18	0,22	1,74	0,00	4,76
<b>21A</b>	1,20	1,12	7,85	0,97	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,39	0,21	0,28	0,00	0,29	0,00	0,16	1,90	0,00	1,48
<b>23B</b>	1,01	0,83	16,08	0,34	0,46	0,75	0,64	0,00	0,24	0,94	0,48	0,28	0,00	0,15	0,21	0,33	1,39	0,06	5,60
<b>22A</b>	0,13	0,28	7,68	0,21	0,36	0,21	0,76	0,09	0,00	1,93	0,09	0,17	0,00	0,15	0,00	0,23	1,03	0,03	2,62
<b>25A</b>	0,00	0,25	8,46	0,00	0,18	0,15	0,30	0,15	0,00	1,50	0,08	0,16	0,00	0,13	0,05	0,08	1,00	0,00	2,46
<b>26B</b>	0,12	0,27	6,42	0,10	0,32	0,24	0,61	0,00	0,00	2,52	0,00	0,04	0,05	0,06	0,04	0,05	0,67	0,05	3,04
<b>24B</b>	0,17	0,17	7,84	0,00	0,34	0,23	1,60	0,06	0,00	1,18	0,02	0,15	0,09	0,05	0,09	0,03	0,65	0,04	2,21
<b>28B</b>	0,09	0,17	7,31	0,06	0,20	0,20	0,93	0,00	0,00	0,64	0,00	0,24	0,06	0,08	0,07	0,03	0,64	0,17	2,37

**(Suite du Tableau 2)**

	V23	V24	V25	V26	V27	V28	V29	V32	V37	V39
<b>24A</b>	2,65	0,15	0,00	3,78	0,00	0,21	69,32	0,00	0,25	0,00
<b>21A</b>	0,96	0,00	0,00	0,85	0,00	0,24	81,43	0,00	0,14	0,00
<b>23B</b>	3,38	0,19	0,00	3,51	0,00	0,25	61,81	0,15	0,52	0,14
<b>22A</b>	0,96	0,08	0,00	1,62	0,00	0,25	80,47	0,09	0,17	0,40
<b>25A</b>	1,56	0,09	0,00	1,92	0,00	0,25	80,88	0,13	0,19	0,00
<b>26B</b>	0,86	0,06	0,00	1,27	0,00	0,17	80,95	0,13	0,45	1,50
<b>24B</b>	0,67	0,08	0,00	1,02	0,10	0,14	78,21	0,11	0,76	3,80
<b>28B</b>	0,76	0,08	0,07	0,95	0,09	0,17	80,76	0,07	0,52	3,43

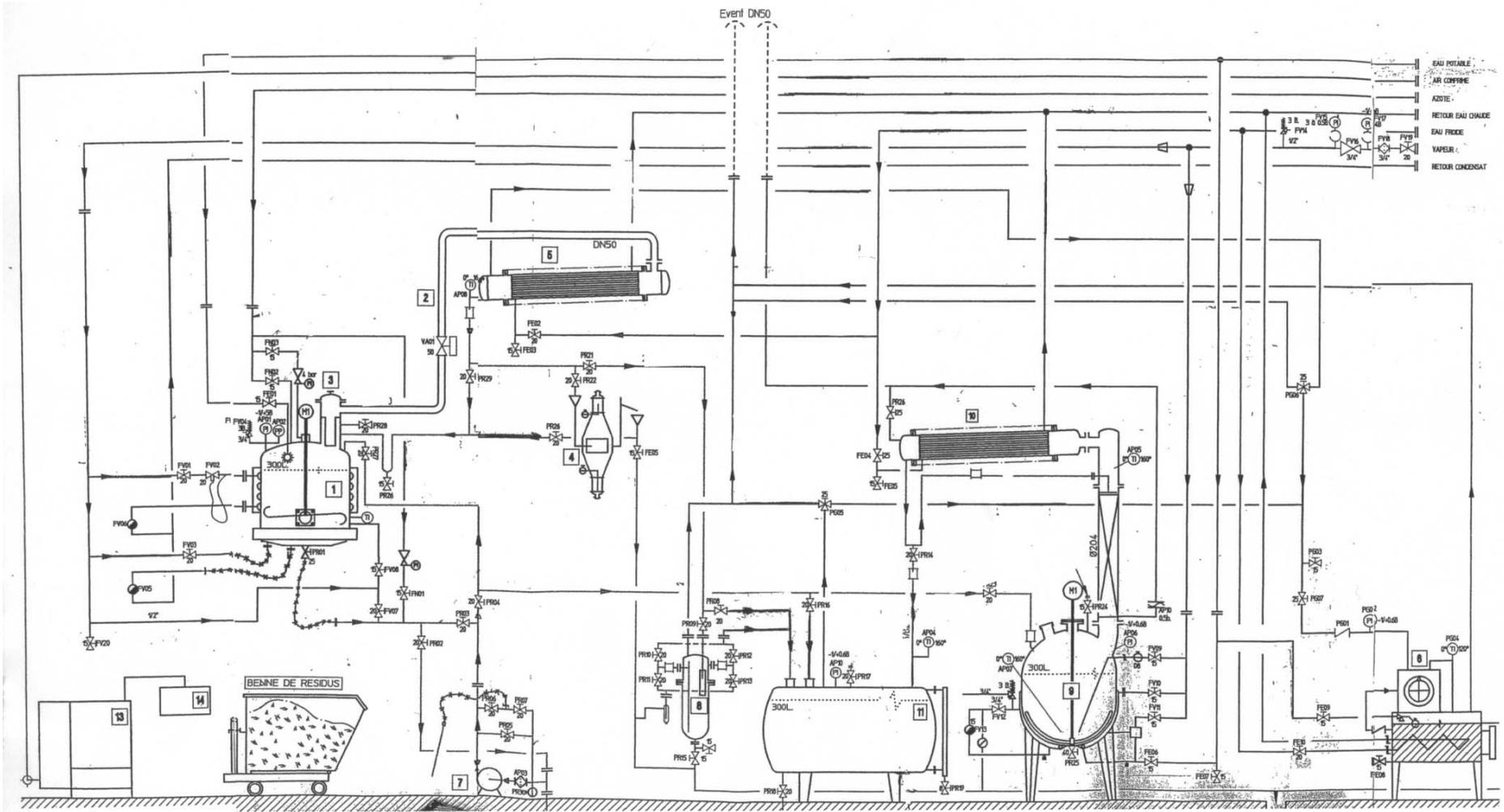
**Tableau 3. Noms des variables (Vn), composés volatils extraits par SPME et analysés par CPG-SM dans les échantillons du Quercy et dans les safrans étrangers (Espagne, Grèce, Iran, Maroc).**

V1 éthanol [64-17-5]	V21 2-phényléthanol [60-12-8]
V2 acétone [67-64-1]	2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohex-1-ène [18378-66-0]
V3 buta-2,3-dione [431-03-8] et acide acétique [64-19-7]	V22 α-isophorone [78-59-1]
V4 2-méthylpent-1-ène [763-29-1]	V23 cétoisophorone [1125-21-9]
V5 1-hydroxypropan-2-one [116-09-6]	V24 lanionone [28750-52-9]
V6 acide propanoïque [79-09-4]	V25 6-hydroxy-2,4,4-triméthylcyclohex-2-ène-1-one [4883-60-7]
V7 3-hydroxybutan-2-one [513-86-0]	V26 dihydroisophorone [20547-99-3]
V8 774	V27 1175
V9 hexanal [66-25-1]	V28 éthylbenzaldéhyde [53951-50-1]
V10 acide 3-méthylbutanoïque [53-74-2]	V29 safranal [116-26-7]
V11 acide 2-méthylbutanoïque [116-53-0]	verbénone [80-57-9]
V12 dihydro-2(3H)furanone [96-48-0] et 2(5H)furanone [497-23-4]	V30 eucarvone [1125-21-9]
V13 limonène [7705-14-8]	V31 2-hydroxy-3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione [503-93-5]
V14 β-isophorone [471-01-2]	2,6,6-triméthyl-3-oxo-1,4-cyclohexadiène-1-carboxaldéhyde [133399-09-6]
V15 2,2-diméthylcyclohexanal [13155-56-1]	V32 acide β-safranique [4430-99-3]
V16 1078	V33 1318
V17 1-(3,4-diméthylphényl)-éthanone [3637-01-2]	V34 1321
V18 linalool [78-70-6]	V35 1355
V19 nonanal [124-19-6]	V36 2,6,6-triméthyl-5-oxo-cyclohexa-1,3-diène [141891-13-6]
V20 2-méthylène-5,5-diméthylcyclohex-3-ène [33399-00-9]	V37 5-hydroxy-2,6,6-triméthyl-3-oxocyclohexa-1,4-diène [87-44-5]
	V38 caryophyllène [87-44-5]
	V39 4-hydroxy-2,6,6-triméthylcyclohex-1-ène (HTCC) [35692-94-5]

**Tableau 4. Pics odorants (Pn) des extraits headspace par SPME des huit échantillons du Quercy, déterminés par CPG-O (Intensité sur 100).**

Ech.	P1 Floral Epicé	P2 Grasse Piquant Acre	P3 Animal	P4 Fruité Grillé	P5 Grillé Epicé	P6 Agrume Fraiche Fruité	P7 Floral Foin	P8 Foin	P9 Foin	P10 Epicé	P11 Floral Grillé	P12 Foin Floral	P13 Douce Indéterminé	P14 Foin
23B	30	70	0	0	0	0	60	50	90	100	0	30	30	70
24B	0	90	70	50	0	50	70	30	80	100	0	60	0	30
26B	0	80	70	0	0	0	80	40	70	100	30	60	0	0
28B	0	90	80	0	50	50	90	50	90	100	0	70	0	60
21A	0	0	0	0	0	0	60	0	80	100	0	0	0	30
22A	0	50	0	0	0	0	40	40	100	90	0	50	30	30
24A	0	70	0	0	0	40	60	50	80	90	0	0	0	30
25A	0	40	0	0	0	30	60	50	90	100	0	80	0	40

**Annexe III : Schéma du procédé d'extraction à l'échelle pilote**



TSA, K9955, Tournaire SA, Grasse, France



## **Annexe IV : Références bibliographiques**

- Abdullaev F. I. (2001). "Saffron (*Crocus sativus* L.) and its possible role in the prevention of cancer." *Phytochemistry and Pharmacology II*, 8: 70-82.
- Abdullaev F. I. et Frenkel G. D. (1992a). "Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis." *BioFactors (Oxf.)*, 3 (3): 201-204.
- Abdullaev F. I. et Frenkel G. D. (1992b). "The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells." *BioFactors (Oxf.)*, 4 (1): 43-45.
- Abe K. et Saito H. (2000). "Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation." *Phytother. Res.*, 14: 149-152.
- Acree T. E. et Barnard J. (1994). "Gas chromatography-olfactometry using CharmAnalysis". *In trends in flavour research. Proceeding of the 7th Weurman Flavour Research Symposium*, Amsterdam, Elsevier. 211-220.
- Adams R. (2001). "Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy". Ed. Adams R. Allured Publishing Corporation. Illinois.
- Akho C. et Min D. (2002). "Food lipids". Dekker, M. New York.
- Algrech C. (2001). "Le safran du Quercy." *Revue Quercy recherche*, 97 et 98 (1-2-4): 20-27;9-16;18-26.
- Alonso G. L. et Salinas M. R. (1998). "Crocin as colouring in the food industry." *Recent Res. Devel. In Agricultural & Food Chem.*, 2 (1): 141-154.
- Alonso G. L., Salinas M. R., Esteban-Infantes F. J. et Sanchez-Fernandez M. A. (1996). "Determination of safranin from Saffron (*Crocus sativus* L.) by thermal desorption-gas chromatography." *J. Agric. Food Chem.*, 44: 185-188.
- Alonso G. L., Salinas M. R. et Garijo J. (1998). "Method to determine the authenticity of aroma of Saffron." *J. Food Protection*, 61 (11): 1525-1528.
- Alonso G. L., Salinas M. R., Garijo J. et Sanchez-Fernandez M. A. (2001). "Composition of crocins and picrocrocin from spanish saffron (*Crocus sativus* L.)." *J. Food Qual.*, 24: 219-233.
- Alonso G. L., Sanchez-Fernandez M. A., Saez J. R., Zalacain A. et Salinas M. R. (2003). "Evaluation of the color of spanish saffron using tristimulus colorimetry." *Ital. J. Food Sci.*, 15 (2): 249-258.
- Alonso G. L., Varon R., Gomez R., Navarro F. et Salinas M. R. (1990). "Auto-oxidation in saffron at 40°C and 75% Relative Humidity." *J. Food Sci.*, 55 (2): 595-596.
- Alonso G. L., Varon R., Salinas M. R. et Navarro F. (1993). "Auto-oxidation of crocin and picrocrocin in saffron under different storage conditions." *Boll. Chim. Farmaceutico*, 132 (4): 116-120.
- Arctander S. (1994a). "Perfume and Flavor chemicals". Ed. Stream C. Allured Publishing Corporation. USA.
- Arctander S. (1994b). "Perfume and Flavor Materials of Natural Origin". Ed. Stream C. Allured Publishing Corporation. USA.
- Barkeshli M. et Ataie G. H. (2002). "pH stability of saffron used in verdigris as an inhibitor in Persian miniature paintings." *Restaurator*, 23 (3): 154-164.

- Barnoud F. (1980). "La cellulose". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 66-86.
- Barrer R. M. et Mackenzie N. (1952). "Sorption by attapulgite. Part I. Availability of intracrystalline channels." *J. Phys. Chem.*, 58: 560-568.
- Barthélémy J., Clément J. F., Danzart M., Issanchou S., Köster E. P., Mac Leod P., Nicod H., Sauvageot F., Sztrygler F. et Touraille C. (1998). "Evaluation sensorielle. Manuel méthodologique". Ed.ACTIA. Technique et Documentation - Lavoisier. Paris.
- Basker D. (1999). "Saffron chemistry." *Medicinal and Aromatic Plants : Industrial Profiles*, 8: 45-52.
- Bate-Smith E. C. (1968). "Phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. II. Monocotyledons." *J. Linn. Soc. Lond., Bot.*, 60 (383): 325-356.
- Berset C., Giampaoli P. et Richard H. (1997). "Histoire de safran : arômes et pigments du safran". *Colloque de Beaune de Rolande*, France, ENSIA laboratoire de chimie des substances naturelles. 89-98.
- Bigois M., Casabianca H., Graff J. B., Philit B., Jame P. et Perrucchiotti C. (1994). "Authentification d'arômes naturels par chromatographie chirale et mesures de rapports isotopiques." *Spectra anal.*, 23 (181): 19-22.
- Boehringer (1997). "Enzymatic bioanalysis". *Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis using test-combinations*. Boehringer Mannheim GmbH Biochemicals. Mannheim, Germany. 159.
- Borel P. (2004). "<http://www.ceiv.org/presse/presse/pdf/ResumePBorel.pdf>".
- Bovjin L., Pirotte J. et Berger A. (1958). *Gas chromatography (Amsterdam Symposium)*, London, UK. 310-320.
- Boyd-Boland A. A., Chai M., Luo Y. Z., Zhang Z., Yang M. J., Pawliszyn J. B. et Gorecki T. (1994). "New solvent-free sample preparation techniques based on fiber and polymer technologies." *Environ. Sci. Technol.*, 28 (13): 569A-574A.
- Bradley W. F. (1945). "Molecular associations between montmorillonite and some polyfunctional organic liquids." *J. Am. Chem. Soc.*, 67: 975-981.
- Bradstreet R. B. (1965). "The Kjeldahl method for organic nitrogen". Academic Press. New York.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (1995). "Carotenoids. Isolation and Analysis". Birkhauser Verlag. Boston.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. (2004). "Handbook : Carotenoids". Ed.Britton G., Liaaen-Jensen S. et Pfander H. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Brusatin M. (1986). "Histoire des couleurs". Champs Flammarion.
- Buchecker R. et Eugster C. H. (1973). "Absolute configuration of picrocrocin." *Hel. Chim. Acta*, 56 (3): 1121-1124.
- Burdick et Jackson (1982). "High Purity Solvent Guide". Burdick and Jackson Laboratories. Muskegon, Michigan USA.
- Cadwallader K. R. (2002). "Flavor chemistry of saffron". *Carotenoid-derived aroma compounds*. Winterhalter P. et Rouseff R. L. ACS Symposium Series. San Francisco, 802. 220-239.

- Cadwallader K. R., Baek H. H. et Cai M. (1997). "Characterization of saffron flavor by aroma extract dilution analysis". *Spices : Flavor Chemistry and antioxydant Properties*. Risch S. J. et Ho C. T. ACS Symposium Series. Washington, 660. 66-79.
- Caillere S., Henin S. et Rautureau M. (1982). "Minéralogie des argiles. II. Classification et nomenclature". Masson. Paris.
- Caillere S., Henin S. et Rautureau M. (1989). "Les argiles". Septima. Paris.
- Cao E., Bryant R. et Williams D. J. A. (1996). "Electrochemical properties of Na-attapulgite." *J. colloid Interface Sci.*, 179: 143-150.
- Cardon D. (2003). "Le monde des teintures naturelles". Belin. Paris.
- Castellar M. R., Montijano H., Manjon A. et Iborra J. L. (1993). "Preparative high-performance liquid chromatographic purification of saffron secondary metabolites." *J. Chromatogr.*, 648 (1): 187-190.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1985). "Correlative changes in carbohydrate content and starch hydrolyzing enzymes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 180 (1): 55-61.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1988). "Correlative changes in nitrogen fractions, proteins, protease activity and nucleic acids in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Acta Physiol. Plant.*, 10 (3): 247-255.
- Chrungoo N. K. et Farooq S. (1993). "Partial purification and physico-chemical properties of starch phosphorylase from corms of saffron crocus (*Crocus sativus*)." *Plant Physiol. Biochem.*, 20 (1): 19-23.
- Chrungoo N. K., Koul K. K. et Farooq S. (1986). "Phenolic compounds in Corms of saffron Crocus (*Crocus sativus* L.) during bud development." *Plant Physiol. Biochem.*, 13 (2): 78-81.
- Clark T. J. et Bunch J. E. (1997). "Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-mass spectroscopy." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3): 844-849.
- Clarke P. A., Barnes K. A., Startin J. R., Ibe F. I. et Shepherd M. J. (1996). "High performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry for the determination of carotenoids." *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10 (14): 1781-1785.
- Corti P., Mazzei E., Ferri S., Franchi G. G. et Dreassi E. (1996). "High-performance thin-layer chromatographic quantitative analysis of picrocrocine and crocetin, active principles of saffron (*Crocus sativus* L.-Iridaceae): a new method." *Phytochem. Anal.*, 7 (4): 201-203.
- Côté F., Cormier F., Dufresne C. et Willemot C. (2000). "Properties of a glucosyltransferase involved in crocin synthesis." *Plant Sci.*, 153 (1): 55-63.
- Cougant M. (1999). "Evaluation sensorielle : Guide de bonnes pratiques". Actia.
- Craig S. A. S., Stark J. R., Dhar D. N. et Tiwari U. K. (1985). "Studies on starch from indian crocus." *Starch/Stärke*, 37 (7): 220-224.
- Cravero F., Keith K. S., Murray H. H. et Toth T. (2000). "A white bentonite from San Juan province, Argentina-geology and potential industrial applications." *Appl. Clay Sci.*, 16: 31-43.

Cristea D. (2003). "Caractérisation physico-chimique de néo-pigments : Etude de la fixation de colorants végétaux sur des supports minéraux pour des applications dans l'industrie des peintures". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des agroressources. Toulouse.

Crouzet J. et Kanasawud P. (1992). "Formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids." *Methods Enzymol.*, 213 (A): 54-62.

Cseke L., Dudareva N. et Pichezsky E. (1998). "Structure and evolution of linalool synthase." *Mol. Biol. Evol.*, 15 (11): 1491-1498.

D'Auria M., Mauriello G. et Rana G. L. (2004). "Volatile organic compounds from saffron." *Flavour Fragr. J.*, 19 (1): 17-23.

De Buyck L., Yao Z. P., Verhe R., De Kimpe N. et Schamp N. (1985). "Improved synthesis of 2-hydroxy-4,4,6-trimethyl-2,5-cyclohexadienone, useful as a flavoring additive." *Bulletin des sociétés chimiques belges*, 94 (1): 75-80.

De Vasconcelos E. C., Vilegas J. H. Y. et Lancas F. M. (2000). "Comparison of extraction and clean-up methods for the analysis of friedelan-3-ol and friedelin from leaves of *Maytenus aquifolium martius* (celastraceae)." *Phytochem. Anal.*, 11 (4): 247-250.

Debonneville C., Orsier B., Flament I. et Chaintreau A. (2002). "Improved hardware and software for quick gas chromatography-olfactometry using CHARM and GC-"SNIF" Analysis." *Anal. Chem.*, 74 (10): 2345-2351.

Devos M. (1990). "Standardized Human Olfactory Thresholds". Ed.Devos M., Patte F., Rouault J., Laffort P. et Van Gemert L. J. Oxford University Press. New York.

Dhingra V. K., Seshadri T. R. et Mukerjee S. K. (1975). "Minor carotenoid glycosides from Saffron (*Crocus sativus*)." *Indian J. Chem.*, 13 (4): 339-341.

Dirinck P. et Van Opstaele F. (1998). "Volatile composition of southern European dry-cured hams." *Dev. Food Sci.*, 40: 233-243.

Douglas M. (1993). "Saffron-*Crocus sativus*", Crop and Food Research.

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. et Smith F. (1956). "Colorimetric method for the determination of sugars and related substances." *Anal. Chem.*, 28: 350-356.

Dupont J. (2001). "Dimensions culturelles et culturelles du safran en France." *Empan*, 41: 34-38.

Duprat F., Gallant D., Guilbot A., Mercier C. et Robin J. P. (1980). "L'amidon". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 176-231.

Ebrahimzadeh H. et Radjabian T. (1998). "Comparative analysis of pigments in petals and stigmata of *Crocus almehensis* C. Brickell and B. Mathew and *Crocus sativus* L." *J. Sci. Islam. Repub. Iran*, 9 (2): 127-135.

Eddaouiri M., Belanger A. et Benjilali B. (1993). "La verveine : effet de séchage du matériel végétal sur le rendement en huile essentielle et sa composition chimique". *2èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Dignes-Les-Bains, Instituto Tetrahedron. 713-726.

Elmore J. S., Erbahadir M. A. et Mottram D. S. (1997). "Comparison of dynamic headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7): 2638-2641.

- Escribano J., Alonso G. L., Coca-Prados M. et Fernandez J. A. (1996). "Crocine, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro." *Cancer Lett.*, 100: 23-30.
- Escribano J., Diaz Guerra M. J. M., Riese H. H., Alvarez A., Proenza R. et Fernandez J. A. (2000a). "The cytolytic effect of a glycoconjugate extracted from corms of saffron plant (*Crocus sativus*) on human cell lines in culture." *Planta Med.*, 66 (2): 157-162.
- Escribano J., Diaz-Guerra M. J. M., Riese H. H., Ontano J., Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D. C., Rubio A. et Fernandez J. A. (1999a). "In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L." *Cancer Lett.*, 144 (1): 107-114.
- Escribano J., Piqueras A., Medina J., Rubio A., Alvarez-Orti M. et Fernandez J. A. (1999b). "Production of a cytotoxic proteoglycan using callus culture of saffron corms (*Crocus sativus* L.)." *J. Biotechnol.*, 73 (1): 53-59.
- Escribano J., Rios A. et Fernandez J. A. (1999c). "Isolation and cytotoxic properties of a novel glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.)." *Biochim. Biophys. Acta*, 1426: 217-222.
- Escribano J., Rubio A., Alvarez-Orti M., Molina A. et Fernandez J. A. (2000b). "Purification and characterization of a mannan-binding lectin specifically expressed in corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.)." *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2): 457-463.
- Farooq S. et Kaul K. K. (1983). "Changes in gibberellin-like activity in corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting." *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 178 (8): 685-9.
- Fernandez J. A., Escribano J., Piqueras A. et Medina J. (2000). "A glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and affects in vitro cell viability." *J. Exp. Bot.*, 51 (345): 731-737.
- Frank D. C., Owen C. M. et Patterson J. (2004). "Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds." *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 37 (2): 139-154.
- Fuller G. H., Steltenkamp R. et Tisserand G. A. (1964). "The gas chromatography with human sensor : perfumer model." *Annals. New York Academy*, 116: 711-724.
- Galan E. (1996). "Properties and applications of palygorskite-speiolite clays." *Clays clay miner.*, 31 (4): 443-453.
- Galan E., Mesa J. M. et Sanchez C. (1994). "Properties and applications of palygorskite clays from Ciudad Real, Central Spain." *Appl. Clay Sci.*, 9: 293-302.
- Ganou L. (1993). "Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles". Institut National Polytechnique de Toulouse. Traitement des matières premières végétales. Toulouse.
- Garnero F., Joulain D. et Buil P. (1978). "De l'influence du stockage des rhizomes d'Iris sur la composition de l'huile essentielle ou beurre d'iris et quelques constituants inédits." *Riv. Ital. EPPOS*, 60: 568-590.
- Garrido J. L., Diez de Bethencourt C. et Revilla E. (1987). "Flavonoid composition of hydrolyzed tepal extracts of *Crocus sativus* L." *An. Bromatol.*, 39 (1): 69-80.
- Giampaoli P., Petrov M., Thiercelin J. M. et Richard H. (1993). "Etude de la fraction aromatique de safrans de diverses origines". 11<sup>èmes</sup> journées internationales des huiles essentielles, Digne. 615-621.
- Giles C. H. et McKay R. B. (1963). "The light fastness of dyes : a review." *Tex. Res. J.*, 33 (7): 528-577.

- Glaser T., Lienau A., Zeeb D., Krucker M., Dachtler M. et Albert K. (2003). "Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling." *Chromatographia*, 57: 19-25.
- Greaves J. (2002). "Colorants for cereal and snack foods." *Cereal Foods World*, 47 (8): 374, 376-377.
- Gregory M. J., Menary R. C. et Davies N. W. (2005). "Effect of drying temperature and air flow on the production and retention of secondary metabolites in saffron." *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5969-5975.
- Grosch W. (1993). "Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis." *Trends Food Sci. Technol.*, 4: 68-73.
- Guentert M., Krammer G., Sommer H. et Werkhoff P. (1998). "The importance of the vacuum headspace method for the analysis of fruit flavors". *ACS Symposium Series*, Washington DC. 38-60.
- Guentert M. et Werkhoff P. (1996). "La technique d'headspace sous vide dans la recherche des arômes." *H&R Contact*, 3: 3-16.
- Harborne J. B. (1984). "Phytochemical Methods". Chapman & hall. New York.
- Heywood Vernon H. (1996). "Les plantes à fleurs". Nathan.
- Himeno H. et Sano K. (1987). "Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated in vitro." *Agric. Biol. Chem.*, 51 (9): 2395-400.
- Hirose Y., Hayashi S., Eto S., Kawagishi E., Hori T., Nomura Y. et Matsuoka C. (1962). "The utilization of plant products. II. Crocus 1." *Kumamoto Pharm. Bull.*, 5: 7-15.
- Holopainen J. K. (2004). "Multiple functions of inducible plant volatiles." *Trends in Plant Biology*, 9 (11): 529-533.
- Hosseinzadeh H. et Younesi Hani M. (2002). "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice." *BMC pharmacology*, 2 (1): 7.
- Iborra J. L., Castellar M. R., Canovas M. et Manjon A. (1992). "TLC preparative purification of picrocrocin, HTCC and crocin from saffron." *J. Food Sci.*, 57 (3): 714-716.
- ISO4120 (1983). "Sensory analysis-Methodology-Triangle test".
- ISO5495 (1983). "Sensory analysis-Methodology-Paired comparison test".
- ISO8588 (1987). "Sensory analysis-Methodology-A-Not A test".
- ISO10399 (1991). "Sensory analysis-Methodology-Duo-trio test".
- ISO/TS (2003). "Safran (*Crocus sativus* L.)- Partie 1 : spécifications, Partie 2 : Méthodes d'essai." *Norme Européenne ISO/TS 3632-1 3632-2*.
- Janssens A. et Roozen J. P. (1991). "SNIF software". Laboratory of Food Chemistry.
- Jaubert J. N., Gordon G. et Dore J. C. (1987a). "Une organisation du champ des odeurs, 2ème partie : modèle descriptif de l'organisation de l'espace odorant." *Parfums, cosmét. arômes*, 78: 71-82.

Jaubert J. N., Gordon G. et Dore J. C. (1987b). "Une organisation du champs des odeurs." *Parfums, cosmét., arômes*, 77: 53-56.

Jerkovic I. et Mastelic J. (2003). "Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae)." *Phytochem.*, 63 (1): 109-113.

Joseleau J. P. (1980). "Les hémicellulose". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 87-121.

Jose-Yacamán M. et Ascencio J. A. (2000). "Electron microscopy study of nanostructured and ancient materials". *Handbook of nanostructures materials and nanotechnology*. Nalwa H. S. Academic Press., 2. 385-428.

Kanakis C. D., Daferera D. J., Tarantilis P. A. et Polissiou M. G. (2004). "Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron." *J. Agric. Food Chem.*, 52 (14): 4515-4521.

Kanasawud P. et Crouzet J. (1990a). "Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1  $\beta$ -carotene." *J. Agric. Food Chem.*, 38: 237-243.

Kanasawud P. et Crouzet J. (1990b). "Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 2 lycopene." *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1238-1242.

Kleber R. L., Masschelein-Kleiner L. et Thissen J. (1967). "Etude et identification du bleu maya." *Stud. Conserv.*, 12 (2): 41-56.

Knapp H., Straubinger M., Stingl C. et Winterhalter P. (2002). "Analysis of norisoprenoid aroma precursors." *ACS Symposium Series*, 802 (Carotenoid-Derived Aroma Compounds): 20-35.

Knapp H., Straubinger M., Witte A. et Winterhalter P. (1999). "Aroma formation in saffron". *Frontiers of Flavour Science, 9th, proceedings of the Weurman Flavour Research Symposium*, Freising, Germany. 440-444.

Kondjoyan N. et Berdague J.-L. (1996). "A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds". Edition du Laboratoire Flaveur.

Kubo I. et Kinst-Hori I. (1999). "Flavonols from Saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism." *J. Agric. Food Chem.*, 47 (10): 4121-4125.

Kuhn R. (1994). "Über das flavonol-glykosid aus crocus-pollen." *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft abteilung B : abhandlungen*, 77: 196-203.

Lagarde J. (1983). "Initiation à l'analyse des données". Bordas. Paris.

Lee S.-J. (2003). "Finding key odorants in foods: gas chromatography olfactometry (GC/O)." *Food Science and Biotechnology*, 12 (5): 597-602.

Lenoir J. (1997a). "Le nez des champignons". Edition Jean Lenoir.

Lenoir J. (1997b). "Le nez des épices". Edition Jean Lenoir.

Lenoir J. (1997c). "Le nez du café". Edition Jean Lenoir.

Li C.-Y., Lee E. J. et Wu T.-S. (2004). "Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*." *J. Nat. Products*, 67 (3): 437-440.

- Li N., Lin G., Kwan Y.-W. et Min Z.-D. (1999). "Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A*, 849 (2): 349-355.
- Liakopoulou-Kyriakides M. et Kyriakidis D. A. (2002). "Crocus sativus-biologically active constituents." *Studies in Natural Products Chemistry*, 26 (Bioactive Natural Products, (Part G)): 293-312.
- Likens S. T. et Nickerson G. B. (1964). "Determination of certain hop oil constituents in brewing products." *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.*: 5-13.
- Littmann E. R. (1980). "Maya Blue - a new perspective." *Am. Antiq.*, 45 (1): 87-100.
- Littmann E. R. (1982). "Maya Blue - further perspectives and the possible use of indigo as the colorant." *Am. Antiq.*, 47 (2): 404-408.
- Loukis A., Al-Kofahi A. et Philianos S. (1983). "Etude des constituants des bulbes de *Crocus sativus* L." *Plant. méd. phytothér.*, 17 (2): 89-91.
- Lozano P., Castellar M. R., Simancas M. J. et Iborra J. L. (1999). "A quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products." *Journal of Chromatography A*, 830 (2): 477-483.
- Lozano P., Delgado D., Omez D., Rubio M. et Iborra J. L. (2000). "A non-destructive method to determine the safranal content of saffron (*Crocus sativus* L.) by supercritical carbon dioxide extraction combined with high-performance liquid chromatography and gas chromatography." *J. Biochem. Biophys. Methods*, 43 (1-3): 367-378.
- MacDaniel M. R., Miranda-Lopez B. T., Watson B. T. et Libbey L. M. (1990). "Pinot noir aroma : a sensory/gas chromatographic approach." *Develop. Food Sci.*, 28: 23-36.
- MacFie H. J., Bratchell N., Greenhoff L. V. et Vallis L. V. (1989). "Designs to balance the effect of order presentation and first-order carry-over effects in hall tests." *J. sens. stud.*, 4: 129-48.
- Macleod G. et Ames M. (1986). "Comparative assessment of the artefact background on thermal desorption of Tenax GC and Tenax TA." *Journal of Chromatography, A*, 355: 393-398.
- Makoumbou U. (1988). "Raffinage des agroressources : la valorisation séquencée des sous-produits de conserverie de maïs-doux". Institut National Polytechnique de Toulouse. Traitement des matières premières végétales. Toulouse.
- Maoka T. (2003). "Analysis of carotenoids by combined HPLC, UV-Vis absorption spectrometry and APCI mass spectrometry." *Lipid Technol.*, 15 (2): 39-42.
- Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K. et Akimoto N. (2002). "Rapid identification of carotenoids in a combination of liquid chromatography / UV-visible absorption spectrometry by photodiode-array detector and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/PAD/APCI-MS)." *Journal of Oleo Science*, 51 (1): 1-10.
- Marechal P. (2001). "Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur Bi-Vis : obtention d'agromatériaux". Institut national Polytechnique de Toulouse. Sciences des procédés. Toulouse.
- Marini D. et Balestrieri F. (1992). "Analytical evaluation of powdered saffron application of multivariate analysis." *Ind. Aliment.*, 31 (301): 123-130.

- Mariotti J. P., Tomi F., Bernardini A. F., Costa J. et Casanovan J. (1993). "Etudes d'huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* L, cultivé en Corse". *12èmes journées Internationales des Huiles Essentielles*, Digne-Les-Bains. 615-620.
- Marsili R. T. (2002). "SPME comparison studies and what they reveal". *Flavor, Fragrance and odor analyse*. Marsili R. New York USA, 115. 205-227.
- Marsili R. T. et Miller N. (2000). "Determination of major aroma impact compounds in fermented cucumbers by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry detection." *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (7): 307-314.
- Martens M. et Martens H. (1986). "Partial least squares regression". *Statistical Procedures in Food Research*. Piggott J. R. Elsevier Applied Science. London. 293-359.
- Martinez J., Pioggia G., Rodriguez-Mendez M. L. et De Saja J. A. (2002). "A dedicated Saffron (*Crocus sativus* L.) odour quality measurement system". *The 9<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Electronic Nose*, Rome, Technical Digest. 210-211.
- Matich A. J., Rowan D. D. et Banks N. H. (1996). "Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles." *Anal. Chem.*, 68 (23): 4114-4118.
- Mehta B. M., Borkhatriya V. N. et Boghra V. R. (2002). "Saffron : the colouring and flavouring agent in dairy and food industry." *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 24 (4): 1038-1049.
- Monties B. (1980). "Les lignines". *Les polymères végétaux*. Monties B. BORDAS. Paris. 122-154.
- Morimoto S., Umezaki Y., Shoyama Y., Saito H., Nishi K. et Irino N. (1994). "Post-harvest degradation of carotenoid glucose esters in saffron." *Planta Med.*, 60: 438-440.
- Mougin I. (1999). "Le safran *Crocus sativus* L. Iridacees". Faculté de médecine et de pharmacie. Besançon.
- Murray H. H. (2000). "Traditional and new application for kaolin, smectite, and palygorskite : a general overview." *Appl. Clay Sci.*, 17: 207-221.
- Narasimhan S., Chand N. et Rajalakshmi D. (1992). "Saffron : quality evaluation by sensory profile and gas chromatography." *J. Food Qual.*, 15: 303-314.
- Navres Y. R. (1974). "Technologie et chimie des parfums naturels". Masson et Cie.
- Negbi M. (1999). "Saffron. *Crocus sativus* L.". Harwood Academic Publishers. Amsterdam.
- NF V 03-908 (1988). "Détermination de la teneur en huile".
- Nickerson G. B. et Likens S. T. (1966). "Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer." *Journal of Chromatography, A*, 21: 1-5.
- Norbek R. et Kondo T. (1998). "Anthocyanins from flowers of *Crocus* (Iridaceae)." *Phytochem.*, 47 (5): 861-864.
- Oberdieck R. (1975). "Die aromastoffe der natürlichen würzessenzen aus gewürzen, kräutern und drogen Teil IV." *Alkohol-Ind.*, 88 (17): 397-401.
- Oda Y. et Tatsumi Y. (1993). "News lectins from bulbs of *Crocus sativum*." *Pharmaceutical society of Japan*, 16: 978-981.

- O'Mahony M. (1986). "Sensory evaluation of food : statistical methods and procedures". Dekker, M. New York.
- Orfanou O. et Tsimidou M. (1995). "Influence of selected additives on the stability of saffron pigments in aqueous extracts." *Dev. Food Sci.*, 37A: 881-894.
- Orfanou O. et Tsimidou M. (1996). "Evaluation of the colouring strength of saffron spice by UV-Vis spectrometry." *Food Chem.*, 57 (3): 463-469.
- Pardo J. E., Zalacain A., Carmona M., Lopez E., Alvarruiz A. et Alonso G. L. (2002). "Influence of the type of dehydration process on the sensory properties of Saffron spice." *Ital. J. Food Sci.*, 14 (4): 413-421.
- Pawliszyn J. B., Ed. (1997). "Solid phase microextraction: theory and practice". USA, Wiley-VCH Inc.
- Pawliszyn J. B., Ed. (1999). "Applications of solid phase microextraction". UK, The Royal Society of Chemistry.
- Pawliszyn J. B. et Belardi R. P. (1989). "The application of chemically modified fused silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns." *Water Pollut. Res. J. Can.*, 24: 179.
- Pfander H. et Rychener M. (1982). "Separation of carotenoids by HPLC. Part 2. Separation of crocetin glycosyl esters by high-performance liquid chromatography." *J. Chromatogr.*, 234 (2): 443-7.
- Pfander H. et Schurtenberger H. (1982). "Biosynthesis of C<sub>20</sub>-carotenoids in *Crocus sativus*." *Phytochem.*, 21 (5): 1039-1042.
- Pfander H., Socaciu C. et Neamtu G. (1994). "High performance liquid chromatography in carotenoid research." *Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Chem.*, 39 (1-2): 70-77.
- Pfister S., Meyer P., Steck A. et Pfander H. (1996). "Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in Gardenia Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne)." *J. Agric. Food Chem.*, 44 (9): 2612-2615.
- Pierlot G. (1925). "Le safran." *Chim. Ind.*, 14 (6): 1-12.
- Piggott J. R. et Sharman K. (1986). "Statistical Procedures in Food Research". Piggott J. R. Elsevier Applied Science. London. 181-232.
- Pinanelli V. (1967). "Le safran, une culture à développer dans le sud-ouest. Les constituants volatils et leurs analyse par CPG dans différents organes". Bordeaux II. Palerme.
- Pollien P., Ott A., Montigon F., Baumgartner M., Munoz-Box R. et Chaintreau A. (1997). "Hyphenated headspace-GC-sniffing technique: the "SNIF" method." *Riv. Ital. EPPOS*: 126-135.
- Priy J. (1994). "Le safran *Crocus sativus*." *Iris et Bulbeuses* (110-111-112).
- Raina B. L., Agarwal S. G., Bhatia A. K. et Gaur G. S. (1996). "Changes in pigments and volatiles of Saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage." *J. Sci. Food Agric.*, 71: 27-32.
- Raynal-Ioualalen R. (1996). "Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes.". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des Agroressources. Toulouse.
- Rodel W. et Petrzika M. (1991). "Analysis of the volatile components of Saffron." *J. High Resolution Chromatogr.*, 14 (11): 771-774.

Rouilly A. (2002). "Nouveaux agro-matériaux composites à matrice protéique ou polysaccharidique : étude du fractionnement, de la transformation et de la mise en forme par extrusion et par injection-moulage de la pulpe de betterave et du tourteau de tournesol". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des Agroressources. Toulouse.

Rubio Moraga A., Fernandez J. A. et Gomez-Gomez L. (2003). "Biosynthesis of carotenoids in Saffron". *1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, Albacete, Spain, Acta Hort. 99-107.

Rubio Moraga A., Fernandez Nohales P., Fernandez Perez J. A. et Gomez-Gomez L. (2004). "Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas." *Planta*, 219 (6): 955-966.

Saitô N., Mitsui S. et Hayashi K. (1960). "Delphin, the anthocyanin of medicinal saffron and its identity with hyacin as shown by paper chromatography of partial hydrolysates." *Bot. Mag. Tokyo*, 36: 340-345.

Salomi M. J., Nair S. C. et Panikkar K. R. (1991). "Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice." *Nutr. Cancer*, 16 (1): 67-72.

Sampathu S. R., Shivashankar S. et Lewis Y. S. (1984). "Saffron (*Crocus sativus* Linn.) cultivation, processing, chemistry and standardization." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 20 (2): 123-157.

San Mames J. J. (2001). "Vanilla, Saffron Imports".

Sauvant D., Perez J. M. et Tran G. (2002). "Tables de compositions et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevages". INRA Editions Versailles. 304.

Scalia S., Giuffreda L. et Pallado P. (1999). "Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (3): 549-558.

Semiond D., Dautraix S., Desage M., Majdalani R., Casabianca H. et Brazier J. L. (1996). "Identification and isotopic analysis of safranal from supercritical fluid extraction and alcoholic extracts of saffron." *Anal. Lett.*, 29 (6): 1027-1039.

Serna C., Van Scoyoc G. E. et Ahlrichs J. L. (1977). "Hydroxyl groups and water in palygorskite." *American Mineralogist*, 62: 784-792.

Siano F., Ghizzoni C., Gionfriddo F., Colombo E., Servillo L. et Castaldo D. (2003). "Determination of estragole, saffrole and eugenol methyl ether in food products." *Food Chem.*, 81 (3): 469-475.

Sinyinda S. et Gramshaw J. W. (1998). "Volatiles of avocado fruit." *Food Chem.*, 62 (4): 483-487.

Solinas M. et Cichelli A. (1988). "HPLC analysis of color and flavor components of saffron." *Ind. Aliment.*, 27 (262): 634-639, 648.

Song J., Gardner B. D., Holland J. F. et Beaudry R. M. (1997). "Rapid analysis of volatile flavor compounds in apple fruit using SPME and GC/Time-of-Flight mass spectrometry." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (5): 1801-1807.

Stashenko E. E., Jaramillo B. E. et Martinez J. R. (2004). "Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography." *Journal of Chromatography, A*, 1025 (1): 105-113.

Steffen A. et Pawliszyn J. (1996). "Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction." *J. Agric. Food Chem.*, 44 (8): 2187-2193.

Straubinger M., Bau B., Eckstein S., Fink M. et Winterhalter P. (1998). "Identification of novel glycosidic aroma precursors in Saffron (*Crocus sativus* L.)." *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3238-3243.

Straubinger M., Bau B., Eckstein S., Jezussek M. et Winterhalter P. (1997a). "Isolation of new saffron constituents using counter-current chromatography". *Natural Product Analysis: Chromatography, Spectroscopy, Biological Testing*, Wuerzburg, Germany. 27-34.

Straubinger M., Jezussek M., Waibel R. et Winterhalter P. (1997b). "Novel glycosidic constituents from Saffron." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (5): 1678-1681.

Sujata V., Ravishankar G. A. et Venkataraman L. V. (1992). "Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetin, picrocrocin and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography." *J. Chromatogr.*, 624: 497-502.

Tarantilis P. A. et Polissiou M. G. (1997). "Isolation and identification of the aroma components from Saffron (*Crocus sativus*)." *J. Agric. Food Chem.*, 45: 459-462.

Tarantilis P. A., Polissiou M. G. et Manfait M. (1994). "Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection." *Journal of Chromatography A*, 664: 55-61.

Tarantilis P. A., Polissiou M. G., Morjani H., Avot P., Bel Jebbar A. et Manfait M. (1992). "Anticancer activity and structure of retinoic acid and carotenoids of *Crocus sativus* L. on HL60 cells". *The 4th international conference of anticancer research*, Crete, Greece. 1889.

Tarantilis P. A., Tsoupra G. et Polissiou M. G. (1995). "Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 699: 107-118.

Torres L. M. (1988). "Maya blue : low the mayas could have made the pigment." *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 123: 123-128.

Tsatsaroni E. G. et Eleftheriadis I. C. (1994). "The color and fastness of natural saffron." *J. Soc. Dyers Colour.*, 110 (10): 313-315.

Tsatsaroni E. G., Liakopoulou-Kyriakides M. et Eleftheriadis I. C. (1998). "Comparative study of dyeing properties of two yellow natural pigments. Effect of enzymes and proteins." *Dyes Pigm.*, 37 (4): 307-315.

Tsimidou M. et Biliaderis C. G. (1997). "Kinetic studies of Saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration." *J. Agric. Food Chem.*, 45 (8): 2890-2898.

Tsimidou M. et Tsatsaroni E. (1993). "Stability of saffron pigments in aqueous extracts." *J. Food Sci.*, 58 (5): 1073-1075.

Ursat J. (1913). "Le safran du Gatinais". Ed.Gauthier L.

USDA-NCI (1998). "USDA-NCI Carotenoid Database", Nutrient Data Laboratory Agricultural Research Service.

Vagi E., Simandi B., Suhajda A. et Hethelyi E. (2005). "Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide." *Food Research International*, 38 (1): 51-57.

- Valizadeh R. (2000). "Utilization of saffron leaves as an animal feedstuff." *Agricultural sciences and technology*, 14 (1): 3-9.
- Vallet N., Piquenot E. et Michaud A. (2002). "Analysis of 12 nature yoghurts by GC-O: the data statistical tests". *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century, Proceedings of the 10th Weurman Flavor Research Symposium*, Beaune, France. 737-740.
- Van Breemen R. B., Huang C.-R., Tan Y., Sander L. C. et Schilling A. B. (1996). "Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization." *J. Mass Spectrom.*, 31 (9): 975-981.
- Van Olphen H. (1966). "Maya blue : a clay-organic pigment." *Science*, 154: 645-646.
- Van Ruth S. M. (2001). "Methods for gas chromatography-olfactometry: a review." *Biomolecular engineering*, 17 (4,5): 121-128.
- Van Ruth S. M. et Roozen J. P. (2004). "Gas chromatography-olfactometry analysis and its importance in food quality control: influence of assessors' training and sampling methods on gas chromatography-olfactometry data." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 542: 155-165.
- Van Ruth S. M., Roozen J. P. et Posthumus M. A. (1995). "Gas chromatography/sniffing port analysis evaluated for aroma release from rehydrated French beans (*Phaseolus vulgaris*)." *J. Sci. Food Agric.*, 69: 393-401.
- Van Soest P. J. (1963). "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin." *Journal of the A.O.A.C.*, 46 (5): 829-835.
- Van Soest P. J. et Wine R. H. (1967). "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents." *Journal of the A.O.A.C.*, 50 (1): 50-55.
- Van Soest P. J. et Wine R. H. (1968). "Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate." *Journal of the A.O.A.C.*, 51 (4): 780-785.
- Vandenbossche Maréchal V. (1998). "Fractionnement des tiges et capitules de tournesol. Hydrodistillation d'une huile essentielle odorante, extraction et modification chimique des pectines, et mise en forme d'agromatériaux biodégradables". Institut National Polytechnique de Toulouse. Sciences des Agrossources. Toulouse.
- Vickackaite V., Romani A., Pannacci D. et Favaro G. (2004). "Photochemical and thermal degradation of a naturally occurring dye used in artistic painting. A chromatographic, spectrophotometric and fluorimetric study on saffron." *International Journal of Photoenergy*, 6: 175-183.
- Vilegas J. H. Y., De Marchi E. et Lancas F. M. (1997). "Extraction of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ("guaco") leaves." *Phytochem. Anal.*, 8 (5): 266-270.
- Visvanath S., Ravishankar G. A. et Venkataraman L. V. (1990). "Induction of crocin, crocetin, picrocrocin, and safranal synthesis in callus cultures of saffron-*Crocus sativus* L." *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12 (3): 336-340.
- Vurdu H. (2003). "Room table : agronomical and biotechnological approches for Saffron improvement". *1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, Albacete, Spain, Acta Hort. 285-290.
- Williams C. A., Harborne J. B. et Goldblatt P. (1986). "Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family iridaceae." *Phytochem.*, 25 (9): 2135-2154.
- Winterhalter P. et Straubinger M. (2000). "Saffron-renewed interest in an ancient spice." *Food Rev. Int.*, 16 (1): 39-59.

Yang X. et Peppard T. (1994). "Solid-phase microextraction for flavor analysis." *J. Agric. Food Chem.*, 42 (9): 1925-1930.

Young A. et Britton G. (1993). "Carotenoids in Photosynthesis". Ed. Young A. et Britton G. Chapman & Hall. London.

Zarghami N. S. et Heinz D. E. (1971a). "Monoterpene aldehydes and isophorone-related compounds of saffron." *Phytochem.*, 10: 2755-2761.

Zarghami N. S. et Heinz D. E. (1971b). "The volatile constituents of Saffron." *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 4 (2): 43-45.

Zhang Z. et Pawliszyn J. (1993). "Headspace solid-phase microextraction." *Anal. Chem.*, 65 (14): 1843-1852.

Zougagh M., Rios A. et Valcarcel M. (2005). "An automates screening method for the fast, simple discrimination between natural and artificial colorants in commercial saffron products." *Analytica Chimica Acta*, 535: 133-138.

Zuhang H. et Barth M. (2002). "Fatty acid oxidation in plant tissues". *Food lipids : chemistry, nutrition and biotechnology*. Akoh C. C. et Min D. B. Dekker M. AG, Basel. New York. 413-463.

## **Annexe V : Publications et participations aux congrès**

### **Communications orales avec actes publiés et comité de lecture**

M. Bergoin, C. Raynaud, G. Vilarem, J.M. Bessière and T. Talou, Investigation on aroma volatiles from fresh flowers of saffron (*Crocus sativus* L.), Food Flavor and Chemistry, Explorations into the 21<sup>st</sup> Century, Ed. A.M. Spanier, F. Shahidi, T.H. Parliament, C. Missinan, C.T. Ho and E. Tratas Contis, 104-114, 2005, Proceedings of the 11<sup>th</sup> International ACS Flavor Conference : Recent advances in Food Flavor Chemistry, 3<sup>rd</sup> George Charalambous Memorial Symposium, 30 juin – 2 juillet, 2004, Samos, Grèce.

M. Bergoin, C. Raynaud, G. Vilarem, J.M. Bessière and T. Talou, Saffron By-products Integrated Valorisation Using Agresource Refining Concept (ARC), Acta Hort., Ed. J.A. Fernandez and F. Abdullaev, 650, 2004, 355-360, Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, 22 - 25 octobre, 2003, Albacete, Espagne.

### **Communication par voie d'affiche avec actes et comité de lecture**

M. Bergoin-Lefort, C. Raynaud, G. Vilarem and T. Talou, Influence of dehydration on key-odour compounds of saffron, The proceedings of the 11<sup>th</sup> Weurman Flavour Research Symposium, Roskilde, Danemark, 21 - 24 juin, 2005, sous presse.

### **Communications par voie d'affiche avec actes sur résumé**

M. Bergoin, C. Raynaud, G. Vilarem and T. Talou, Description of sensory properties of saffron, European Conference on Sensory Science of Food and Beverages, A Sense of Identity, 26 – 29 septembre, 2004, Florence, Italie.

M. Bergoin, C. Raynaud, G. Vilarem, J.M. Bessière and T. Talou, Fresh saffron stigmas to typical dried spice : Evolution of organoleptic properties, The 34<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oil ISEO, 7 10 septembre, 2003, Würzburg, Allemagne.



Acta Horticulturae

Number 650

Proceedings of the  
First International Symposium  
on  
Saffron Biology  
and  
Biotechnology

Editors

J.-A. Fernández  
E. Abdullayev





---

International Society for Horticultural Science  
Société Internationale de la Science Horticole

---

ACTA HORTICULTURAE® is a publication of ISHS.  
Information about Acta Horticulturae® and ISHS is given at the  
end of this book.

Check out [www.actahort.org](http://www.actahort.org) for details on our latest titles.

**Editorial Advisory Board of Acta Horticulturae®**

Jules Janick, Purdue University, USA,  
*Chair of the Editorial Advisory Board*

Anthony G. Biggs, President AuSHS, Australia

Byung-Dong Kim, Department of Plant Sciences and Center  
for Plant Molecular Genetics and Breeding Research,  
Seoul National University, Korea

António A. Monteiro, College of Agriculture and Forestry,  
Technical University of Lisbon, Portugal

Robert K. Prange, Atlantic Food and Horticulture Research  
Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Canada

Manfred Schenk, Institute of Plant Nutrition,  
University of Hannover, Germany

**Executive Director of ISHS**

Ir. J. Van Assche

**Secretariat of ISHS**

PO Box 500  
3001 Leuven 1  
Belgium

Phone: +32.16.22 94 27  
Fax: +32.16.22 94 50  
E-mail: [info@ishs.org](mailto:info@ishs.org)  
Internet: [www.ishs.org](http://www.ishs.org)

## Saffron By-products Integrated Valorisation Using Agroresource Refining Concept (ARC)

Marjorie Bergoin, Christine Raynaud, Gérard Vilarem, Jean-Marie Bessière and Thierry Talou

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle  
INPT-ENSIACET, 118 route de Narbonne  
31077 Toulouse  
France

**Keywords:** GC-O, headspace, SPME, vegetative refining

### Abstract

Our scientific objective consists in a new saffron by-products integrated valorisation approach by applying the agroresource refining concept to the different parts of the plant in order to obtain aromatic and dye products.

On stigmas, the SPME, volatiles extraction method, has been recognized as the more adapted to a better saffron quality classification. Higher boiling point compounds have been extracted, which could constitute new quality markers. The saffron determined, by this way, as low aromatic value could be used as oleoresins in industrial process.

Fresh flowers have been extracted by hexane maceration giving an intense yellow concrete-absolute. The olfactory impact of aroma compounds has been evaluated by GC/O analysis. An important contribution of the honey note, about 50% of the total odours intensity, suggests a potent application in flavour and fragrance industry.

### INTRODUCTION

*Crocus sativus* Linn. is well known for the high value spice obtained from its dried stigmas. The freshly picked stigmas give not the typical saffron flavour, which is developed during the drying process (Basker, 1993; Raina et al., 1996). Saffron is widely used in Mediterranean countries as a condiment for its delicate flavour and intense colour. The production of 1 kg of saffron, requires more than 160,000 flowers, representing 300 kg of floral waste (Kubo and Kinst-Hori, 1999) and also an important quantity of leaves, about 1.5 tones, formerly used as cattle forage.

Our scientific objective consists in a new saffron by-products integrated valorisation approach by applying the agroresource-refining concept (ARC) to the different parts of the plant. ARC has been widely applied on the different parts of the sunflower plant. From seed, sunflower oil has been produced and from the oil cake, cosmetic products (Diot et al., 1991) and fuels (Yorgun et al., 2001), have been made. From the steam and the wastes of flowers, essential oil was extracted and paper pulp and agromaterials with low density like polystyrene (Marechal and Rigal, 1999) have been developed.

Regarding to the few studies carried on *C. sativus* flowers, leaves and bulbs, our objective is to apply this ARC (Table 1) to *C. sativus* in order to investigate and obtain aromatic and dye by-products. Only the aromatic aspect will be presented in this paper and two valorisations will be developed i.e. the stigmas of second choice and the flowers by-products. Our investigations on stigmas, part of the plant the most used, consist in a better understanding of saffron classification. At the moment, saffron quality has been determined by the International Organization for Standardization (ISO) 3632 trade standards (ISO 3632-2, 1993) in quantifying the rate of crocin, picrocrocin and safranal. The evaluation of the saffron aroma impact has only been made by measuring safranal. Our objective is to find good markers using new analytical methods to determine saffron authenticity and quality category.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

The plant used in these experiments was *C. sativus*. Samples of dried stigmas and flowers came from Quercy area (South-West of France).

### Treatments

800g of flowers have been extracted by maceration in 3L of hexane. Solvent was evaporated and concentrated to give a concrete. Waxes from concrete were removed using absolute ethanol.

### Analytical Methods

Dynamique Headspace (DHS) technique was used to concentrate saffron volatiles. About 0.1g of dried stigmas were placed into a glass cell. Volatiles were trapped on TENAX with a stripping gas (Helium) flow rate of 30ml/min during 15min at room temperature. The same batches of sample were concentrated during 120min by the Solid Phase MicroExtraction (SPME) technique using a carboxen-PDMS stationary phase fibre.

Headspace extract were analysed by a gas chromatograph (HP 5890) coupled to a mass spectrometer (HP 5971) and performed with a BPX5 column (60m, 0.32mm i.d., 1µm f.t.). A CHISA injector (SGE device) has been used for the DHS analysis (Breheret, et al, 1997). Desorption time was 3min. The conditions were as follows: carrier gas, helium at 1.5 bar; temperature program, 40°C, 1min, 5°C/min, 140°C, 3°C/min, 240°C; split 10ml/min; detector, 300°C, injector, 240°C. Compounds were identified by comparison of their spectra with those of the NIST 98 and WILEY library and literature (Winterhalter, 2002; and Cadwallader et al., 1997).

GC-olfactometry (GC-O) system consisted of a Varian 3900 equipped with a flame ionization detector (FID) and a sniffing port. Column effluent was split 1:1 between FID and sniffing port by using a DB5ms column (50m, 0.32mm i.d., 0.52µm f.t.). Helium was used as carried gas at a constant flow rate 1.5ml/min. Oven temperature was fixed at 60°C during 3 min and increased from 60°C to 110°C at a rate of 3°C/min and then at 5°C/min to 280°C during 20min. One µl of extract was injected (split 10ml/min; 200°C injector temperature; 280°C detector temperature). An expert assessor was used for evaluation of absolute in three replicates by GC-O analyses. Odorants were described and the odour intensity was measured using a scale up to five points. Scores across replicates were analysed to give the aroma profiles of absolute.

## RESULTS AND DISCUSSION

Stigmas volatiles have been identified by the GC-MS analysis (Table 2). SPME and DHS extracting methods were compared by chromatography profiles (Figure 1 and 2). The 3-hydroxy-2-butanone is higher extracted by DHS using TENAX trap. Volatiles are presents after the elution of the safranal, suggesting that higher boiling point compounds have been extracted with SPME: 2-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dione, 4-hydroxy-3,5,5-trimethylcyclohex-2-enone, 2,4,4-trimethyl-3-carboxaldehyde-6-hydroxy-2,5-cyclohexadien-1-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-ol. This technique seemed to be more adaptable to concentrate saffron volatiles and to evaluate saffron quality by giving more information on the volatiles extract. Bad aromatic quality of saffron could be valorised in producing oleoresin (Table 1).

The fresh flowers solvent extraction gave 1.48 g of concrete. The extraction yield was 0.19%. A yellow sweet-smelling absolute has been obtained by removing waxes. The sensory characteristics of flowers absolute were obtained by GC sniffing (Figure 3). The detection of an odour at the sniffing port below an intensity of two was considered as "noise". Sniffing port analysis revealed that odorants could be classified in seven categories: "burned", "roasted", "floral", "green", "nutty", "pungent honey" and "sweet honey" notes. At the beginning of the elution, fresh odours such as "floral" and "green"

notes were detected by the assessor followed by a relative intense "nutty" note. In the middle of the analysis strong "honey" notes were perceived and at the end "pyrogenous" notes were more present. The odour contribution of compounds (Figure 4) showed that "honey" notes and "nutty" notes represent respectively 50% and 20% of the total odours intensity. Sniffing port analysis of absolute gives interesting sensory data. The diversifying note and the important contribution of honey odour suggest that saffron flowers absolute could have a potent application in flavour and fragrance industry.

## CONCLUSION

Our investigations consisted in finding new analytical methods to determine quality markers in saffron aroma. SPME method seemed to be more adaptable to extract a wider range of volatiles from saffron. Saffron, evaluated by SPME/GC-MS technique and determined as low aromatic value, could be used in industry to obtain oleoresins.

Flower's wastes represent a real aromatic interest. The intense "honey" notes from absolute could find an application in fragrance industry.

Further research developments turned towards the application of the agrosresource refining concept to the other parts of the plant, style, petals, stamens, leaves, stem and corms are actually underway in order to valorise all the organs of the plant.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the "Safraniers du Quercy" society for providing saffron samples, flowers, leaves and bulbs, the Midi-Pyrénées Regional Council and Regional Delegation of Ministry of Research for sponsoring this study, the French Ministry of Research for allowing a Ph.D. grant.

## Literature Cited

- Basker, D. 1993. Saffron the costliest spice: drying and quality supply and price. *Acta Horticulturae* 344: 86-97.
- Breheret, S., Talou, T., Rapior, S. and Bessière, J.M. 1997. Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). *J. Agr. Food Chem.* 45: 831-836.
- Cadwallader, K.R., Baek, H.H. and Cai, M. 1997. In Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. ACS (American Chemical Society) Symposium 660: 66-79.
- Diot, M., Bonne C. and Sincholle, D. 1991. Préparation cosmétique contenant un extrait de tourteaux de tournesol (*Helianthus annuus*) WO 91/11169.
- ISO. 1993. Saffron (*Crocus sativus* Linnaeus). Part 1 (Specification) and Part 2 (Test methods). ISO 3632-1. The international Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Kubo, I. and Kinst-Hori, I. 1999. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agr. Food Chem.* 47: 4121-4125.
- Marechal, V., Rigal, L. 1999. Characterization of by-products of sunflower culture. Commercial applications for stalks and heads. *Ind. Crop. Prod.* 10: 185-200.
- Raina, B.L., Argarwal, S.G., Bathia, A.K., Gaur, G.S. 1996. Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. *J. Sci. Food Agric.* 71: 27-32.
- Winterhalter, P. 2002. Carotenoid-Derived Aroma compounds. ACS (American Chemical Society) Symposium Series 802: 220-239.
- Yorgun, S., Sensoz, S. and Kockar, O. M., 2001. Flash pyrolysis of sunflower oil cake for production of liquids fuels. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 60: 1-12.

## Tables

Table 1. Agroresource refining concept applied to *Crocus sativus*.

Parts of the plant	Extraction	By-products	Application
Stigmas 2 <sup>nd</sup> choice	ethanol extraction	oleoresins	flavour and fragrance industry
style	Ethanol extraction	oleoresins	
stamen	solvent extraction	concrete/absolute	flavour & dye industry
petals	hydrodistillation	essential oil	flavour and fragrance industry
leaves & stem	hydrodistillation	aromatic waters	
corms 2 <sup>nd</sup> choice	hydrodistillation	essential oil	flavour and fragrance industry
	oxidation	aromatic extract	

Table 2. Volatiles compounds identified in dried stigmas by DHS/GC-MS and SPME/GC-MS.

No.	Compounds	Mass spectral data [ <i>m/z</i> (%)]	DHS/ GC-MS Area %	SPME/ GC-MS Area %
1	Acetic acid	43(100),45(88),60(80),28(35), 42(15),44(8)	-	9.4%
2	3-hydroxy-2-butanone	45(100),43(85),29(23),88(16), 42(12),73(5),55(3)	12.2%	1.8%
3	2-(5H)-furanone/ $\gamma$ -butyrolactone	55(100),42(80),84(73),41(48), 86(40),110(30),109(24)	1.6%	3.3%
4	6,6-dimethylcyclohexane- carboxaldehyde	107(100),125(35),81(33),55(30), 91(28),140(28),122(15)	1.1%	0.4%
5	2,2-dimethylcyclohexane- carboxaldehyde	121(100),105(60),91(55),107(35), 150(33),79(30),151(5)	0.3%	-
6	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol (linalool)	71(100),43(85),41(80),93(75), 55(55),69(38),80(30),121(20),136(8)	0.8%	0.3%
7	2-methylene-6,6-dimethyl-3- cyclohexene-1-carboxaldehyde	121(100),91(60),107(45),79(40), 135(30),150(15),166(10)	4.4%	0.6%
8	phenylethylalcohol	91(100),92(50),122(40),65(15), 77(8)	-	0.8%
9	3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (isophorone)	82(100),138(25),54(10),95(8), 67(6),83(5),139(2)	9.4%	4.3%
10	2,6,6-trimethyl-2-cyclohexene-1,4- dione (4-ketoisophorone)	68(100),96(95),39(50),152(48), 109(15),137(13),153(5),81(4)	2.9%	1.5%
11	2,2,6-trimethyl-1,4-cyclohexanedione	56(100),42(95),139(96),154(70), 69(60),70(50),83(15)	3.0%	3.3%
12	2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadiene-1- carboxaldehyde (safranal)	107(100),91(80),121(50),150(45), 105(40),79(25),135(10)	63.6%	50.9%
13	2-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2- cyclohexen-1,4-dione	84(100),126(69),168(50),56(48), 153(40),125(38),140(35)	-	2.1%
14	4-hydroxy-3,5,5-trimethylcyclohex-2- enone	98(100),112(50),70(48), 69(46),42(20)	-	0.6%
15	2,4,4-trimethyl-3-carboxaldehyde-6- hydroxy-2,5-cyclohexadien-1-one	109(100),137(95),180(80),152(78), 123(65),91(45),165(35)	-	6.2%
16	4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)- 3-buten-2-ol (beta-ionol)	105(100),161(98),91(80),119(80), 121(78),176(45),133(40)	-	0.3%

Figures

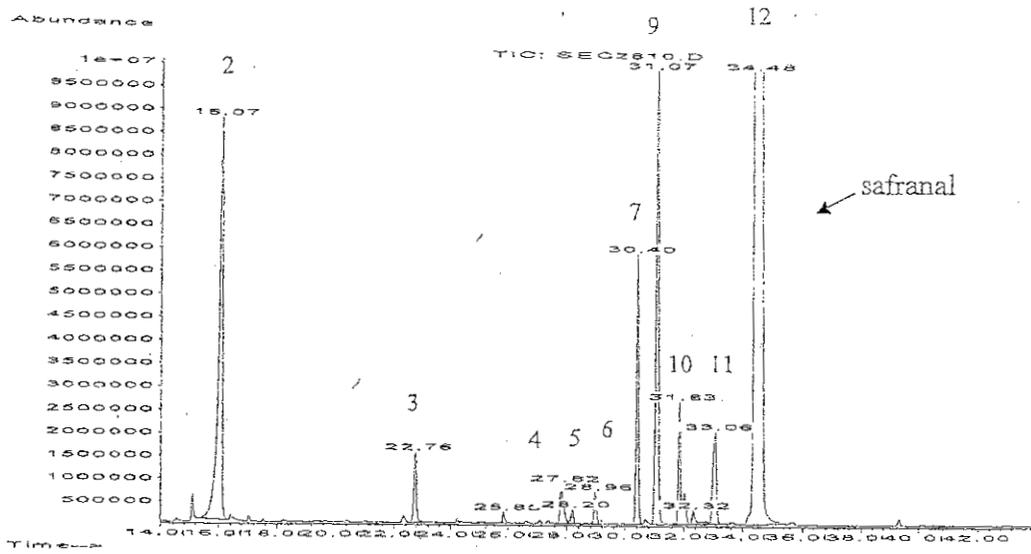


Fig. 1. Chromatogram of saffron obtained by DHS/GC-MS on dried stigmas. See table 2 for picks code.

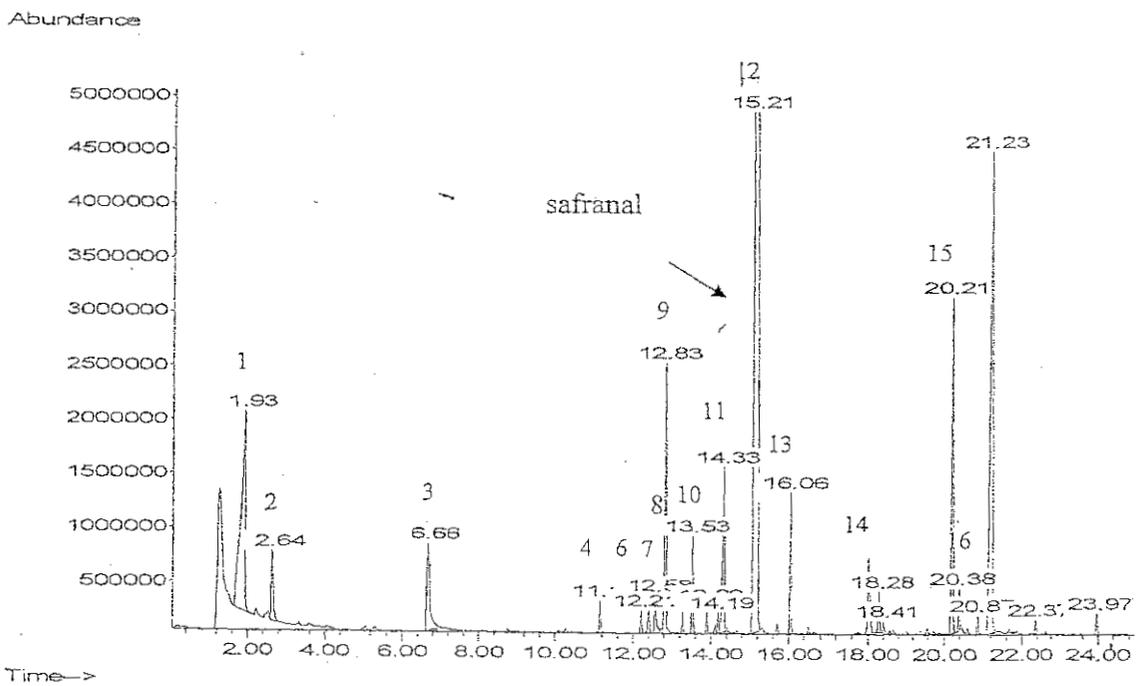


Fig. 2. Chromatogram of saffron obtained by SPME/GC-MS on dried stigmas. See table 2 for picks code.

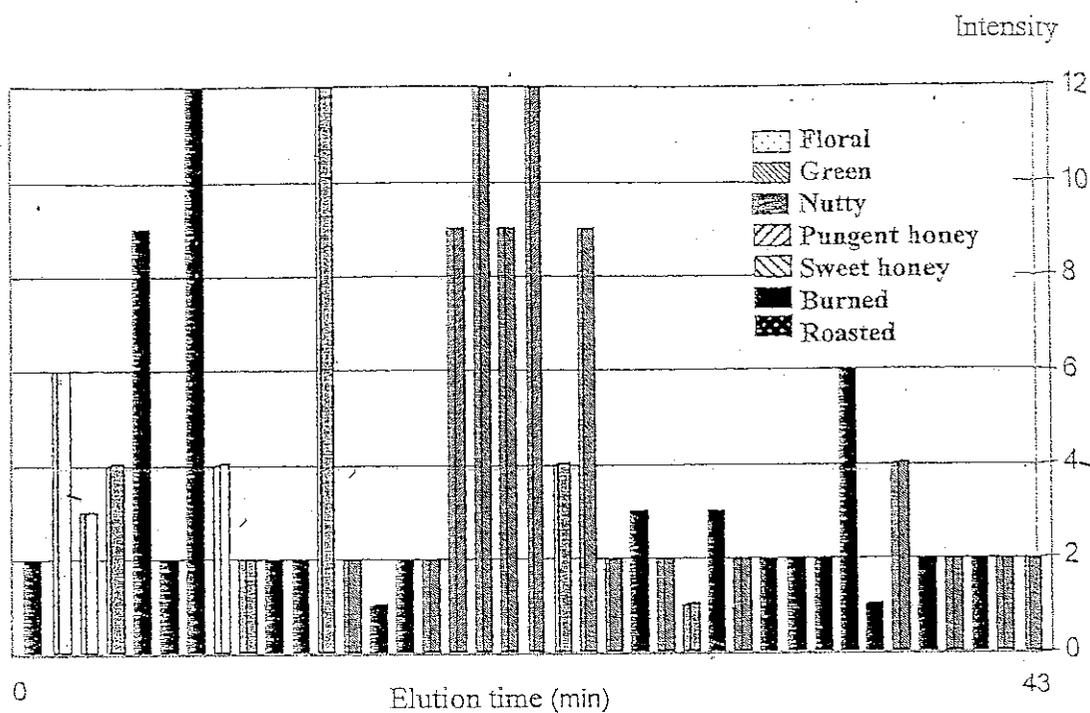


Fig. 3. Aroma profile of the absolute.

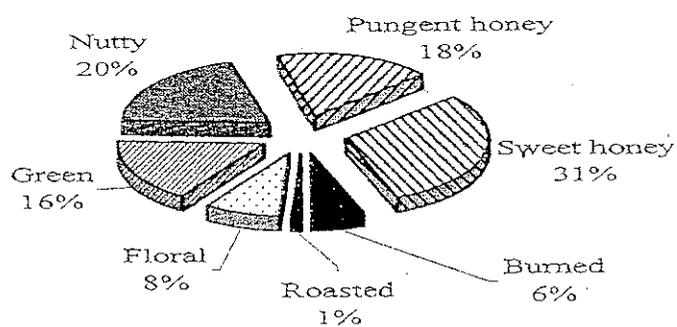
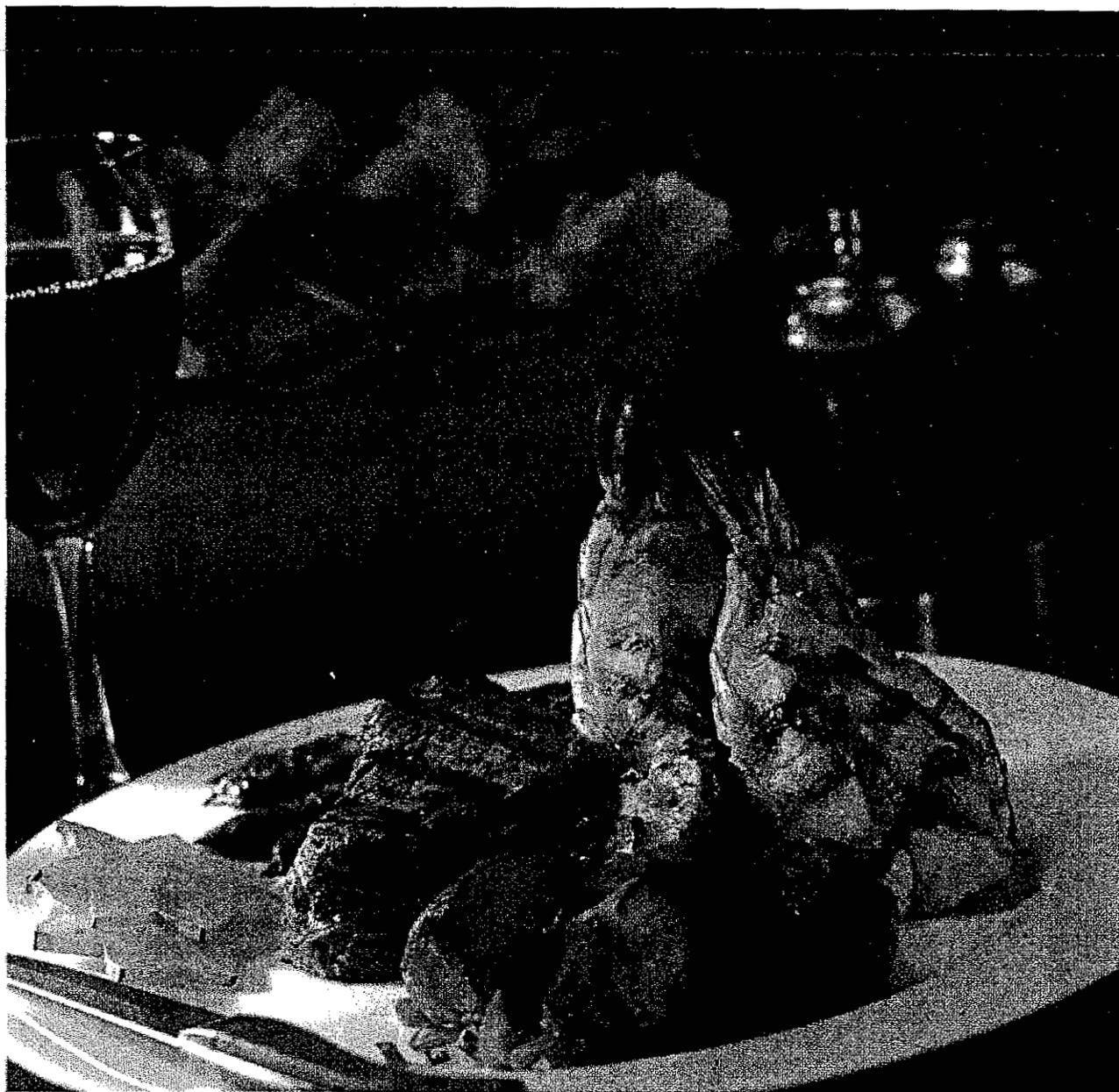


Fig. 4. Odour contribution of compounds.

A M Spanier, F Shahidi, T H Parliment, C Mussinan,  
C-T Ho, E Tratras Contis

# Food Flavor and Chemistry

Explorations into the 21st Century



**RSC** | Advancing the  
Chemical Sciences

# **Food Flavor and Chemistry**

## **Explorations into the 21st Century**

Edited by

**A.M. Spanier**

*US Dept of Agriculture, Rockville, Maryland, USA*

**F. Shahidi**

*Memorial University of Newfoundland, St John's, NF, Canada*

**T.H. Parliment**

*Parliment Consulting, New City, NY, USA*

**C. Mussinan**

*IFF R&D, Union Beach, NJ, USA*

**C.-T. Ho**

*Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA*

**E. Tratras Contis**

*Eastern Michigan University, Ypsilanti, MI, USA*

The proceedings of the 11<sup>th</sup> International Flavor Conference: Recent Advances in Food Flavor Chemistry, 3<sup>rd</sup> George Charalambous Memorial Symposium held on 29 June to 2 July 2004 in Samos, Greece.

Special Publication No. 300

ISBN 0-85404-653-4

A catalogue record for this book is available from the British Library

© The Royal Society of Chemistry 2005

*All rights reserved*

*Apart from any fair dealing for the purpose of research or private study for non-commercial purposes, or criticism or review as permitted under the terms of the UK Copyright, Designs and Patents Act, 1988 and the Copyright and Related Rights Regulations 2003, this publication may not be reproduced, stored or transmitted, in any form or by any means, without the prior permission in writing of The Royal Society of Chemistry, or in the case of reprographic reproduction only in accordance with the terms of the licences issued by the Copyright Licensing Agency in the UK, or in accordance with the terms of the licences issued by the appropriate Reproduction Rights Organization outside the UK. Enquiries concerning reproduction outside the terms stated here should be sent to The Royal Society of Chemistry at the address printed on this page.*

Published by The Royal Society of Chemistry,  
Thomas Graham House, Science Park, Milton Road,  
Cambridge CB4 0WF, UK

Registered Charity Number 207890

For further information see our web site at [www.rsc.org](http://www.rsc.org)

Printed by Athenaeum Press Ltd, Gateshead, Tyne and Wear, UK

INVESTIGATION OF AROMA VOLATILES FROM FRESH FLOWERS OF SAFFRON (*CROCUS SATIVUS* L.)

M. Bergoin, C. Raynaud, G. Vilarem and T. Talou

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, ENSIACET, 118 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

### 1. ABSTRACT

Saffron is a high-value spice obtained from dried *Crocus sativus* Linnaeus stigmas. It is widely used as condiment for its delicate flavour and intense color. Although the production of 1 kg of saffron requires more than 160,000 flowers, only few studies have been carried out on *Crocus sativus* L. flowers. Especially the aroma potential of the flower has not yet been subject of detailed investigation. During the saffron harvesting season in October 2002, flowers from the Quercy area (France) have been collected. After removing the stigmas, fresh flowers have been extracted by two different methods: hexane maceration was applied, leading to extracts called "concrete" and "absolute". The essential oil and the aromatic water were obtained by steam distillation. The headspace volatiles of these products were analyzed by gas chromatography, after direct injection or dynamic headspace sampling. Compounds of high olfactory impact were determined by sniffing detection GC/O and identified by mass selective detection GC/MS.

### 2. INTRODUCTION

Saffron, dried *Crocus sativus* Linnaeus stigmas, is a high value spice appreciated in the Mediterranean countries for its flavor, aroma and coloring properties. In 2003, the estimated global saffron market was about 170 tons. To produce 1 kg of saffron, more than 160,000 flowers are required, representing 300 kg of floral waste<sup>1</sup> and about 1.5 tons of leaves formerly used as cattle forage. At a global scale, *Crocus sativus* L. wastes represent a real potential.

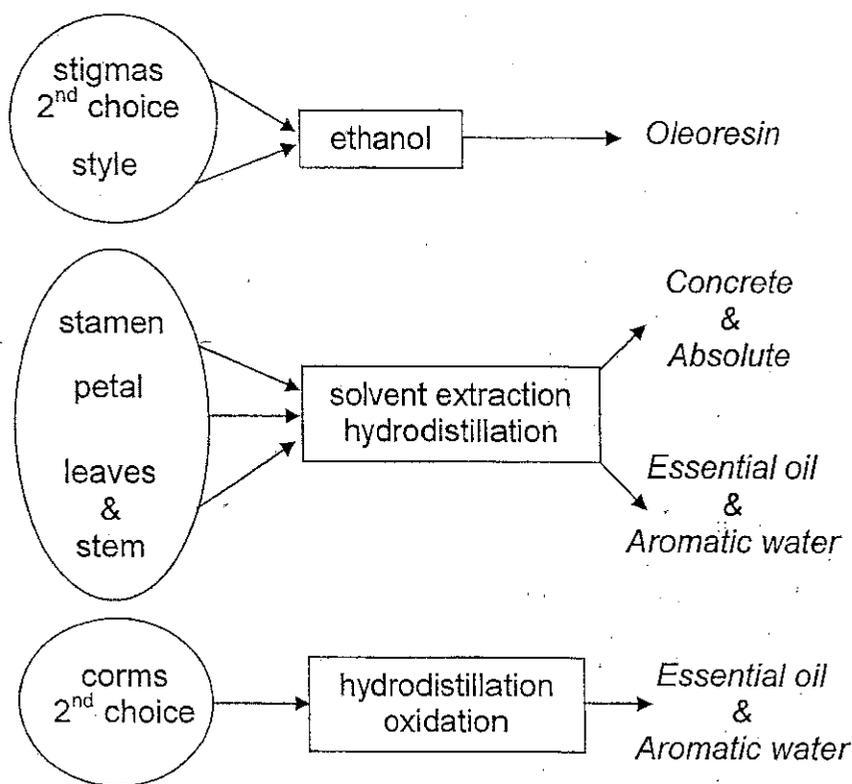
The objective of this work was the development of new ways of adding value to saffron by-products. This approach is also known as the agrosresource refining concept (ARC) for different parts of the plant. ARC has been widely used for different parts of the sunflower plant. Apart from the main product, sunflower oil, cosmetic products<sup>2</sup> and fuels,<sup>3</sup> have been produced from the oil cake. From stem and flower, essential oil was extracted and both paper pulp and low density agromaterials similar to polystyrene<sup>4</sup> have been developed.

The objective of this work was to apply ARC (Figure 1) concept to *Crocus sativus* L. in order to investigate its potential for obtaining aromatic and dye products from flowers, leaves and bulbs. On flowers, previous studies have been focused on characterisation of pigments present in petals as anthocyanins and flavonoids,<sup>5,6</sup> but to our knowledge the aromatic aspect of flower by-products has not yet been investigated. Hence, the characterisation of key odorous compounds present in saffron fresh flowers was the main goal of this study.

### 3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.1 Plant material used and agresource refining concept (ARC)

The plant used in these experiments was *Crocus sativus* L. Flowers were harvested in Quercy area (South-West of France) and immediately shipped to us for analysis. The ARC protocol is shown in (Figure 1).



**Figure 1** Agresource Refining Concept (ARC) applied to *Crocus sativus* L.

### 3.2 Extraction

**3.2.1 Hydrodistillation.** Fresh flowers (800 g) were extracted by hot water (5 L) in a adapted Clevenger apparatus over eight hours. Aromatic water was recovered at the end of hydrodistillation. Essential oil was extracted from the water using dichloromethane (3x20 mL). Solvent was then evaporated under a nitrogen flow until obtaining 1 mL of extract.

**3.2.2 Maceration.** Fresh flowers (70 g) were extracted by maceration in a glass vessel with two different solvents (750 mL), diethyl ether and hexane, under stirring. Times of maceration tested were: 15 min, 30 min and 60 min. After maceration, the extracts were filtered. Solvent was evaporated, under vacuum from hexane extract and under nitrogen flow from diethyl ether extract. Different concentrates, called "concretes", were obtained. From a 10 mg aliquot of the concrete, waxes were removed by using absolute ethanol (750 mg), leading to extracts called "absolutes". These extracts were filtered by a PTFE 0.45  $\mu\text{m}$  filter before being analyzed.

### 3.3 Analytical methods

**3.3.1 Aromatic Water.** Dynamic Headspace<sup>7</sup> (DHS) technique was used to concentrate aromatic water volatiles. Aromatic water (15 g) was placed into a glass vessel during 40 min for headspace equilibration. Aroma compounds trapped on Tenax TA (130 mg) were analyzed by combined gas chromatography (GC, HP 5890, Hewlett Packard, France) and mass spectrometry (MS, HP 5971, Hewlett Packard, France) using a BPX5 column (60 m, 0.32 mm i.d., 1  $\mu\text{m}$  f.t., SGE, France). Desorption of volatile compounds from Tenax (220°C, 5 min) was performed by a thermal desorption injector (CHISA, SGE device, France). An initial oven temperature of 40°C was used followed by a rate increase of 5°C.min<sup>-1</sup> to 280°C. Mass spectra were obtained with 70 eV electron impact ionisation from  $m/z$  15 to 350. Volatile compounds were identified by comparison of their spectra with those of the NIST 98 (Agilent, France) and WILEY (Hewlett Packard, France) libraries and using retention indices.<sup>8</sup>

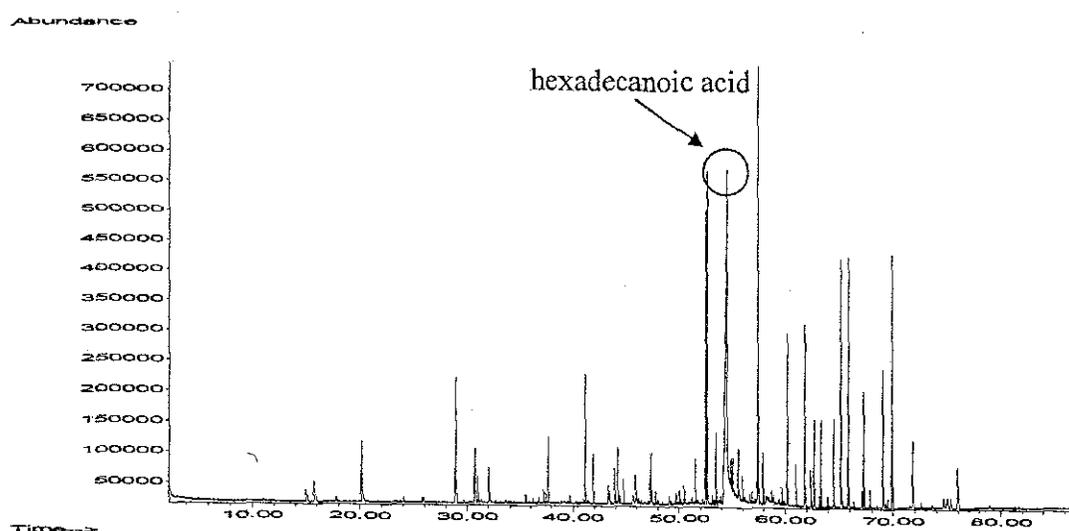
**3.3.2. Essential Oil.** Essential oil was analyzed by a gas chromatograph (HP 5890) coupled to a mass spectrometer (HP 5971) and performed with a DB5ms column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  f.t.). The conditions were as follows : helium carrier gas flow rate 1.3 mL.min<sup>-1</sup>, temperature program; 40°C, 2°C.min<sup>-1</sup>, 100°C, 4°C.min<sup>-1</sup>, 250°C, 20 min; split 10 mL.min<sup>-1</sup>; detector 250°C, injector 200°C. Compounds were identified by comparison of their spectra with those of the NIST 98 and WILEY libraries and using retention indices.

**3.3.3 Absolute from Hexane and Diethyl ether Extracts.** GC/MS-olfactometry (GC/MS-ODP) system consisted of a gas chromatograph (Agilent 6980, France) coupled to a mass spectrometer (Agilent 5973N, France) and an olfactory detector port (ODP<sub>2</sub>, Gerstel GmbH, RIC, France). At the end of the DB5ms column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  f.t., JW Agilent Technologies, USA), the effluent was split in a 1:2 ratio between mass selective detector and sniffing port. Helium was used as carried gas at a constant flow rate of 1.4 mL.min<sup>-1</sup>. Oven temperature started at 90°C and was increased at a rate of 5°C.min<sup>-1</sup> to 280°C over a 20 min period. The "absolute" sample (2  $\mu\text{L}$ ) was injected (split 10 mL.min<sup>-1</sup>; 200°C injector temperature; 290°C detector temperature). An expert assessor, trained on saffron stigmas, evaluate three replicates using ODP device. Odors were described and their intensities were posteriorly recorded on a scale from 1 to 5. Replicates

scores were averaged to establish an aroma profile of the "absolute" samples. Additionally, an olfactory intensity device (OID) was used to mark odor-active zones in the chromatogram, in order to identify compounds by comparison of their spectra with those of the NIST 98 and WILEY libraries and using retention indices.

#### 4. RESULTS AND DISCUSSION

The hydrodistillation of fresh saffron flowers was not enough efficient. Essential oil was extracted from aromatic water in order to be characterized. The GC/MS profile of the dichloromethane extract (Figure 2) shows that the main compound was hexadecanoic acid (20% of total area). The volatiles which contribute to the overall odor (Table 1) were: 2-ethyl-1-hexanol and phenylethyl alcohol giving both "floral" notes and phenylacetaldehyde, L-carvone and ionol giving "herbaceous" notes.<sup>9</sup>



**Figure 2** GC/MS chromatogram of fresh saffron flowers essential oil obtained by hydrodistillation

Headspace volatile compounds of aromatic water were extracted by DHS and identified by GC/MS. The aroma profile (Figure 3) indicated that main compounds were nonanal (50.2 %), heptanal (15.3 %) and hexanal (20.5 %). These odor active molecules give, respectively, "floral", "fatty" and "green" notes. Concerning minor compounds, some were found to be odorous and are thus susceptible of contributing to the aroma of fresh saffron flowers as benzaldehyde associated to an "almond" note, octanal to a "fatty citrus-like" note and safranal to a "saffron" note. Aromatic water contained mainly aldehydes which probably originated from oxidation of double bound compounds.

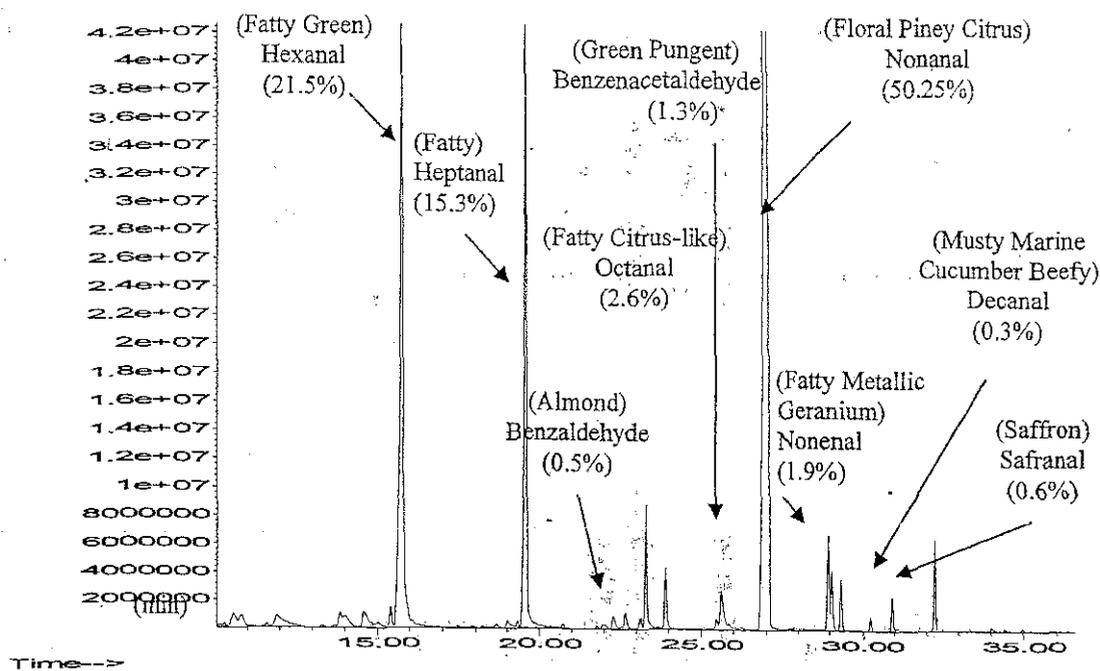
**Table 1.** Identification of aroma volatile compounds in essential oil obtained from fresh saffron flowers hydrodistillation

Identification <sup>a</sup>	Area Percent (%)	Mass spectral data [m/z (%)]	Retention Indices <sup>b</sup>	Descriptors given by literature <sup>c</sup>
2-ethyl-1-hexanol	0.5	57(100), 41(50), 55(40), 70(39), 83(38), 55(37), 84(3)	1024	Oily, sweet, slightly floral-rose odor
phenylacetaldehyde	1.5	91(100), 120(30), 92(30), 65(29), 39(10), 51(8)	1036	Powerful, penetrating pungent-green, floral and sweet odor
phenylethyl alcohol	2.7	91(100), 92(50), 122(40), 65(30)	1104	Mild, warm, rose-honey-like odor
L-carvone	3.9	82(100), 54(40), 93(58), 108(35), 150(10), 135(2)	1231	Warm-herbaceous, breadlike, penetrating and diffusive odor, somewhat spicy
ionol	1.0	121(100), 43(70), 161(69), 91(50), 105(48), 136(40), 179(30), 194(10)	1395	Sweet, oily-herbaceous, warm odor with floral-balsamic undertones

<sup>a</sup> Identification by comparison of their spectra with those of the NIST 98 and Wiley libraries <sup>b</sup> Experimental retention indices <sup>c</sup> S. Arctander, Perfume and Flavor Chemicals, 1994, Vol. 1-2.

The various diethyl ether extracts (15 min, 30 min and 60 min) possess four common notes among which a "burned" and two "floral honey" notes (A and B, figure 4) were very intense ("burned" note upto 3.7 units and "floral honey" notes upto 3.0 and 4.0). In addition to these notes, other odorants are present in high amounts in single sample. In the shortest time maceration a "bread" note was present, in the 30 min maceration sample it was a "pungent green" note and for the longest time maceration, an intense "peanut" note was perceived (3.7 units). It has been observed that the "burned" and "mushroom" notes were increasing with increasing maceration time whereas the "bread" one was decreasing.

A total of 14 volatile compounds possess detectable odors in hexane extracts whereas in diethyl ether extracts only eleven notes were perceived. Main notes were "burned" and "pungent green". Moreover, the 15 min maceration sample contained intense "mushroom" and "floral honey" notes (3.7 and 5.0 respectively) and the 30 min maceration one featured a second intense "burned" note (4.3) and the same "floral honey" note (4.7). The "mushroom" and "floral honey" notes were decreasing with increasing maceration time.

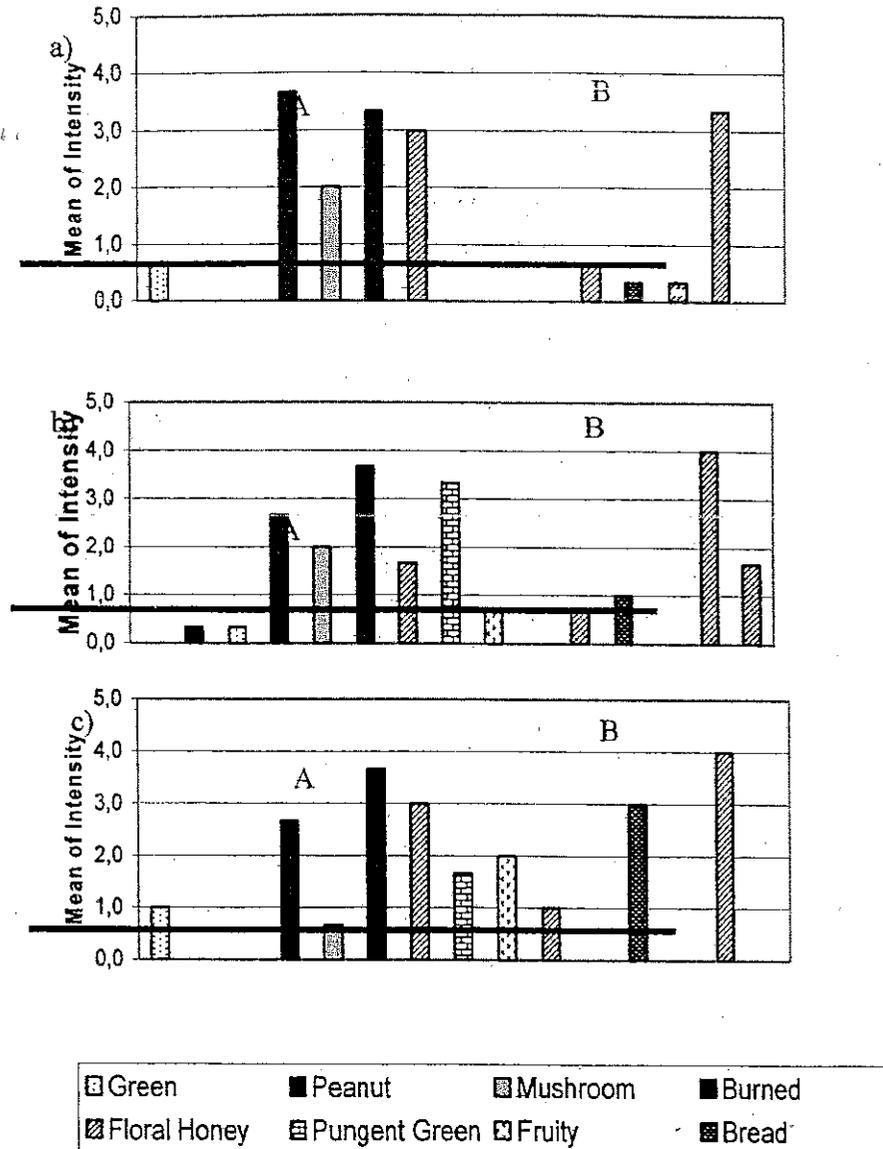


**Figure 3** Chromatogram obtained by DHS/GC-MS of aromatic water from hydrodistillation of fresh saffron flowers. Aroma descriptors used are coming from the literature<sup>9</sup>

Maceration at room temperature is a softer process to obtain volatiles from fresh flowers. Extractions were made with two solvents. Firstly, diethyl ether was used for its high extraction power and secondly, hexane was used as a commonly used solvent in industrial processes. Whatever the maceration time and the solvent used, no significant variation of extraction yield was noticed (Table 2). Yellow sweet-smelling absolutes have been obtained after removing waxes. The sensory characteristics of the flower absolutes were obtained by GC sniffing. The sum of intensity values of the detected odors are visualized in the aroma profile of each sample (Figure 4 and Figure 5). A mean intensity of 0.7 was considered as noise level. The odor of active volatile compounds detected at the sniffing port could be classified in 13 categories: "green", "peanut", mushroom", "burned", "floral honey", "bread", "floral", "pungent honey", "fruity", "fresh honey", "roasted", "pungent green" and "animal" notes.

**Table 2** Yield of extraction of fresh saffron flowers according to solvent and maceration time

Solvent	Diethyl ether			Hexane		
Maceration time (min)	15	30	60	15	30	60
Yield of maceration (%)	0.46	0.33	0.41	0.31	0.27	0.31



**Figure 4** *Aroma profiles of fresh saffron flowers absolute corresponding to increasing duration of diethyl ether maceration 60 min a), 30 min b) and 15 min c)*  
 (A) : phenylethyl alcohol  
 (B) : 4-hydroxybenzeneethanol

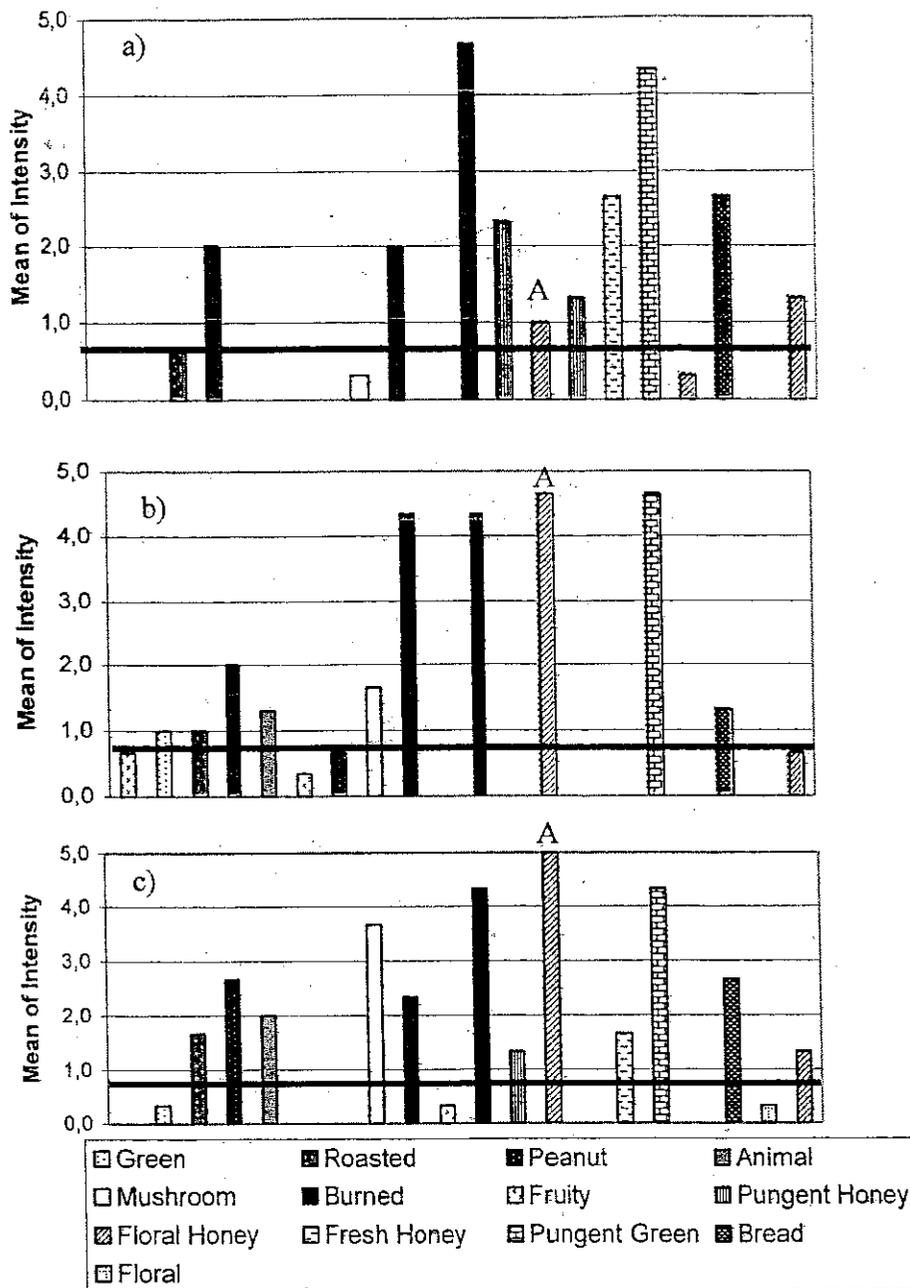


Figure 5 *Aroma profiles of fresh saffron flowers absolute corresponding to increasing duration of hexane maceration 60 min a), 30 min b) and 15 min c) (A): phenylethyl alcohol*

In radar plots (Figures 6 and 7), the intensities of the same odor perceived at the sniffing port were summed to visualize their impact in the global aroma of the extract. The aromatic pattern is very different for diethyl ether and hexane extracts. Hexane extracts contained more odorants with "fresh honey" and "roasted" notes and also many strong odorants with pyrogenous notes like "burned", "pungent green" and "pungent honey". Diethyl ether extracts were essentially characterized by the intense, persistent and penetrating "floral honey" odor class (B).

A sensory analysis on concretes has been made by a French perfumer. Concretes from diethyl ether featured intense "honey" and "warm" notes reminding "mimosa", "broom" and "marigold" concretes. In the hexane concrete, "burned" and "green" notes were particularly present, the latter increasing with the maceration time.

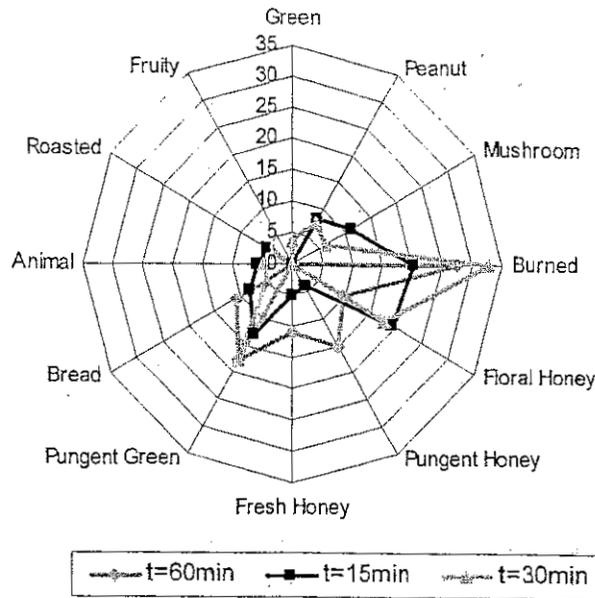
Instrumental sensory results on absolutes justified the sensory evaluation made by the perfumer on concretes.

Despite their very low MS response, many compounds which contribute to absolutes aroma were identified by mass spectra and retention times of GC/MS analysis (Table 3). They are also characterized by their QID peak areas and the odors described (Figure 8). In hexane extracts the "pungent green" note was related to 2-phenylethyl ester of formic acid and the "burned" one may be undecane. The "floral honey" note (A) which is much more intense in hexane extract was identified as phenylethyl alcohol and the second one (B), which is typical of the diethyl ether extract, was identified as 4-hydroxybenzenethanol.

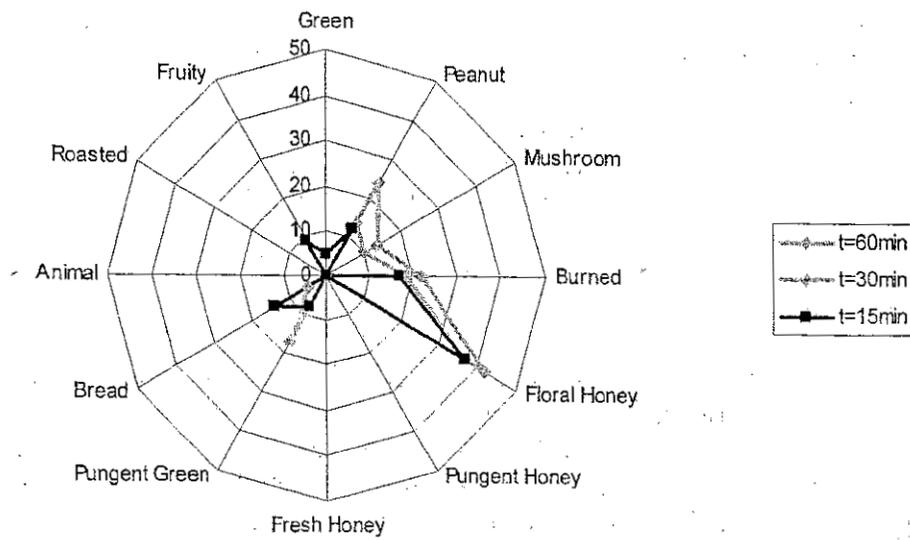
**Table 3** Identification of key-odor compounds of fresh saffron flowers absolute by comparison of their spectra with those of the Nist 98 and weiley libraries and literature

Odor <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	Mass spectral data [m/z (%)]	RT(min)	RI <sup>c</sup>
Green	Hexanal	44(100), 56(80), 57(60), 72(35), 82(20), 67(15)	2.36	808
Animal	Heptanal	44(100), 70(70), 55(60), 57(45), 81(20), 86(10), 96(5)	2.96	906
Mushroom	1-octen-3-one	55(100), 70(80), 27(40), 83(10), 97(10), 111(2)	3.66	979
Burned	Undecane	57(100), 43(80), 71(70), 85(40) 70(5), 84(3), 99(2), 156(2)	5.30	1097
Floral honey	Phenylethyl alcohol	91(100), 44(60), 92(50), 122(35), 152(5)	5.89	1125
Pungent green	2-pheny-ethyl formate	104(100), 91(75), 51(25), 105(15), 92(10), 103(5), 122(2)	6.83	1176
Floral Honey	4-hydroxy- benzeneethanol	107(100), 138(30), 77(28) 108(4)	11.71	1367

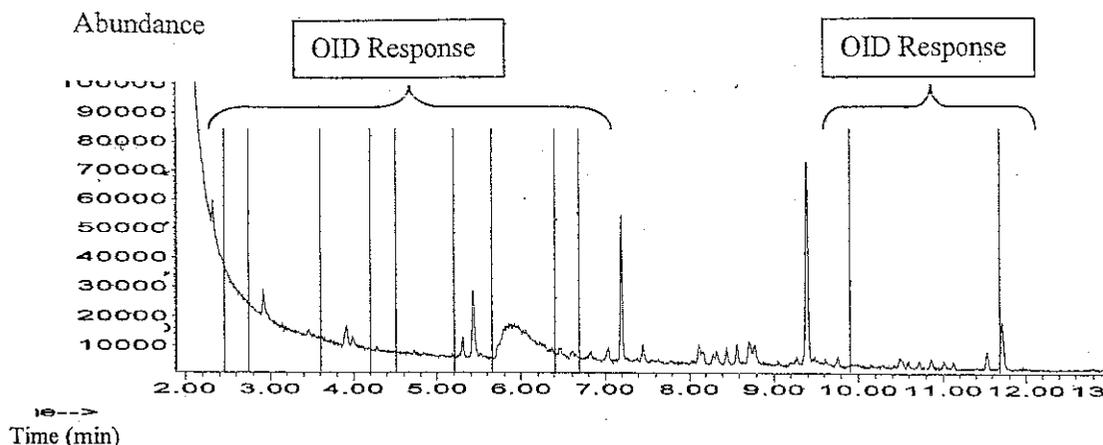
<sup>a</sup> Perceived at the sniffing port <sup>b</sup> Identification by comparison of their spectra with those of the NIST 98 and Wiley libraries <sup>c</sup> RI: Retention index, Experimental retention indices



**Figure 6** Aroma profiles of notes from fresh saffron flowers absolute corresponding to increasing duration of hexane maceration



**Figure 7** Aroma profiles of notes from fresh saffron flowers absolute corresponding to increasing duration of diethyl ether maceration



**Figure 8** *OID (Olfactory Intensity Device) and GC/MS responses of fresh saffron flowers absolute from hexane maceration (time=15 min)*

## 5. CONCLUSIONS

The objective of the reported investigations was to add value to saffron flower waste material. Absolutes from hexane macerations with their intense "honey" and "pungent green" notes could find an application in fragrance industry. Concretes from saffron flowers without stigmas possess an intense yellow color conferred by carotenoids suggesting a possible use in cosmetic and food industries which are increasingly interested in plant dyes.

In the framework of the agroresource refining concept (ARC), our research on *Crocus sativus* L. is still underway to find potential application to all plant organs (style, petals, stamens, leaves, stem and corms) into value.

## References

- 1 I. Kubo and I. Kinst-Hori, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4121.
- 2 M. Diot, C. Bonne and D. Sincholle, 1991, WO 91/11169.
- 3 S. Yorgun, S. Sensoz and O. M. Kockar, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2001, **60**, 1.
- 4 V. Marechal, L. Rigal, *Ind. Crops Prod.*, 1999, **10**, 185.
- 5 H. Ebrahimzadeh and T. Radjabian, *J. Sci. I. R. Iran*, 1998, **9**, 127.
- 6 R. Norbaek, K. Brandt and J. K. Nielson, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2002, **30**, 763.
- 7 S. Breheret, T. Talou, S. Rapior and J. M. Bessière, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 831.
- 8 N. Kondjoyan and J. L. Berdagué, 'A Compilation of relative Retention Indices for the analysis of aromatic compounds', Edition du Laboratoire Flaveur, Saint Genes Champanelle France, 1996.
- 9 S. Arctander, 'Perfume and Flavor Chemicals', Allured Publishing Corporation, Carol Stream FL, 1994, 1-2.

# Influence of dehydration on key-odour compounds of saffron

Marjorie Bergoin-Lefort<sup>a</sup>, Christine Raynaud<sup>a</sup>, Gérard Vilarem<sup>a</sup>,  
Thierry Talou<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Agro-Industrial chemistry, 118 route de Narbonne, 31077  
Toulouse, France

Keywords: saffron, moisture, UV, SPME, olfactometry

## 1. ABSTRACT

Nine new compounds have been identified in saffron and six new key-odorous ones were detected using frequency detection GC/O method. A remaining high moisture content in saffron after drying process induces modifications in chemical composition and on aroma with the emergence of HTCC and an “animal” note the 3-methylbutanoic acid.

## 2. INTRODUCTION

Safranal is the major constituent of saffron volatile fraction, generated by hydrolysis and enzymatic reactions during drying process [1]. The quality of the aroma, colour and flavor of saffron depend on drying process [2] and on final moisture content [3-4]. Currently, these properties are evaluated by international standard ISO/TS 3632 [5], measuring safranal, crocin and picrocrocin by spectrophotometry. But minor compounds contribute to the overall aroma like for example 2-hydroxy-4,4,6-trimethyl-2,5-cyclohexadien-1-one (lanierone) [6] and the absorption of cis-crocin at the same wavelength as safranal and its low solubility in water, overstated the total content of safranal [7]. The aim of this work was to determine the real impact of dehydration process on saffron properties, colour, flavor and aroma using complementary analytical methodologies.

## 3. MATERIALS AND METHODS

Eight saffron samples (2003) from Quercy area (France) were dried by two producers, using two different drying processes: (A) electrical dehydrator, from 55°C to 60°C (depending on moisture content) during 40 min or (B) ventilated oven at 60°C during 30 min. Moisture content and safranal, crocin and picrocrocin contents were measured as described in standard ISO/TS 3632-2 [5] by spectrophotometry, giving  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ . Volatiles from 0.2g of dried stigmas were extracted by a SPME using a carboxen-PDMS fiber [9].

All the samples were analysed by a GC/MS (Agilent 6980/5973N, France) with a DB5ms column (30m, 0.25mm i.d., 0.25 $\mu$ m f.t., JW Agilent Technologies, USA) coupled to an Olfactory Detector Port (Gerstel-ODP2, RIC, France) GC/MS/ODP [10] (split ratio 1:2). Helium was used as carried gas at a constant flow rate of 1.4 mL.min<sup>-1</sup>. Oven temperature started at 40°C during 1 min and was increased at a rate of 5°C.min<sup>-1</sup> to 100°C, at 3°C.min<sup>-1</sup> to 125°C and at 6°C.min<sup>-1</sup> to 240°C. Compounds were identified by comparison of their spectra with those of the NIST 98 (Agilent, France) and WILEY (Hewlett Packard, France) libraries, using retention indices and literature [1, 6, 11]. To GC sniffing, ten panelists were asked to assign a descriptor from a list of 15 odour classes. Data acquisition was performed by a dedicated SNIF Software (Wageningen University). The analytical and olfactive data were treated using ANOVA. Relationships between data and moisture and crocin contents were explored by Partial Least Square (PLS) regression.

#### 4. RESULTS

The content of moisture, crocin, picrocrocin and safranal in saffrons is presented in Table 1. Two saffrons (B3 and B4) are excluded from category I.

Table 1. Secondary metabolites and moisture rates of saffron samples from producers, dried with two different processes (A and B).

Saffrons	A1	A2	B1	A3	A4	B2	B3	B4
MC%	6.36	6.49	6.49	8.64	8.87	13.58	18.05	19.14
E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup> Picrocrocin	93.8	114.5	97.2	106.5	105.4	95.4	84.3	82.4
E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup> Crocin	270.5	274.3	235.8	256.8	255.2	221.8	129.1	84.7
E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup> Safranal	11.7	27.4	24.7	31.3	26.2	27.7	26.6	32.5

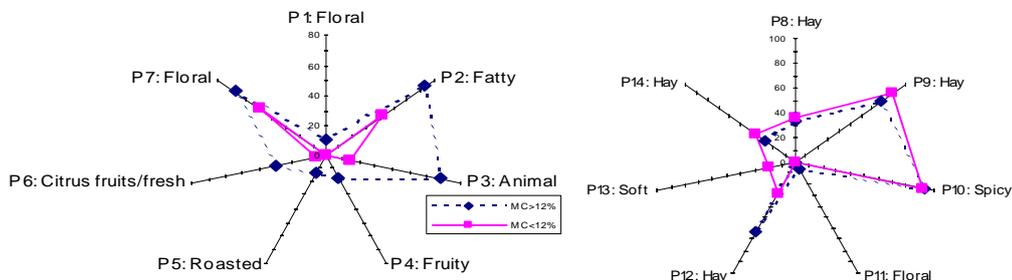
35 volatiles were extracted by SPME from saffron samples and 32 were identified by GC/MS. Nine of them have never been reported in literature (Table 2.) Three compounds are coeluted with safranal: verbenone [12], eucarvone [6] and 2-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dione [11]. According to the ANOVA only two volatiles were nonsignificant ( $p > 0.05$ ) in discriminating saffrons. PLS1 on analytical data gives successful prediction for moisture (coef. of calib, 0.999, coef. of valid., 0.989) and crocin rates (coef. of calib, 0.996, coef. of valid., 0.913). PC<sub>1</sub> described a moisture and a crocin dimension. Loading weight plots show that HTCC and two unknown compounds (RI: 1078, 1176) predict moisture content.

14 odorous areas were detected in all the saffrons. The more odorous sample (B4) and the less one (A2) had respectively 11 and 5 odorous areas. Peaks, 7, 9 and 10 have been sniffed in all the samples as peak 2 and 8 (except in A2 see Table 2.). Saffron samples (Figure 1) were especially “hay” and “spicy” but could be “fatty” and “animal” when the moisture content was high. PLS1 on sensory data confirms that moisture content is correlated to 3-methylbutanoic acid, which give an “animal” note.

Table 2. Volatiles and descriptors identified from saffrons using SPME/GC/MS/ODP. \*Indicates compounds not previously detected in saffron, \*\* Indicates odorous compounds not previously detected in saffron aroma. <sup>a</sup>Frequency detection odour calculated on overall saffrons. <sup>b</sup>Frequency of assignment of odour descriptors  $\geq 20\%$ .

RI	Compounds	Frequency detection <sup>a</sup>	Odours Descriptors <sup>b</sup>
496	<b>ethanol*</b>		
506	<b>acetone* **</b>	P1: 3.7%	Floral (67%), spicy (33%)
601,621	2,3-butadione [6] + acetic acid [6]	<b>P2: 58.7%</b>	Fatty (68%), acidic/pungent (26%)
658	<b>2-methyl-1-pentene*</b>		
667	<b>1-hydroxy-2-propanone*</b>		
701	<b>propanoic acid*</b>		
709	3-hydroxy-2-butanone [6]		
802	hexanal [8]		
843	3-methylbutanoic acid [6]	P3: 25.0%	Animal (59%)
854	<b>2-methylbutanoic acid**</b>	P4: 6.2%	Fruity (40%), roasted (20%)
912	<b>2-[5H]-furanone** [6]</b>	P5: 5.0%	Roasted (20%), spicy (20%)
1040	$\beta$ -isophorone [1]		
1063	2,2-dimethylcyclohexane-1-carboxaldehyde [1]		
1091	<b>1-(3,4-dimethylphenyl)-ethanone*</b>		
1100	linalool [6]	P6: 20.0%	Citrus fruits/fresh (41%), fruity (24%)
1104	nonanal [8]		
1108	2-methylene-6,6-dimethyl-3-cyclohexene-1-arboxaldehyde [11]		
1115	phenylethylalcohol [11] + 2,6,6-trimethyl-3-oxo-1-cyclohexene-carboxaldehyde		
1121	<b><math>\alpha</math>-isophorone**[11]</b>	<b>P7: 56.2%</b>	Floral (40%), hay (28%)
1143	<b>4-Ketoisophorone**[11]</b>	<b>P8: 35.0%</b>	Hay (55%)
1156	lanierone [1, 6]	<b>P9: 83.7%</b>	Hay (49%)
1164	<b>6-hydroxy-2,4,4-triméthylcyclohex-2-èn-1-one*</b>		
1171	2,2,6-trimethyl-1,4-cyclohexanedione [11]		
1185	<b>ethylbenzaldehyde*</b>		
1199	safranal [11, 6]	<b>P10: 92.5%</b>	Spicy (70%)
1121	<b>eucarvone**</b>	P11: 3.7%	Floral (67%), roasted (33%)
1306	2,6,6-trimethyl-3-oxo-1,4-cyclohexadiene-1-carboxaldehyde [11] + $\beta$ -safranic acid [1]		
1335	undetected	P12: 41.2%	Hay (51%), floral (31%)
1379	undetected	P13: 11.2%	Soft (33%), unidentified (33%)
1387	<b>2,4,4-trimethyl-3-carboxaldehyde-5-hydroxy-2,5-cyclohexadien-1-one*</b>		
1417	undetected	P14: 32.5%	Hay (45%)
1426	HTCC [11]		

Figure 1. Sensory profiles of saffrons, MC<12% (A1, A2, B1, A3, A4) and MC>12% (B2, B3, B4). For each odorous area, the pourcentage indicate the frequency detection among MC<12% and MC>12% samples and the descriptor associated was the frequentliest used by panelists.



## 5. DISCUSSION AND CONCLUSION

The increase of moisture content (Table 1) induces a crocin deterioration by auto-oxidation, as mentioned by Alonso and al. [3], whereas safranal and picrocrocin seem to be stable. But the headspace extraction by SPME shows that safranal, product of picrocrocin hydrolysis, increased slightly with the moisture content (MC < 12%: 75%, MC > 12%: 80%) as demonstrated by Tsimidou [4]. The increase of HTCC is generated by soft hydrolysis in high moisture content medium [1]. The presence of  $\beta$ -safranic acid in samples (MC > 12%) could be the result of safranal oxidation [12]. Safranal and lanierone, giving respectively “spicy” and “hay” notes, were the major odorous detected compounds (92.5% and 83.7% of frequency detection) although the lanierone was present in a low amount compared to safranal (respectively 0.1% and 76.7% of total area). Other minor volatiles participate to the saffron aroma. 15 compounds have been reported as odour active volatiles, five have been previously identified by Cadwallar and al. [6] and six were odorous compounds identified for the first time in saffrons. The 3-methylbutanoic acid, responsible of the animal note (Figure 1), could appear by oxidation of the corresponding aldehyde in a high water content medium (MC > 13.6%). Drying process and moisture content have a big impact on colour but also on chemical composition of volatiles and on aroma, i.e HTCC and an “animal” note.

## References

1. W. Rodel and M. Petrizka. *J. High Resolution Chromatogr.* 14 (11) (1991) 771.
2. B.L. Raina and S.G. Agarwal. *J.Sci. Food Agri.* 71 (1996) 27.
3. G.L. Alonso and R. Varon. *Boll. Chim. Farmaceutico.* 132 (4) (1993) 116.
4. M. Tsimidou and C.G. Biliaderis. *J. Agri. Food Chem.* 45 (8) (1997) 2890.
5. International Standard, Saffron-Specification, ISO/TS 3632-1 and 3632-2, International Organization for Standardization, 2003.
6. K.R. Cadawaller and H.H. Baek, *Spices : Flavor Chemistry and antioxidant Properties*, Washington, US, 1997, pp. 66-79
7. G.L. Alonso and M.R. Salinas. *Food Sci. Tech. Int.* 7 (3) (2001) 229.
8. M. D’Auria and G. Mauriello. *Flavour Fragr. J.* 19 (2004) 17.
9. M. Bergoin and C. Raynaud, *Proceeding of the First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology in Acta Horticulturae*, Leuven, Belgium, 2004, pp.355-360.
10. M. Bergoin and C. Raynaud. *Investigation on Aroma Volatiles from Fresh Flowers of Saffron (Crocus sativus L.)*, *Recent Advances in Food and flavor Chemistry*, in press.
11. N. S. Zarghami and D.E. Heinz. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 4 (2) (1971) 43.
12. P.A. Tarantilis and M. G. Polissiou. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 459.

---

### **Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants**

La caractérisation des composés volatils des stigmates a permis une meilleure connaissance de l'arôme du safran. La typicité du safran du Quercy a été démontrée. Le safran frais libère majoritairement du linalool. Une teneur en eau résiduelle élevée induit des hauts taux d'HTCC et de safranal (note "épicée"), la dégradation de la couleur et la synthèse de l'acide 3-méthylbutanoïque (note "animale"). Le potentiel moléculaire des bulbes, des feuilles et des fleurs a été évalué afin de proposer de nouvelles valorisations. Les bulbes possèdent une teneur élevée en amidon et leur fraction lipidique est riche en acides gras oméga 6. Les concrètes de fleurs et de feuilles donnent des notes "miellées" (2-phényléthanol) et "vertes". Les caroténoïdes présents dans ces organes sont des xanthophylles en  $C_{40}H_{56}O_4$  et en  $C_{40}H_{56}O_2$ , estérifiées par des acides gras dans le cas des fleurs. L'extraction des molécules aromatiques et colorantes a été réalisée avec succès à l'échelle pilote.

safran, composé volatil, CPG-O, concrète, caroténoïde

---

### **Application of the Agresource Refining concept to saffron (*Crocus sativus*), aiming the utilisation of its by-products for aroma and dyeing purposes**

The characterization of stigmas volatiles has allowed gaining further insight into the aroma of saffron. The specificity of saffron from the Quercy area has been demonstrated. The main volatile compound of fresh stigmas is linalool. High moisture content induces an increase of HTCC and safranal (spicy note), a loss of colour and the formation of 3-methylbutanoic acid (animal note). The molecular potential of bulbs, leaves and flowers has been evaluated to suggest novel utilisation strategies for the by-products of saffron cultivation. Bulbs contain a high amount of starch and their lipid fraction is rich in omega 6 fatty acids. Concretes from flowers and leaves give "honey" (2-phenylethanol) and "green" notes. Carotenoids from flowers and leaves were identified as  $C_{40}H_{56}O_4$  and  $C_{40}H_{56}O_2$  xanthophylls, esterified by fatty acids in the case of flowers. The extraction of aromatic and colouring molecules has been successfully tested at pilot scale.

Saffron, volatiles, GC-O, concrete, carotenoids