

Stage de césure 2015

Impact des procédés sur la qualité du poivre de la Réunion (*Piper borbonense*)



Alioune Diop
IRC Sup'Agro

Remerciements

Au terme de ce stage riche en expériences, je souhaite remercier sans limites Mathieu Weil qui m'a redonné une deuxième chance pour un stage qui a été initialement annulé du fait du décès de mon père Modou Awa Balla Diop à qui je dédie toutes les œuvres que je réaliserai dans ma vie. C'est bien grâce à lui que j'en suis arrivé à ce niveau d'étude ; grâce à sa persévérance sur mon éducation, son aide financière et morale. Ce séjour fut donc enrichissant mais aussi ressourçant par rapport aux mois difficiles qui précédaient le stage. Mathieu m'a très bien accueilli, m'a fait confiance durant toute la durée de mon stage en me responsabilisant sur tous les essais sur le poivre ; il m'a donc parfaitement intégré à ses travaux de thèse.

Je tiens à remercier profondément Mathilde Hoarau et Jérôme Minier qui m'ont formé aux travaux de laboratoire. Mathilde m'a guidé sur toutes les analyses de laboratoire sur le poivre, c'est à elle que je dois mon autonomie rapidement acquise.

L'intégration au sein du CIRAD a été très facile avec l'équipe de l'UMR QualiSud qui a été très accueillante, je pense à Marc Chillet, Bastien Barral et Fabrice Davrieux ainsi qu'au reste de l'équipe et aux stagiaires qui travaillaient avec moi au laboratoire. Je remercie aussi les autres équipes telles que celles du pôle élevage et du pôle télédétection.

Mes colocataires de la case 19 ont été fabuleux. Notre cohésion, les randonnées, les bons moments que nous avons passés ensemble, les discussions et les bons plats divers du soir seront des souvenirs inoubliables.

Une grande pensée à ma mère, mes frères, mes sœurs ainsi qu'à toute ma famille.

Ce stage a mis au clair mes projets post-diplôme d'ingénieur ; ainsi je compte me diriger vers une thèse qui sera très bénéfique pour ma carrière professionnelle. Je compte retourner au Sénégal après ma thèse pour apporter mes connaissances, ma démarche et mes expériences à la recherche, à l'éducation et au développement des filières de fruits et légumes locaux.

Table des matières

I.	Introduction.....	1
II.	Etude bibliographique	2
II. 1.	Présentation du poivre de la Réunion.....	2
II. 1.	Etude des procédés de transformation du Tsiperifery de Madagascar	3
II. 2.	Evaluation de la qualité du poivre.....	4
	Arôme	4
	Couleur	5
	Microbiologie du poivre	6
III.	Matériels et méthodes	6
III. 1.	Collecte et préparation des échantillons	6
III. 2.	Procédés mis en œuvre sur les échantillons	6
	Essai impact des procédés sur l'huile essentielle.....	6
	Essai impact de l'échaudage sur la teneur en huile essentielle	7
	Essai impact des procédés sur la couleur	7
	Essai impact des procédés sur la flore microbienne du poivre	8
III. 3.	Analyse des échantillons issus des procédés de transformation	9
	Extraction et détermination de la teneur en huile essentielle par hydro-distillation.....	9
	Analyse de la composition aromatique de l'huile essentielle et quantification des constituants..	9
	Détermination de la teneur en matière sèche	10
	Analyse de la couleur	10
	Analyses microbiologiques	11
IV.	Résultats et discussion	11
	Essai - impact des procédés sur la composition aromatique	11
	Essai impact de l'échaudage sur la teneur et la composition en huile essentielle	13
	Essai impact des procédés sur la couleur	15
	Essai impact des procédés sur la flore microbienne du poivre	17
V.	Conclusions et perspectives	18
VI.	Références bibliographiques	19
VII.	Annexes	20

I. Introduction

Etudiant en année de césure tutorée Ingénieur Systèmes Agricoles et Agroalimentaires dans les Pays du Sud (SAADS), spécialité Industries Agroalimentaires (IAAS), j'ai effectué durant 5 mois au CIRAD dans l'UMR QualiSud, à l'Île de la Réunion, un stage sur l'étude de « l'impact des procédés sur la qualité du poivre sauvage de la Réunion (*Piper borbonense*) ». La césure est une période d'arrêt d'un an de cours entre la deuxième et la troisième année d'école d'ingénieur pendant laquelle des stages de longues durées, sélectionnés avec un tuteur de césure et un jury sont effectués pour orienter efficacement ses projets post-diplôme d'ingénieur. Ce stage suit donc une logique de continuité par rapport à mes objectifs de parcours professionnel. Conventionné par l'école, il me permet d'acquérir de l'expérience dans le domaine de la recherche appliquée pour le développement et surtout sera déterminant pour mon choix d'orientation entre l'industrie et la recherche après mon diplôme d'ingénieur.

Le Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), est un centre de recherche et développement rattaché au Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et au Ministère des Affaires étrangères. Les recherches du CIRAD sont axées sur le développement de filières tropicales, de l'agronomie à la transformation des produits ; elles tiennent compte des enjeux locaux et sont toujours menées en partenariat avec les acteurs (producteurs, transformateurs, instituts techniques, centre de recherche ...) des pays du Sud. L'objectif de l'Unité Mixte de Recherche QualiSud qui m'a accueilli durant ces 5 mois « consiste ainsi à développer une démarche intégrée (du champs à l'assiette) pour la production et la préservation de produits et d'aliments de qualité optimale dans les pays du Sud ». **(Présentation UMR 95 Qualisud 2015)**

Mon stage s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche et développement porté par l'UMR QualiSud du CIRAD et financé par la région Réunionnaise qui consiste à développer une filière poivre « haute valeur ajoutée » à la Réunion et qui comprend les éléments suivants :

- calage des pratiques agronomiques – domestication,
- mise au point de procédés de transformation pour l'obtention de produits à haute valeur ajoutée,
- appui à la création d'unités de transformation adaptées.

Mon stage s'intègre complètement dans le projet de thèse de mon maître de stage, Mathieu Weil, qui est « L'étude des procédés de transformation des poivres sauvages d'îles de l'océan indien : impact sur la qualité », et qui vise à répondre aux questions de recherche suivantes : Quels sont les procédés de transformation du poivre sauvage (*Piper spp*) mis en œuvre à Madagascar ? **"Postharvest treatments of wild pepper (*Piper spp.*) in Madagascar. Fruits, 69 (5): 371-380."**

- Quelles sont les opérations unitaires (ou combinées) critiques pour la qualité du produit fini? Des réponses seront apportées dans une publication en cours de rédaction : « **Impact of blanching, sweating and drying operations on quality characteristics of *Piper borbonense*** »
- Quels sont les mécanismes biochimiques et/ou physico-chimiques, qui interviennent et expliquent l'expression (ou la dégradation) de la qualité du poivre lors des opérations unitaires critiques ?
- Quels procédés (durables) peuvent être mis en œuvre en Océan Indien pour exprimer la qualité du ou des poivre(s) sauvage(s) ? **(Présentation lors du comité de thèse de Mathieu Weil)**

L'avancée des recherches sur le poivre de la Réunion a permis d'aboutir aux travaux actuels qui sont l'objet de mon stage : « Impact des procédés sur la qualité du poivre sauvage de la Réunion (*Piper borbonense*) ». Il s'agissait de mettre en œuvre puis de mesurer l'impact de différents procédés de

transformation (comprenant les opérations unitaires d'échaudage, d'étuvage, et de séchage) sur la qualité du poivre. La qualité sensorielle a été appréhendée par l'analyse de l'arôme et de la couleur tandis que des analyses microbiologiques ont permis de caractériser la qualité sanitaire du poivre le long des procédés. La finalité du travail est donc de déterminer quelles sont les opérations (et les conditions opératoires) qui sont critiques, c'est-à-dire qui influencent la qualité du poivre, mais aussi dans un deuxième temps, de comprendre les mécanismes qui interviennent pour pouvoir les maîtriser et proposer ensuite des procédés optimisés par rapport à la qualité attendue.

II. Etude bibliographique

II. 1. Présentation du poivre de la Réunion

Très peu étudié, le poivre de la Réunion n'est pas non plus exploité ; si certains disent en utiliser les feuilles en pharmacopée ou en cueillir quelques grains pour épicer leur carry, il ne fait pas l'objet de filière de commercialisation. Le taxon *Piper borbonense* a été déterminé (sur la base d'échantillons collectés en 2011 par Frédéric Descroix) par le Conservatoire National Botanique de Mascarin. C'est une liane dioïque à tige devenant ligneuse atteignant un diamètre de 4-5 cm à la base et grimpant à une hauteur de 5-10 m sur les arbres supports. En plus des recherches menées sur sa transformation, un travail de domestication est en cours. Rappelons que sur la Grande Ile voisine, à Madagascar, l'exploitation d'espèces cousines de poivres sauvages (Plantes Forestières Non Ligneuses qui portent le nom vernaculaire de Tsiperifery pour poivres sauvages) est incriminée pour ses méthodes de récoltes destructrices : arrachage des lianes et abattage des tuteurs portant les lianes de poivre. Ce phénomène accentue les trouées dans les forêts. Etant donné que les lianes de poivre sont sciaphiles, ce phénomène entrainerait une diminution de la capacité de production de poivre au fil des années. (Annaig Levesque 2012). Actuellement le processus de domestication est étudié à la Réunion par Frédéric Descroix, qui a mis au point le bouturage et teste l'impact de différents niveaux d'ombrage sur la croissance et la fructification des lianes de poivre. (Synthèse bibliographique Mathieu Weil).

Photo 1 : *Piper borbonense*



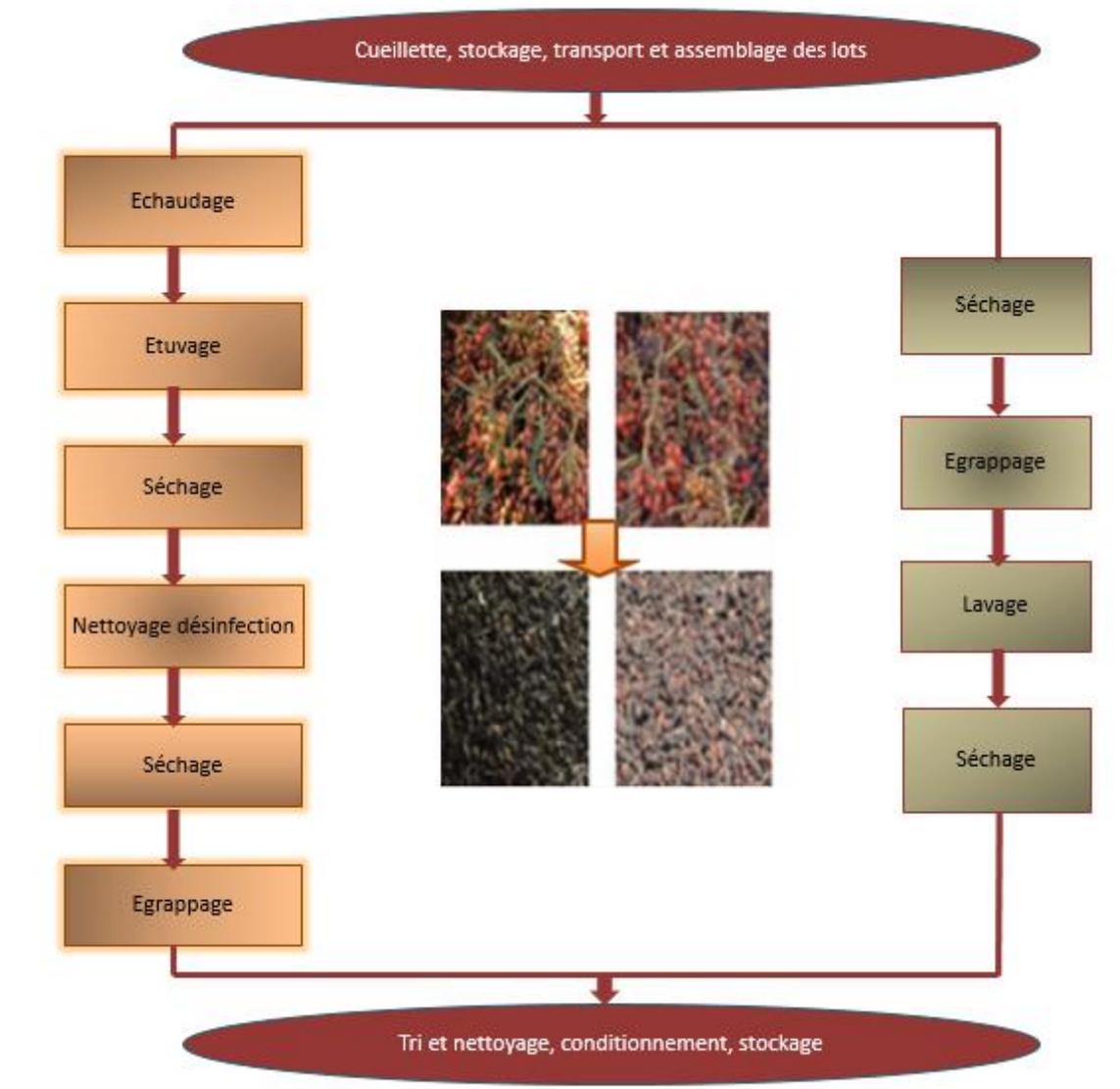
Frais en grappe

Frais, décongelé et égrappé

II. 1. Etude des procédés de transformation du Tsiperifery de Madagascar

Dans la mesure où il n'existe pas de filière d'exploitation du Piper borbonense à la Réunion, il était nécessaire d'étudier la filière malgache où plusieurs espèces de poivres sauvages (appelées Tsiperifery) proches de notre poivre réunionnais sont exploitées et exportées (environ 50 tonnes en sec en 2012) depuis une petite dizaine d'années maintenant.

Figure 1 : Procédés de transformation du Tsiperifery de Madagascar (M. Weil et al., 2014)



Il existe deux voies de transformation : une voie sèche et une voie humide comprenant les opérations d'échaudage et d'étuvage. Chaque voie de transformation donne une qualité différente. Les opérations critiques pour la qualité du poivre sont : l'échaudage, l'étuvage et le séchage.

Echaudage : Il s'agit de mettre le poivre dans de l'eau frémissante (entre 85-100°C) pendant 3 à 5 minutes. Il permet de laver le poivre, de réduire sa charge microbienne, d'augmenter la vitesse de séchage qui suivra et il aura un impact sur sa couleur.

Etuvage : cette opération consiste à mettre, dès la sortie d'échaudage) le poivre dans une atmosphère confinée saturée en eau (par exemple dans une couverture) pendant 12 à 24h. Cette

opération permettrait de laisser un temps de contact entre les enzymes actifs et leurs substrats. Elle aurait un impact sur la couleur et peut être sur l'arôme du poivre.

Séchage : C'est le moyen de conservation le plus utilisé au monde. Il permet de réduire la teneur en eau du produit à un niveau qui inhibe le développement microbien et les activités enzymatiques. Le séchage se fait au soleil et la teneur en eau du poivre passe de 60-70% à 10-15% (en base humide).

II. 2. Evaluation de la qualité du poivre

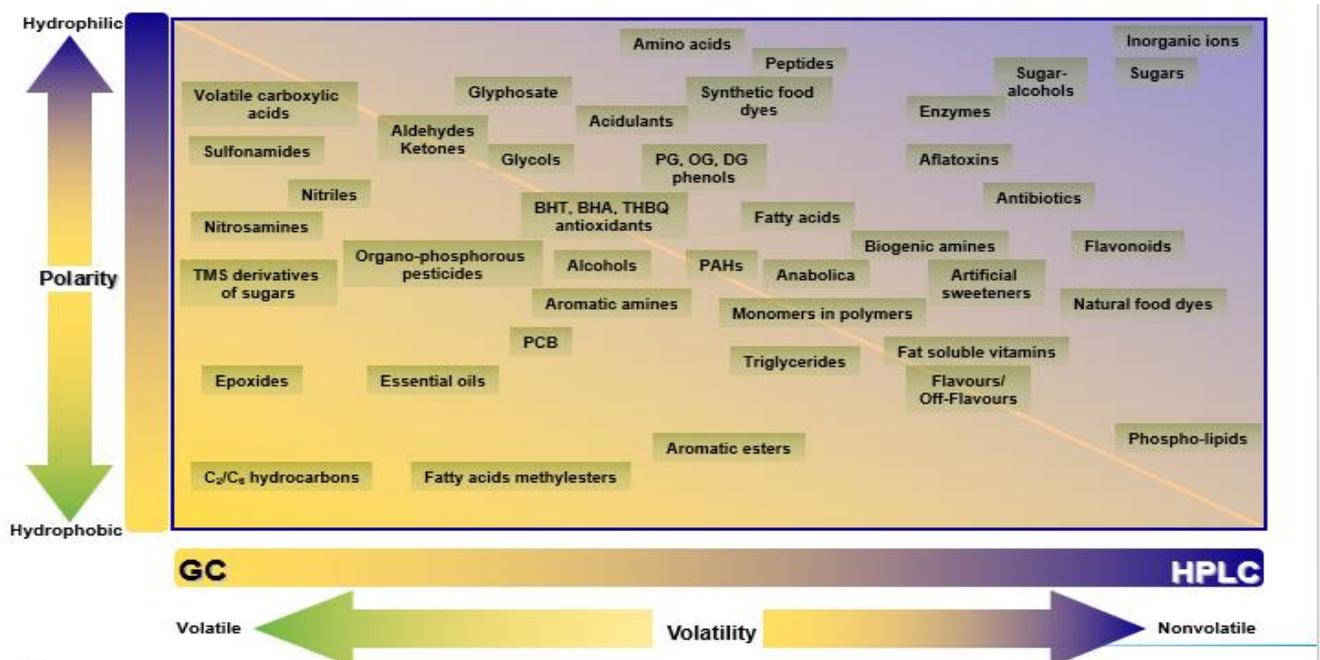
Arôme

Les huiles essentielles sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (Cseke et Kaufman 1999). L'huile essentielle est un liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'un volume plus ou moins important en fonction de la partie de la plante étudiée, qui est obtenu après extraction mécanique, entraînement à la vapeur d'eau ou distillation à sec. Ces extraits peuvent contenir, en fonction du produit, un nombre important de composés. Ils sont pour la plupart, des molécules peu complexes, tels que les monoterpènes (avec leurs phénols liés), ou des terpènes plus complexes, dont les sesquiterpènes. La conjonction de ces molécules donne une note aromatique complète du produit, mais il se peut qu'il y ait des composés qui s'expriment plus que d'autres en fonction de leur quantité dans le produit et de leur seuil de perception (H. Richard).

La chromatographie en phase gazeuse

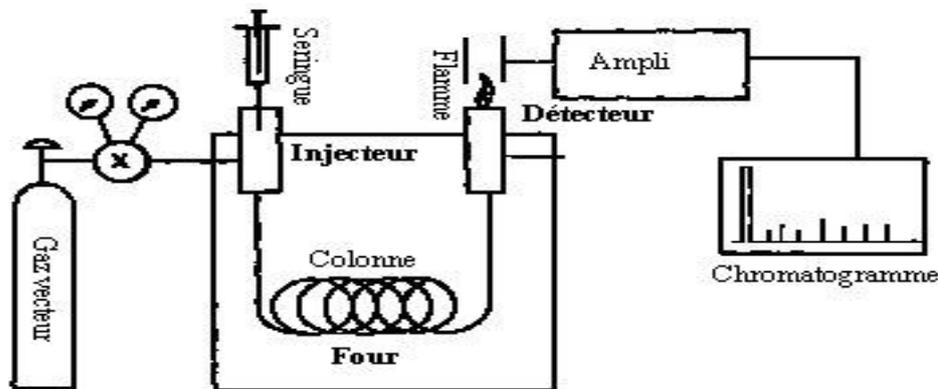
Elle est la technique la plus adéquate pour l'analyse de la composition aromatique de l'huile essentielle ; elle permet la séparation des composés en fonction de leur polarité et de leur volatilité comme l'illustre le graphique ci-dessous.

Figure 2 : Techniques de chromatographie : polarité en fonction de la volatilité des composés (Formation chromatographie en phase gazeuse -M. Rogemont – HTDS International)



Le chromatographe est essentiellement composé d'un système d'injection (manuel ou automatique), d'une colonne (capillaire ou remplie), d'un four, d'un système de détection.

Image 2 : schéma d'un chromatographe en phase gazeuse



L'échantillon à analyser est introduit dans l'injecteur qui le vaporise et le mélange au gaz vecteur (phase mobile) dont le débit est régulé dans la colonne où se trouve la phase stationnaire. Ainsi les molécules sont séparées en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire de la colonne et le gaz vecteur, et selon la température du four. Les composés les plus retenus par la phase stationnaire sont élués en dernier et ceux qui ont le moins d'affinités sont élués en premier ; ils sont ensuite détectés à la sortie de la colonne. Concernant notre étude, les deux types de détecteurs utilisés sont : FID (détecteur à ionisation de flamme) et SM (spectromètre de masse). Le détecteur SM, utilisé pour caractériser les composés est muni d'un filament chauffé qui émet des électrons qui sont accélérés sous un champ électrique. Ils entrent en collision avec les molécules de l'échantillon entraînant leur ionisation. Les ions sont transformés en signal électrique en fonction du degré d'ionisation. Le résultat obtenu est un spectre de masse qui permet une identification de chaque molécule en se référant à une banque de spectres. Pour le détecteur FID utilisé pour la quantification, les molécules sont ionisées lors de la traversée de la flamme entraînant un courant électrique qui transite entre les électrodes de collecte du détecteur. Ce courant est d'autant plus important que le nombre d'atomes de carbone traversant la flamme par seconde est important. Il est ensuite amplifié et traduit en pics de chromatogramme. (Formation chromatographie en phase gazeuse - M. Rogemont – HTDS International)

Couleur

La couleur est un critère important dans l'appréciation des aliments. Les différentes opérations unitaires de transformation du poivre entraînent des variations de la couleur qui, visibles à l'œil, seront quantifiées à l'aide d'un chromamètre qui est l'appareil utilisé dans le cadre de notre étude. Il émet une lumière qui sera absorbée sous toutes ses longueurs d'onde par l'objet irradié, sauf pour la longueur d'onde correspondant à la couleur de l'objet. Il mesure la longueur d'onde du rayonnement réfléchi correspondant à la couleur de l'objet étudié. L'appareil fait ses mesures dans le vert, le rouge et le bleu. Il permet de mesurer l'intensité de la couleur à partir d'une lampe à xénon qui illumine la surface du produit à analyser. Cette couleur sera traduite – objectivement - en valeurs chromatiques primaires virtuelles (X, Y, Z) qui sont ensuite transformées en valeurs L, a*, b*. Ces paramètres L, a*, b* correspondent à l'espace couleur développé en 1976 par la Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) :

- L correspond à la luminosité ou clarté et est exprimée selon une échelle continue de valeurs de 0 (noir) à +100 (blanc),
- a* correspond à une échelle continue de longueurs d'onde de -300 (vert) à +300 (rouge)

- b* correspond à une échelle continue de longueurs d'onde de -300 (bleu) à +300 (jaune)

Microbiologie du poivre

Comme tout aliment, le poivre est susceptible d'être contaminé microbiologiquement ; des techniques de décontamination, par traitement thermique ou fumigation notamment, existent et un bon séchage (teneur en eau inférieure à 12% en base humide) permet de limiter le risque développement. Il n'y a pas de règlements sanitaires propres au poivre de la Réunion ; on se réfère donc à la réglementation et aux articles scientifiques existants pour le poivre noir (*Piper nigrum*). Selon les articles référencés une grande variété de bactéries dont certaines pathogènes est fréquemment présente dans le poivre (*Piper nigrum*) entier ou moulu. La flore totale peut ainsi représenter jusque 10 000 000 d'UNFC/g de poivre, parmi lesquelles *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* et également *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, et *Klebsiella sp.* sont souvent cités. Si les teneurs préconisées par l'Association Européenne des Epices (ESA) sont rarement atteintes (Salmonelles : absence dans 25g ; E. coli : 1000/g), ce danger justifie cependant les décontaminations (traitements thermiques, irradiation et technologie microondes notamment) mises en œuvre par les importateurs afin de limiter ce risque.

Les moisissures et les levures, pour lesquelles l'ESA préconise de ne pas dépasser 1 000 000 d'unités par gramme, sont elles aussi souvent présentes y compris certaines espèces mycotoxinogènes. *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* de même que *P. citrinum*, *P. islandicum* et *E. nidulan* ont ainsi été identifiés parmi 42 espèces de moisissures différentes isolées dans des échantillons de *Piper nigrum* du Brésil. Les aflatoxines B1 et B2 normalement produites par *A. flavus* n'ont pas été détectées alors qu'à l'inverse la toxine G2 l'a été sans présence des champignons (*A. Parasiticus* et *A. nomius* qui la synthétise (Freire et al. 2000). Dans ses travaux, Gatti (2003), a lui aussi mis en évidence plusieurs moisissures mycotoxinogènes (dont *Aspergillus flavus* et *parasiticus*) dans une part importante de ses échantillons de poivre noir brésilien sans pour autant détecter de traces de mycotoxines en chromatographie couche mince. Selon l'article de L. H. McKee (1995), les valeurs maximum tolérées par le Règlement 466/2001/CE pour les aflatoxines (5ppb de B1 et 10ppb de B1+B1+G1+G2) peuvent parfois être dépassées dans le *Piper nigrum* noir ou blanc. (Synthèse bibliographique Mathieu Weil).

III. Matériels et méthodes

III. 1. Collecte et préparation des échantillons

Le poivre de la Réunion est collecté à la rivière Langevin sur une zone peu étendue. Elle s'applique uniquement sur une espèce à une maturité déterminée.

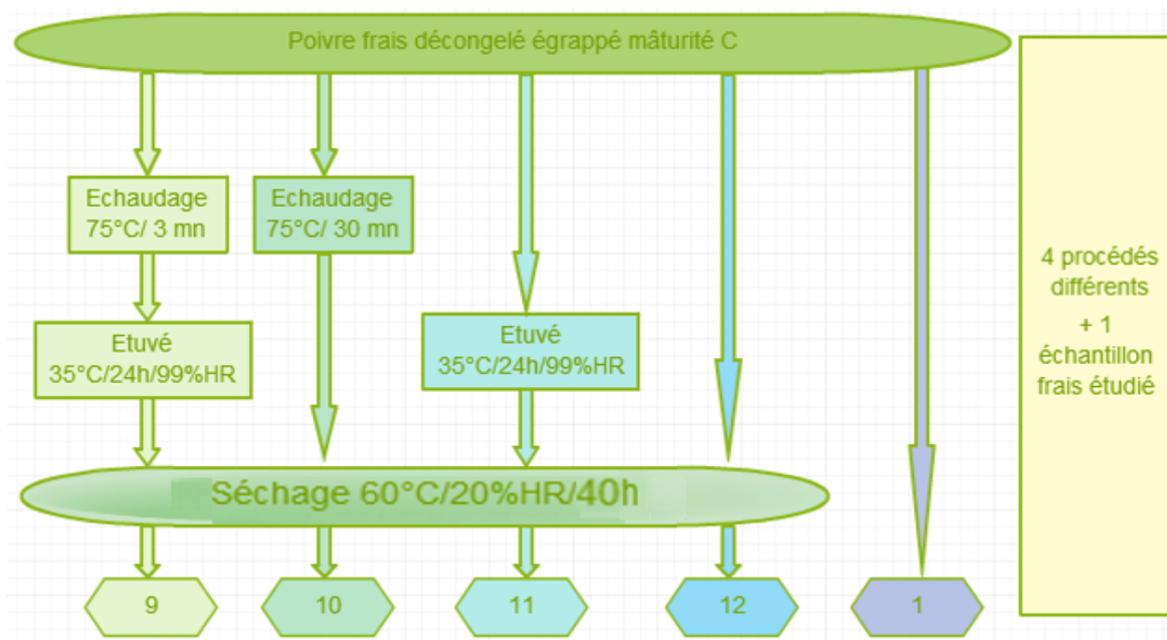
III. 2. Procédés mis en œuvre sur les échantillons

Des choix minutieux de types de procédés à mettre en œuvre ont été faits pour tenter de comprendre, caractériser et quantifier objectivement l'influence des opérations unitaires ou combinées d'échaudage, étuvage et séchage sur la qualité du poivre. Ci-dessous sont présentés tous les essais qui ont été effectués pendant (excepté un essai réalisé avant) le stage pour aboutir à des conclusions constructives qui, le cas échéant peuvent mener à d'autres pistes de recherche.

Essai impact des procédés sur l'huile essentielle

Pour cet essai, 4 procédés de transformation différents ont été appliqués sur du poivre frais congelé de *Piper borbonense*.

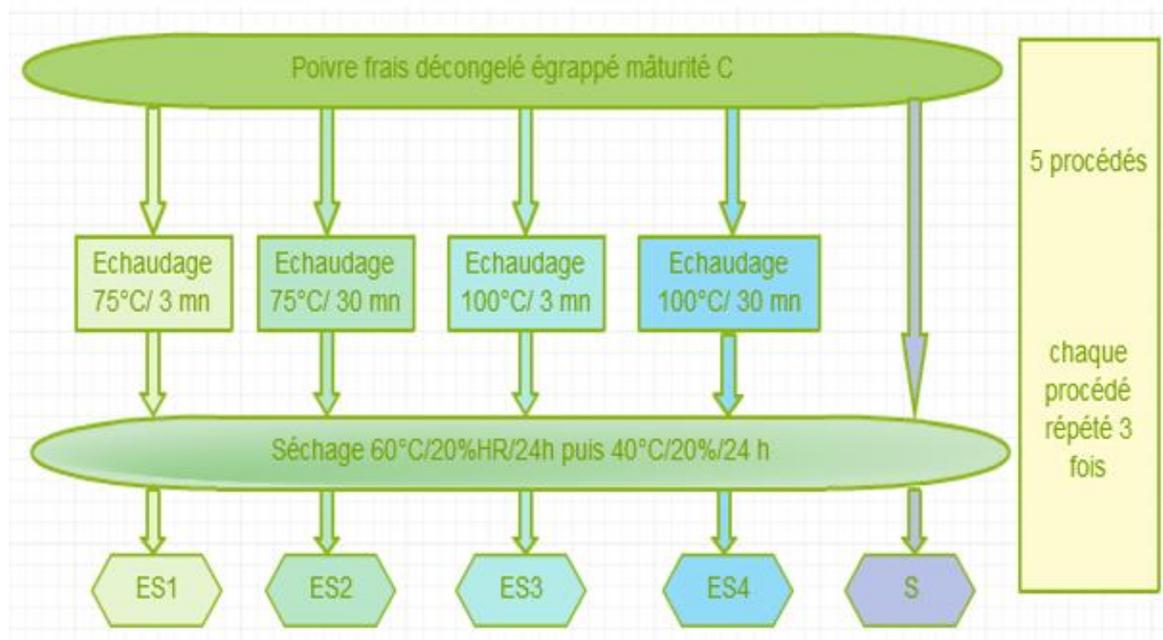
Figure 3 : protocole essai procédés sur poivre frais



Essai impact de l'échaudage sur la teneur en huile essentielle

Etant une étape clé, l'échaudage mérite d'être étudié pour connaître son impact sur la qualité aromatique. Des échaudages plus ou moins drastiques ont été appliqués sur du poivre frais décongelé. Tous les procédés sont répétés trois fois.

Figure 4 : Essai échaudages sur poivre frais

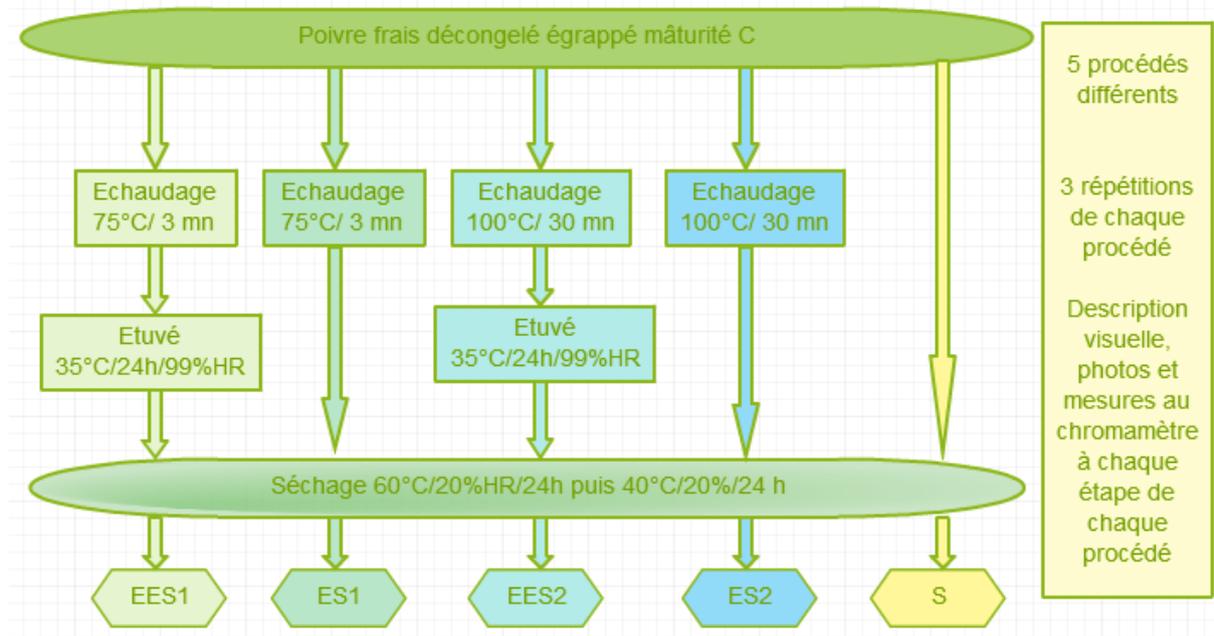


Essai impact des procédés sur la couleur

Le protocole ci-dessous a été utilisé pour étudier l'impact des procédés sur la couleur du poivre en appliquant des températures d'échaudage différentes qui activeraient ou inhiberaient les enzymes

(tels que PPO et POD) responsables des phénomènes de brunissement enzymatique. Ils sont suivis ou non d'un étuvage qui serait par une mise en contact enzymes-substrats, une étape favorable à l'activité enzymatique initiée lors de l'échaudage. Tous les procédés sont répétés trois fois.

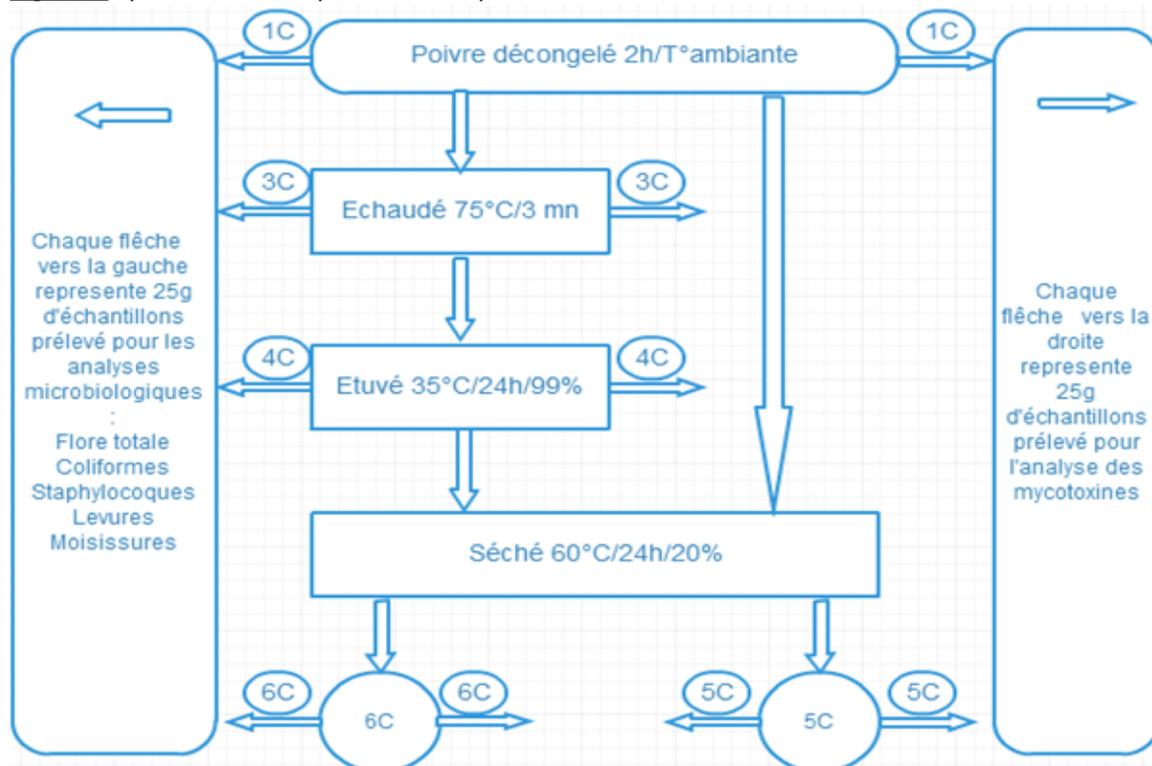
Figure 5 : protocole essai procédés sur poivre frais



Essai impact des procédés sur la flore microbienne du poivre

Les variations quantitatives de la flore microbienne sont étudiées dans cet essai à chaque étape du procédé.

Figure 6 : protocole essai procédés sur poivre frais



III. 3. Analyse des échantillons issus des procédés de transformation

Extraction et détermination de la teneur en huile essentielle par hydro-distillation

Les huiles essentielles des produits finis issus de l'essai impact de l'échaudage (S, ES1, ES2, ES3, ES4) ont été extraites pour en déterminer les teneurs. Toutes les extractions sur les échantillons (1, 9, 10, 11, 12) de l'essai impact des procédés sur l'huile essentielle, ont été faites avant le début de mon stage. Toutes les extractions sont répétées trois fois.

Pour cette analyse, il s'agit de porter à ébullition 200 ml d'eau contenant 8 à 10 g de poivre moulu dans un ballon raccordé à un hydro distillateur lui-même raccordé à un système de refroidissement. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées. Une fois le condensat bien décanté, le volume d'huile essentielle est mesuré dans la partie burette de l'hydro distillateur pour calculer la teneur d'huile essentielle en base sèche.

$$THE(BS) = \frac{VHE \times 100}{m \text{ poivre}} \times \frac{100}{MS}$$

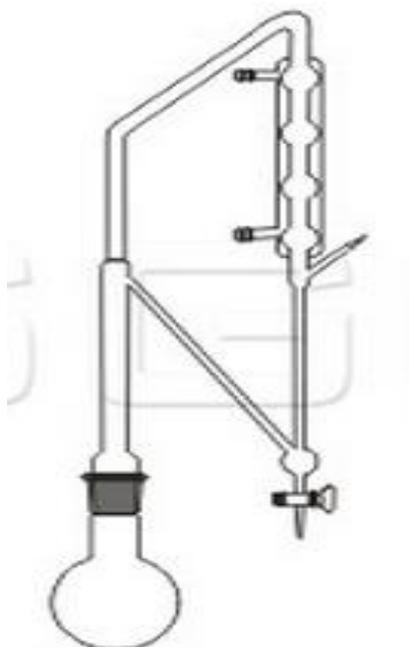


Image 3 : matériel d'extraction de l'huile essentielle

Analyse de la composition aromatique de l'huile essentielle et quantification des constituants

L'huile essentielle issue d'un poivre frais de *Piper borbonense* a été injectée (avant le début de mon stage) en CG-SM pour identifier ses composés aromatiques. Cela nous permettra d'avoir une référence pour les autres analyses quant à la nomination les pics de chromatogrammes et la quantification en CG-FID.

En CG-FID, pour déterminer les quantités de chaque composé, dans chaque chromatogramme, un étalon interne terpinolène (dont la masse est connue) est injecté avec l'échantillon d'huile

essentielle. La quantité de chaque composée est calculée par un calcul du rapport entre l'aire de chaque composé et celle du terpinolène.

$$\text{Masse composé } (\mu\text{g}) = \frac{\text{masse de terpinolène injectée } [\mu\text{g}] * \text{aire du pic du composé analysé}}{\text{aire du pic du terpinolène}}$$

Ensuite le pourcentage de chaque composé est calculé par rapport à la masse totale des composés présents dans le chromatogramme. Chaque pourcentage est multiplié par la teneur en huile essentielle en base sèche de l'échantillon analysé pour obtenir la quantité de ce composé sur une base de 100 g de poivre en base sèche.

Méthode et équipement pour déterminer l'impact des procédés sur l'huile essentielle

L'analyse des huiles essentielles des échantillons 9, 10, 11, 12 a été faite avec un chromatographe Hewlett Packward 5890 Serie II équipé un détecteur FID. Les injections se préparent avec de 20µl d'huile essentielle et 2µl d'étalon interne (terpinolène). Un volume de 0.3 µl est injecté avec un ratio de split de 3:100. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur FID à 270°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 0.7 ml/min dans une colonne capillaire (60m ; 320µm). La température de la colonne est initialement à 60°C et augmente de 4°C/min jusqu'à 250°C et est ensuite maintenue à cette température pendant 20 minutes.

Méthode et équipement pour déterminer l'impact de l'échaudage sur l'huile essentielle

L'analyse des huiles essentielles des échantillons (S, ES1, ES2, ES3 et ES4) a été faite avec un chromatographe Clarus 580 équipé d'un passeur automatique et d'un détecteur FID. Les injections se préparent avec 100µl d'huile essentielle et 10 µl d'étalon interne (terpinolène). Un volume de 0.5 µl est injecté avec un ratio de split de 1:55. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur FID à 270°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 1.5 ml/min dans une colonne capillaire (60m ; 320µm). La température de la colonne est initialement à 60°C et augmente de 2°C/min jusqu'à 250°C et est maintenue à cette température pendant 20 minutes.

Détermination de la teneur en matière sèche

3 à 5g de poivre broyé sont mis à l'étuve (Memmert) à 105°C pendant 30h (jusqu'à masse constante). La masse perdue est constituée de l'eau et de l'huile essentielle du produit. Cette valeur sera utilisée pour rapporter les teneurs en huile essentielle en base sèche.

Le résultat est exprimé de la façon suivante :

$$\text{Teneur en eau (et volatiles) (\%)} = \frac{(M1 - M2) \times 100}{M1}$$

$$\text{Teneur en MS (\%)} = \frac{M2 \times 100}{M1}$$

M1 : la masse nette de départ

M2 : la masse nette obtenue après séchage (M3-M4)

Analyse de la couleur

Après chaque opération unitaire de chaque procédé (décrit dans la figure 5) une description visuelle est faite, une photo et 10 mesures de couleur avec un chromamètre (Minolta CR-400), muni d'une interface d'acquisition des données L, a* et b*. Elles sont ensuite transférées sur le logiciel de l'ordinateur.

Analyses microbiologiques

Après chaque opération unitaire du procédé décrit sur la figure 6, 25 g de poivre sont prélevés, pour l'analyse de la flore totale, des levures et moisissures, des staphylococcus et des coliformes. Un autre prélèvement en parallèle de 25 g est effectué pour l'analyse des mycotoxines qui sera fait dans les mois à venir. Après étuvage et dénombrement pour PCA (flore totale) et GN (levures et moisissures), les colonies sont comparées aux descriptions macroscopiques des colonies des dernières analyses. Ainsi la banque des microorganismes est enrichie en repiquant les colonies inconnues de ces deux milieux et en les conservant dans 9 ml de glycérol à -80°C pour identifications ultérieures. Pour VRBL (coliformes) et BP (staphylocoques), on se contente de la quantification.

IV. Résultats et discussion

Essai - impact des procédés sur la composition aromatique

Vingt-six composés aromatiques ont été identifiés en CG-SM parmi une quarantaine de composés présents dans l'huile essentielle du *Piper borbonense* (échantillon 1). (Annexe 3)

En CG-FID (sur l'échantillon 1) il s'est avéré que le limonène prédomine (environ 26%). Ensuite, les composés majoritaires par ordre décroissant sont les suivants : l'alpha-phellandrène (14%), l'asaricin (13%), l'alpha-pinène (7%) et le bêta-pinène (7%).

Pour l'exploitation des résultats les composés présents à plus de 1% ont été choisis pour évaluer l'influence des procédés sur ceux-ci. Ils représentent 93% du total d'huile essentielle.

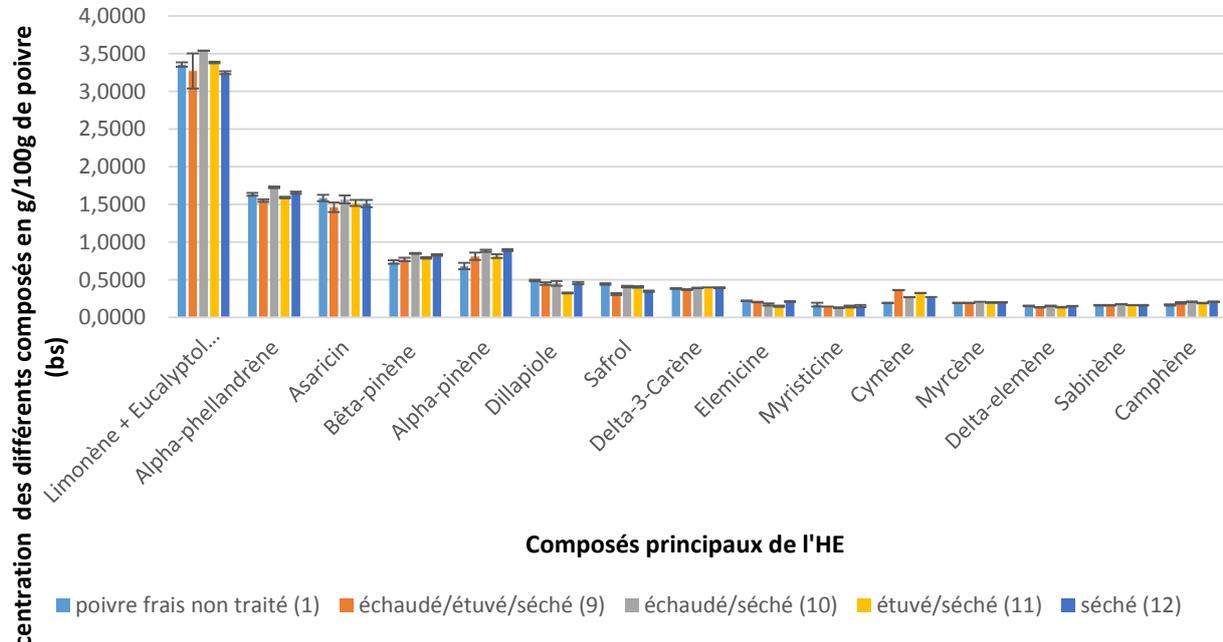
Tableau 1 : Principaux composés aromatiques de l'huile essentielle de *Piper borbonense*

	Composés	Poivre frais	
		% HE	% m/m poivre bs
1	Limonène + Eucalyptol* (environ 2%)	29,568%	3,3915
2	Alpha-phellandrène	14,387%	1,6502
3	Asaricin	14,013%	1,6073
4	Bêta-pinène	6,546%	0,7509
5	Alpha-pinène	6,166%	0,7073
6	Dillapiole	4,191%	0,4807
7	Safrol	3,890%	0,4462
8	Delta-3-Carène	3,410%	0,3912
9	Elemicine	1,903%	0,2183
10	Myristicine	1,338%	0,1534
11	Cymène	1,715%	0,1967
12	Myrcène	1,710%	0,1961
13	Delta-elemène	1,315%	0,1509
14	Sabinène	1,427%	0,1637
15	Camphène	1,476%	0,1693
	Total	93,056%	10,6735

*Il n'a pas été possible de séparer systématiquement l'Eucalyptol du Limonène par la méthode chromatographique appliquée

Ces valeurs (obtenues sur poivre frais) ont été comparées à celles des huiles essentielles des échantillons transformés (9, 10, 11, 12) pour évaluer l'impact que les procédés qui leur sont appliqués ont sur la composition aromatique.

Graphe 1 : Evolution quantitative des différents composés de l'HE du poivre sauvage en fonction des procédés



Les monoterpènes (α -pinène, β -pinène, Camphène, o-cymène) sont en plus grande concentration dans le poivre transformé (échantillons 9, 10, 11, 12) que dans le poivre frais (échantillon 1).

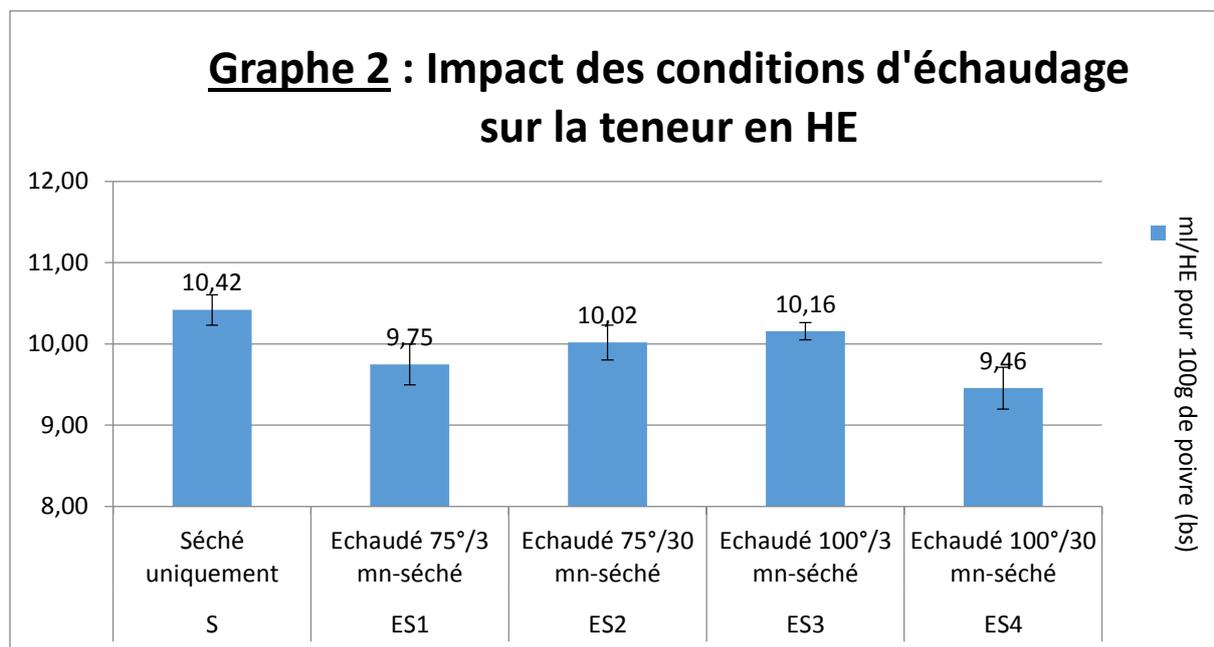
A l'opposé, les composés non monoterpéniques (Asaricin, Dillapiol, Safrol, Myristicine, Delta-elemène) se retrouvent tous en moins grande concentration dans les poivres transformés (échantillons 9, 10, 11, 12) que dans le poivre frais (échantillon 1).

Les concentrations en monoterpènes (α -pinène, β -pinène, Camphène, Sabinène, α -phellandrène, β -myrcène) sont toutes affectées à la baisse (10 vs 9 d'une part et 12 vs 11 d'autre part) par l'étuvage.

Les profils aromatiques des échantillons 9 (voie humide) et 12 (voie sèche) sont très proches ; seules de faibles différences dans les concentrations en α -phellandrène et en o-cymène existent.

Les composés les plus affectés par les procédés sont le Safrol (perte de 30% entre 1 et 9) le o-cymène (gain de 89% entre 1 et 9) alors que les moins affectés sont le delta 3-carène, la β -Myrcène et le Sabinène.

Les différences de compositions entre les échantillons ne peuvent pas être décrites pour le moment d'un point de vue sensoriel. Du « sniffing », et une analyse des seuils de perception de chaque composé pourraient nous éclairer sur l'interprétation sensorielle de ces résultats.



Toutes les opérations d'échaudage diminuent la teneur en huile essentielle du poivre. Cette diminution est cependant très faible sauf pour l'échaudage à 100°C/30 minutes (le plus drastique) où une réduction de 9% de la teneur par rapport au poivre uniquement séché est observée.

Impact sur la composition aromatique

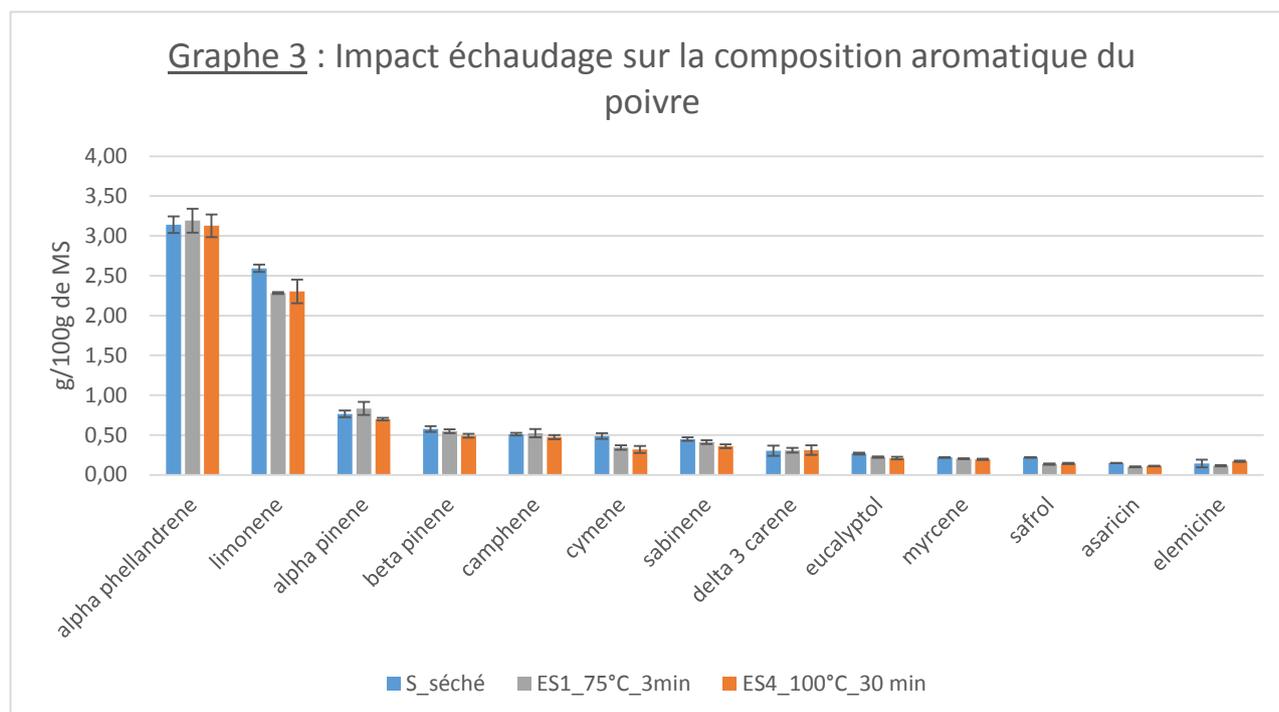
L' α -phellandrène est le composé présent en plus grande quantité (29%), suivent ensuite le limonène (24,74%) puis l' α et le β -pinène (7,30% et 5,48%) dans l'échantillon uniquement séché. Le fait que l'on travaille ici sur un lot de poivre différent (année et donc climat, maturité, lianes différentes) peut expliquer que dans cet essai les composés prédominants soient différents de ceux qui prédominaient dans l'essai précédent.

Pour l'exploitation des résultats les composés présents à plus de 1% ont été choisis pour évaluer l'influence des procédés sur ceux-ci. Ils représentent 94% du total d'huile essentielle.

Tableau 2 : Principaux composés aromatiques de l'huile essentielle : échantillon uniquement séché (S)

	Composés	% sur total HE	g/100g poivre (base sèche)
1	alpha phellandrène	29,96%	3,14
2	limonène	24,74%	2,59
3	alpha pinène	7,30%	0,77
4	beta pinène	5,48%	0,57
5	camphène	4,86%	0,51
6	cymène	4,66%	0,49
7	Sabinène	4,27%	0,45
8	delta 3 carène	2,88%	0,30
9	eucalyptol	2,54%	0,27
10	Myrcène	2,07%	0,22
11	Safrol	2,08%	0,22
12	asaricin	1,42%	0,15
13	Elemicine	1,34%	0,14
	Total	93,60%	9,81

La composition aromatique de l'échantillon S a été comparée à celle de deux autres échantillons ; l'un ayant subi un procédé standard d'échaudage (ES1 : 75°C-3 min) et un autre beaucoup plus drastique (ES 4 : 100°C-30 min)



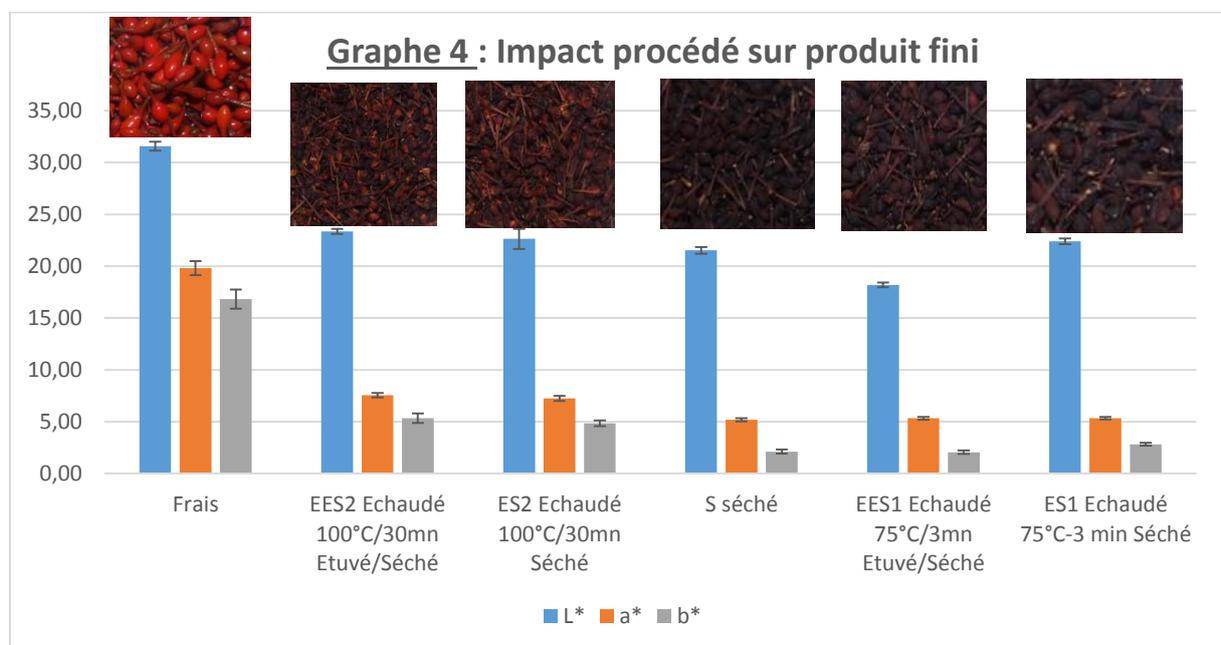
La tendance à la baisse de la quantité des composés aromatiques sur les produits transformés est remarquée. Le limonène, le cymène, l'eucalyptol, le Safrol et l'asaricin, notamment, sont présents en moins grande quantité sur produits transformés.

L'alpha et le bêta-pinène, le Sabinène et le Myrcène sont présents en moins grande quantité dans le poivre ayant subi un échaudage drastique (100°C/30 minutes). Les autres composés sont stables à la transformation même sous l'effet drastique.

Ces baisses ont sans doute un effet sur la perception sensorielle ; il serait intéressant de faire déguster ces poivres par un jury de dégustation et de procéder à une analyse des seuils de perception de chaque composé pour indiquer quelle baisse (quel composé ?) impacte le plus sur l'odeur et l'arôme du poivre.

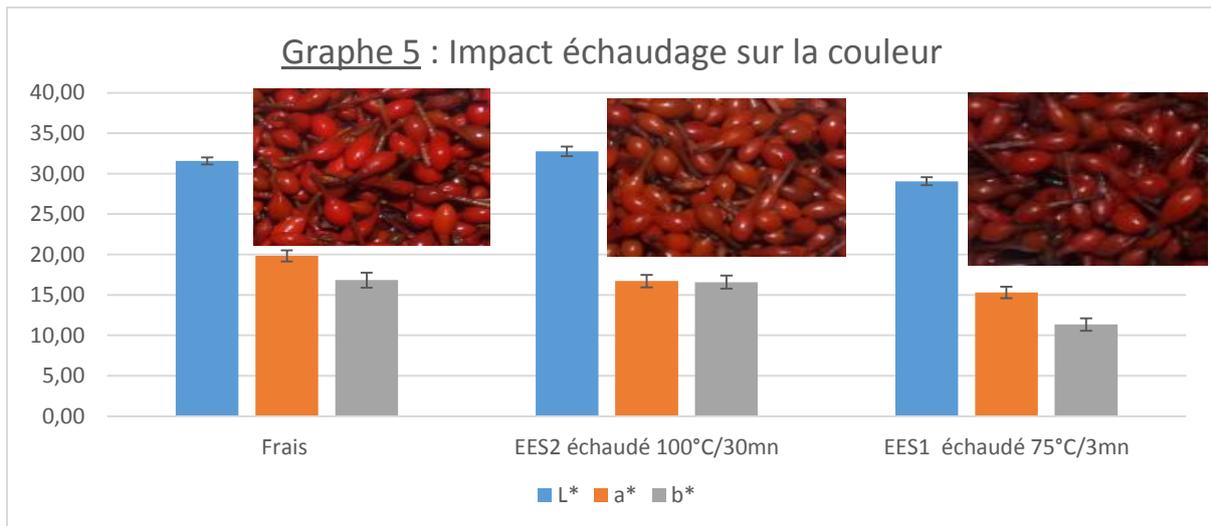
Essai impact des procédés sur la couleur

Ces graphiques représentent les variations des moyennes de L, a* et b* sur 30 mesures par produit intermédiaire ou fini : 10 mesures par étape de procédé et 3 répétitions par procédé.

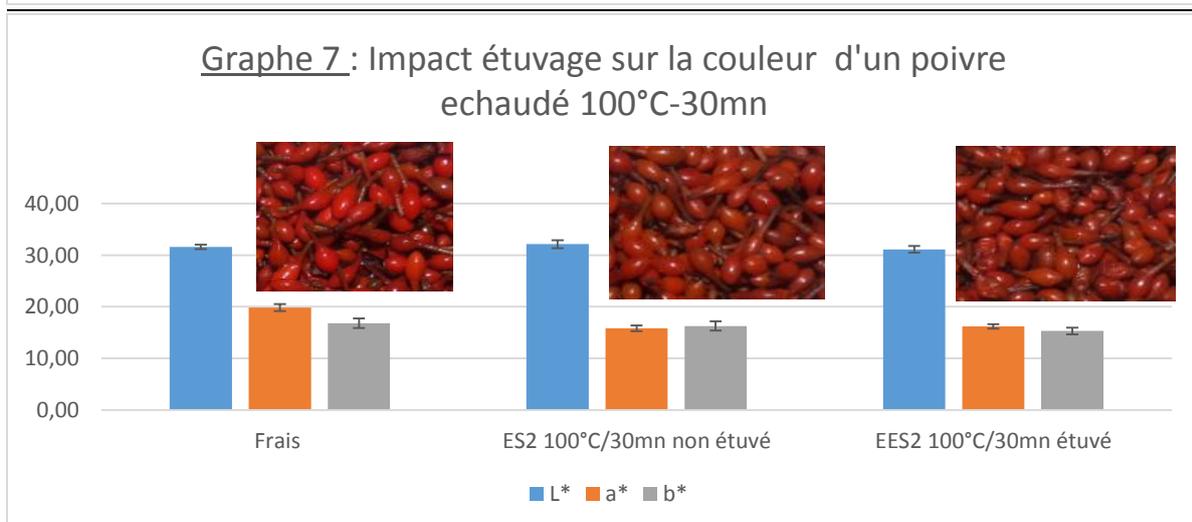
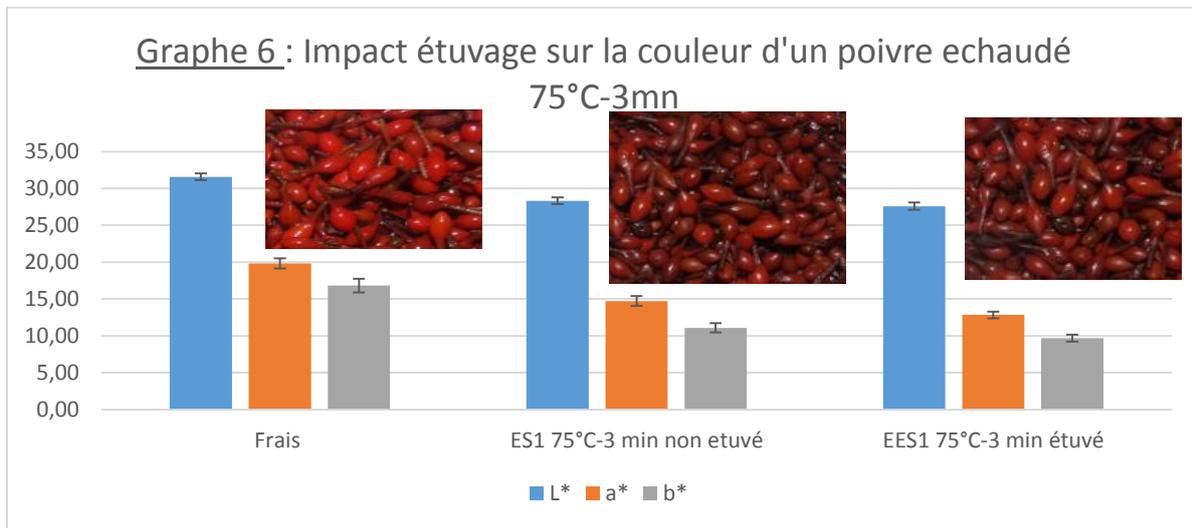


La couleur du poivre s'assombrit quel que soit le procédé. L'échaudage permettrait de mieux conserver la couleur rouge d'autant plus qu'il est poussé.

L'étuvage a un faible impact sur la couleur lorsqu'il suit un échaudage poussé, tandis que lorsque l'échaudage est peu poussé, la couleur du produit fini est plus sombre



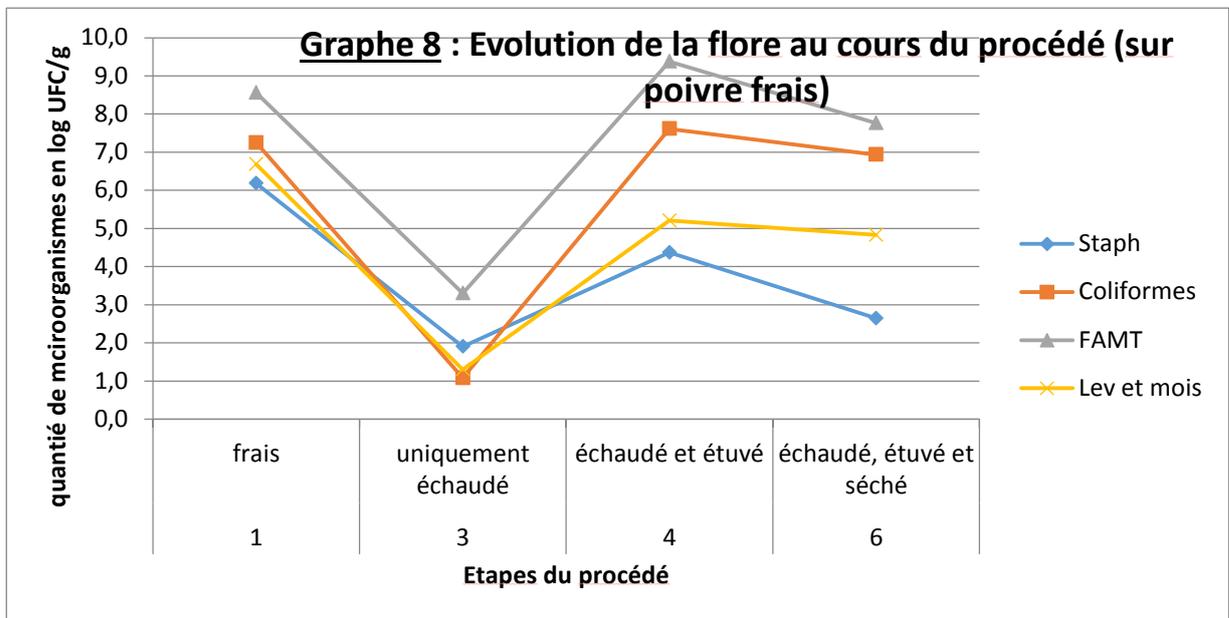
En sortie d'échaudage poussé (100°C/30 min) le poivre est plus rouge qu'en sortie d'échaudage 75°C/3min. L'échaudage à 100°C permettrait de réduire l'activité enzymatique donc de mieux préserver le poivre du brunissement enzymatique contrairement à l'échaudage peu poussé.



L'étuvage lorsqu'il suit un échaudage peu poussé (75°C/3 min) à une action sur la couleur ce qui confirme le phénomène enzymatique constaté à l'échaudage.

A noter également (graphique 4) que le poivre uniquement séché à une couleur sombre (autant que celle des poivres échaudés à 75°C), et que quelles que soient les étapes préalables, le poivre continue à s'assombrir lors du séchage, ce qui laisse à penser qu'il existe également un brunissement non enzymatique du poivre.

Essai impact des procédés sur la flore microbienne du poivre



L'échaudage a un fort impact sur toutes les flores (- 4,3 à -6,1 log ufc/g).

L'étuvage permet une reprise importante de croissance de toutes les flores (+2,5 à +6,5 log ufc/g).

Le séchage a un impact manifeste sur les staphylocoques et la flore totale, un impact très limité sur les autres coliformes et pas d'impact sur les levures et moisissures.

L'ensemble du procédé permet de réduire fortement (3,6 log) la population de staphylocoques, et significativement celle de levures et moisissure (1,9 log), mais n'a pas d'impact sur les coliformes, ni la FAMT.

La transformation "**voie sèche**" a un impact manifeste sur les staphylocoques et pas d'impact sur les autres flores. (Comité de thèse Mathieu Weil)

V. Conclusions et perspectives

L'expérience acquise dans le domaine de la recherche a été très satisfaisante et ce stage m'a convaincu que c'est le domaine dans lequel je me sens le mieux et qui rejoint le plus mon projet professionnel.

Les expériences menées montrent clairement que les procédés ont des impacts sur la qualité (en particulier sur la qualité sanitaire et sur la couleur) du poivre.

L'échaudage est une opération clef dans le procédé de fabrication. Il diminue la charge microbienne du poivre, augmente la vitesse de séchage du poivre mais diminue (certes assez faiblement) la quantité d'huile essentielle et impacte (ce qui découle logiquement de ce qui précède) à la baisse certains composés aromatiques du poivre. Il faut cependant l'appliquer de manière drastique (100°C/30 min) pour que ces écarts se montrent significatifs, ce qui n'est pas souvent le cas dans les procédés traditionnels de transformation du poivre. Cette opération permet de mieux conserver la couleur en détruisant les enzymes responsables du brunissement du poivre. La couleur est d'autant plus conservée que la température et le temps d'échaudage sont élevés.

L'étuvage a un impact significatif sur le poivre. Quelles que soit les conditions d'échaudage qui le précèdent, il permet d'accroître la croissance de la flore microbienne et a une action sur la couleur (poivre plus sombre) lorsque l'échaudage n'est pas drastique (75°C/3 min). Ces mécanismes sont dus au fait que les conditions d'étuvage (température 35°C et humidité 99% - durant 24h) sont optimales à la fois pour la croissance microbienne et pour l'action enzymatique. L'étuvage n'affecte pas la teneur en huile essentielle mais affecte à la baisse la quantité de monoterpènes (α -pinène, β -pinène, Camphène, Sabinène, α -phellandrène, β -Myrcène) présents dans celle-ci.

Le séchage est le procédé qui affecte le plus la couleur du poivre. Il accentue le noircissement du poivre quel que soit le procédé qui le précède. Ce noircissement est d'autant plus important lors de cette opération que la température et le temps d'échaudage précédant sont bas. Sans échaudage drastique, il affecte beaucoup plus la couleur. Il n'a d'impact ni sur la quantité d'huile essentielle ni sur le profil aromatique mises à part de faibles différences perçues dans les concentrations en α -phellandrène et en o-cymène entre la voie sèche (échantillon 12) et la voie humide (échantillon 9). Son impact est manifeste sur les staphylocoques et la flore totale, très limité sur les coliformes et nul sur les levures et moisissures.

Ces connaissances sur l'impact des procédés sur la qualité mériteraient d'être confirmées notamment par des tests sensoriels. Par ailleurs il ne suffit d'observer des impacts mais il convient de comprendre les mécanismes biochimiques qui conduisent à la dégradation ou à l'expression de la qualité si l'on souhaite pouvoir piloter efficacement les procédés en fonction de la qualité attendue.

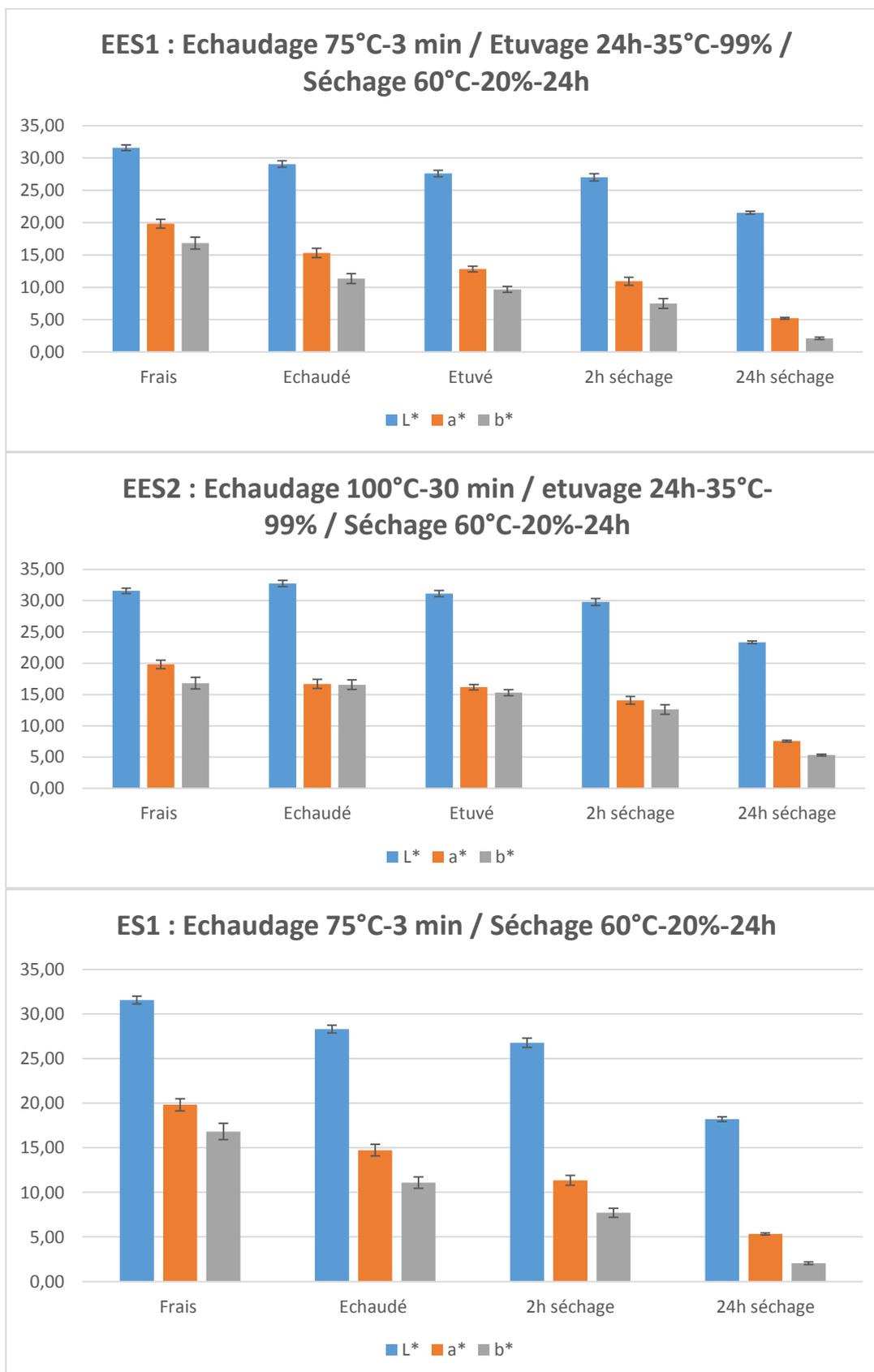
Enfin, il n'est jamais facile de choisir un procédé optimal. Cela, entre autres, parce que bien souvent les opérations unitaires impactent simultanément de façon positive sur une composante de la qualité et de façon négative sur une autre. Il s'agit donc bien souvent d'un compromis. L'optimisation des procédés de transformation du poivre consistera ainsi à trouver la ou les meilleure(s) conjonction(s) d'opérations unitaires pour pouvoir proposer un ou des poivres dont la/les qualité(s) correspondent aux attentes du marché.

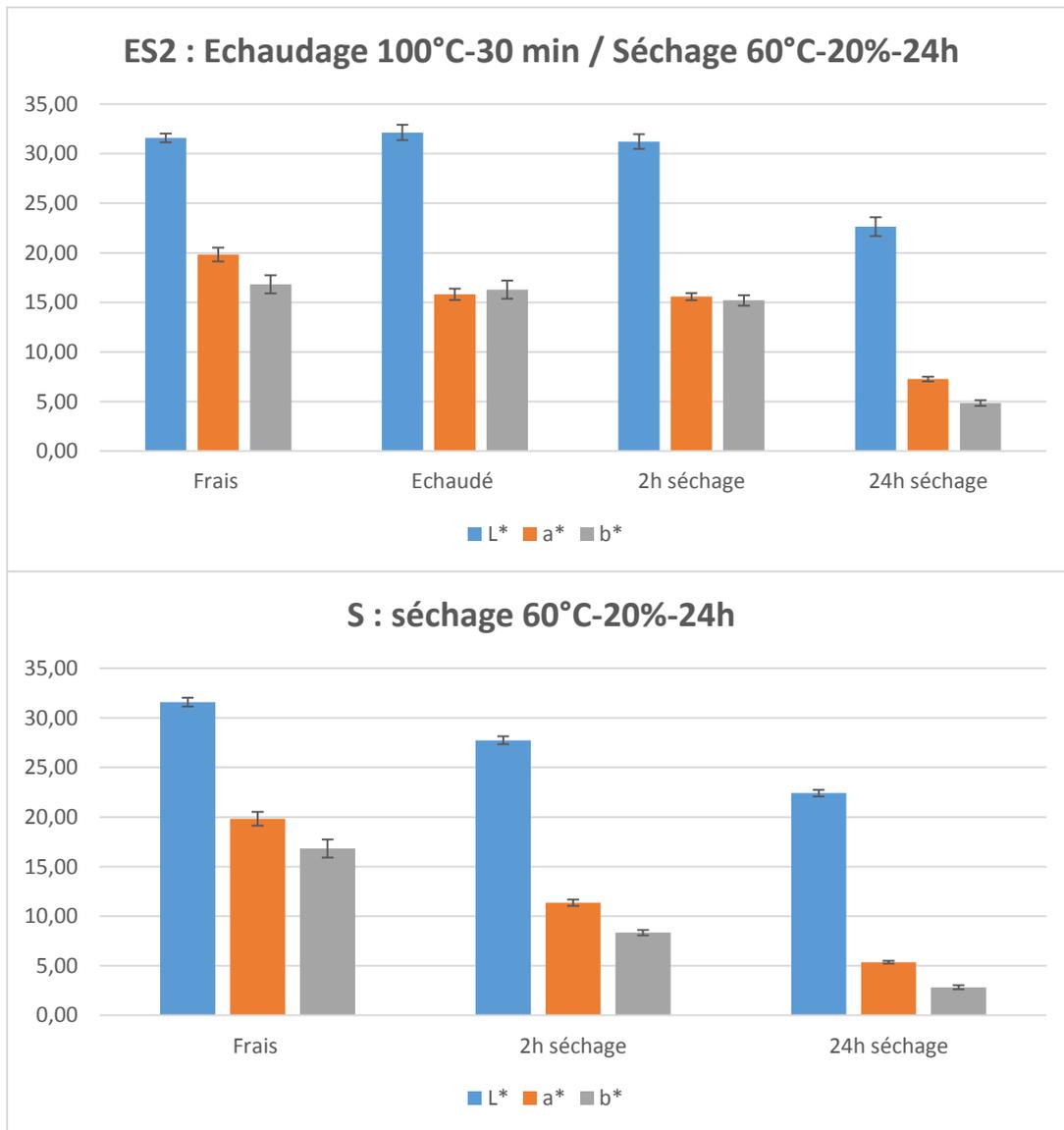
VI. Références bibliographiques

- Synthèse bibliographique de Mathieu Weil
- Cours formation CG avec M. Rogemont
- Présentation comité de thèse (05/06/15) de Mathieu Weil
- M. Weil 2014 ; Postharvest treatments of wild pepper (*Piper* spp.) in Madagascar
- Hubert RICHARD ; Arômes alimentaires
- Présentation UMR 95 Qualisud 2015
- Cseke et Kaufman 1999 ; Natural Products from Plants
- Annaïg Levesque « Etude de différents schémas de vie mis en oeuvre sur le Tsiperifery poivre sauvage malgache »
- Antennae 2007, vol. 14, no 1 ; Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre »
- www.books.google.com
- www.sciencedirect.com

VII. Annexes

Annexes 1 : Impact des différents procédés sur la couleur du poivre





Annexes 2 : Photos évolution de la couleur de quelques procédés



Annexe 3: composés aromatiques de l'huile essentielle de *Piper borbonense*

N°Pic	Composés	Ret Time	Pourcentage	Masse dans 100g poivre (g)
1	Hexane	6.587		
2		13.222	0,512%	0,0587
3	Alpha-pinène	13.586	7,807%	0,8955
4	Camphène	14.132	1,812%	0,2078
5	Sabinène	14.927	1,415%	0,1624
6	Bêta-pinène	15.180	7,258%	0,8325
7	Myrcène	15.354	1,754%	0,2012
8	Alpha-phellandrène	16.154	14,475%	1,6603
9	Delta-3-Carène	16.349	3,447%	0,3954
10	Cymène	16.834	2,384%	0,2734
11	Limonène	17.151	26,134%	2,9976
12	Eucalyptol	17.274	2,321%	0,2662
13		17.511	0,110%	0,0126
14		18.089	0,198%	0,0227
15	Terpinolène	19.385		
16		21.579	0,182%	2,090%
17		21.780	0,119%	0,0137
18		22.928	0,181%	0,0208
19		23.096	0,159%	0,0183
20	Alpha-Terpinéol	23.417	0,517%	0,0593
21		25.982	0,192%	0,0220
22	Safrol	27.263	3,097%	0,3553
23		28.987	0,102%	1,170%
24	Delta-elemène	29.101	1,317%	0,1511
25	Ylangène	30.472	0,357%	0,0409
26	Alpha-cubebene ou caprène ?	30.639	0,210%	0,0241
27	Méthyleugénol	31.149	0,457%	0,0524
28	Caryophyllène	32.370	0,581%	0,0667
29	Alpha-humulène	33.574	0,116%	0,0133
30	Sesquiterpène MM: 204	34.089	0,565%	0,0648
31	Germacrène D	34.503	0,814%	0,0934
32	Asaricin	34.908	13,018%	1,4931
33	Myristicine	35.595	1,234%	0,1415
34	Cadinène	35.759	0,621%	0,0712
35	Elemicine	36.436	1,843%	0,2114
36	Dillapiole	39.065	3,938%	0,4517
37		39.414	0,236%	0,0271
38		40.260	0,359%	0,0411
38		40.690	0,157%	0,0180

*Les cases hachurées sont les composés aromatiques non-identifiés.