

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**



THESE DE DOCTORAT LMD

Spécialité : Chimie

Option : Chimie des Matériaux et de l'Environnement

Présentée par :

M^{lle} SEBAOUI Ouiza

Thème

Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron et de son utilisation dans l'encapsulation des composés phénoliques des margines de l'industrie oléicole

Devant le jury composé de:

M ^f . ELIAS Abdelhamid	Professeur	UMMTO	Président
M ^f . MOUSSAOUI Ramdane	Professeur	UMMTO	Rapporteur
M ^f . KADI Hocine	Professeur	UMMTO	Co-Rapporteur
M ^f . DIDI Mohamed Amine	Professeur	UABB Tlemcen	Examineur
M ^f . MOUFFOK Benali	Professeur	UDL Sidi Bel Abbès	Examineur
M ^f . AMROUCHE Tahar	MCA	UMMTO	Examineur

Soutenue le 03 / 07 / 2018

Remerciements

Mes profonds remerciements vont au Directeur du Laboratoire de chimie appliquée et génie chimique de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (LCAGC), M^r le Professeur **Smaïn HOCINE** pour son accueil et son support professionnel.

Je tiens à remercier vivement mon directeur de thèse M^r le Professeur **Ramdane MOUSSAOUI** et mon co-directeur M^r le professeur **Hocine KADI** qui ont permis à cette thèse de prendre forme par leur inestimable soutien scientifique. Leur compétence, leur rigueur et leur clairvoyance m'ont beaucoup appris. Merci également pour leur réactivité et leur patience lors de la rédaction de l'article et de la thèse, j'ai eu beaucoup de chance d'avoir bénéficié de leurs conseils, remarques et orientations. Certaine que je n'oublierai jamais, soyez assurés de mon attachement et de ma profonde gratitude.

Par ailleurs, je tiens à remercier les membres du jury :

Monsieur **Abdelhamid ELIAS**, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, vous me faites l'honneur en acceptant d'être membre de mon jury et d'en être le président.

Monsieur **Mohamed Amine DIDI**, Professeur à l'Université de Tlemcen, je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Monsieur **Benali MOUFFOK**, Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur **Tahar AMROUCHE**, Maître de conférences/A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi - Ouzou, merci d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également toutes les personnes formidables que j'ai eu à rencontrer par le biais de ce travail de recherche. Je pense particulièrement à l'équipe du Laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Médecine de l'université Mouloud Mammeri. Je voudrais exprimer toute mon amitié à **Zohra, Sihem, Smaïl** et particulièrement

au Docteur Kessal Fetta pour sa disponibilité et l'intérêt sans faille qu'elle a apporté à mon travail. Un grand merci à tous les membres de cette équipe pour leurs soutiens permanents, leurs encouragements et leur tempérament «no-stress» ainsi que leur bonne humeur.

J'ai le plaisir de remercier tout le personnel du laboratoire de recherche (LCAGC) et toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin à l'aboutissement de cette thèse.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma maman qui m'a fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes qu'on pourrait résoudre grâce à des formules mathématiques et des formules chimiques. Malgré mon éloignement, leur soutien indéfectible, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci de m'avoir accordé la liberté d'action et la confiance nécessaires à l'aboutissement de ce travail et merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mes parents ;

A mes frères et sœurs ;

A mes neveux et nièces surtout ROMAÏSSA ;

A mes ami(e)s ;

A tous ceux qui me sont chers.

Table de matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale..... 3

PARTIE 1. STADE ACTUEL DE LA RECHERCHE

CHAPITRE I. Généralités sur les pectines

I.1. Introduction..... 4

I.2. Structure des pectines..... 4

 I.2.1. Homogalacturonane 5

 I.2.2. Rhamnogalacturonane..... 6

 I.2.2.1. Rhamnogalacturonane I 6

 I.2.2.2. Rhamnogalacturonane II..... 6

 I.2.3. Xylogalacturonane 7

I.3. Types de pectines 8

I.4. Localisation des pectines..... 9

I.5. Propriétés physico-chimiques 10

 I.5.1. Solubilité et précipitation..... 10

 I.5.2. Stabilité et dégradation 11

 I.5.3. Viscosité 12

 I.5.4. Emulsification..... 12

 I.5.5. Gélification 12

 I.5.5.1. Gélification des pectines hautement méthylées 13

 I.5.5.2. Gélification des pectines faiblement méthylées..... 13

 I.5.6. Masse moléculaire 14

I.6. Utilisations des pectines 14

 I.6.1. Pectine comme matrice d'encapsulation 15

 I.6.2. Utilisation des pectines dans le domaine des biomatériaux..... 15

I.7. Extraction des pectines..... 16

 I.7.1. Méthodes physico-chimiques..... 16

I.7.2. Méthodes physico-chimiques activées.....	17
I.7.3. Méthodes enzymatiques.....	18
I.8. Mécanisme et cinétique de l'extraction des pectines	18
I.9. Dosage des pectines	19
I.9.1. Dosage colorimétrique.....	19
I.9.2. Dosage par chromatographie	19

CHAPITRE II. Encapsulation des composés phénoliques des margines

II.1. Introduction	21
II.2. Généralités sur l'encapsulation.....	21
II.2.1. Définition et domaines d'applications.....	21
II.2.2. Différents systèmes d'encapsulation	22
II.2.3. Objectifs de l'encapsulation	22
II.2.4. Matériaux d'encapsulation	23
II.2.5. Procédés d'encapsulation	24
a- Procédés physico-chimiques.....	24
b- Procédés chimiques.....	25
c- Procédés mécaniques	25
II.2.6. Procédé de la gélification de gouttes (extrusion).....	25
II.2.7. Capacité d'encapsulation et mécanisme de libération du principe actif.....	26
II.3. Encapsulation des composés phénoliques des margines	27
II.3.1. Généralités sur les composés phénoliques.....	27
II.3.1.1. Classification	27
II.3.1.2. Propriété antioxydante des composés phénoliques	28
II.3.1.3. L'intérêt d'encapsulation des composés phénoliques	30
II.3.2. Généralités sur les margines	31
II.3.2.1. Composés phénoliques des margines.....	32
II.3.2.2. Impacts environnementaux	33
II.3.2.3. Valorisation des margines	35
II.3.2.4. Encapsulation des composés phénoliques des margines par des polysaccharides	36

CHAPITRE III. Méthodologie de la recherche expérimentale

III.1. Introduction	37
III.2. Vocabulaire de base des plans d'expériences.....	37
a. Réponse	37
b. Facteur	37
c. Matrice d'expériences	37
d. Plan d'expérimentation	38
e. Formule de codage	38
III.3. Etapes d'une étude par plans d'expériences	38
III.4. Etude de criblage (screening).....	39
- Matrice d'Hadamard	39
- Principe de construction de la matrice d'Hadamard	39
III.5. Etude quantitative des facteurs.....	40
III.5.1. Plans factoriels complets (2^K)	40
III.5.2. Plans factoriels fractionnaires (2^{k-r}).....	41
III.6. Etude pour surfaces de réponses (MSR)	41

PARTIE 2. EXPERIMENTATION ET RESULTATS

CHAPITRE IV. Techniques expérimentales

IV.1. Introduction.....	42
IV.2. Matériels.....	42
IV.3. Opérations de prétraitement	43
IV.3.1. Zeste de citron.....	43
IV.3.2. Margines d'olive	43
IV.4. Méthodes.....	44
IV.4.1. Extraction de la pectine	44
IV.4.2. Encapsulation des composés phénoliques des margines.....	45
IV.4.3. Elaboration d'un biomatériau composite Pectine / Hydroxyapatite	47
IV.5. Analyses.....	47
IV.5.1. Caractérisation de la pectine extraite	47
IV.5.1.1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	47

IV.5.1.2. Spectrophotométrie infrarouge	47
IV.5.1.3. Chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC-PAD).....	48
IV.5.2. Caractéristiques physico-chimiques des margines prétraitées	48
IV.5.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques et leur pouvoir antiradicalaire dans les capsules.....	51
IV.5.3.1. Teneur en composés phénoliques	51
IV.5.3.2. Evaluation de pouvoir antiradicalaire	52
IV.6. Caractérisation des composites pectine / hydroxyapatite	52
IV.6.1. Densité des composites.....	52
IV.6.2. Test de résistance à la rupture en compression.....	53

CHAPITRE V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

V.1. Introduction	54
V.2. Criblage de facteurs.....	54
V.2.1. Domaine expérimental des facteurs	54
V.2.2. Construction de la matrice d'expériences	55
V.2.3. Estimation des poids des facteurs.....	57
V.2.4. Etude graphique des effets du rendement.....	58
V.3. Etude des surfaces de réponses.....	59
V.3.1. Modèle mathématique	59
V.3.2. Matrice d'expériences	59
V.3.3. Qualité de prédiction	61
V.3.3.1. Fonction de variance	61
V.3.3.2. Isovariance par rotation.....	61
V.3.4. Expérimentation	62
V.3.5. Validation du modèle	62
V.3.5.1. Equation du modèle sans les points tests	62
V.3.5.2. Modèle mathématique affiné.....	64
V.3.5.3. Analyse des résidus	65
V.3.5.4. Analyse de la variance.....	65
V.3.6. Optimisation	67
V.3.6.1. Analyse canonique	67

V.3.6.2. Etude du chemin optimal	70
V.7. Caractérisation de la pectine extraite.....	72
V.7.1. Infrarouge.....	72
V.7.2. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	73
V.7.3. Chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC-PAD)....	73
V.8. Conclusion.....	74

**CHAPITRE VI. Cinétique de l'extraction de la pectine à partir
du zeste de citron**

VI.1. Introduction	75
VI.2. Utilisation du modèle validé par l'étude des surfaces de réponses.....	75
VI.3. Description du modèle cinétique de l'extraction de la pectine	75
VI.4. Rendement prédit de l'extraction de la pectine	77
VI.5. Etude cinétique.....	78
VI.5.1. Détermination des paramètres cinétique du modèle (k_{ext} et k_{deg}).....	78
VI.5.2. Détermination de t_{max} et $y_{e,max}$	80
VI.5.3. Détermination de $Y_p(t)$, $Y_e(t)$ et $Y_d(t)$	81
VI.6. Etude thermodynamique (énergie d'activation).....	81
VI.7. Conclusion	82

**CHAPITRE VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des
marges en utilisant les surfaces de réponses**

VII.1. Introduction	83
VII.2. Caractérisation des marges	83
VII.3. Caractéristiques macroscopiques des capsules	85
VII.4. Modélisation (étude des surfaces de réponses).....	85
VII.4.1. Matrice d'expériences (matrice composite centrée)	85
VII.4.2. Modèle mathématique	86
VII.4.3. Critère à priori (fonction de variance)	88
VII.4.4. Expérimentation.....	88
VII.4.5. Validation du modèle pour les deux réponses Y_1 et Y_2	89
VII.4.5.1. Réponse Y_1	89

a. Equation du modèle sans les points tests pour Y_1	89
b. Modèle mathématique affiné pour Y_1	91
c. Analyse de la variance pour Y_1	92
VII.4.5.2. Réponse Y_2	93
a. Equation du modèle sans les points tests pour Y_2	93
b. Modèle mathématique affiné pour Y_2	94
c. Analyse de la variance pour Y_2	95
VII.5. Optimisation simultanée des deux réponses Y_1 et Y_2	96
VII.6. Conclusion	98

CHAPITRE VIII. Utilisation de la pectine pour l'élaboration d'un biomatériau

VIII.1. Introduction	99
VIII.2. Forme des biomatériaux	99
VIII.3. Contrainte - déformation	99
VIII.4. Résistance à la rupture en compression et densité des biomatériaux	100
VIII.5. Conclusion.....	101
Conclusion générale	102
Références bibliographiques	104

Liste des figures

Figure I.1. Molécule de la pectine	4
Figure I.2. Structure schématique d'une molécule de pectine	5
Figure I.3. Structure primaire d'un homogalacturonane	6
Figure I.4. Structure du rhamnogalacturonane I (RG I).....	6
Figure I.5. Structure du rhamnogalacturonane II	7
Figure I.6. Structure chimique de xylogalacturonane	7
Figure I.7. Pectines hautement méthylées.....	8
Figure I.8. Pectines faiblement méthylées	8
Figure I.9. Substitution de l'acide galacturonique	9
Figure I.10. Stabilité de la pectine	11
Figure I.11. Réaction de β -élimination	12
Figure I.12. Représentation schématique de la gélification des pectines LM (a : gel de pectine et b : boîte à œufs ou "egg box ")	14
Figure I.13. Mécanisme d'hydrolyse et de transport de la pectine à la surface des particules ...	19
Figure II.1. Représentation schématique des systèmes d'encapsulation : (a) liposomes, (b) sphères, (c) capsules, (d) système moléculaire.....	22
Figure II.2. Schéma de principe du procédé de gélification de gouttes (extrusion)	26
Figure II.3. Représentation schématique des deux modes de libération des particules	27
Figure II.4. Réaction de réduction de DPPH par un antioxydant	29
Figure IV.1. Etapes de préparation de la poudre du zeste de citron.....	43
Figure IV.2. Système de l'extraction de la pectine (montage à reflux)	45
Figure IV.3. Flow sheet des différentes étapes de formulation des capsules.....	46
Figure IV.4. Formulation des capsules	46
Figure IV.5. Mesure de la résistance à la rupture en compression	53
Figure V.1. Pectine après coagulation (a), gel de pectine (b).....	54
Figure V.2. Représentation graphique des effets des facteurs sur le rendement d'extraction.....	59
Figure V.3. Variation de la réponse (Rendement) au temps = 40 min.....	61
Figure V.4. Répartition des résidus en fonction du rendement calculé.....	65
Figure V.5. Courbure de l'équation canonique	69
Figure V.6. Analyse du chemin optimal de la réponse (rendement en pectine).....	70
Figure V.7. Variation de la réponse (rendement) à température = 94 °C.....	71
Figure V.8. Spectres IR de la pectine commerciale et de celle extraite	72

Figure V.9. Images MEB des pectines : commerciale (a) et extraite (b)	73
Figure VI.1. Graphique des valeurs prédites du rendement d'extraction de la pectine (a. pH=1.50 ; b. pH=1.80 ; c. pH=2.50 ; d. pH=3.00).....	77
Figure VI.2. Graphique du rendement prédit et calculé à différentes température pour chaque pH (a. pH =1.50 ; b. pH = 1.80 ; c. pH = 2.50 ; d. pH = 3.00).....	79
Figure VI.3. Variation de $Y_{e,max}$ en fonction de pH à différentes températures	80
Figure VI.4. Représentation graphique des valeurs de $Y_p(t)$, $Y_e(t)$ et $Y_d(t)$ (a. pH = 1.80 et T = 94°C ; pH = 1.80 et T = 40 ° C	81
Figure VI.5. Détermination de l'énergie d'activation.....	82
Figure VII.1. Aspect macroscopique des capsules obtenues : (a) capsules dans le bain de $CaCl_2$; (b) capsules après refroidissement et (C) capsules après séchage	85
Figure VII.2. Profil de la désirabilité des deux réponses Y_1 et Y_2	97
Figure VIII.1. Forme des biomatériaux	99
Figure VIII.2. Courbe contrainte - déformation de composite pectine/ HA / talc (10 %).....	100
Figure VIII.3. Résistance à la rupture en compression et la densité des biomatériaux préparés	101

Liste des tableaux

Tableau I.1. Teneur en pectine de quelques végétaux	10
Tableau II.1. Structure et concentration des monomères les plus rencontrés dans les margines	33
Tableau III.1. Lignes génératrices d'une matrice d'Hadamard	40
Tableau V.1. Domaine expérimental des facteurs (criblage)	55
Tableau V.2. Matrice d'expériences (criblage)	55
Tableau V.3. Plan d'expérimentation (criblage)	56
Tableau V.4. Rendement d'extraction en pectine (Y_e)	57
Tableau V.5. Estimations des coefficients du modèle	58
Tableau V. 6. Matrice composite centrée en variables codées et variables réelles.....	60
Tableau V.7. Résultats expérimentaux (matrice composite centrée)	62
Tableau V.8. Coefficients du modèle sans les points tests (Y_e).....	63
Tableau V.9. Tests statistiques appliqués aux points tests.....	64
Tableau V.10. Coefficients du modèle affiné	64
Tableau V.11. Analyse de la variance.....	66
Tableau V.12. Rendement en pectine extraite à partir de différentes espèces végétales	71
Tableau V.13. Composition en monosaccharides de la pectine extraite	74
Tableau VI.1. Teneur totale en protopectine dans le zeste de citron (A_0)	76
Tableau VI.2. Paramètres du modèle cinétique et R^2	78
Tableau VI.3. Energie d'activation	82
Tableau VII.1. Caractéristiques des margines utilisées	83
Tableau VII.2. Domaine expérimental de la matrice composite centrée.....	86
Tableau VII. 3. Matrice composite centrée en variables codées et réelles	87
Tableau VII.4. Résultats expérimentaux des deux réponses Y_1 et Y_2	89
Tableau VII.5. Estimations des coefficients du modèle sans les points tests pour Y_1	90
Tableau VII.6. Tests statistiques appliqués aux points tests pour Y_1	91
Tableau VII.7. Estimations des coefficients du modèle affiné pour Y_1	91
Tableau VII.8. Analyse de la variance pour Y_1	92
Tableau VII.9. Estimations des coefficients du modèle sans les points tests pour Y_2	93
Tableau VII.10. Tests statistiques appliqués aux points tests pour Y_2	94
Tableau VII.11. Estimations des coefficients du modèle affiné pour Y_2	95
Tableau VII.12. Analyse de la variance pour Y_2	96
Tableau VII.13. Coordonnées de l'optimum	97

Liste des abréviations

HG: homogalacturonane

RG I: rhamnogalacturonane I

RG II : rhamnogalacturonane II

XGA : xylogalacturonane

Gal A : acides galacturoniques

Rha : unités rhamnosiques

DM : degré de méthylation

HM : pectine hautement méthylées

LM : pectine faiblement méthylées

DE : degré d'estérification

KDa : kilo Dalton

M : mole/L

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

CDTA : trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique

Φ OH : composés phénoliques

UV : ultraviolet

DPPH : diphénylepicrylhydrazyl

MSR : méthodologie des surfaces de réponses

HA : hydroxyapatite

MPa : Mégapascal

Y_e : rendement d'extraction en pectine

Exp : expérience

A_0 : teneur totale en protopectine contenue dans le zeste de citron

MEB: microscopie électronique à balayage

IR : infrarouge

HPAEC-PAD: chromatographie d'échange d'anions à haute performance couplée d'une détection ampérométrique pulsée

DCO : demande chimique en oxygène

MS: teneur en matière sèche

TE : teneur en eau

TC : teneur en cendres

MV : teneur en matière volatile

R_r : résistance à la rupture en compression

Y_e : rendement d'extraction en pectine

X : variable codée

σ : l'écart-type

ddl: degré de liberté

b_j : estimations des poids des facteurs

$Y_p(t)$: quantité de protopectine

k_{ext} : constante de vitesse d'extraction

k_{deg} : constante de vitesse de dégradation

$Y_d(t)$: quantité de la pectine dégradée

INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'antiquité, la culture des agrumes joue un rôle très important dans le développement économique et social des pays producteurs à travers le monde. La production d'agrumes se trouve principalement concentrée dans les pays du bassin méditerranéen où ce secteur représente un segment porteur de grande valeur ajoutée. En Algérie, les agrumes occupent une place importante dans la nouvelle politique agricole avec une production estimée à 571 000 tonnes au cours des années 2010 - 2011, où le citron (Lemon) représente 8 % de la production totale d'agrumes avec une quantité de 44 000 tonnes (FAO, 2012). La superficie couverte par cette culture fruitière est de 65 353 ha, soit 8 % de la superficie agricole utile (SAU) (Agroline, 2014).

Les agrumes, sont destinés soit à être consommés directement (frais) ou à subir des transformations (boissons, confitures,...). A cet effet, l'industrie de fabrication de jus rejette annuellement des tonnages énormes de sous-produits (écorces, pépins,...) dans la nature sans aucun traitement. Ces rejets ne cessent de polluer l'environnement à longueur d'année. Ces résidus peuvent constituer une source intéressante de matières premières pour l'extraction de biomolécules nobles telles que les huiles essentielles, les composés phénoliques, les flavonoïdes et polysaccharides comme la cellulose ou plus particulièrement les pectines (Bicu et Mustata, 2011; Kim *et al.*, 2004).

Les pectines sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire comme épaississants, gélifiants et émulsifiants dans l'élaboration des confitures, des gelées, des jus de fruits, des desserts et des produits laitiers (May, 1990). Elles sont utilisées aussi comme renfort dans le domaine des biomatériaux (Munarin *et al.*, 2011; Sumathra *et al.*, 2017) et comme agent d'encapsulation des substances actives dans divers domaines (pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique, ...), ceci, grâce à leur propriété de former avec des ions divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , ...) une boîte à œufs enveloppant des composés d'intérêt tels que les arômes, les vitamines (Liu *et al.*, 2003 ; Zam *et al.*, 2013) et notamment les composés phénoliques (Martins *et al.*, 2014 ; Pang *et al.*, 2014).

Les composés phénoliques ont pour propriété principale la capacité de neutraliser les radicaux libres dommageables pour les organismes vivants. En plus de cet effet, ces composés interviennent dans le traitement de certaines maladies inflammatoires, cardiovasculaires,... (Aruoma, 1994 ; Stoclet *et al.*, 2004). Ils sont également utilisés comme additifs dans les industries agroalimentaires et cosmétiques et ils sont largement présents dans les organes végétaux (graines, fruits, feuilles). Cependant, lors des procédés de transformation industriels de ces végétaux, une grande partie de ces composés se trouve dans leur sous produits comme

l'industrie oléicole qui engendre un déchet liquide riche en composés phénoliques (Ranalli, 1991). Ces composés ont l'avantage d'être bénéfique pour la santé, cependant, ils ont un impact négatif sur l'environnement.

Les pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive sont confrontés à la problématique de l'élimination des rejets liquides, appelés margines. Ces eaux de végétation sont très polluantes, fortement chargées en matières organiques. En Algérie, ces effluents sont estimés à 105 000 tonnes pour une production annuelle de 30 000 tonnes d'huile d'olive (Filaha, 2009). L'absence des techniques de traitements adaptés fait que les industries oléicoles rejettent ces margines dans la nature sans aucun traitement préalable, ce qui en résulte un impact négatif sur l'environnement, engendrant le colmatage des sols, dégagement de mauvaises odeurs, réduisant ainsi la qualité des sols et induisant une forte consommation d'oxygène...(Mebirouk, 2002 ; Benyahia et Zein, 2003). L'effet nocif de ces margines dérive en grande partie de leur contenu important en composés phénoliques, difficilement biodégradables. Afin de remédier à ces problèmes, plusieurs techniques ont été testées, mais les contraintes économiques restent le facteur limitant. Comme alternative aux traitements onéreux, la récupération de quelques composés dont notamment les composés phénoliques à partir de ces effluents par la méthode de l'encapsulation constitue l'une des solutions valorisantes.

L'objectif de ce travail consiste en la valorisation des sous produits agrumicoles et oléicoles. La démarche consiste d'abord en la récupération de la pectine à partir des écorces de citron ; cette pectine servira comme agent enrobant des composés phénoliques des margines d'olive sans passer par leur extraction. Ce polysaccharide sera aussi utilisé pour améliorer la résistance à la rupture de l'hydroxyapatite.

Cette étude est constituée de deux parties :

La première partie comporte des généralités sur les pectines et quelques notions sur l'encapsulation des composés phénoliques des margines. Nous avons également donné quelques définitions sur la méthodologie de la recherche expérimentale (plans d'expériences).

Composée de cinq chapitres, la seconde partie est consacrée à l'expérimentation et à l'interprétation des résultats. Le premier chapitre décrit le matériel (zeste de citron, margines...) et les méthodes utilisées (extraction de la pectine, encapsulation des composés phénoliques des margines et élaboration d'un matériau composite pectine / hydroxyapatite).

Le deuxième chapitre est dédié à la présentation et à l'interprétation des résultats obtenus en utilisant les plans d'expériences lors de l'extraction de la pectine (criblage et surface de réponses). Nous retrouvons dans le chapitre trois l'étude cinétique de cette extraction; en utilisant le modèle mathématique développé lors de l'étude des surfaces de réponses.

Le quatrième chapitre porte sur l'encapsulation des composés phénoliques des margines par la pectine sans passer par leur extraction (modélisation par les surfaces de réponses et interprétation des résultats).

Dans le dernier chapitre, sont interprétés les résultats du test mécanique (résistance à la rupture en compression) appliqué aux biomatériaux : hydroxyapatite, pectine / hydroxyapatite et pectine / hydroxyapatite / adjuvant.

PARTIE 1

STADE ACTUEL DE LA RECHERCHE

CHAPITRE I. GENERALITES SUR LES PECTINES

CHAPITRE II. ENCAPSULATION DES COMPOSES
PHENOLIQUES DES MARGINES

CHAPITRE III. METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES

PECTINES

I.1. Introduction

Les polymères naturels occupent une place importante dans de nombreuses applications, à la fois pour leur image comme produit naturel, leurs propriétés nutritionnelles et surtout fonctionnelles. Parmi ces polymères, les pectines sont très largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, pour leurs propriétés gélifiantes, stabilisantes ou viscosifiantes.

Pour la première fois, les pectines, du mot grec pektos, qui signifie «prise en gelée», ont été isolées par Henri Braconnot, en 1825, à partir d'extraits végétaux. Ces molécules représentent un ensemble complexe et hétérogène de polysaccharides fortement hydratés et riches en acides uroniques. Au début du XX^{ème} siècle, la pectine a fait l'objet, pour la première fois d'une extraction à l'échelle industrielle.

I.2. Structure des pectines

Les pectines sont une classe complexe de polysaccharides qui entrent dans la composition des parois cellulaires végétales. Elles sont considérées comme des additifs alimentaires (enregistrées sous le n°E440). Le squelette de la pectine est composé majoritairement d'unités d'acide D-galacturonique reliées en α -(1 \rightarrow 4) par des liaisons glycosidiques et de faibles quantités de α -L-rhamnose plus ou moins ramifiés (Fishman et Jen, 1986) (figure I.1).

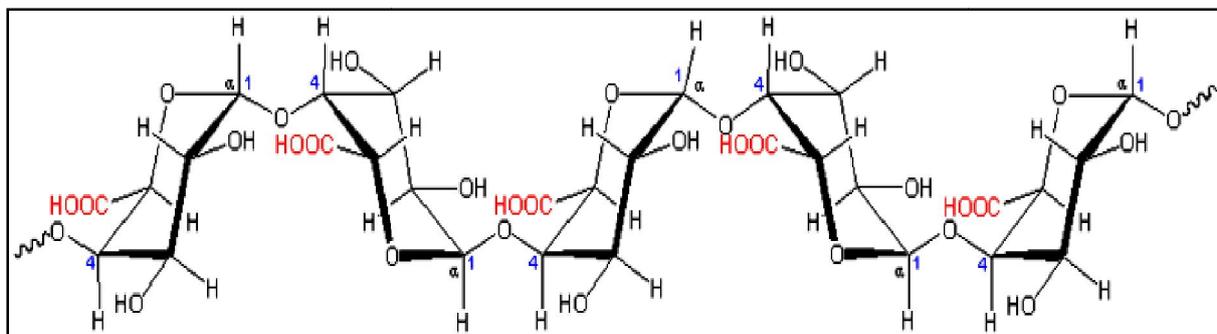


Figure I.1. Molécule de la pectine (Fishman et Jen, 1986).

La structure fine des pectines peut varier en fonction de l'espèce végétale considérée, le stade de développement, la localisation pariétale ou tissulaire et la méthode d'extraction. (Ridley *et al.*, 2001 ; Thakur *et al.*, 1997). Typiquement, dans la paroi végétale d'un tissu indifférencié, les homogalacturonanes (HG) sont les plus abondants. Ils représentent 65 % des pectines, la proportion de rhamnogalacturonane I (RG I) est comprise entre 20 % et 35 % (Mohnen, 2008). Les rhamnogalacturonanes II (RG II) et xylogalacturonanes (XGA) sont

des composés minoritaires qui représentent moins de 10 % des pectines (O'Neill *et al.*, 2004 ; Zandleven *et al.*, 2007; Mohnen, 2008). Ces différents domaines interagissent pour former une macromolécule complexe selon plusieurs modèles structuraux.

Dans le premier modèle développé, les HG et XGA forment des zones lisses et les RG I et RG II les zones hérissées (Schols *et al.*, 1995), ces domaines contiennent des chaînes latérales de sucres neutres. Dans le second modèle, le squelette principal est uniquement formé par les RG I, toutes les autres sous-structures forment des chaînes latérales (Vincken, 2003).

Le modèle généralement utilisé est celui qui décrit les pectines comme un enchaînement de deux structures majoritaires, présentant une chaîne principale homogalacturonique (zone lisse nommée HG) et une chaîne rhamnogalacturonique (zone hérissée nommée RG), laquelle présente des ramifications (De Vries *et al.*, 1982) (figure I.2).

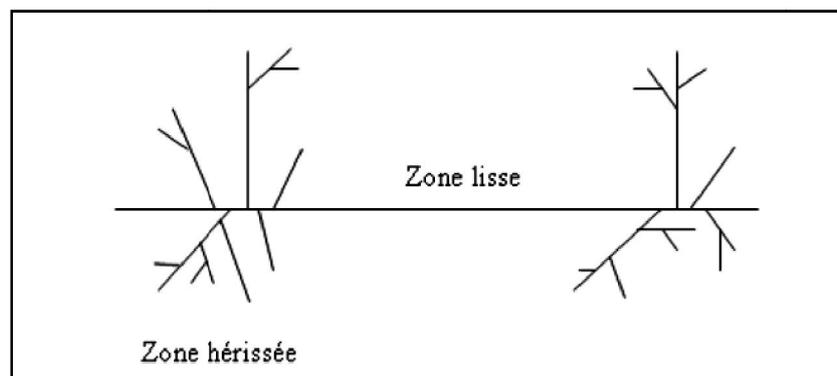


Figure I.2. Structure schématique d'une molécule de pectine.

I.2.1. Homogalacturonane

L'homogalacturonane est un homopolymère linéaire constitué d'environ 100 résidus d'acides galacturoniques (GalA) liés en α -(1,4) (Thibault *et al.*, 1993). Certains résidus GalA peuvent être estérifiés en position C-6 par des groupements méthyles ou O-acétylés en O-2 ou O-3 (Perrone *et al.*, 2002). Ils forment la zone lisse des pectines (figure I.3).

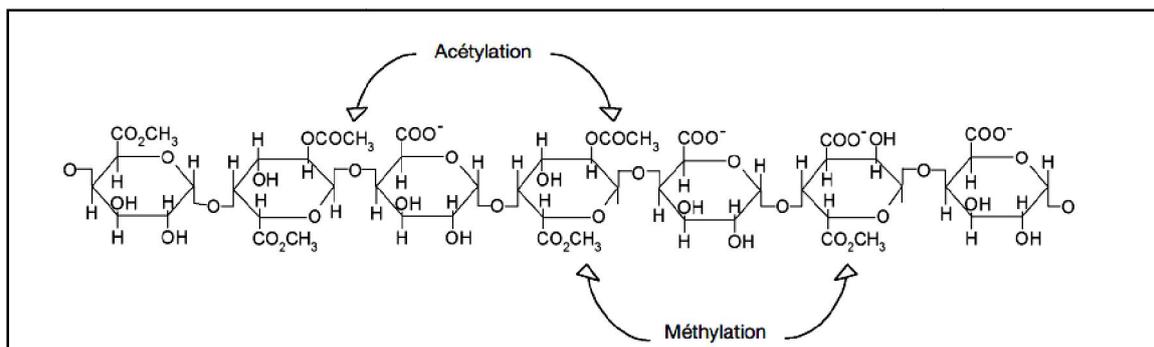


Figure I.3. Structure primaire d'un homogalacturonane.

I.2.2. Rhamnogalacturonane

I.2.2.1. Rhamnogalacturonane I

Le squelette osidique de rhamnogalacturonane I est constitué d'une alternance d'unités rhamnosiques et d'unités galacturoniques [$\rightarrow 4$]- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow)]. Comme dans l'homogalacturonane, certains résidus d'acide galacturonique de RG I sont acétylés (Dumville et Fry, 2000 ; Perrone *et al.*, 2002), de nombreux oses peuvent se lier sur les résidus rhamnosyl en C-4 ou sur les chaînes d'acide galacturonique, dont les plus dominants sont l'arabinose, le galactose et les arabinogalactanes (Bonnin *et al.*, 2002 ; Thibault *et al.*, 2000 ; Ralet *et al.*, 2001) (figure I.4).

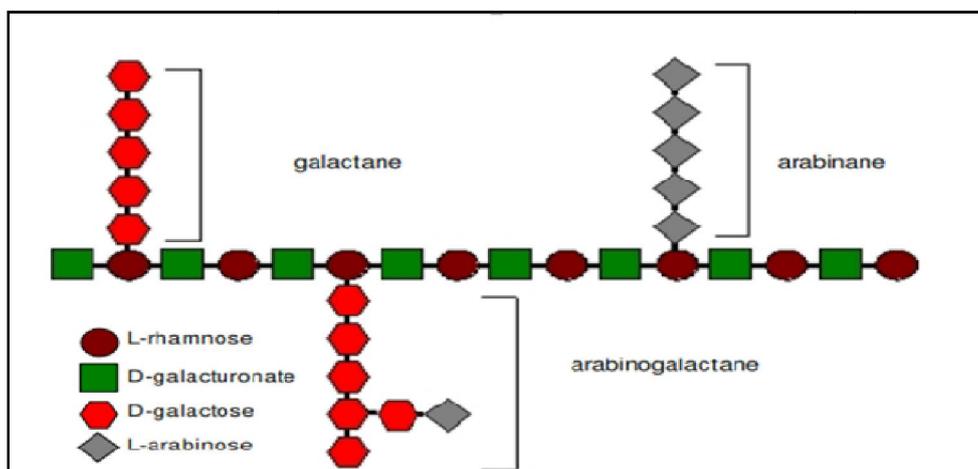


Figure I.4. Structure du rhamnogalacturonane I (RG I).

I.2.2.2. Rhamnogalacturonane II

Le RG II comprend approximativement neuf résidus de GalA, auxquels sont unies quatre chaînes latérales complexes, nommées A, B, C et D (figure I.5) (O'Neill *et al.*, 2004).

Ces chaînes latérales sont constituées d'au moins 12 résidus glycosyles différents : D-apiose, 3-C-carboxyl 5-déoxy-Lxylose (acide L-acérique), 2-O-méthyl L-fucose, 2-O-méthyl D-xylose, L-galactose, acide 3-déoxy-D-lyxo-2-heptulosarique, acide 2-kéto-3-déoxy-D-manno-octulosonique, L-arabinose, D-galactose, L-rhamnose, D-acide glucuronique et D-GalA (O'Neill *et al.*, 2004).

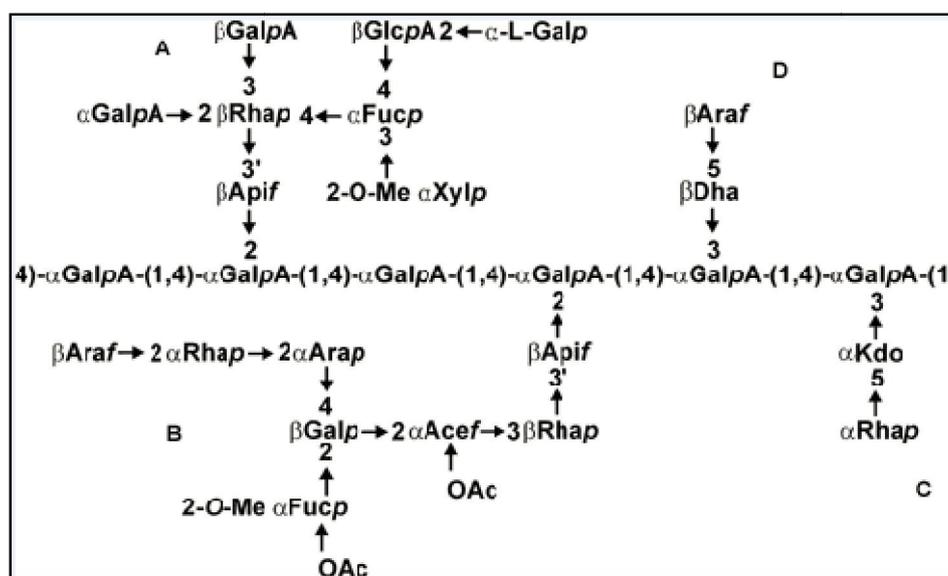


Figure I.5. Structure du rhamnogalacturonane II.

I.2.3. Xylogalacturonane

Les homogalacturonanes peuvent également être substitués par des unités simples de β-D xylose liées sur le C-3 des acides galacturoniques. Ces zones sont appelées xylogalacturonanes (figure I.6).

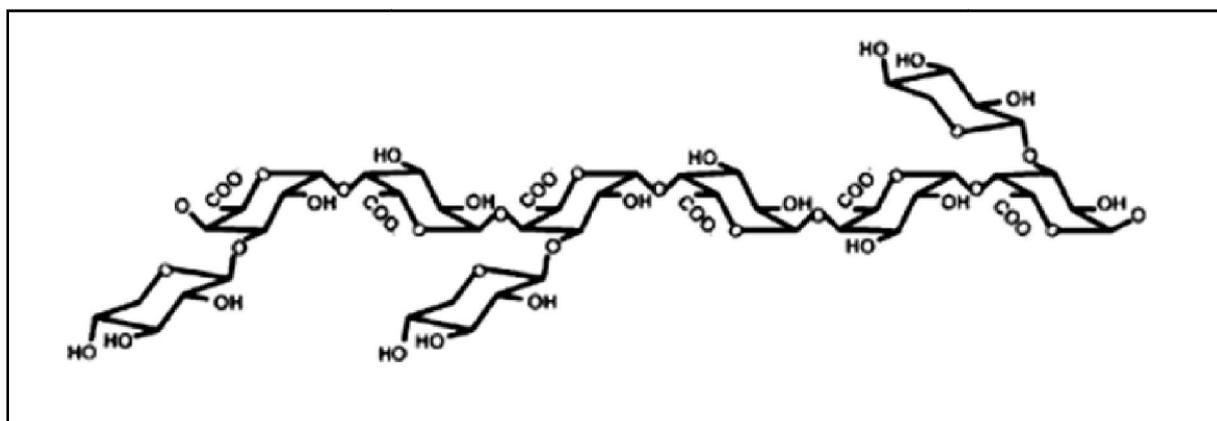


Figure I.6. Structure chimique de xylogalacturonane (Wong, 2008).

I.3. Types de pectines

Les pectines sont identifiées à partir de leur degré de méthylation (DM) exprimé en %, qui est défini comme étant le nombre de fonctions carboxyliques méthylées pour cent motifs d'acide galacturonique de la chaîne principale (nombre de résidus méthylés par rapport aux résidus totaux). Selon leur degré de méthylation, on distingue:

- les pectines "hautement méthylées" (HM pour High Methoxyl) (figure I.7) ayant un DM > 50 % sont majoritairement présentes dans la nature (May, 1990).

- les pectines "faiblement méthylées" (LM pour Low Methoxyl) (figure I.8) ayant un DM < 50 % sont obtenues à partir des pectines HM, soit par voie chimique (dé-estérification alcaline à basse température) ou par voie enzymatique (utilisation de pectines méthylestérases).

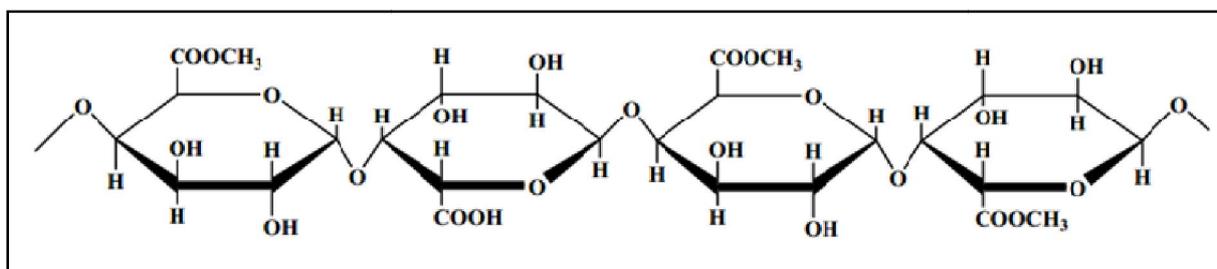


Figure I.7. Pectines hautement méthylées (Serguschenko *et al.*, 2007).

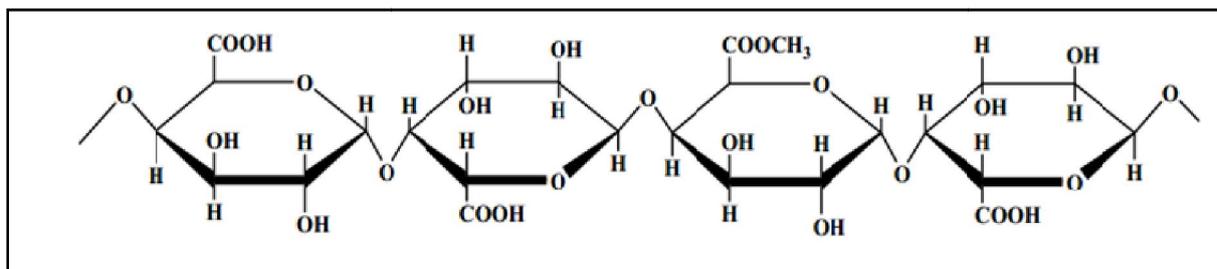


Figure I.8. Pectines faiblement méthylées (Serguschenko *et al.*, 2007).

Il est aussi possible de modifier chimiquement la structure de la pectine pour lui conférer d'autres propriétés (amidation), en procédant à une dé-estérification des pectines HM en présence d'ammoniaque en suspension alcoolique qui permet de convertir les groupements méthoxyles en groupements amides primaires (-CONH₂). Les facteurs influençant la réaction d'amidation sont : le type de chaîne alkyle de l'amine, la basicité du composé aminé (dépend du pH du milieu réactionnel), la polarité et la température du milieu réactionnel (Tilly, 2010).

Les fonctions acides des pectines sont souvent neutralisées par la présence d'ions mono ou divalents tels que $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{NH}_4^+/\text{Ca}^{++}$ (figure I.9) (Tilly, 2010).

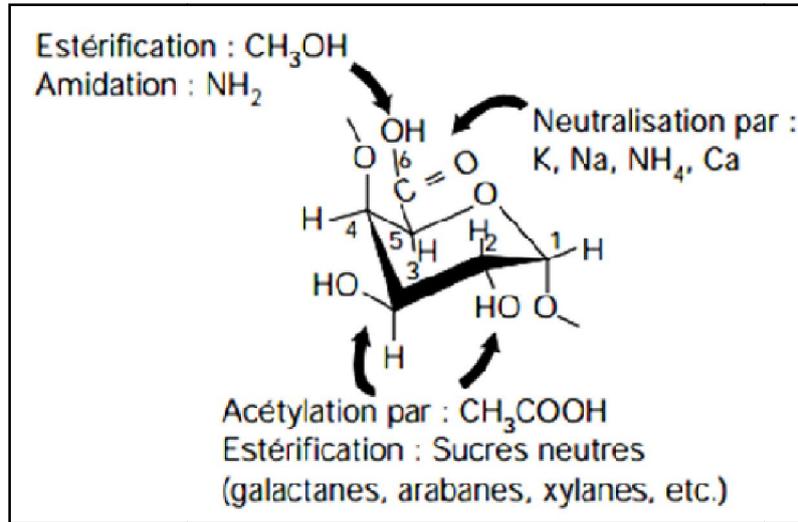


Figure I.9. Substitution de l'acide galacturonique.

I.4. Localisation des pectines

Les substances pectiques sont présentes dans tous les végétaux (tableau I.1) où elles représentent environ 0.04 à 5.50 % du poids frais (Bonnin *et al.*, 1997, Thibault et Ralet, 2001 ; Kashyap *et al.*, 2001). Elles sont localisées dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules (Gognies *et al.*, 1999 ; Voragen *et al.*, 1995). La fonction de la pectine dans la lamelle moyenne est de réguler l'adhésion des cellules végétales entre elles (Iwasaki *et al.*, 1998). Les pectines présentes dans la paroi cellulaire primaire sont nécessaires à la structure de la plante (Willats *et al.*, 2001). Selon l'âge des tissus, la pectine se trouve sous deux formes : protopectine et acide pectique (Kirk *et al.*, 1967). La transformation progressive de la protopectine en pectine soluble se fait au cours de la croissance cellulaire, selon des mécanismes enzymatiques complexes qui aboutissent au ramollissement des tissus végétaux (Thibault et Petit, 1979).

Les pectines sont abondantes dans les épiluchures des pommes, des agrumes et des pêches. C'est dans la pelure des agrumes (citron, orange) que les pectines se trouvent le plus (tableau I.1). Plusieurs travaux de recherche ont été consacrés à la valorisation des sous produits issus de la transformation des fruits et légumes (industrie agroalimentaire) dans le but de procéder à l'extraction de la pectine. Nous pouvons citer la pelure de betterave (Mesbahi *et al.*, 2005), les déchets de sisal (Santos *et al.*, 2013) et les écorces d'orange (Abid *et al.*, 2009). Soulignons par ailleurs l'importance des écorces de citron qui peuvent être considérées

comme une matière première à valoriser en raison de leur richesse en pectine (Masmoudi *et al.*, 2008; Sundararaman *et al.*, 2016 ; Bagde *et al.*, 2017).

Tableau I.1. Teneur en pectine de quelques végétaux
(Bonnin *et al.*, 1997 ; Thibault et Ralet, 2001).

Fruits	Teneur en pectine (% du poids frais)
Ecorce d'orange	3.60 - 5.50
Ecorce de citron	2.50 - 4.00
Ecorce de fruit de la Passion	2.10 - 3.00
Marc de pomme	1.50 - 2.50
Tamarin	1.71
Banane	0.70 - 1.20
Pulpe de betterave	1.00
Mûre	0.72
Pomme	0.50 - 1.60
Pêches	0.10 - 0.90
Tomate	0.20 - 0.60
Carotte	0.20 - 0.50
Mangue	0.26 - 0.42
Ananas	0.04 - 0.13

I.5. Propriétés physico-chimiques

Les caractères polymérique et polyélectrolytique des pectines leur confèrent un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques, dont nous citons :

I.5.1. Solubilité et précipitation

La pectine est soluble dans l'eau, formant une solution colloïdale, opalescente et insoluble dans l'éthanol. La solubilité des pectines est conditionnée par un certain nombre de facteurs : température, masse moléculaire, taux de ramification, degré de méthylestérification et répartition des groupements méthylesters. Ainsi, une pectine sera d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible, que sa structure est fortement ramifiée et que ces fonctions carboxyliques sont engagées dans une estérification avec le méthanol (taux de méthyl estérification fort) (Thibault *et al.*, 1991).

Les pectines peuvent être aisément précipitées en présence de solvants organiques (acétone, éthanol, isopropanol) et de cations mono et multivalents (Na^+ , Ca^{2+} , H^+ , Al^{3+}).

I.5.2. Stabilité et dégradation

Les pectines en solution dans un milieu acide sont stables, en revanche, des réactions de désestérification et de dépolymérisation (hydrolyse ou β -élimination) peuvent se produire sous des conditions données de pH et de température. Aux températures inférieures à 10°C , la désestérification prédomine alors qu'à des températures plus élevées, la dépolymérisation a lieu plus rapidement et peut conduire à la dégradation totale de la pectine (Voragen *et al.*, 1995). En milieu alcalin et à basse température, les groupements esters sont saponifiés (figure I.10). les réactions de β -élimination des substituants en O_4 sont accélérées à des températures supérieures à 60°C (Kim *et al.*, 1978 ; Oosterveld *et al.*, 1996) selon le mécanisme où l'hydrogène en C_5 , rendu plus acide par le groupe ester méthylique, est attaqué par l'ion hydroxyde. Il se produit alors un arrangement avec transfert électronique aboutissant à la rupture de la liaison glycosidique et la formation entre les C_4 et C_5 d'une double liaison qui est conjuguée avec celle de la fonction carboxylique (Morris *et al.*, 2002) (figures I. 10 et I.11).

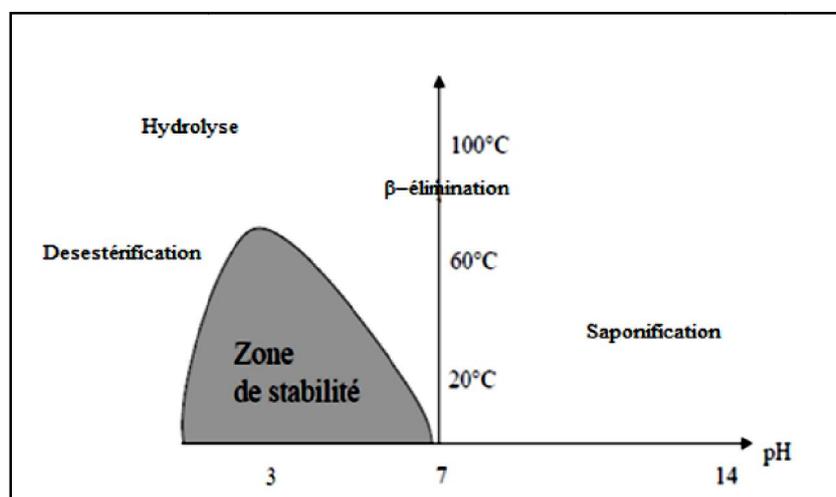


Figure I.10. Stabilité de la pectine (Renard, 2010).

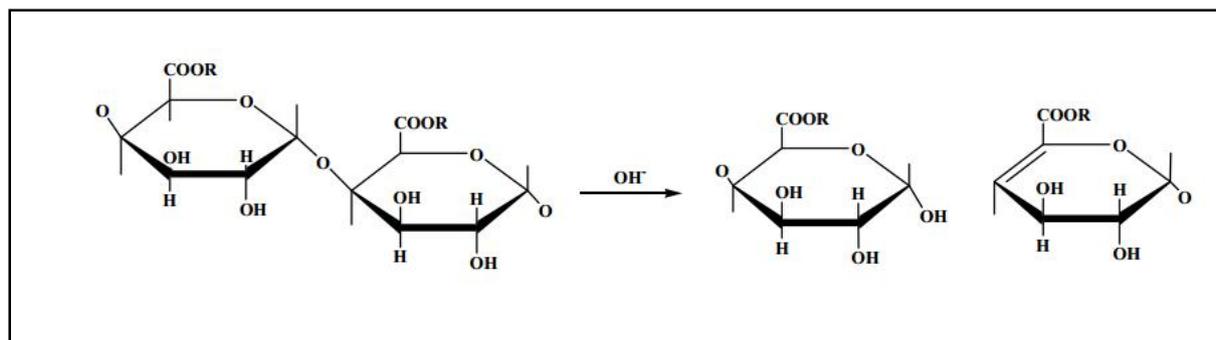


Figure I.11. Réaction de β -élimination.

I.5.3. Viscosité

Le pouvoir épaississant des pectines peut être évalué grâce à leur viscosité intrinsèque qui reflète le volume hydrodynamique occupé par le polymère à des conditions données. La viscosité intrinsèque des pectines est influencée par le DM (lié à la masse molaire) (Yoo *et al.*, 2006). Le pouvoir d'épaississement dépend, aussi, des conditions extrinsèques (température, nature de solvant, pH) (Hotchkiss *et al.*, 2002 ; Mesbahi *et al.*, 2005). Citons comme exemple les pectines de la betterave sucrière qui ont une faible viscosité par rapport à celles issues du citron ou de la pomme (Oosterveld *et al.*, 1996).

I.5.4. Emulsification

Le rôle d'un agent émulsifiant est de réduire la tension interfaciale d'une émulsion (eau dans l'huile, huile dans l'eau...) pour lui permettre de se diviser en fines gouttelettes et d'être stable. La plupart des polysaccharides ne sont pas considérés comme des émulsifiants. Néanmoins, les pectines peuvent être utilisées comme agents émulsifiants à condition de réduire leurs interactions avec les ions divalents (Akhtar *et al.*, 2002). Le pouvoir émulsifiant des pectines est influencé par les caractéristiques structurales de celles-ci et les conditions extrinsèques comprenant la concentration en polymère et le pH de la solution (Ngouemazong *et al.*, 2015). Les études réalisées sur les pectines dépolymérisées de citrus ou de pomme ont montré qu'à des poids moléculaires inférieurs à 80 KDa, ces dernières possèdent de bonnes propriétés émulsifiantes avec un taux d'acétylation bas (Mazoyer *et al.*, 1999).

I.5.5. Gélification

La gélification se définit par l'établissement d'un réseau continu tridimensionnel de molécules de polymère reliées entre elles par des zones de jonction retenant une phase liquide entre les mailles du réseau.

Les pectines sont capables de former des gels par différents mécanismes, quel que soit leur degré de méthylation. Pour le cas des pectines HM, le degré d'estérification (DE) conditionne la rapidité de la prise du gel, plus il est élevé, plus la formation du gel est rapide. Les pectines faiblement méthylées (LM) sont capables de fixer fortement les ions divalents tels que le calcium. Pour les pectines LM amidées, la cinétique de gélification est proche de celle des pectines LM classiques, néanmoins, la présence des groupements amides permet la gélification des pectines LM à pH acide inférieur à 3 (Capel *et al.*, 2006).

1.5.5.1. Gélification des pectines hautement méthylées

Les pectines HM sont capables de former un gel à pH acide (2.20 - 2.80) en présence d'un sucre, par exemple : le saccharose (Voragen *et al.*, 1995). Ces deux éléments favorisent les interactions pectine - pectine plutôt que les interactions pectine - eau, ceci suite à la diminution des répulsions électrostatiques (pH acide) et de l'activité de l'eau (présence de sucre) (Sato et Miyawaki, 2008). Dans ce cas, le mécanisme de gélification correspond à la formation d'interactions hydrophobes entre les groupements méthyles et les liaisons hydrogènes entre les groupements carboxyliques des résidus d'acide galacturonique non estérifiés et les alcools secondaires (Oakenfull et Scott, 1984).

1.5.5.2. Gélification des pectines faiblement méthylées

La pectine LM se gélifie en présence d'ions calcium, le gel serait formé par l'association de chaînes pectiques, au niveau des zones homogalacturoniques non estérifiées (figure I.12a). Les ions calcium établissent des liaisons de coordination entre les groupements carboxylates de deux chaînes pectiques adjacentes. Ces liaisons sont stabilisées par les oxygènes des hydroxyles adjacents. La prise du gel dépend fortement de la quantité du calcium fixée. Cette réactivité aux ions calcium est également influencée par la distribution des groupements carboxyles libres et par une distribution en bloc qui permet la fixation et conditionne ainsi la texture finale du produit. Dans ce cas, le calcium va favoriser la liaison de deux fragments de chaînes composées d'acide galacturonique non méthylé pour donner une structure dite de boîte à œufs ou "egg box" (figure I.12b) (Axelos et Thilbault, 1991).

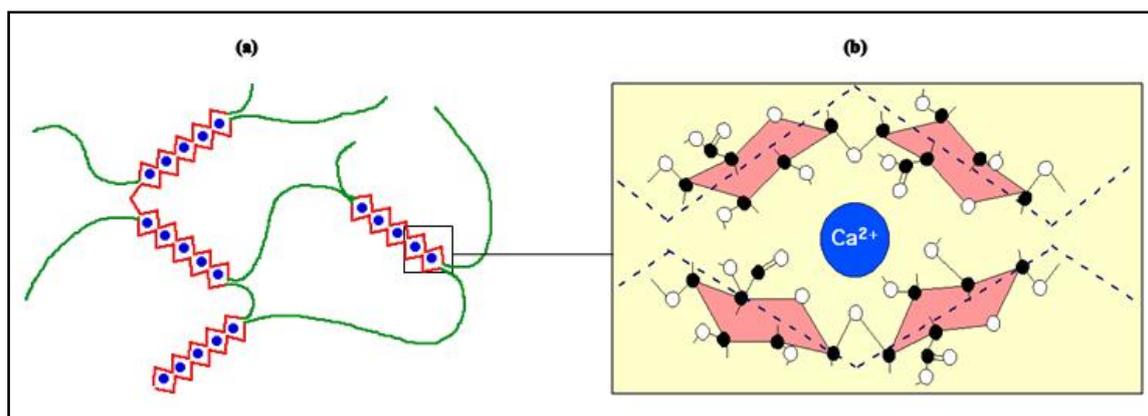


Figure I.12. Représentation schématique de la gélification des pectines LM (a : gel de pectine et b : boîte à œufs ou “egg box”).

I.5.6. Masse moléculaire

La masse moléculaire des pectines est relativement difficile à évaluer notamment à cause de leur hétérogénéité et leur caractère polyanionique. La masse moléculaire des pectines est comprise entre une dizaine et une centaine de KDa. Elle dépend à la fois de l'origine des pectines et de leur mode d'extraction. En effet, certaines méthodes d'extraction, visant à purifier les échantillons, peuvent entraîner des dépolymérisations des chaînes de pectine.

A ce sujet, la technique HPLC d'exclusion stérique couplée au laser light scattering qui améliorerait sensiblement la caractérisation du poids moléculaire des pectines a été développée (Ralet *et al.*, 2002).

I.6. Utilisations des pectines

Les substances pectiques ont fait l'objet de nombreuses recherches portant notamment sur leurs fonctions au sein de la paroi végétale, leur structure chimique et leur caractérisation en tant qu'additifs. Toutes ces recherches ont conduit au développement de nombreuses applications de la pectine dans divers domaines tels que : l'industrie cosmétique et plastique. Ces substances pectiques sont essentiellement utilisées comme agents de texture, gélifiants, stabilisants et épaississants (May, 1990 ; Thakur *et al.*, 1997 ; Mesbahi *et al.*, 2005). D'un point de vue nutritionnel, les pectines sont considérées comme des fibres alimentaires qui exercent des effets physiologiques sur le tractus intestinal en réduisant le temps du transit et l'absorption du glucose (Olano-Martin *et al.*, 2002). Elles sont utilisées aussi comme ingrédient dans la préparation des confitures, des marmelades et des gelées. Les pectines sont employées dans la fabrication de l'emballage alimentaire comme films comestibles biodégradables, respectant l'environnement (Espitia *et al.*, 2014).

Les pectines sont aussi utilisées dans le domaine pharmaceutique comme agents anti diarrhée, pour la désintoxication et l'élimination du cholestérol dans le sang (Voragen *et al.*, 1995).

I.6.1. Pectine comme matrice d'encapsulation

Les pectines sont très utilisées comme matrices d'encapsulation et de vectorisation de molécules d'intérêt (arômes, antioxydants, antimicrobiens, huiles essentielles, principes actifs,...) (Liu *et al.*, 2003 ; Zam *et al.*, 2013) en raison de leurs propriétés gélifiantes et filmogènes. A ce sujet, différents travaux ont été réalisés. Une technique de mise au point des microsphères à base de prednisolone a été développée pour la thérapie ciblée du côlon où la pectine est utilisée comme agent d'enrobage (Dashora et Jain, 2009). De même, un système multiparticulaire a été mis au point (microsphères pectiniques chargées de Tramadol) pour le traitement du syndrome de l'intestin irritable (Kushwaha *et al.*, 2011). La pectine comme agent d'encapsulation a été utilisée pour préparer des microbeads chargées de polyphénols extraits à partir des pelures de grenade (Zam *et al.*, 2013). Elle a été aussi utilisée pour l'encapsulation de l'huile de foie de requin (Diaz-Rojasa *et al.*, 2004).

I.6.2. Utilisation des pectines dans le domaine des biomatériaux

L'os remplit une fonction de soutien dans l'organisme qui peut être affecté par des maladies ou des traumatismes. Quand la taille des défauts osseux atteint une dimension critique ou dans le cas d'incapacité de l'os à se réparer, les chirurgiens font appel aux greffes osseuses : autogreffe (provenant de la même personne), allogreffes (provenant d'une autre personne) et xélogreffes (provenant d'autres espèces). Mais ces types de greffes, entraînent un risque non négligeable de transmission de maladies infectieuses bactériennes et surtout virales.

C'est pourquoi, en raison de sévères problèmes posés par les matériaux osseux, de très importants efforts ont été consentis pour trouver des matériaux synthétiques substitutifs adéquats (Schwartz, 2010). Parmi les matériaux composites synthétiques similaires à l'os, nous avons le polymère / minéral (Rezwana *et al.*, 2006). Ce composite est constitué d'une hydroxyapatite carbonatée (phase minérale) et du collagène (phase organique). Dans ces composites, le renfort contribue à améliorer la résistance mécanique du matériau. Dans le cadre de ce sujet, les gels des pectines peuvent servir de matrice pour la création de biominéraux, définis comme des agglomérats de cristaux distribués à l'intérieur d'une matrice organique principalement composée de polysaccharides et de protéines. La minéralisation

apparaît spontanément en présence d'une quantité adéquate de calcium et de phosphate. La présence des groupements COO^- de la pectine stimule la liaison des cations à partir de la solution vers le substrat (Munarin *et al.*, 2010).

Parmi les travaux réalisés dans ce cadre, nous pouvons citer les microsphères injectables composées de pectine et de phosphate de calcium dans le but de les utiliser comme support dans une régénération osseuse (Munarin *et al.*, 2011) et les composites hydroxyapatite/pectine utilisés dans les applications relatives à l'ingénierie tissulaire (Sumathra *et al.*, 2017).

I.7. Extraction des pectines

Plusieurs modes d'extraction des pectines sont envisageables. Il peut s'agir des méthodes chimiques, physiques ou enzymatiques.

I.7.1. Méthodes physico-chimiques

Les pectines sont des hydrocolloïdes et à ce titre, elles sont fréquemment isolées après extraction en solution aqueuse (à froid ou à chaud) suivie d'une coagulation dans l'alcool. Le coagulat ainsi obtenu est filtré, lavé, séché et enfin, broyé pour obtenir une poudre fine.

Le procédé d'extraction fait appel à la méthode conventionnelle en utilisant un système à reflux ou un « soxhlet ». L'extraction des pectines acides faiblement méthylestérifiées est facilitée par la présence de chélateurs de calcium tels que le CDTA, l'EDTA, l'imidazole ou l'oxalate d'ammonium (Redgwell *et al.*, 1992 ; Yeoh *et al.*, 2008).

Les pectines sont généralement extraites avec de l'eau chaude (90 à 100°C), en milieu acide (pH compris entre 1.5 et 3.0) et à des temps allant de 0.5 à 6 heures (Ralet *et al.*, 2002).

Les rendements d'extraction varient en fonction des conditions opératoires et de l'espèce végétale utilisée. Parmi les nombreux travaux portant sur ce sujet, nous pouvons citer l'extraction de la pectine à partir :

- de l'écorce d'orange qui a permis l'obtention d'un rendement situé dans le domaine 21 - 30 % en utilisant une solution aqueuse acidifiée à $\text{pH} = 1.70$ et à une température de 90°C pendant 120 min (El-Nawawi et Shehata, 1987). De même, un rendement de 16.10 % en pectine a été obtenu en utilisant ce même déchet à une température de 80 °C pour un temps d'extraction de 120 min et un pH de 2.50 (Abid *et al.*, 2009).

- du marc de pêche avec un rendement maximal de l'ordre de 9.20 % en présence de l'acide nitrique à 70 %, à pH 1.20 et à 80°C pendant 60 min (Pagan et Ibarz., 1999).

- de la pelure de betterave où un rendement de l'ordre de 22.40 % a été obtenu pendant 4 heures (Mesbahi *et al.*, 2005).

- de l'écorce de citron à l'aide du jus de datte acidifié a conduit à un rendement maximal de l'ordre de 11.21 % au bout de 3h et 34 min à un pH = 2.80 et à une température de 84.34°C (Masmoudi *et al.*, 2008).

L'influence de la nature de l'espèce végétale (écorce de citron et d'orange) sur le rendement d'extraction et les caractéristiques physico-chimiques de la pectine (couleur, solubilité...) a été mise en évidence (Bagde *et al.*, 2017). Dans ce cas, l'écorce de citron a permis l'obtention de résultats satisfaisants.

I.7.2. Méthodes physico-chimiques activées

Différentes méthodes physiques comme les micro-ondes, l'irradiation γ et les ultrasons peuvent être utilisées pour activer les réactions chimiques de l'extraction des pectines.

L'utilisation des microondes pour extraire les pectines permet de réduire la durée, les coûts de l'extraction avec de bons rendements et de limiter les phénomènes de dépolymérisation par rapport aux méthodes conventionnelles (Liu *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007 ; Maran *et al.*, 2014 ; Fishman *et al.*, 2000). Yeoh a montré qu'un temps d'extraction de 15 min sous radiations micro-ondes est suffisant pour extraire la même quantité de pectine pendant 3h dans un réacteur soxhlet (Yeoh *et al.*, 2008).

L'utilisation des radiations γ induit principalement la formation de radicaux hydroxyles libres qui catalysent la dépolymérisation du polysaccharide (Courtois, 2009). Le traitement par l'irradiation γ entraîne une diminution de la viscosité et du degré de méthylation des pectines (Sjoberg, 1987).

L'extraction assistée par ultrason est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Elle permet d'améliorer les rendements d'extraction avec une réduction de la durée et de la température sans que la texture du gel obtenue ne soit altérée. Une étude portant sur l'extraction de la pectine à partir de l'écorce de pamplemousse assistée par ultrasons a montré que le rendement augmente de 16.34 % par rapport à la méthode conventionnelle avec une diminution de la température de 13.3°C et de la durée de l'opération de 37.78 %. La microstructure et la couleur de la pectine obtenue n'ont pas été affectées par ce type d'extraction (Wang *et al.*, 2015). Une autre étude réalisée sur l'extraction de la pectine à partir du fruit de la passion a conduit à un rendement supérieur à celui obtenu par la méthode conventionnelle de 1.6 fois (De Oliveira *et al.*, 2016).

I.7.3. Méthodes enzymatiques

Contrairement aux méthodes chimiques et physiques, l'introduction d'enzymes du groupe des hydrolases ou lyases dans le milieu réactionnel permet de cibler les liaisons glycosidiques. Ces méthodes dites "méthodes douces" sont peu consommatrices d'énergie et limitent les réactions secondaires (comme la caramélisation).

Les pectines extraites par voie enzymatique ont un degré d'estérification plus élevé et sont très solubles dans l'eau (Turakhozhaev et Khodzhaev, 1993). Toutefois, le traitement prolongé de la matière première (environ 20 h) donne lieu à une pectine à faible indice de gélification (Sakai *et al.*, 1993).

I.8. Mécanisme et cinétique de l'extraction des pectines

L'obtention de la pectine se déroule en trois étapes (figure I.13) :

- hydrolyse de la protopectine ;
- diffusion de la protopectine à travers le réseau poreux du solide (matière première) ;
- transfert de la pectine vers la phase externe (diffusion externe).

Le processus d'extraction est accompagné d'une dégradation inévitable de la pectine. La modélisation mathématique qui décrit la cinétique d'extraction de la pectine a fait l'objet de nombreux travaux (Panchev *et al.*, 1989; Minkov *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2000; Hrabovska *et al.*, 2015).

Panchev a présenté un modèle cinétique appliqué à l'extraction de la pectine de pomme (Panchev *et al.*, 1989). Ce modèle décrit les deux phénomènes réactionnels en prenant en compte l'hydrolyse de la protopectine en pectine et l'effet de la dégradation et de la dépolymérisation de la pectine sur le rendement d'extraction. Ce modèle permet l'obtention du rendement en pectine, de la quantité de produits pectiques dépolymérisés ainsi que la détermination de la durée optimale de l'extraction. Un autre modèle mathématique basé sur une réaction chimique de premier ordre incluant uniquement l'hydrolyse de la protopectine et l'extraction de la pectine a été élaboré (Minkov *et al.*, 1996 ; Hrabovska *et al.*, 2015).

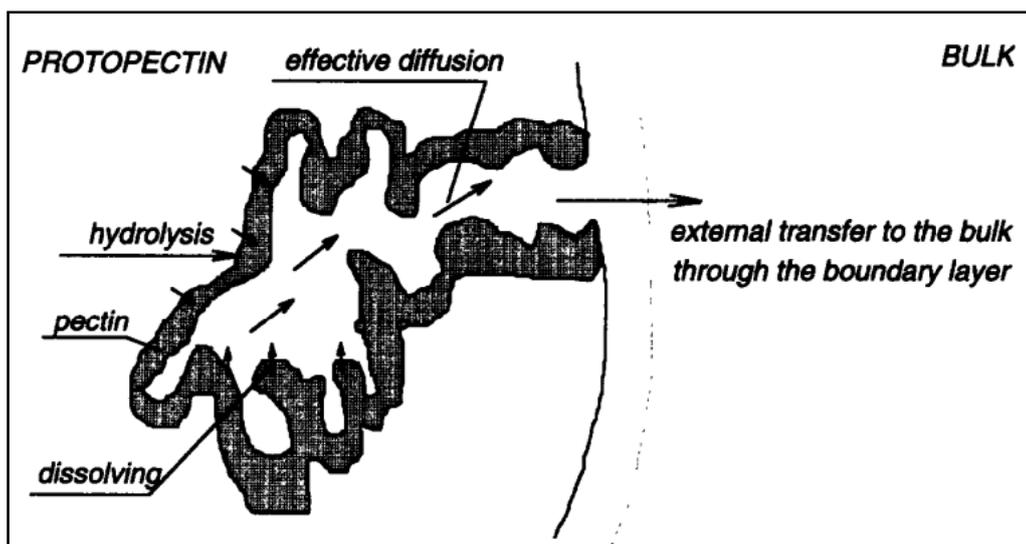


Figure I.13. Mécanisme d'hydrolyse et de transport de la pectine à la surface des particules (Minkov *et al.* 1996).

I.9. Dosage des pectines

Le dosage des pectines repose d'une part sur des méthodes colorimétriques globales et d'autre part sur des méthodes chromatographiques nécessitant une dépolymérisation préalable en éléments monomériques.

I.9.1. Dosage colorimétrique

Les dosages colorimétriques sont des techniques d'analyse quantitative rapides et simples à mettre en œuvre. Elles s'appliquent aussi bien aux résidus, qu'aux extraits et permettent de doser de manière globale les sucres totaux et de manière spécifique les acides uroniques. Le principe des dosages colorimétriques repose sur la condensation par estérification d'un chromogène avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. Le dosage des sucres totaux, utilise de préférence le phénol plus sensible à la détermination quantitative des oses que des chromogènes (Dubois *et al.*, 1956). Le méta-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium a été utilisé comme chromophore sélectif lors du dosage des acides uroniques (Thibault *et al.*, 1991).

I.9.2. Dosage par chromatographie

La détermination de la composition monomérique des pectines nécessite une dépolymérisation préalable puis un dosage généralement réalisé par séparation chromatographique (phase gazeuse ou HPLC). La principale difficulté réside dans l'étape de dépolymérisation qui s'effectue le plus souvent par voie acide en raison de la résistance à

l'hydrolyse des liaisons impliquant les acides uroniques; leur réduction préalable a été proposée pour diminuer les difficultés du dosage. En outre, la nature chimique complexe des substances pectiques rend également délicate la séparation des différents constituants. C'est pour cela que les méthodes chromatographiques sont de nos jours les plus utilisées, bien qu'elles ne permettent pas la détermination simultanée des acides uroniques et des oses neutres. La méthanolyse suivie d'un dosage en phase gazeuse ou en HPLC, constitue une alternative intéressante à l'hydrolyse acide et permet de doser simultanément les acides uroniques et les oses neutres (Thibault *et al.*, 1991).

CHAPITRE II

ENCAPSULATION DES

COMPOSES PHENOLIQUES

DES MARGINES

II.1. Introduction

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ils sont reconnus pour leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et antivirales. Ces molécules ont de nombreuses applications dans diverses industries. Cependant, leur utilisation est limitée par leur instabilité au cours du stockage, leur mise en œuvre et leur effet toxique sur l'environnement (la faune et la flore). Pour palier à ces inconvénients, l'encapsulation peut constituer une excellente solution afin d'assurer une meilleure protection de ces composés contre les rayons ultraviolets, l'humidité et l'oxygène.

II.2. Généralités sur l'encapsulation

II.2.1. Définition et domaines d'applications

L'encapsulation regroupe l'ensemble des techniques permettant d'emprisonner des liquides, des solides et des composés gazeux dans une enveloppe. Le but recherché est de protéger les composés encapsulés de l'environnement et de maîtriser leur libération dans les conditions souhaitées (Risch, 1995 ; Boh et Sumiga, 2008; Luca *et al.*, 2014).

Pour donner une idée sur la taille des particules “ emprisonnées ” que le mot “ encapsulation ” ne précise pas, on utilise:

- le terme “ microencapsulation ” fait référence à des particules de tailles comprises entre 1 μm et 1 mm.
- le terme “ nanoencapsulation ” est utilisé pour les particules de taille inférieure au micron.

Historiquement, l'une des premières applications de l'encapsulation a été réalisée vers 1950 avec la recherche d'enduits sensibles à la pression pour la fabrication du papier autocopiant sans carbone (Green et Scheicher, 1955). La commercialisation de ce produit a débuté en 1968 où 110 000 tonnes de microcapsules ont été utilisées pour cette application aux Etats-Unis (Guéry, 2006). Depuis, les recherches dans le domaine de l'encapsulation se sont intensifiées afin de développer de nouvelles technologies et d'encapsuler de nouveaux composés. Les produits encapsulés peuvent être hydrophiles ou lipophiles et avoir des propriétés diverses.

L'encapsulation est très utilisée dans l'industrie pharmaceutique, chimique, cosmétique, agroalimentaire, imprimerie, produits phytosanitaires... (Augustin et Hemar, 2009). Dans le domaine alimentaire, les composés encapsulés peuvent être des aromatiques, des vitamines,

des colorants, des enzymes ou des antioxydants (Dziezak, 1988 ; Jackson et Lee, 1991 ; Shahidi et Han, 1993).

II.2.2. Différents systèmes d'encapsulation

Les différents systèmes d'encapsulation sont (figure II.1):

- les liposomes : ce sont des vésicules constituées de bicouches de molécules amphiphiles qui délimitent deux compartiments aqueux : un compartiment aqueux interne ou cavité aqueuse et un compartiment aqueux externe dans lequel les vésicules se trouvent en suspension (Coimbra *et al.*, 2011).

- les sphères (système matriciel) sont des particules constituées d'un réseau macromoléculaire continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active. Cette dernière peut se présenter sous forme de fines particules solides ou encore de gouttelettes (Zuidam et Shimoni, 2010).

- les capsules (système réservoir) sont des particules constituées d'un cœur de matière active liquide ou solide, entourées d'une enveloppe solide (matériau enrobant) (Zuidam et Shimoni, 2010).

- système moléculaire (cyclodextrines et maltodextrines), dans lequel la substance est encapsulée dans une cavité hydrophobe (Charumanee *et al.*, 2006).

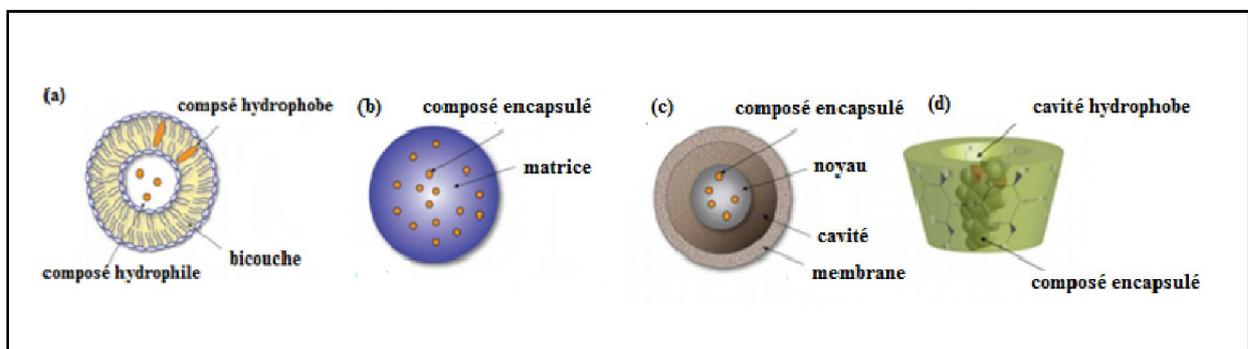


Figure II.1. Représentation schématique des systèmes d'encapsulation : (a) liposomes, (b) sphères, (c) capsules, (d) système moléculaire.

II.2.3. Objectifs de l'encapsulation

Les principaux objectifs de l'encapsulation sont (Celli *et al.*, 2015 ; Giraud, 2002) :

- la protection d'un principe actif ou d'une substance à la fois contre la dégradation physique (précipitation, cristallisation) et la dégradation chimique (oxydation) induite par l'exposition à l'oxygène, la lumière, l'humidité ou la température.

- la transformation d'un liquide en solide. En effet, lors de l'encapsulation d'un produit liquide, celui-ci est transformé en poudre de granulométrie plus ou moins fine, de ce fait, l'encapsulation facilite la manipulation des réactifs liquides.
- la variation de la masse volumique d'un liquide en l'encapsulant. Ce faisant, on peut obtenir qu'un produit dense flotte ou bien qu'un produit léger coule.
- la diminution de la volatilité d'un produit possédant une forte tension de vapeur. Ceci est valable par exemple, pour les arômes dans les préparations culinaires.
- libération contrôlée d'un produit actif, qui est surtout valable dans les formes pharmaceutiques afin d'obtenir des médicaments à effet retard.
- séparation de deux produits incompatibles devant se trouver dans un même mélange afin d'éviter des réactions chimiques non souhaitées.
- l'encapsulation présente également un intérêt particulier pour les différentes problématiques liées au stockage de certaines substances. En effet, le temps de stockage d'un composé volatil peut être augmenté d'une manière significative.
- masquage de goût et d'odeur.

II.2.4. Matériaux d'encapsulation

Une large gamme de différents matériaux peut être employée dans l'encapsulation (Brazel, 1999), malgré le nombre limité des méthodes existantes (Versic, 1988). Ces matériaux sont constitués de :

- polymères qui constituent la voie la plus utilisée dans différentes applications d'encapsulation. Ces composés peuvent être d'origine naturelle (gélatine, chitosane, alginate de sodium, agarose, pectine...), hémisynthétique (dérivés de la cellulose...) et synthétique (copolymères des acides lactique et glycolique). L'intérêt de leurs utilisations est de permettre une grande flexibilité des interactions spécifiques.
- lipides et cires minérales : corps gras solides, glycérides, cires (d'abeille, de carnauba...).
- particules solides, colloïdales ou non-colloïdales également bien connues pour s'adsorber à l'interface entre deux liquides immiscibles.
- molécules tensioactives candidates naturelles à l'encapsulation des substances hydrophobes. Leur structure amphiphile leur confère la capacité de s'organiser aux interfaces, la partie hydrophobe résidant dans l'huile et la partie hydrophile dans la phase continue aqueuse. Ceci est à l'origine de nombreuses phases organisées qui peuvent servir à piéger des composés hydrophobes et à les disperser.

Le choix de ces matériaux est lié aux conditions d'utilisation du produit, à la nature du polymère, au procédé d'encapsulation et au coût d'utilisation (Amrita *et al.*, 1999).

Pour l'encapsulation des composés phénoliques, le polymère utilisé doit satisfaire certaines exigences, comme :

- la non réactivité avec le principe actif.
- présenter une forme facile à manipuler.
- avoir une faible viscosité.
- apporter à la substance active une protection maximale contre les facteurs externes indésirables.
- assurer de bonnes propriétés d'émulsification.
- avoir un comportement efficace de redispersion, afin d'assurer une libération contrôlée des composés phénoliques (Shahidi et Han, 1993).

II.2.5. Procédés d'encapsulation

Les différents procédés ou méthodes d'encapsulation peuvent être classés selon plusieurs critères :

- la taille désirée des particules ;
- les propriétés physico-chimiques du principe actif encapsulé ;
- la nature du procédé utilisé.

Selon leur nature, ces procédés sont répartis en trois grandes classes (Finch et Bodmeier, 2005 ; Richard et Benoit, 2013) :

a. Procédés physico-chimiques

Les procédés physico-chimiques reposent sur la maîtrise des paramètres tels que la solubilité et la précipitation des agents enrobants en fonction de l'ajout d'un non solvant, du pH et de la température, mais aussi du contrôle du changement d'état physique des polymères d'encapsulation. Ces procédés sont :

- séparation de phases ou coacervation (simple ou complexe) ;
- évaporation - extraction de solvant ;
- gélification thermique d'émulsion.

b. Procédés chimiques

Au cours de ces procédés, se déroulent de manière simultanée la synthèse de la membrane (ou de la matrice) et l'encapsulation de la matière active. La formation in situ du matériau enrobant peut s'effectuer selon les voies suivantes :

- polycondensation interfaciale ;
- polymérisation interfaciale ;
- polymérisation en milieu dispersé par voie radicalaire ou anionique.

c. Procédés mécaniques

Les procédés mécaniques mettent en œuvre les techniques suivantes :

- séchage par nébulisation (spray drying) ;
- extrusion ou la gélification de gouttes ;
- enrobage en lit fluidisé (spray-coating);
- extrusion/sphéronisation.

II.2.6. Procédé de la gélification de gouttes (extrusion)

Ce procédé consiste en la dispersion de la matière active dans une substance matricielle (polymère), suivie de son extrusion dans un milieu où la matrice se gélifie (milieu réceptionniste) (figure II.2). La solubilité de la matière active dans le milieu de réception doit être la plus faible possible pour minimiser les pertes par solubilisation (Richard et Benoit, 2013).

L'encapsulation par la technique d'extrusion en utilisant des polymères comme matériaux d'enrobage est l'un des processus largement utilisé. Parmi ces polymères, nous pouvons citer l'alginate de sodium, le chitosane, l'agarose et la pectine.

Dans le cas de l'alginate de sodium et des pectines, les gouttelettes formées, par extrusion à travers une buse vibrante ou une aiguille, sont réceptionnées dans une phase aqueuse gélifiante contenant du chlorure de calcium (Deladino *et al.*, 2007 ; Pawar *et al.*, 2008 ; Anbinder *et al.*, 2011). Elles se transforment instantanément en microparticules de gel sphérique. Ce type de méthode a été employé pour l'encapsulation de la Pénicilline G dans des matrices à base d'alginate combiné avec d'autres types de polymères (maltodextrine, carboxyméthyle cellulose (CMC), octenyl succinic anhydride (OSA) starch et pectine). Les résultats obtenus dans ce cas, ont montré un taux de rétention de la Pénicilline G de l'ordre de 51.66 %, en utilisant l'alginate / OSA starch comme matériau enrobant (Fontes *et al.*, 2012).

Lorsque le chitosane est utilisé, la phase aqueuse de réception des microgouttelettes est une solution alcaline qui rend ce polymère insoluble. Dans le cas de l'agar, c'est la variation de température des gouttelettes de 80 °C à 30 °C qui induit la gélification (Richard et Benoit, 2013).

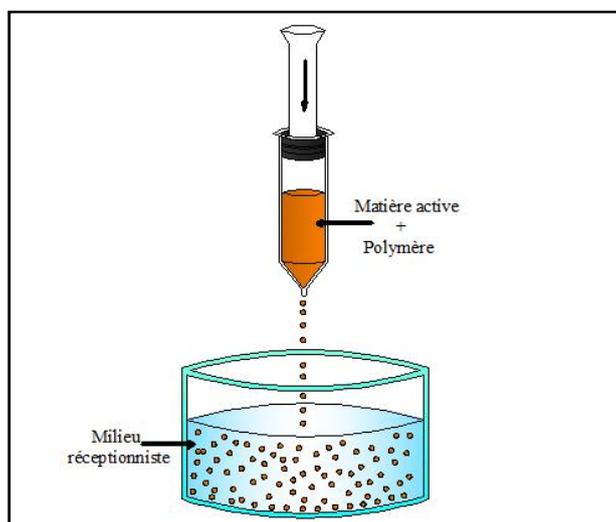


Figure II.2. Schéma du procédé de gélification de gouttes (extrusion).

II.2.7. Capacité d'encapsulation et mécanisme de libération du principe actif

L'efficacité de l'encapsulation correspond au rapport entre la quantité de principe actif initialement introduite dans la formule et la quantité incorporée dans les particules. Elle dépend de la solubilité du principe actif, de sa concentration initiale et des interactions éventuelles polymère / principe actif.

La teneur en matière active ou taux d'encapsulation peut être très élevée dans les capsules (85 à 90 %). Au contraire, les teneurs habituellement rencontrées dans les sphères sont plus faibles (20 à 35 %), même si, dans certains cas, des teneurs de l'ordre de 50 % peuvent être atteintes. En termes de contenance, le système capsule est beaucoup plus intéressant que la sphère (Richard et Benoît, 2013).

En se basant sur les interactions matière active / milieu extérieur, les mécanismes de libération de la matière active peuvent être classés en deux catégories (figure II.3):

- les systèmes à libération déclenchée sont généralement des capsules formées d'une membrane étanche, qui libèrent brutalement leur contenu par éclatement sous l'effet de la pression (mécanique ou osmotique) ou par fusion sous l'effet de la température.
- les systèmes à libération prolongée sont des capsules dont les substances actives sont libérées progressivement à travers la membrane selon une certaine vitesse.

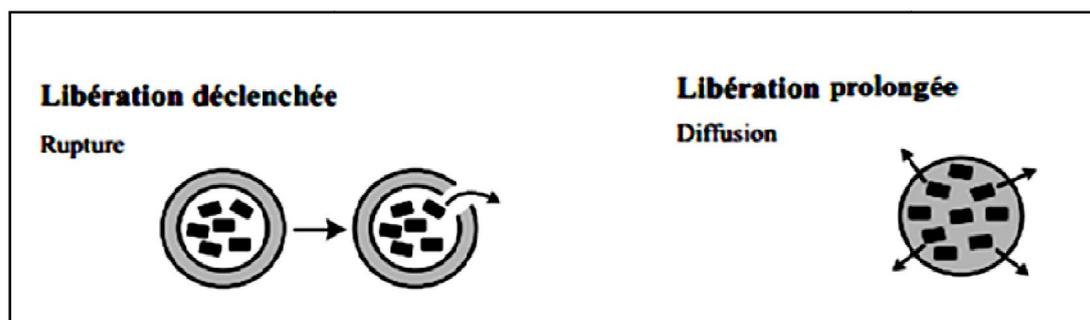


Figure II.3. Représentation schématique des deux modes de libération des particules (Kreuter, 1994).

II.3. Encapsulation des composés phénoliques des margines

II.3.1. Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe phénolique considéré.

Dans les plantes, les composés phénoliques assurent la croissance, la floraison, la formation du pollen, la germination et la ramification des racines. Ce sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux (légumes, fruits, céréales,...), des boissons, du café, du cacao, du thé,... (Pincemail *et al.*, 2007).

II.3.1.1. Classification

Selon leurs caractéristiques structurales, les composés phénoliques se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004).

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...) et enfin, par les liaisons possibles que ces molécules de base peuvent établir avec d'autres molécules telles que les glucides, les lipides, les protéines, ou encore d'autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques (Boros *et al.*, 2010). Les composés phénoliques se répartissent comme suit :

- les phénols simples : un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C₆-C₁) ;
- les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆): deux noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné ;
- les tanins hydrolysables et non-hydrolysables ;
- les stilbènes (C₆-C₂-C₆) ;
- les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane ;
- autres phytoestrogènes ;
- les saponines (triterpénoïdes) ;
- les phytostérols et les phytostanols (Moutsatsou, 2007). Bien qu'ils ne soient pas des composés phénoliques, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates (Dacosta, 2003).

II.3.1.2. Propriété antioxydante des composés phénoliques

L'activité antioxydante d'un composé phénolique correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures. Les propriétés antioxydantes de ces composés sont attribuées à leur capacité de piéger les radicaux libres. De ce fait, les composés phénoliques sont considérés comme des antioxydants très puissants (Pietta, 2000 ; Frei et Higdon, 2003 ; Oszmianski *et al.* 2007), grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique. Ils sont capables de piéger les radicaux libres oxygènes, en particulier les radicaux peroxydes (ROO[•]), alkoxyles (RO[•]), superoxydes (O₂[•]) et les hydroxyles (OH[•]), générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections...) (Min et Ebeler, 2008).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante d'un composé par piégeage de radicaux libres, comme les peroxydes ROO[•] par la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Da Silva *et al.*, 1991), les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie et Strain, 1996), ou les radicaux ABTS[•] (sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re *et al.*, 1999), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH[•] (diphényl-picrylhydrazyl) (Sharma *et al.*, 2009).

- *Evaluation de l'activité antioxydante par le test du radical libre DPPH*

Du point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant les groupes SH⁻, NH⁻ et OH⁻ (Salah *et al.*, 1995). Ce test s'effectue à température ambiante afin d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

- *Principe de la méthode*

Le radical DPPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution dans des conditions particulières (obscurité et basse température). Ce radical est de coloration violette. Les composés phénoliques (ΦOH) agissent en transférant un atome d'hydrogène au radical libre DPPH[•], qui est alors transformé en une molécule stable (DPPHH). A la suite de cette réaction, un changement de coloration de la solution initiale est observé. Le mécanisme réactionnel est donné par l'équation II.1 et la figure II.4.



L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie UV-Visible à 516 nm. Plus un composé cède facilement son atome d'hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH[•] restant dépend de la concentration de l'antioxydant.

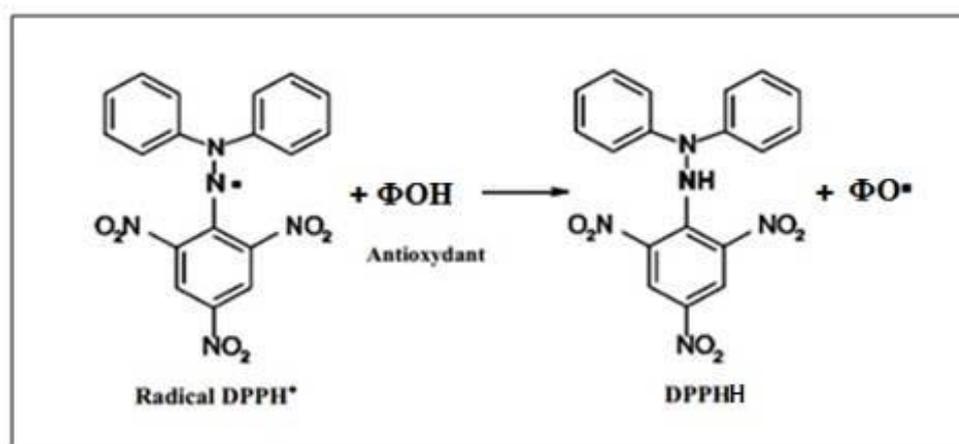


Figure II.4. Réaction de réduction du radical DPPH[•] par un antioxydant.

Le rôle des composés phénoliques comme antioxydants est de permettre à l'organisme de lutter contre les agressions de l'oxygène. De nos jours, ces composés suscitent beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter sur la prévention et le traitement de certaines maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératifs (Aruoma, 1994 ; Stoclet *et al.*, 2004; Leifert et Abeywardena, 2008 ; Ramassamy, 2006). Ils suscitent

également de l'espoir pour le cancer et l'hypertension (Yi *et al.*, 2005 ; Hügela *et al.*, 2016). Les composés phénoliques sont aussi utilisés dans d'autres domaines, tels que la cosmétologie et l'agroalimentaire. Dans le domaine de l'industrie des cosmétiques, les composés phénoliques sont utilisés pour lutter contre le vieillissement cutané en tant que molécule antiradicalaire et en tant que protecteur des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène. Dans le domaine de l'agroalimentaire, ils sont reconnus pour leur intérêt dans la conservation des aliments (retardent la vitesse de formation de peroxydes). Dans ce contexte, le rôle des composés phénoliques totaux dans la préservation de la qualité de l'huile a été mis en évidence (Chimi et Rahmani, 1990). Cette propriété antioxydante a été aussi montrée lors d'une étude portant sur les extraits phénoliques des margines d'olives (Moussaoui *et al.*, 2010). Dans ce dernier cas, l'efficacité des composés phénoliques des margines sur la conservation de l'huile d'olive vierge est nettement meilleure que celle obtenue en utilisant un antioxydant de synthèse (β -carotène).

Des inconvénients sont cependant liés à leur emploi. En effet, la plupart des composés phénoliques apportent un goût désagréable (amertume) et une astringence. Leur efficacité dépend aussi de leur biodisponibilité, de leur stabilité et de leur activité durant leur passage dans le tractus digestif. Pour palier à ces inconvénients, l'encapsulation pourrait constituer une excellente solution.

II.3.1.3. L'intérêt de l'encapsulation des composés phénoliques

L'encapsulation permet de masquer le goût des composés phénoliques, d'optimiser leur assimilation par l'organisme et d'améliorer la conservation de leurs propriétés au cours du procédé de fabrication et du stockage. Les supports (matériaux d'encapsulation) de ces encapsulats sont principalement des amidons modifiés, des maltodextrines, des gommes, des polysaccharides... (Fang et Bhandari, 2010).

L'encapsulation des composés phénoliques synthétiques ou naturels a fait l'objet de nombreuses recherches. Dans le cadre de l'exploitation des composés antioxydants issus de sources naturelles, l'encapsulation des composés phénoliques des pelures de grenade a conduit à un rendement de 50 % en ces composés et une activité antioxydante de 33.33 % pour un rapport alginate de sodium : pectine égale à 2:1 (Zam *et al.*, 2013). En raison de leurs propriétés médicinales et antioxydantes, des mûres sauvages (*Rubus ulmifolius* Schott) ont été également soumises à une étude portant sur l'encapsulation de leurs composés phénoliques (Martins *et al.*, 2014). Ce procédé a été réalisé dans une matrice d'alginate, les capsules obtenues ont été incorporées dans un yogourt pour obtenir des avantages antioxydants.

Des composés phénoliques extraits à partir des feuilles d'orthosiphon stamineus (herbe connue sous le nom de thé Java) ont fait l'objet d'une encapsulation à l'aide de la maltodextrine par le procédé de séchage / nébulisation (spray drying) (Pang *et al.*, 2014). De même, un autre procédé par nébulisation a été utilisé pour encapsuler la mangiférine (extrait à partir de la mangue) en utilisant quatre types de polymères. Dans ce cas, le taux d'encapsulation le plus élevé a été obtenu grâce à l'utilisation des pectines en présence de Polysorbate 80 (Tween 80) comme agent d'émulsification (De Souza *et al.*, 2013). Des nanoparticules chargées de composés phénoliques du thé ont été obtenues par la méthode de gélification ionique en utilisant le carboxyméthyl chitosane et le chlorhydrate de chitosane avec un taux d'encapsulation qui varie de 44 à 83 % (Liang *et al.*, 2011).

Les composés phénoliques sont aussi fortement présents dans les margines d'olive. Leur récupération par la technique d'encapsulation constitue un double intérêt :

- protection de l'environnement ;
- valorisation des composés antioxydants.

II.3.2. Généralité sur les margines

Les margines, appelées aussi eaux de végétation ou encore effluents d'huilerie d'olives sont générées lors de l'extraction de l'huile. Les margines provenant du système de la pression sont composées de l'eau de constitution des olives qui représente en fonction des caractéristiques du cultivar, une teneur de l'ordre de 40 à 50 % du poids de la drupe et par l'eau utilisée pour la trituration du fruit ainsi que celle du lavage des installations utilisées pour l'extraction (Nefzaoui, 1987).

Concernant les systèmes d'extraction par centrifugation, les volumes de margines engendrées représentent 80 à 110 % de la masse des olives triturées (Amirante, 1999).

La composition chimique des margines est assez variable. Elle dépend de nombreux facteurs, tels que la variété, la maturité des olives, les conditions pédoclimatiques, la méthode de culture et en particulier le mode d'extraction de l'huile (Paraskeva et Diamadopoulons, 2006).

Les margines ont un aspect trouble et une couleur brune à brune rougeâtre. Elles renferment la majeure partie des espèces chimiques de l'olive solubles dans l'eau, ont un pH de 4.5 à 5.0 et une demande chimique en oxygène (DCO) dépassant 200 g d'O₂/L (Morillo *et al.*, 2009). Elles sont composées essentiellement d'eau (83 - 92 % en poids), de matières organiques, telles que, les sucres, les protéines facilement fermentescibles, les acides (acétique, fumarique, glycérine et oxalique), l'huile émulsionnée, les phénols, les vitamines et

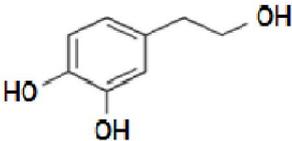
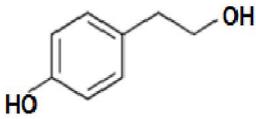
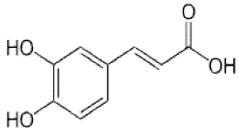
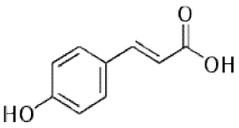
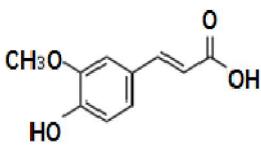
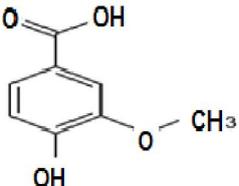
les traces de pesticides (Kapellakis *et al.*, 2008). Elles présentent aussi des concentrations élevées en matières solides totales (Rivas *et al.*, 2000).

II.3.2.1. Composés phénoliques des margines

Dans les margines, les composés phénoliques ont une structure variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'élaboration de l'huile (Ranalli, 1991). Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée dans les margines (Ranalli, 1991). En général, la teneur en composés phénoliques des margines varie entre 5.5 à 12 g/L (Sassi *et al.*, 2006). Plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés. Ceux-ci sont constitués de monomères aromatiques et de composés phénoliques à haut poids moléculaire (Tanchev *et al.*, 1980 ; Lafka *et al.*, 2010).

Parmi les composés phénoliques présents dans les margines, les acides phénoliques constituent le groupe le plus vaste et le plus répandu (acide caféique, acide p-coumarique, acide vanillique,...). Ces effluents d'huilerie renferment aussi des alcools phénoliques dont les plus rencontrés sont : 4- Hydroxyphényléthanol (thyrosol) et 3,4- dihydroxyphényléthanol (Hydroxythyrosol). Ce dernier possède une activité antioxydante très importante recherchée dans le domaine agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique (D'Angelo *et al.*, 2005 ; Hamden *et al.*, 2009). Les composés phénoliques des margines à haut poids moléculaire sont essentiellement des tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/L (Balice *et al.*, 1982). Les monomères les plus rencontrés dans les margines sont présentés dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Structure et concentration des monomères les plus rencontrés dans les margines.

Composé phénolique	Structure	Concentration (mg.L ⁻¹)	Référence
Hydroxytyrosol		1433.4	Fki <i>et al.</i> , 2005
Tyrosol		851	Fki <i>et al.</i> , 2005
Acide caféique		321	Fki <i>et al.</i> , 2005
Acide p-coumarique		298	Fki <i>et al.</i> , 2005
Acide ferrulique		95	Fki <i>et al.</i> , 2005
Acide vanillique		20	Azabou <i>et al.</i> , 2007

II.3.2.2. Impacts environnementaux

Le rejet des effluents de l'industrie d'huile d'olive dans la nature sans aucun traitement constitue un sérieux problème environnemental. En effet, ces rejets liquides acides et chargés en matières organiques qui renferment essentiellement les composés phénoliques sont à l'origine de différents types de pollutions. Les principaux impacts sont :

- Impacts sur les eaux

Les margines sont peu dégradables à cause des substances phytotoxiques et antimicrobiennes (phénols, acides gras volatiles, insecticides...) qu'elles contiennent (Dagga et Böhmer, 2001). Les margines sont le plus souvent rejetées dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun traitement préalable et nuisent fortement à la qualité de ces eaux de surfaces. La très forte charge en matières organique empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances (Mebirouk, 2002).

Les margines rejetées dans la nature sur les sols peuvent aussi poser des problèmes environnementaux. Par ce mode d'élimination des effluents, les eaux souterraines peuvent être polluées, ce qui affecte la qualité de l'eau potable.

L'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer une pollution par les nitrates, des nappes situées dans la zone ou à proximité de la zone d'épandage (Benyahia et Zein, 2003).

- Impacts sur les sols

Épandues sur les sols, les margines diminuent la qualité des ces derniers. Les substances toxiques contenues dans ces eaux de végétation se fixent dans les terres. Parmi ces substances toxiques, les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne du sol (Benyahia et Zein, 2003).

Les composés phénoliques et les acides organiques peuvent être à l'origine des effets phytotoxiques sur les oliviers (FAO, 1983).

- Impacts sur l'air

Les mauvaises odeurs générées lors du traitement des margines posent des problèmes de pollution de l'air par le taux élevé d'ammoniacque et d'autres gaz produits (Mechichi et Sayadi, 2005). La pollution atmosphérique importante serait induite en raison de la fermentation anaérobie et de production de gaz (méthane).

- Impacts sur les plantes

Les composés phénoliques sont les responsables majeurs de la phytotoxicité des effluents d'huileries d'olive. L'application directe de ces effluents sur le sol peut diminuer le rendement de certaines cultures, et même inhiber la germination de quelques graines. Les résidus de pesticides présents dans les margines peuvent également être nocifs pour les plantes (Samperdro *et al.*, 2004).

II.3.2.3. Valorisation des margines

Dans le souci de réduire les coûts des différents traitements appliqués aux margines et de rationaliser la gestion de leurs rejets ou de les valoriser, des recherches sont orientées sur leur valorisation dans divers domaines.

- ***Utilisation comme fertilisants***

L'utilisation des margines comme fertilisants pour les sols et les cultures est une pratique courante qui permet de résoudre partiellement le problème de l'élimination de ces effluents liquides. Comme les margines sont très riches en matières organiques et en nutriments, les sols arides peuvent bénéficier de cette utilisation, notamment les pays producteurs de l'huile d'olive qui se situent dans les régions arides et semi arides (Saviozzi *et al.*, 1993).

- ***Compostage***

La valorisation agricole des margines par compostage a pour but essentiel de fixer les éléments fertilisants sur un substrat carboné au cours d'un processus aérobie, pour les restituer au sol en fonction des besoins des plantes. Plusieurs techniques de traitement des margines par voie anaérobie peuvent être améliorées pour permettre la valorisation des sous-produits de traitement. L'effet antioxydant des composés phénoliques reste le facteur limitant pour ces procédés de valorisation. Une étape de prétraitement est nécessaire afin d'extraire les composés phénoliques (Hamdi, 1996; Sabbah *et al.*, 2004).

- ***Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU)***

L'obtention des protéines unicellulaires constitue une des solutions optimales pour la valorisation des effluents d'huileries d'olive. La plupart des procédés appliqués sont basés sur l'utilisation des levures capables de transformer les substances organiques en biomasse à haut contenu en protéines et vitamines de grande valeur pour l'alimentation animale et même humaine (El Alami, 2000).

- ***Récupération de quelques composants***

Il s'agit, en particulier, de la récupération des composants aromatiques, phénoliques et glucidiques.

- Les composants aromatiques sont obtenus par distillation sous vide et les arômes sont récupérés par extraction aux solvants, d'abord à l'hexane ensuite au chloroforme. Les

principaux composants du mélange sont des terpènes, des dérivés benzéniques, des éthers... (Fedeli et Camurati, 1981).

- Les extraits phénoliques obtenus ont été comparés aux antioxydants de synthèse les plus connus, dans des essais de résistance à l'oxydation. Il a été constaté que l'addition de l'extrait des margines protège de l'oxydation l'huile de manière plus efficace que les antioxydants de synthèse (Moussaoui *et al.*, 2010).

- La fraction de margine dépourvue de ces composants phénoliques et aromatiques peut être utilisée pour la production de biomasses. En effet, cette fraction est riche en glucides fermentescibles utilisables comme substrat de fermentation pour la production de biomasse. Cette biomasse, constituée principalement de protéines unicellulaires de haute valeur biologique sera incorporée dans les concentrés pour l'alimentation des animaux, en particulier des monogastriques (Nefzaoui, 1984).

II.3.2.4. Encapsulation des composés phénoliques des margines par des polysaccharides

La récupération des composés phénoliques des margines par extraction est généralement un processus difficile à réaliser, compte tenu de la grande variété de ces composés pouvant se trouver dans les échantillons naturels. L'obtention de bons rendements en composés phénoliques étant difficile à obtenir, l'expérimentation doit être réalisée avec soin pour éviter les modifications chimiques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction.

Pour palier à cet inconvénient, développer des méthodes de valorisation des composés phénoliques des margines sans passer par l'extraction pourrait être une bonne alternative. L'utilisation des polysaccharides pour piéger ces composés par la technique d'encapsulation a montré son efficacité. A ce sujet, la société Biovalor au Maroc, une unité sise dans la région de Fès utilise pour la valorisation des antioxydants des margines par encapsulation un procédé qui consiste à ajouter un polysaccharide aux margines, puis à atomiser le mélange pour obtenir une poudre contenant les composés phénoliques encapsulés à l'intérieur de la structure du polymère. Si cette opération est coûteuse, elle est néanmoins efficace et permet en même temps de traiter les margines en récupérant une eau utilisable dans l'agriculture (Lakhtar, 2009).

CHAPITRE III

METHODOLOGIE DE LA

RECHERCHE

EXPERIMENTALE

III.1. Introduction

La méthodologie de la recherche expérimentale ou « plans d'expériences » regroupe les méthodes qui permettent de structurer le recueil d'informations pour évaluer les liens entre une variable à expliquer Y , appelée réponse, et une ou plusieurs variables explicatives X appelées facteurs. L'objectif de cette méthodologie qui obéit à des règles mathématiques strictes est d'optimiser l'organisation des essais expérimentaux tout en faisant varier tous les facteurs simultanément afin d'obtenir un maximum de renseignements avec le minimum d'expériences et la meilleure précision possible sur les réponses calculées avec le modèle. Le choix du plan d'expériences à mettre en œuvre dépend du problème posé. On peut distinguer quatre types, les plans de criblage, d'étude quantitative des facteurs, des surfaces de réponses (optimisation) et des mélanges.

III.2. Vocabulaire de base des plans d'expériences

Avant d'aborder le principe des plans d'expériences, il est important de préciser le vocabulaire utilisé.

a. Réponse

La réponse est la grandeur mesurée à chaque essai; le plan vise à déterminer quels facteurs l'influencent ou quelle est son évolution en fonction de ceux-ci.

b. Facteur

Un facteur est une variable qui peut éventuellement avoir une influence sur la réponse observée. Il peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu (discret). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau, le niveau bas est noté par la variable codée -1 et le niveau haut par la variable codée $+1$. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut.

c. Matrice d'expériences

Une matrice d'expériences est l'organisation de l'ensemble des expériences à réaliser exprimées avec les variables codées. Elle est sous forme de tableau dans lequel est représenté une succession d'essais (lignes) au sein desquels on fait varier différents paramètres (colonnes). Le rôle de cette matrice est la réalisation d'un nombre minimum d'essais à effectuer afin de déterminer avec un maximum de précision l'influence respective de chacun des différents facteurs contrôlés d'une réponse.

d. Plan d'expérimentation

Le plan d'expérimentation correspond à la traduction de la matrice d'expériences en variables réelles.

e. Formule de codage

L'intérêt des unités codées est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. La formule permettant le passage des variables réelles (A) aux variables codées (X) est donnée par :

$$X = \frac{A - A_0}{\text{pas}} \quad (\text{III.1})$$

A_0 : la valeur centrale ou milieu du domaine, donné par :

$$A_0 = \frac{A_+ + A_-}{2} \quad (\text{III.2})$$

Pas : le pas de variation, donné par :

$$\text{pas} = \frac{A_+ - A_-}{2} \quad (\text{III.3})$$

Où ;

A_- est le niveau bas de la variable correspond à la variable codée -1.

A_+ est le niveau haut de la variable correspond à la variable codée +1.

III.3. Etapes d'une étude par plans d'expériences

Pour obtenir des informations pertinentes, une démarche méthodologique doit être suivie (Goupy, 2001):

- définition des objectifs ;
- choix des réponses expérimentales ;
- choix des facteurs et du domaine expérimental ;
- proposition d'un modèle ;
- construction du plan d'expérimentation ;
- réalisation des essais ;
- estimation des coefficients du modèle ;
- validation du modèle ;
- prédiction des valeurs optimales des facteurs du modèle.

III.4. Etude de criblage (screening)

Le criblage des facteurs constitue une étape préalable lors d'une étude par les plans d'expériences.

Cette étude peut être définie comme une étape permettant de repérer rapidement, parmi un grand nombre de facteurs, ceux qui sont effectivement influents sur un processus dans un domaine expérimental fixé. Dans cette étude ayant pour but d'estimer le " poids " de chacune des variables étudiées, on suppose à priori que les effets sont totalement additifs, ceci implique que la relation entre les réponses mesurées et les variables a la forme d'un modèle polynomial du 1^{er} degré (équation III.4) qui néglige toutes les interactions entre les facteurs.

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_k X_k \quad k = 1 \text{ à } n \quad (\text{III.4})$$

Où :

Y : Réponse estimée ;

b_0 : Représente la constante du modèle ;

b_{1-k} : Représente les effets des facteurs.

Les matrices d'expériences de criblage les plus connues sont les matrices d'Hadamard ou matrices de Plackett et Burman (Plackett et Burman, 1946).

- Matrice d'Hadamard

Les matrices d'Hadamard sont des matrices à colonnes orthogonales composées uniquement des valeurs +1 ou -1 (Louvét et Delplanque, 2006). Le nombre d'expériences N à réaliser pour k facteurs est un multiple de 4 et doit satisfaire à la relation :

$$N \geq k + 1 \quad (\text{III.5})$$

- Principe de construction de la matrice d'Hadamard

La construction de la matrice d'Hadamard s'effectue en quatre étapes:

1. repérer la ligne génératrice (figurant dans le tableau III.1) pour laquelle le nombre N d'expériences à réaliser, est supérieur ou égale au nombre d'inconnues à estimer ;
2. transposer cette ligne dans la première ligne ou colonne d'une matrice de rang (N-1), puis recopier cette première colonne par permutation circulaire à partir de la droite ou la gauche, du haut ou du bas ;
3. compléter la matrice par une ligne exclusivement remplie de signes négatifs ;
4. supprimer les éventuelles colonnes superflues.

Tableau III.1. Lignes génératrices d'une matrice d'Hadamard.

Nombre de facteurs	Nombre d'expériences	Ligne de départ
$K \leq 3$	4	++-
$4 \leq K \leq 7$	8	+++--
$8 \leq K \leq 11$	12	++-+++--+-
$12 \leq K \leq 15$	16	++++-+-+--+-
$16 \leq K \leq 19$	20	++--++++-+-+--+-
$20 \leq K \leq 23$	24	++++-+-+--+-+--+-

III.5. Etude quantitative des facteurs

L'hypothèse d'additivité qui est implicite dans une étude de screening n'est pas toujours pertinente et tout particulièrement lorsque l'expérimentateur s'interroge sur l'existence d'éventuels effets d'interaction entre les facteurs qui montreraient que l'influence d'un facteur sur la réponse peut dépendre du niveau des autres facteurs. Dans ce cas, le plan d'expériences à construire doit apporter la réponse à ces questions et doit permettre de quantifier les effets des facteurs étudiés et leurs effets d'interaction. Pour introduire ces effets, il faut ajouter les termes de produit " $X_i X_j$ " au modèle précédent (l'équation III.4).

Dans cette étude, les matrices d'expériences les plus utilisées pour les facteurs à 2 niveaux sont les matrices factorielles complètes (2^k) ou fractionnaires (2^{k-r}).

III.5.1. Plans factoriels complets (2^k)

Dans ces plans, le nombre d'expériences à réaliser est $N = 2^k$. La matrice factorielle complète est construite comme suit :

- une suite de signes - et + alternés en commençant par un signe - ;
- la colonne de signes du facteur 2 est constituée de deux signes -, suivis de deux signes + ;
- pour le facteur 3, la série de signes est constituée de quatre signes -, suivis de quatre signes +. Les facteurs suivants sont 8, 16, 32, ..., signes -, suivis de 8, 16, 32, ..., signes + ... etc. Pour chaque facteur, il y a autant de signes - que de signes +.

III.5.2. Plans factoriels fractionnaires (2^{k-r})

Les plans fractionnaires ont été conçus pour remédier à l'inflation rapide du nombre d'essais dans les plans complets. Le nombre d'expériences à réaliser est : $N = 2^{k-r}$ où k est le nombre de facteurs et r est le nombre de générateurs indépendants.

III.6. Etude pour surfaces de réponses (MSR)

La méthodologie du plan des surfaces de réponses est souvent utilisée à la suite du screening qui vise à déterminer les conditions expérimentales optimales. Cet outil est souvent basé sur un modèle du second ordre (équation III.6), qui permet de calculer en chaque point du domaine expérimental d'intérêt la valeur de la réponse avec une précision au moins égale à celle qu'on obtiendrait si l'on faisait l'expérience (Goupy, 1999).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^K b_i X_i + \sum_{i=1}^K b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=i+1}^K b_{ij} X_i X_j \quad (\text{III. 6})$$

Où, X_i, X_j représentent les variables codées du système, b_0, b_i ($i = 1, 2, \dots, k$), b_{ii} ($i = 1, 2, \dots, k$) et b_{ij} ($i = 1, 2, \dots, k-1; j = 2, 3, \dots, k$) sont respectivement les coefficients de régression pour les termes d'ordonnée à l'origine, linéaire, quadratique et d'interaction et k désigne le nombre de facteurs.

Parmi les différents types de plans des surfaces de réponses couramment utilisés, nous citons : les matrices composites, les matrices de Doehlert, les matrices de Box- Behnken, les matrices hybrides, ... Le plan pour surfaces de réponses illustré dans ce chapitre est celui de la matrice composite centrée.

- Matrice composite centrée

Cette matrice est constituée:

- d'un plan factoriel : c'est un plan à deux niveaux par facteurs. Les points expérimentaux sont aux sommets du domaine d'étude ($N_F = 2^k$);
- des points axiaux (en étoile) : sont situés à la même distance ($\pm \alpha$) du centre du domaine d'étude ($N_\alpha = 2k$). Dans le cas d'un domaine cubique ($\alpha = 1$) et pour la géométrie sphérique ($\alpha = (N_F)^{1/4}$);
- des points au centre du domaine d'étude (N_0).

Le nombre total d'expériences N à réaliser est :

$$N = N_F + N_\alpha + N_0 = 2^k + 2K + N_0 \quad (\text{III.7})$$

PARTIE 2

EXPERIMENTATION

ET RESULTATS

CHAPITRE IV. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

CHAPITRE V. MODELISATION ET OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DE LA PECTINE A PARTIR DU ZESTE DE CITRON

CHAPITRE VI. CINETIQUE DE L'EXTRACTION DE LA PECTINE A PARTIR DU ZESTE DE CITRON

CHAPITRE VII. MODELISATION DE L'ENCAPSULATION DES COMPOSES PHENOLIQUES DES MARGINES EN UTILISANT LES SURFACES DE REPONSES

CHAPITRE VIII. UTILISATION DE LA PECTINE POUR L'ELABORATION D'UN BIOMATERIAU

CHAPITRE IV

TECHNIQUES

EXPERIMENTALES

IV.1. Introduction

Cette étude expérimentale est composée de trois parties, à savoir : extraction de la pectine à partir du zeste de citron, encapsulation des composés phénolique des margines et élaboration d'un matériau composite pectine / hydroxyapatite / adjuvant.

IV.2. Matériels

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation des produits suivants : zeste de citron, margines d'olive, pectine commerciale et hydroxyapatite.

- Zeste de citron

Le citron utilisé dans cette étude a été récolté durant les mois de Mars / Mai 2013. Il est issu du marché local (Tizi-Ouzou).

- Margines d'olive

Les margines d'olive employées dans ce travail proviennent d'une huilerie moderne sise à Maâtkas dans la wilaya de Tizi-Ouzou, durant la campagne oléicole 2016 - 2017.

- Pectine commerciale

La pectine commerciale utilisée (Pectagel rose) est de marque Louis François, fabricant d'ingrédients alimentaires (France). Elle est composée d'un gélifiant qui est une pectine amidée (E440ii) et des épaississants qui sont : la caroube, la guar E412 et le dextrose. Cette pectine a été utilisée lors du procédé d'encapsulation des composés phénoliques des margines et dans l'élaboration des matériaux composite pectine / hydroxyapatite / adjuvant.

- Hydroxyapatite

La poudre d'hydroxyapatite utilisée provient de l'entreprise MCP (Médicale Calcium Phosphate) de Toulouse (France). Celle-ci est composée de 70 % d'hydroxyapatite et 30 % de TCP (phosphate tricalcique).

- Produits chimiques

Tous les produits chimiques utilisés lors de la réalisation de cette étude sont de grade analytique.

IV.3. Opérations de prétraitement

IV.3.1. Zeste de citron

La poudre du zeste de citron (matière première) qui a servi comme source d'extraction de la pectine, a été obtenue après les opérations de prétraitement suivantes (figure IV.1) :

- lavage du fruit ;
- séparation de la peau de l'endocarpe à l'aide d'un couteau ;
- découpage de la peau en dés (a) ;
- séchage dans un séchoir de marque Retsch sous convection forcée à une température de 60°C (b et c) ;
- broyage à l'aide d'un broyeur de marque Samap (d) ;
- conservation de la poudre du zeste obtenue dans des boîtes hermétiques à une température de 4 à 6°C jusqu'à utilisation.

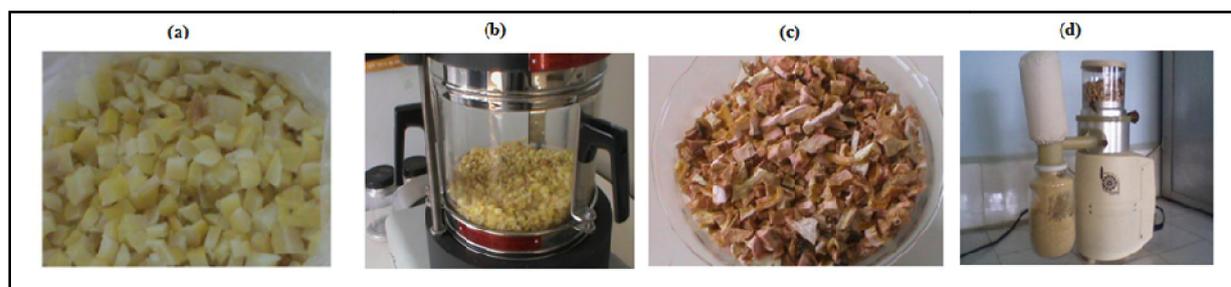


Figure IV.1. Etapes de préparation de la poudre du zeste de citron.

IV.3.2. Margines d'olive

Afin d'éliminer les matières en suspensions ainsi que la matière grasse, les margines ont subi les opérations de prétraitement suivantes:

- délipidation par décantation à l'aide d'une ampoule à décanter ;
- centrifugation à 3000 tours/min pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse de marque Hettich EBA 20 ;
- filtration sous vide à l'aide d'une pompe à vide.

Les margines prétraitées sont stockées à une température de - 10°C dans des récipients en matière plastique jusqu'à utilisation.

IV.4. Méthodes

IV.4.1. Extraction de la pectine

L'extraction de la pectine à partir du zeste de citron est réalisée selon la méthode de Kratchanova légèrement modifiée (Kratchanova *et al.*, 2004). Une prise d'essai de 5g de poudre du zeste de citron (préparée précédemment) a été introduite dans un réacteur contenant de l'eau distillée acidifiée. Le pH de la solution a été ajusté en lui ajoutant de l'acide chlorhydrique (2N). Le réacteur contenant le mélange réactionnel baigne dans l'huile de silicone contenue dans un cristalliseur, lequel est déposé sur une plaque chauffante munie d'une agitation magnétique. Le montage à reflux utilisé est illustré par la figure IV.2.

Après une certaine durée d'extraction définie par les conditions opératoires, chaque expérience est suivie d'un refroidissement immédiat du mélange réactionnel dans un bain de glace afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse acide. Après refroidissement, une filtration sous pression atmosphérique a été effectuée pour isoler le gâteau de la solution.

Le filtrat obtenu est coagulé en lui ajoutant un volume équivalent d'éthanol 96 % . Vu le caractère colloïdale des pectines, la filtration du coagulant a été réalisée sous vide à l'aide d'une trompe à eau. Une série de lavages a été effectuée par l'éthanol acidifiée 70 %, puis avec l'éthanol 70 % et 96 %, enfin trois fois avec l'acétone. Le gel de pectine récupéré a été séché à l'étuve qui est portée à une température de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à obtention d'une masse constante.

Le film de pectine obtenu a subi un broyage à l'aide d'un broyeur à lames afin d'obtenir une poudre fine qui sera conditionnée dans des boîtes hermétiquement fermées à une température inférieure à 10°C .

Le rendement en pectine Y_e est déterminé par la formule :

$$Y_e(\%) = \frac{m_2}{m_1} * 100 \quad (\text{IV.1})$$

Où : m_2 est la masse de la pectine après séchage et m_1 est la masse de la poudre du zeste de citron introduite dans le réacteur (5g).



Figure IV.2. Système de l'extraction de la pectine (montage à reflux).

Afin d'étudier la cinétique de l'extraction, nous avons procédé à la détermination de la teneur totale en pectine (A_0) contenue dans le zeste de citron. Pour cela, une extraction épuisante de la matière première a été effectuée. Au cours de ce processus, le résidu de la première extraction a été réutilisé dans la deuxième extraction et ainsi de suite jusqu'à épuisement de la matière première (zeste de citron). Cette extraction a été réalisée dans les conditions optimales estimées lors de l'étude des surfaces de réponses.

IV.4.2. Encapsulation des composés phénoliques des margines

Le flow sheet des opérations nécessaires à la préparation des capsules par la méthode d'extrusion est donné par la figure IV.3. Cette méthode consiste à introduire une quantité de pectine définie par le rapport margine/pectine (M/P) dans un volume de margines (30 mL). Après solubilisation totale de la pectine sous chauffage avec agitation mécanique, une solution homogène visqueuse a été obtenue. Cette solution (sous chauffage) a été extrudée à travers un système sous forme de compte goutte et réceptionnée dans un bain de CaCl_2 (figure IV.4). Le bain contenant les capsules a été refroidi dans de la glace. Après refroidissement, les capsules obtenues ont été filtrées, lavées avec de l'alcool puis avec l'acétone et enfin séchées à l'étuve pendant 10 heures à 40°C .

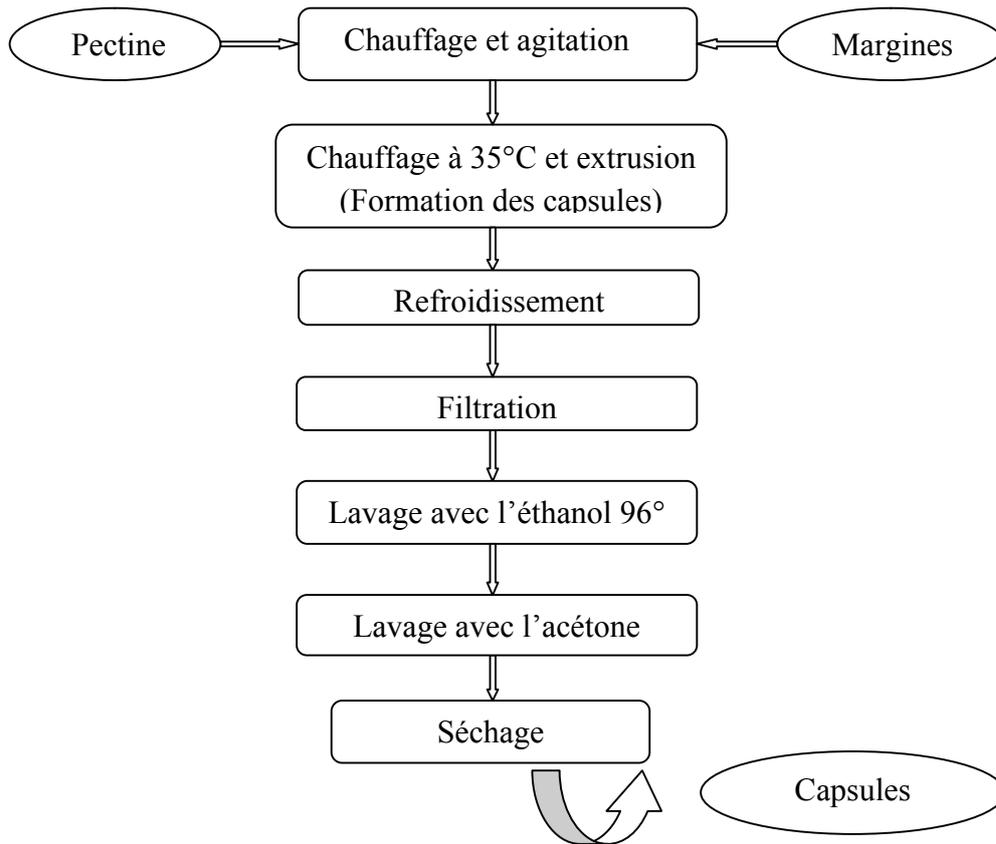


Figure IV.3. Flow sheet des différentes étapes de formulation des capsules.

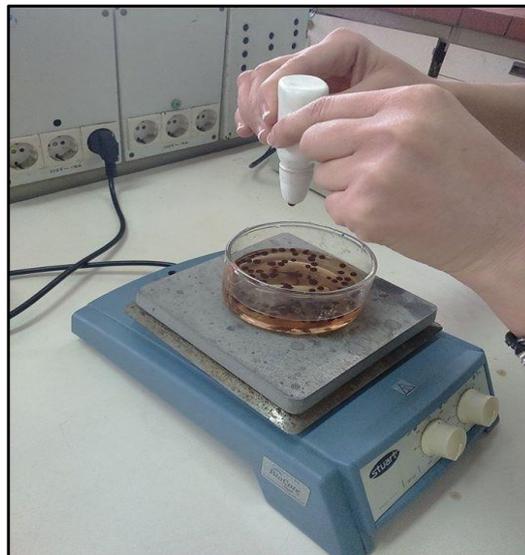


Figure IV.4. Formulation des capsules.

IV.4.3. Elaboration d'un biomatériau composite Pectine / hydroxyapatite

Les composites pectine / hydroxyapatite ont été préparés par voie humide. Le principe consiste à mélanger la poudre d'hydroxyapatite avec un gel de pectine. Le mélange homogène obtenu a été moulé sous forme de bloc ayant la forme parallélépipédique dont les dimensions sont : 20 mm de longueur, 18 mm de largeur et 26 mm de hauteur. Le composite formé est séché à l'air libre pendant environ 12 heures. Le même procédé est appliqué à l'obtention des composites pectine / hydroxyapatite en présence des agents de solidification (talc, silicate, borax et glycérol).

IV.5. Analyses

IV.5.1. Caractérisation de la pectine extraite

Dans le but d'identifier les groupements fonctionnels et de comparer la morphologie de la pectine commerciale à celle extraite dans les conditions optimales obtenues par l'étude des surfaces de réponses, deux types d'analyse ont été utilisés, à savoir la spectrophotométrie infrarouge (IR) et la microscopie électronique à balayage (MEB). L'analyse de la composition en monosaccharides des pectines extraite a été évaluée par (HPAEC).

IV.5.1.1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La morphologie de la pectine a été observée à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type ESEM XL 30 marque Philips (Germany). Cette technique permet d'obtenir des images de surfaces de pratiquement tous les matériaux solides, à des échelles allant de celle de la loupe (x 10) à celle du microscope électronique en transmission (x 500.000 ou plus).

Le principe de fonctionnement du MEB est basé sur l'irradiation du matériau sous vide par un faisceau électronique très fin et très énergétique de l'ordre de 30 à 40 KeV délivré par un canon à électrons. Ce faisceau balaye, point par point, la surface du matériau et les électrons primaires sont focalisés et dirigés vers celle-ci. L'interaction des électrons primaires avec la surface produit diverses émissions. L'intensité de chaque signal relatif à ces émissions est enregistrée de façon synchrone avec le balayage du faisceau sur l'échantillon. Un système électronique permet de convertir ces signaux en image.

IV.5.1.2. Spectrophotométrie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est l'une des méthodes efficaces et répandues qui permet l'identification des molécules organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés

vibrationnelles. En effet, la molécule exposée aux radiations peut absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupements chimiques présents dans l'échantillon. La mesure de l'intensité de lumière absorbée à chaque longueur d'onde λ conduit à un spectre caractéristique du produit étudié. Le plus souvent les analyses sont effectuées en transmission. Le spectrophotomètre utilisé est de marque Perkin Elmer (L1600400).

IV.5.1.3. Chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC-PAD)

L'analyse qualitative et quantitative des monosaccharides de la pectine extraite a été effectuée en utilisant la chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC). L'appareil est équipé d'un système de détection ampérométrique pulsée (PAD) et d'un injecteur automatique AS50. L'appareillage utilisé est un système Dionex (Dionex ICS 3000). Les monosaccharides ont été séparés sur une colonne CarboPacTMPA₁ de dimension 4 × 250 mm en combinaison avec une colonne de garde (précolonne) CarboPacTM PA₁ (4 × 50 mm).

Avant l'analyse, les pectines séchées ont été hydrolysées dans l'acide trifluoroacétique (TFA) 4 M pendant 4 h à 100 °C et neutralisées dans une solution de NH₄OH 4M. Les échantillons (10 mg.mL⁻¹) ont été filtrés en utilisant un filtre à membrane de porosité 0.2 µm et le volume d'injection a été fixé à 25 µL. Avant chaque injection, les colonnes ont été équilibrées en courant (phase mobile) pendant 15 min avec du NaOH 18 mM. Les échantillons ont été élués de manière isocratique avec du NaOH 18 mM pendant 30 minutes, suivi par un gradient linéaire entre 0 et 1 M d'acétate de sodium dans 200 mM de NaOH pendant 20 minutes pour éluer les monosaccharides acides. L'essai a été suivi d'un lavage de 15 minutes avec 200 mM de NaOH. Le débit de l'éluant a été maintenu constant à 1 mL.min⁻¹. Les colonnes ont été thermostatées à 25°C. Les données ont été collectées et analysées avec le logiciel Dionex Chromeleon 6.80 (Sunnyvale, USA). Toutes les analyses ont été effectuées en triple et les écarts-types relatifs sont inférieurs à 5 %.

IV.5.2. Caractéristiques physico-chimiques des margines prétraitées

La caractérisation physico-chimique des margines est basée sur l'étude des paramètres suivants : pH, conductivité, teneur en matière sèche, teneur en eau, teneur en cendres et en matière volatile, teneur en composés phénoliques et DCO. Chaque résultat obtenu représente une moyenne de trois déterminations.

- Le potentiel d'hydrogène (pH)

La mesure du pH des margines a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre de marque Hanna (pH 211) muni d'une électrode combinée. L'étalonnage de l'appareil a été obtenu avec des solutions tampons de pH 4.0 - 7.0. Le procédé consiste à introduire la sonde du pH-mètre dans un bécher contenant 50 mL de margines et lire ensuite le pH.

- Conductivité

La conductivité caractérise la résistance au passage du courant ou de la chaleur dans un matériau. La conductivité électrique de la margine a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de type W T W 82362 Weinheim, elle est exprimée en $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

- Teneur en matière sèche

La détermination de la teneur en matière sèche (MS) des margines consiste à évaporer un échantillon de 20 mL dans un creuset en porcelaine à une température de 100 ± 3 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Cette teneur est calculée par la relation suivante :

$$\text{MS (g/L)} = \frac{m - m_0}{20} * 1000 \quad (\text{IV.2})$$

Où : m_0 : la masse du creuset vide et m : représente la masse du creuset et des margines après séchage.

- Teneur en eau

L'humidité ou encore teneur en eau (TE) d'un échantillon est le rapport entre la masse d'eau contenue dans l'échantillon et sa masse anhydre.

Pour déterminer cette teneur dans les margines, une quantité de 20 mL de cette solution est soumise à une dessiccation à l'étuve (100 ± 3) °C jusqu'à obtention d'une masse constante. Cette teneur est déterminée comme suit :

$$\text{TE (\%)} = \frac{m_1 - m}{m_1 - m_0} * 100 \quad (\text{IV.3})$$

Où ;

m_0 : la masse du creuset vide ;

m_1 : la masse du creuset contenant 20 mL de margines avant séchage ;

m : représente la masse du creuset et des margines après séchage.

- Teneur en cendres et en matière volatile

La matière sèche des margines (MS) précédemment préparée a été incinérée à 600°C jusqu'à obtention d'une masse constante dans un four à moufle. La teneur en cendres (TC), est donnée par:

$$TC \text{ (g/L)} = \frac{m_2 - m_0}{V} * 1000 \quad (\text{IV.4})$$

m_2 est la masse de la matière sèche calcinée et V est le volume de la prise d'essai (20 mL).

La teneur en matière volatile (MV) est déterminée en faisant la différence entre la teneur en matière sèche obtenue par évaporation à (100 ± 3) °C et celle en résidus de cendres issus de la calcination à 600°C pendant 4 heures. Elle est exprimée en g.L^{-1} par rapport à la matière sèche.

$$MV \text{ (g/L)} = MS - TC \quad (\text{IV.5})$$

- Teneur en composés phénoliques

La détermination de la teneur en composés phénoliques des margines a été réalisée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, de couleur jaune est constitué par un mélange d'acides phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). En milieu alcalin, les composés phénoliques réduisent l'acide phosphomolybdique et l'acide phosphotungstique du réactif de Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleue. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration des composés phénoliques des margines.

La concentration en composés phénoliques a été déterminée sur 0.5 mL d'échantillon dilué dans 10 mL d'eau distillée, auquel sont ajoutés 0.5 mL du réactif de Folin. Après trois minutes, on ajoute 1mL d'une solution de carbonate de sodium saturée.

La lecture des absorbances contre un blanc (0.5 mL d'eau distillée à la place de l'échantillon) se fait après une heure d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Shimadzu UV-1601PC) à 750 nm. La concentration en composés phénoliques est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage qui a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique.

- Demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène correspond à la proportion de matière organique susceptible d'être oxydée par un fort oxydant chimique ($K_2Cr_2O_7$). La réaction se déroule à chaud ($150^\circ C$), en milieu acide par le bichromate de potassium en présence d'un catalyseur (ion d'argent) et du sulfate de mercure comme complexant des chlorures. La DCO est exprimée en milligrammes d'oxygène par litre d'échantillon ($mg\ d'O_2/L$). La mesure de la DCO a été réalisée avec un DCO-mètre (réacteur programmable) de marque Hanna instruments HI 839800. Le réactif utilisé est livré dans des tubes prédosés. Il existe plusieurs gammes de mesures (étroite, moyenne et large). Dans notre cas, nous avons utilisé la gamme étroite, selon le protocole suivant :

- un échantillon de 2 mL de margine (préalablement diluée) a été introduit dans un tube DCO. Un autre tube DCO auquel est ajouté 2 mL d'eau distillée (étalon) a été préparé ;
- placer les tubes contenant les solutions à analyser dans un four DCO porté à $150^\circ C$ pendant 2 heures ;
- laisser refroidir ;
- lire la valeur avec le lecteur DCO.

IV.5.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques et leur pouvoir antiradicalaire dans les capsules

Afin de déterminer la teneur en composés phénoliques encapsulés ainsi que leur pouvoir antiradicalaire, les capsules ont été solubilisées dans un volume de 50 mL d'une solution de citrate de sodium 5 % pendant 1 heure sous agitation mécanique (1000 tr / min) à $37^\circ C$ (Deladino *et al.*, 2007). La solution obtenue a été filtrée puis analysée.

IV.5.3.1. Teneur en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques encapsulés a été déterminée dans la solution de citrate de sodium, par la méthode de Folin Ciocalteu. Les mesures ont été faites contre un blanc de citrate de sodium à une longueur d'onde 750 nm et chaque échantillon a été analysé trois fois.

La teneur en composés phénoliques encapsulés est donnée par :

$$Y_1(\%) = \frac{Q}{Q_0} * 100 \quad (IV. 6)$$

Où ;

Y_1 : teneur en composés phénoliques encapsulés (%) ;

Q: quantité des composés phénoliques encapsulés (mg) déterminée dans la solution de citrate de sodium ;

Q₀: quantité initiale des composés phénoliques présente dans 30 mL des margines (mg).

IV.5.3.2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire

La détermination de l'activité antiradicalaire des composés phénoliques (retenus dans les capsules) dans la solution de citrate de sodium (échantillon), a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH'. Le test de DPPH a été réalisé selon la méthode décrite par Brand-Williams (Brand-Williams *et al.*, 1995). Un volume de 250 µL de l'échantillon a été dilué dans 10 mL d'eau distillée. 200 µL d'échantillon dilué ont été mélangés avec 2 mL d'une solution méthanolique de DPPH 100 µM. Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 60 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 517 nm, contre un blanc de citrate de sodium. Les résultats présentent la moyenne de trois expériences menées en parallèle.

Le pouvoir antiradicalaire (Y₂) est calculé selon l'équation suivante :

$$Y_2(\%) = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} * 100 \quad (\text{IV.7})$$

Où,

Y₂: pourcentage de réduction du radical libre DPPH' (%) ;

A_{contrôle}: l'absorbance de contrôle (en absence de l'échantillon) ;

A_{échantillon}: l'absorbance en présence de l'échantillon déterminée dans la solution de citrate de sodium.

IV.6. Caractérisation des composites pectine / hydroxyapatite

IV.6.1. Densité des composites

La densité a été déterminée par une méthode géométrique basée sur la mesure de la hauteur, la largeur et la longueur de l'échantillon (composite). La densité (masse volumique) est le rapport entre la masse et le volume de l'échantillon :

$$\rho \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{m_i}{V_i} \quad (\text{IV.8})$$

m_i : masse de l'échantillon ;

V_i : volume de l'échantillon, nos échantillons ont une forme parallélépipède, leur volume est donné par :

$V = L * l * h$, avec : L, l et h sont respectivement la longueur, la largeur et la hauteur de l'échantillon.

Les mesures géométriques ont été faites à l'aide d'un pied à coulisse de précision (± 0.01) de type Mitutoya.

IV.6.2. Test de résistance à la rupture en compression

Le test de la résistance à la rupture en compression des composites obtenus a été réalisé à l'aide d'une machine de type (Zwick/Roelle). Cette machine est munie d'un capteur de force assisté par ordinateur à l'aide d'un logiciel (figure IV.5). Lors de cette compression, la déformation du matériau en fonction de l'effort appliqué est enregistrée. Une courbe Force (N) - déformation (%) est obtenue.

L'essai permet de déterminer la résistance à la rupture en compression exprimée en Pa ou MPa, selon la formule suivante :

$$R_r = F_{\max} / S \quad (\text{IV.9})$$

Où ;

R_r est la résistance à la rupture en compression (MPa) ;

F_{\max} est la force maximale à la rupture (N) ;

S est la surface de matériau (mm^2), donnée par :

$$S = L * l \quad (\text{IV.10})$$

Où : L est la longueur de composite et l : est la largeur de composite.

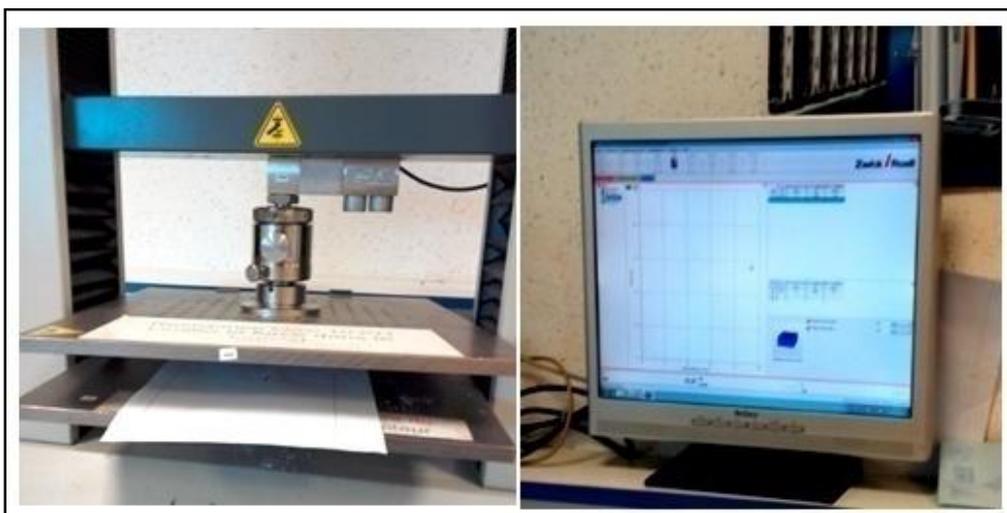


Figure IV.5. Mesure de la résistance à la rupture en compression.

CHAPITRE V

**MODELISATION ET OPTIMISATION
DE L'EXTRACTION DE LA PECTINE A
PARTIR DU ZESTE DE CITRON**

V.1. Introduction

Dans ce chapitre sont présentés les résultats de la modélisation et de l'optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron. La pectine gélifiée extraite à partir du zeste de citron comme illustrée dans la figure V.1 (a et b), a été séchée puis broyée pour obtenir une poudre. La masse obtenue après séchage lors de la réalisation des expériences de modélisation, est considérée comme la réponse à étudier (rendement en pectine Y_e).

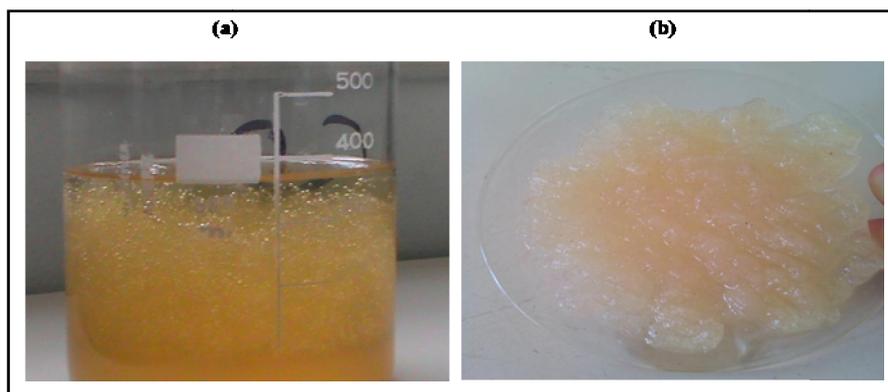


Figure V.1. Pectine après coagulation (a), gel de pectine (b).

V.2. Criblage de facteurs

Le but de cette étape est de déterminer parmi les facteurs recensés comme éventuellement influents sur le rendement d'extraction de la pectine (réponse), ceux qui ont une influence statistiquement significative. Cette étape est nécessaire pour réduire le nombre de facteurs à étudier dans les surfaces de réponses.

V.2.1. Domaine expérimental des facteurs

Le choix des facteurs et leurs niveaux de variation a été effectué en tenant compte des données de la littérature (citées dans le chapitre I).

Les facteurs susceptibles d'affecter le rendement d'extraction en pectine sont :

- Temps de coagulation (h) ;
- pH du mélange réactionnel ;
- rapport Liquide / Solide (mL/g) ;
- température (°C) ;
- temps d'extraction (minutes) ;
- vitesse d'agitation du mélange réactionnel (tours/minute) ;
- température de séchage (°C).

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

Le domaine expérimental des facteurs pouvant affecter le rendement de l'extraction est donné par le tableau V.1.

Tableau V.1. Domaine expérimental des facteurs (criblage).

Facteurs	Symbole	Variable Codée	Unité	Niveau (-)	Niveau (+)	Centre	Pas de variation
Temps de coagulation	t_{coag}	X_1	h	1	2	1.5	0.5
pH	pH	X_2	-	1.5	3	2.25	0.75
Rapport Liquide/Solide	L/S	X_3	mL/g	25	50	37.5	12.5
Température	T	X_4	°C	40	80	60	20
Temps d'extraction	t	X_5	min	20	60	40	20
Vitesse d'agitation	V_a	X_6	tr/min	200	400	300	100
Température de séchage	T_s	X_7	°C	40	60	50	10

V.2.2. Construction de la matrice d'expériences

Le criblage des sept facteurs susceptibles d'affecter le rendement de l'extraction de la pectine a été effectué en utilisant la matrice d'Hadamard. Comme le nombre de facteurs est $k=7$, le plan d'expériences sera une matrice de 8 expériences. Pour obtenir une variance expérimentale de la réponse, nous avons dupliqué le plan, ce qui mène donc à une matrice de 16 essais. La matrice d'expériences sous forme de variables codées est construite par permutation circulaire à partir de la droite (tableau V.2).

Tableau V.2. Matrice d'expériences (criblage).

N° EXP	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
1	1	1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	1	-1	1	-1	-1
3	-1	1	1	1	-1	1	-1
4	-1	1	1	1	-1	1	-1
5	-1	-1	1	1	1	-1	1
6	-1	-1	1	1	1	-1	1

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

7	1	-1	-1	1	1	1	-1
8	1	-1	-1	1	1	1	-1
9	-1	1	-1	-1	1	1	1
10	-1	1	-1	-1	1	1	1
11	1	-1	1	-1	-1	1	1
12	1	-1	1	-1	-1	1	1
13	1	1	-1	1	-1	-1	1
14	1	1	-1	1	-1	-1	1
15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

La traduction des niveaux de cette matrice en variables réelles nous permet d'avoir le plan d'expérimentation donné par le tableau V.3.

Tableau V.3. Plan d'expérimentation (criblage).

N° exp	t_{coag}	pH	L/S	T	t	V_a	T_s
1	2	3	50	40	60	200	40
2	2	3	50	40	60	200	40
3	1	3	50	80	20	400	40
4	1	3	50	80	20	400	40
5	1	1.5	50	80	60	200	60
6	1	1.5	50	80	60	200	60
7	2	1.5	25	80	60	400	40
8	2	1.5	25	80	60	400	40
9	1	3	25	40	60	400	60
10	1	3	25	40	60	400	60

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

11	2	1.5	50	40	20	400	60
12	2	1.5	50	40	20	400	60
13	2	3	25	80	20	200	60
14	2	3	25	80	20	200	60
15	1	1.5	25	40	20	200	40
16	1	1.5	25	40	20	200	40

Les valeurs de la réponse obtenues (rendement d'extraction) sont regroupées dans le tableau V.4.

Tableau V.4. Rendement d'extraction en pectine (Y_e).

N° exp	Y_e (%)	N° exp	Y_e (%)
1	6.20	9	5.40
2	7.40	10	5.80
3	9.20	11	12.60
4	9.00	12	13.80
5	21.40	13	6.80
6	20.20	14	6.60
7	29.80	15	11.80
8	20.20	16	12.00

V.2.3. Estimation des poids des facteurs

Pour déterminer les facteurs qui ont des effets statistiquement significatifs sur la réponse, il est indispensable de calculer l'écart-type, le t de Student et le seuil de signification (%) pour chaque coefficient.

$$\text{Var}(b_j) = \frac{\text{Var}(Y)}{N} \quad \longrightarrow \quad \sigma(b_j) = \sqrt{\frac{\text{Var}(Y)}{N}} \quad (\text{V.1})$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{b_j}{\sigma(b_j)} \quad (\text{V.2})$$

Où ;

σ est l'écart-type ;

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

N est le nombre d'essais.

Connaissant t_{exp} et le nombre de degré de liberté (ddl), on détermine le seuil de signification (%) en utilisant la loi de Student.

Dans notre étude, les estimations des poids b_j , les écart-types ainsi que le seuil de signification sont calculés par le logiciel Nemrodw (Mathieu *et al.*, 2007). Les résultats obtenus sont représentés par le tableau V.5.

Tableau V.5. Estimations des coefficients du modèle.

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-type	t_{exp} .	Signif. %
b_0	12.39		0.61	20.15	< 0.01 **
b_1	0.54	1.00	0.61	0.87	40.70
b_2	-5.34	1.00	0.61	-8.68	< 0.01 **
b_3	0.09	1.00	0.61	0.14	89.00
b_4	3.01	1.00	0.61	4.90	0.12 *
b_5	2.16	1.00	0.61	3.52	0.79 *
b_6	0.84	1.00	0.61	1.36	21.00
b_7	-0.81	1.00	0.61	-1.32	22.30

t_{exp} : valeur expérimentale du rapport de Student.

* : significatif au niveau de confiance 95 %.

** : significatif au niveau de confiance 99 %.

Nous considérons généralement que si le seuil de signification est inférieur à 5 %, l'effet est significatif. Les résultats du tableau V.5 montrent donc que les facteurs présentant un poids significatif sur la réponse sont:

- pH ;
- température ;
- temps de contact.

V.2.4. Etude graphique des effets du rendement

La représentation graphique des effets des facteurs est illustrée par le diagramme indiqué par la figure V.2. En considérant l'intervalle de confiance des valeurs des coefficients (délimité par les deux lignes verticales en pointillés), nous pouvons affirmer, que trois

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

facteurs sont actifs sur la réponse. Il s'agit du pH (effet négatif), de la température (effet positif) et du temps de contact (effet positif).

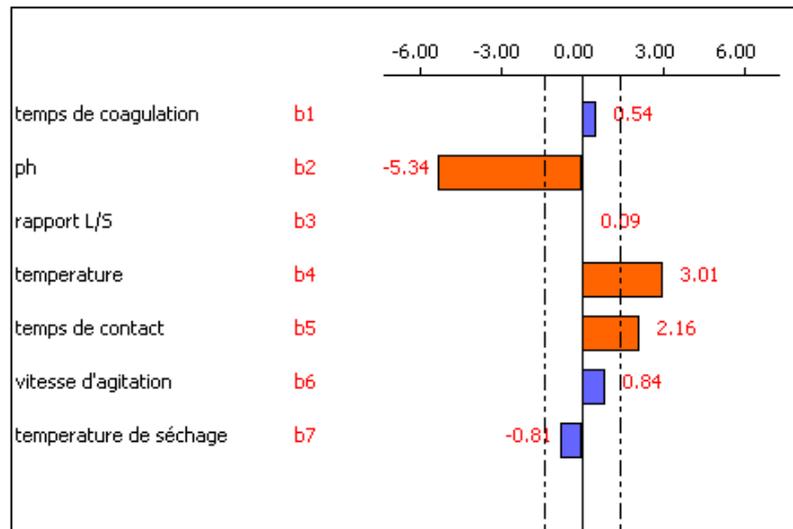


Figure V.2. Représentation graphique des effets des facteurs sur le rendement d'extraction.

Les facteurs influents, définis dans cette étape ont été ensuite optimisés en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses.

V.3. Etude des surfaces de réponses

V.3.1. Modèle mathématique

Pour ne pas perturber le lecteur, nous préférons garder la même notation pour les facteurs sélectionnés dans l'étude de criblage (X_2 , X_4 et X_5), pour cela, le modèle mathématique du second degré postulé pour l'étude des surfaces de réponses est donné par:

$$Y_e = a_0 + a_2X_2 + a_4X_4 + a_5X_5 + a_{22}X_2^2 + a_{44}X_4^2 + a_{55}X_5^2 + a_{24}X_2X_4 + a_{25}X_2X_5 + a_{45}X_4X_5 \quad (V.3)$$

V.3.2. Matrice d'expériences

Les trois variables (facteurs) sélectionnées lors de l'étude de criblage, à savoir le pH, la température et le temps de contact, sont soumis à une étude des surfaces de réponses. Le plan d'expérimentation utilisé est basé sur une matrice composite centrée pour 3 facteurs X_2 , X_4 , X_5 appliquée dans le domaine expérimental donné par le tableau V.1. Cette matrice est constituée de 19 expériences réparties en huit points factoriels ($N_F = 8$), six points axiaux (N_α

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

= 6 et $\alpha = 1.68$) et cinq points au centre du domaine ($N_0 = 5$) (tableau V.6). Les répétitions de point au centre sont effectuées afin d'évaluer la répétabilité de la méthode et pour déterminer la variance de l'erreur pure. Quatre expériences (points tests) sont ajoutées à la matrice composite centrée afin de vérifier la validité du modèle ajusté.

Tableau V.6. Matrice composite centrée en variables codées et variables réelles.

N°exp	Variables codées			Variables réelles		
	X ₂	X ₄	X ₅	pH	T	t
1	-1.00	-1.00	-1.00	1.50	40	20
2	+1.00	-1.00	-1.00	3.00	40	20
3	-1.00	+1.00	-1.00	1.50	80	20
4	+1.00	+1.00	-1.00	3.00	80	20
5	-1.00	-1.00	+1.00	1.50	40	60
6	+1.00	-1.00	+1.00	3.00	40	60
7	-1.00	+1.00	+1.00	1.50	80	60
8	+1.00	+1.00	+1.00	3.00	80	60
9	-1.68	0.00	0.00	0.99	60	40
10	+1.68	0.00	0.00	3.51	60	40
11	0.00	-1.68	0.00	2.25	26	40
12	0.00	+1.68	0.00	2.25	94	40
13	0.00	0.00	-1.68	2.25	60	6
14	0.00	0.00	+1.68	2.25	60	74
15	0.00	0.00	0.00	2.25	60	40
16	0.00	0.00	0.00	2.25	60	40
17	0.00	0.00	0.00	2.25	60	40
18	0.00	0.00	0.00	2.25	60	40
19	0.00	0.00	0.00	2.25	60	40
20	-0.70	-0.41	-0.29	1.72	52	34
21	+0.70	-0.41	-0.29	2.78	52	34
22	0.00	+0.82	-0.29	2.25	76	34
23	0.00	0.00	+0.87	2.25	60	57

V.3.3. Qualité de prédiction

V.3.3.1. Fonction de variance

Une matrice d'expériences est dite de prévision acceptable si elle conduit à une fonction de variance de la réponse inférieure ou voisine de 1 dans tout le domaine expérimental. La valeur maximal est notée d_{\max} ($d_{\max} \leq 1$). Il est très utile de connaître la valeur de d_{\max} pour juger si on peut procéder à l'expérimentation.

Comme, dans notre cas d_{\max} est égal à 0.67, nous pouvons donc passer à l'expérimentation.

V.3.3.2. Isovariance par rotation

Nous désirons que les réponses calculées avec le modèle aient une erreur de prévision identique pour des points situés à la même distance du centre du domaine d'étude. Dans ce cas, on parle de plan isovariant par rotation (rotatable). Dans notre étude, cette propriété est assurée comme le montre la figure V.3.

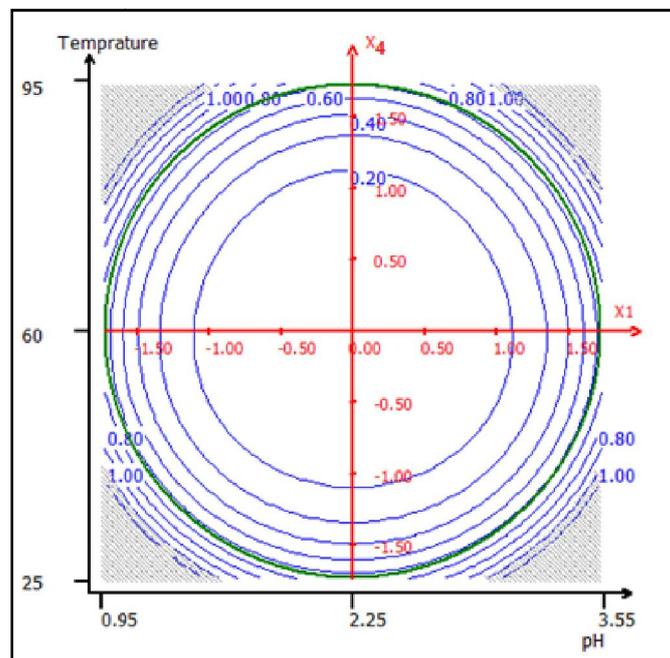


Figure V.3. Variation de la réponse (Rendement) au temps = 40 min.

V.3.4. Expérimentation

Sachant que la fonction de variance d_{\max} est inférieure à l'unité et que l'isovariance par rotation est assurée, nous pouvons réaliser l'expérimentation. Les expériences ont été réalisées après randomisation et les résultats (rendement en pectine) obtenus sont donnés dans le tableau V.7.

Tableau V.7. Résultats expérimentaux (matrice composite centrée).

N°exp	Y _e (%)	N°exp	Y _e (%)
1	12.00	13	12.80
2	8.10	14	17.40
3	19.00	15	19.00
4	14.00	16	19.40
5	11.00	17	18.80
6	9.20	18	18.20
7	22.40	19	19.20
8	17.00	20	17.80
9	16.60	21	12.80
10	6.40	22	20.20
11	8.40	23	17.20
12	24.00		

V.3.5. Validation du modèle

V.3.5.1. Equation du modèle sans les points tests

Les estimations des 10 coefficients du modèle sans les points tests sont calculées par le logiciel Nemrodw sur la base des résultats expérimentaux (tableau V.8). Les valeurs du coefficient de détermination ($R^2 = 0.98$) et du coefficient de détermination ajusté ($R^2_a = 0.97$) montrent que l'ajustement est de bonne qualité. L'écart type de la réponse est de 0.91 avec 9 degrés de liberté.

Tableau V.8. Coefficients du modèle sans les points tests (Y_e).

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-type	t _{exp}	Signif.%
a ₀	18.92		0.41	46.61	< 0.01
a ₂	-2.44	1.00	0.25	-9.91	< 0.01
a ₄	4.27	1.00	0.25	17.38	< 0.01
a ₅	1.04	1.00	0.25	4.24	0.217
a ₂₋₂	-2.60	1.04	0.25	-10.58	< 0.01
a ₄₋₄	-0.94	1.04	0.25	-3.82	0.408
a ₅₋₅	-1.33	1.04	0.25	-5.40	0.0431
a ₂₋₄	-0.59	1.00	0.32	-1.83	10.1
a ₂₋₅	0.21	1.00	0.32	0.66	52.5
a ₄₋₅	0.79	1.00	0.32	2.45	3.66

Le modèle postulé exprimé en variables codées est représenté par l'équation suivante:

$$Y_e = 18.92 - 2.44X_2 + 4.27X_4 + 1.04X_5 - 2.60X_2^2 - 0.94X_4^2 - 1.33X_5^2 - 0.59X_2X_4 + 0.21X_2X_5 + 0.79X_4X_5 \quad (V.4)$$

Pour valider le modèle, nous avons réalisé des expériences en des points tests de telle façon qu'ils soient les plus éloignés possible des points expérimentaux. Les résultats des tests statistiques appliqués en ces points sont donnés par le tableau V.9.

Les résultats obtenus montrent que la différence entre la réponse expérimentale et prédite ($Y_{exp} - Y_{pre}$) pour chaque point test se situe dans la gamme des erreurs expérimentales, c'est-à-dire statistiquement non significative en utilisant le test t.

La variance de la différence ($Y_{exp} - Y_{pre}$) est calculée en utilisant la relation suivante :

$$\text{Var(Différence)} = [1 + dU] \sigma^2 \quad (V.5)$$

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

Tableau V.9. Tests statistiques appliqués aux points tests.

N° exp	Y _{exp}	Y _{pre}	Différence	t _{exp}	dU	Degré de liberté	Ecart-type	(Signif. %)
20	17.80	16.99	0.81	0.82	0.19	9	0.99	43.60
21	12.80	13.80	-1.00	-1.01	0.19	9	0.99	34.00
22	20.20	21.18	-0.98	-0.99	0.19	9	0.99	34.90
23	17.20	18.82	-1.62	-1.64	0.19	9	0.99	13.70

V.3.5.2. Modèle mathématique affiné

Nous pouvons obtenir un modèle mathématique plus précis en intégrant dans l'estimation des coefficients les valeurs des réponses obtenues aux points tests. Les nouveaux coefficients sont consignés dans le tableau V.10.

Tableau V.10. Coefficients du modèle affiné.

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t _{exp}	Signif.%
a ₀	18.63		0.35	52.54	< 0.01
a ₂	-2.52	1.00	0.25	-10.14	< 0.01
a ₄	4.22	1.00	0.25	16.99	< 0.01
a ₅	0.97	1.00	0.25	3.91	0.179
a ₂₋₂	-2.48	1.02	0.25	-10.09	< 0.01
a ₄₋₄	-0.85	1.02	0.25	-3.47	0.414
a ₅₋₅	-1.28	1.02	0.25	-5.21	0.0169
a ₂₋₄	-0.53	1.00	0.33	-1.59	13.6
a ₂₋₅	0.25	1.00	0.33	0.76	46.1
a ₄₋₅	0.81	1.00	0.33	2.40	3.06

L'équation du modèle affiné est la suivante:

$$Y_e = 18.63 - 2.52X_2 + 4.22X_4 + 0.97X_5 - 2.48X_2^2 - 0.85X_4^2 - 1.28X_5^2 - 0.53X_2X_4 + 0.25X_2X_5 + 0.81X_4X_5 \quad (V.6)$$

V.3.5.3. Analyse des résidus

Un résidu est la différence entre la réponse expérimentale et la réponse prédite. Le graphe de la répartition des résidus est représenté par la figure V.4. Nous constatons d'après ce graphique que les résidus semblent disposés aléatoirement et ne présentent pas vraiment de tendance particulière. Ce résultat indique que toutes les informations sur la réponse étudiée sont expliquées par le modèle.

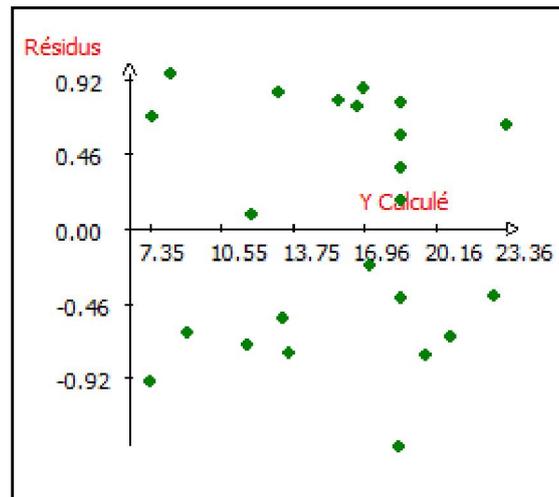


Figure V.4. Répartition des résidus en fonction du rendement calculé.

V.3.5.4. Analyse de la variance

Les résultats de l'analyse de la variance sont regroupés dans le tableau V.11. Le modèle mathématique postulé représente bien le phénomène si les résidus sont de l'ordre de l'erreur expérimentale.

$$r_i = Y_{\text{exp},i} - Y_{\text{cal},i} = e_i \quad (\text{V.7})$$

Nous pouvons accéder à la variance expérimentale si l'hypothèse précédente est vérifiée en calculant la somme des carrés des écarts (SCE) et en la divisant par (N-p) pour obtenir la moyenne de la somme des carrés des écarts (MSCE).

$$\text{SCE} = \sum (Y_{\text{exp},i} - Y_{\text{cal},i})^2 = 11.7474 \quad (\text{V.8})$$

$$\text{MSCE} = \frac{\text{SCE}}{N-p} = \frac{11.7474}{13} = 0.9036 \quad (\text{V.9})$$

N est le nombre d'expériences et p le nombre de coefficients du modèle.

$$p = \frac{(k+1)(k+2)}{2} = \frac{4 \times 5}{2} = 10$$

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

Tableau V.11. Analyse de la variance.

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif.
Régression	493.1908	9	54.7990	60.6418	< 0.01 **
Résidus	11.7474	13	0.9036		
Validité	10.8994	9	1.2110	5.7125	5.4
Erreur	0.8480	4	0.2120		
Total	504.9383	22			

** Significatif au niveau de 99.90 %.

Nous pouvons à partir de l'ensemble des points expérimentaux obtenir deux sortes d'informations indépendantes :

Aux points répétés :

L'expérience a été répétée 5 fois au centre du domaine. Comme la dispersion des résultats obtenus ne dépend pas du modèle mais seulement de l'erreur expérimentale, on peut donc avoir une estimation de la variance expérimentale à partir de ces résultats.

$$S^2 = [\sum (Y_{0,i} - \bar{Y}_0)^2] / (N_0 - 1) = \frac{0.8480}{4} = 0.2120 \quad (\text{V.10})$$

Où ;

Y_0 est la moyenne des valeurs de la réponse au centre du domaine ;

N_0 le nombre d'expériences en ce point.

Aux autres points

La somme des carrés des écarts calculée précédemment peut être scindée en deux parties.

$$SCE = SCE_1 + SCE_2 \quad (\text{V.11})$$

SCE_1 : Somme des carrés des écarts pour les points au centre.

SCE_2 : Somme des carrés des écarts pour les autres points.

$$SCE_2 = SCE - SCE_1 = 11.7474 - 0.8480 = 10.8994$$

Si l'hypothèse est vérifiée, on peut obtenir une autre estimation de la variance expérimentale en utilisant la relation: $SCE_2 / [(N-P) - (N_0 - 1)]$

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

Nous disposons donc de deux estimations indépendantes de la variance :

$$MSCE_1 = SCE_1 / (N_0 - 1) = 0.8480 / 4 = 0.2120 \quad \text{avec} \quad \text{ddl} = 4. \quad (\text{V.12})$$

$$MSCE_2 = SCE_2 / [(N - P) - (N_0 - 1)] = 10.8994 / (13 - 4) = 1.2110 \quad \text{avec} \quad \text{ddl} = 9. \quad (\text{V.13})$$

$MSCE_1$ et $MSCE_2$ sont deux estimations indépendantes d'une même variance.

$$MSCE_2 / MSCE_1 = 1.2110 / 0.2120 = 5.7123$$

Le test statistique montre que la probabilité pour que ces deux valeurs représentent une même variance est de 5.4 %. Le modèle peut donc être validé.

Représentativité du modèle

Le modèle étant validé, nous pouvons prendre comme variance expérimentale :

$$MSCE = (SCE_1 + SCE_2) / (N - P) = (0.8480 + 10.8994) / 13 = 0.9036 \quad \text{avec} \quad \text{ddl} = 13. \quad (\text{V.14})$$

Est-ce que le modèle nous apporte quelque chose ? Pour le savoir, calculons :

$$SCR = \sum (Y_{\text{cal},i} - Y_{\text{moy}})^2 = 493.1908 \quad (\text{V.15})$$

$$MSCR = SCR / (P - 1) = 493.1908 / 9 = 54.7990$$

Si la variance MSCR est de l'ordre de l'erreur expérimentale, on peut écrire

$$E(MSCR) = \sigma^2 \quad \text{avec} \quad \text{ddl} = 9$$

$E(MSCR)$: Espérance mathématique.

On peut comparer $E(MSCR)$ avec l'estimation de la variance expérimentale calculée plus haut.

Le test statistique (loi F) permettant de voir si les deux estimations indépendantes MSCR et MSCE représentent la même variance conduit à une probabilité très faible (< 0.01 %). Donc la variation de la réponse calculée n'est pas due à l'erreur expérimentale.

Le modèle postulé étant déjà validé, il peut être maintenant utilisé pour calculer la valeur de la réponse en tout point du domaine expérimental.

V.3.6. Optimisation

V.3.6.1. Analyse canonique

Nous rappelons que l'équation mathématique du modèle validé est la suivante :

$$Y_e = 18.63 - 2.52X_2 + 4.22X_4 + 0.97X_5 - 2.48X_2^2 - 0.85X_4^2 - 1.28X_5^2 - 0.53X_2X_4 + 0.25X_2X_5 + 0.81X_4X_5 \quad (\text{V.16})$$

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

Ce modèle peut être écrit sous la forme matricielle suivante :

$$Y = a_0 + X^t a + X^t A X \quad (V.17)$$

Où ;

X est la matrice du modèle ;

X^t est la matrice transposée de X ;

A représente les coefficients du modèle.

$$Y_e = 18.63 + (X_2 \ X_4 \ X_5) \begin{pmatrix} -2.520 \\ +4.224 \\ +0.972 \end{pmatrix} + (X_2 \ X_4 \ X_5) \begin{pmatrix} -2.482 & -0.264 & +0.127 \\ -0.264 & -0.854 & +0.406 \\ +0.127 & +0.406 & -1.278 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X_2 \\ X_4 \\ X_5 \end{pmatrix}$$

Les coordonnées du point stationnaire peuvent être calculées en utilisant la relation

$$X_s = -\frac{1}{2} A^{-1} a_k \quad (V.18)$$

Où:

A^{-1} est la matrice inverse de A

$$\begin{pmatrix} X_{2,s} \\ X_{4,s} \\ X_{5,s} \end{pmatrix} = -\frac{1}{2} \begin{pmatrix} -0.417 & +0.129 & -0.001 \\ +0.129 & -1.419 & -0.438 \\ -0.001 & -0.438 & -0.922 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -2.520 \\ +4.224 \\ +0.972 \end{pmatrix}$$

Le calcul donne :

$$X_{2,s} = -0.796$$

$$X_{4,s} = +3.372$$

$$X_{5,s} = +1.372$$

La distance du point stationnaire à l'origine OS est donnée par la relation suivante :

$$(OS)^2 = X_{2,s}^2 + X_{4,s}^2 + X_{5,s}^2 \quad (V.19)$$

$$OS = \sqrt{X_{2,s}^2 + X_{4,s}^2 + X_{5,s}^2} = 3.726$$

Le point stationnaire de la conique représentative de la réponse est situé à l'extérieur du domaine d'étude. Il faut faire une translation.

L'équation de la réponse écrite en fonction des axes Z_i de la conique après translation est :

$$Y_1 = 19.453 + 4.351 Z_2 + 0.000 Z_4 + 0.000 Z_5 - 0.594 Z_2^2 - 1.466 Z_4^2 - 2.554 Z_5^2 \quad (V.20)$$

Où ;

Z_2, Z_4 et Z_5 sont les axes de la conique.

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

Les équations qui permettent le passage des axes Z_i à X_i sont :

$$\begin{aligned} X_2 &= -0.09 Z_2 + 0.23 Z_4 + 0.97 Z_5 - 0.476 \\ X_4 &= 0.86 Z_2 - 0.47 Z_4 + 0.19 Z_5 + 0.208 \\ X_5 &= 0.50 Z_2 + 0.85 Z_4 - 0.16 Z_5 - 0.445 \end{aligned} \quad (\text{V.21})$$

Nous observons sur la figure de la courbure de l'équation canonique (figure V.5) que tout déplacement le long de Z_4 et Z_5 diminue la réponse, donc pour augmenter la valeur de la réponse, il est nécessaire de prendre $Z_4 = Z_5 = 0$. Par ailleurs, on note que Z_2 augmente la réponse.

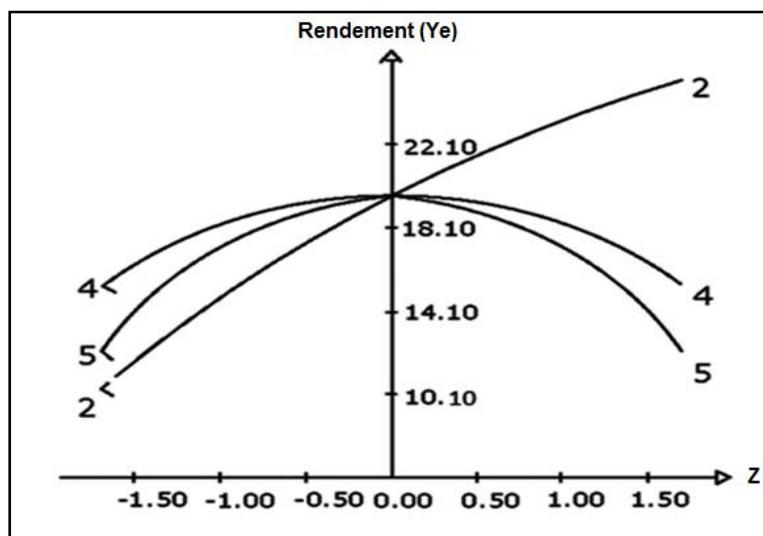


Figure V.5. Courbure de l'équation canonique.

En prenant $Z_4 = 0$ et $Z_5 = 0$, les équations de passage des X aux Z deviennent:

$$\begin{aligned} X_2 &= -0.09 Z_2 - 0.476 \\ X_4 &= 0.86 Z_2 + 0.208 \\ X_5 &= 0.50 Z_2 - 0.445 \end{aligned} \quad (\text{V.22})$$

D'après la figure V.6 de l'analyse du chemin optimale, nous remarquons que pour augmenter la réponse, X_4 soit le maximum ($X_4 = +1.68$).

Comme la valeur de X_4 est maintenant connue, il suffit de la remplacer dans le système d'équations V.22 pour trouver les niveaux optimums à attribuer aux X_2 et X_5 en variables codées.

$$\begin{aligned} X_2 &= -0.09 Z_2 - 0.476 & \longrightarrow & X_2 = -0.63 \\ X_4 &= 0.86 Z_2 + 0.208 & \longrightarrow & Z_2 = +1.71 \\ X_5 &= 0.50 Z_2 - 0.445 & \longrightarrow & X_5 = +0.41 \end{aligned} \quad (\text{V.23})$$

Les conditions optimales de la réponse sont :

- $X_2 = -0.63$ en valeur codée, ce qui correspond à un $\text{pH} = 1.78$.
- $X_4 = +1.68$ en valeur codée, ce qui correspond à une température $T = 94^\circ\text{C}$.
- $X_5 = +0.41$ en valeur codée, ce qui correspond à un temps $t = 48$ min.

V.3.6.2. Etude du chemin optimal

L'analyse du chemin optimal permet de déterminer le point où la réponse étudiée est optimale.

Le logiciel Nemrodw présente les résultats sous forme de graphe indiquant à chaque distance du centre du domaine, la valeur optimale de la réponse étudiée, ainsi que les niveaux optimums à attribuer aux facteurs (figure V.6).

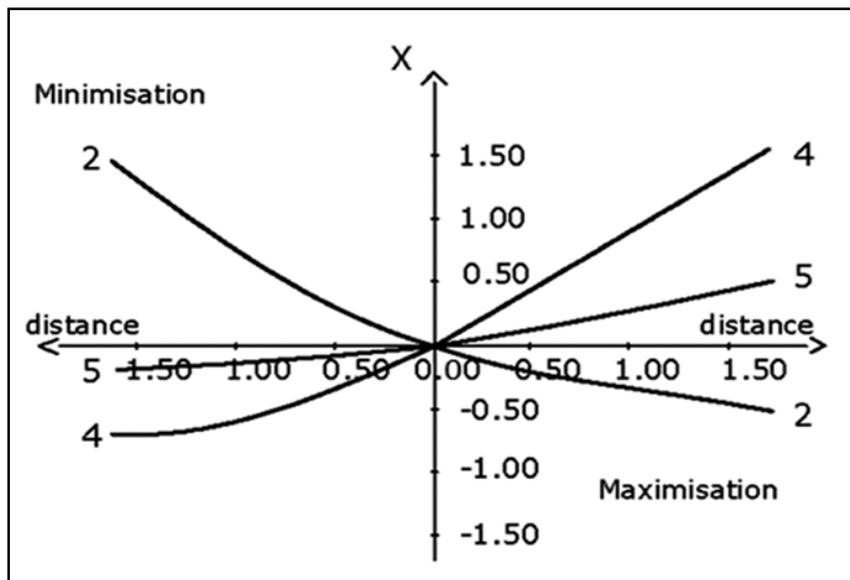


Figure V.6. Analyse du chemin optimal de la réponse (rendement en pectine).

La valeur théorique maximale du rendement est d'environ 25.18 ± 1.84 % (figure V.7). La connaissance de X_4 ($T = 94^\circ\text{C}$) conduit à la figure V.7 qui donne les surfaces de réponses.

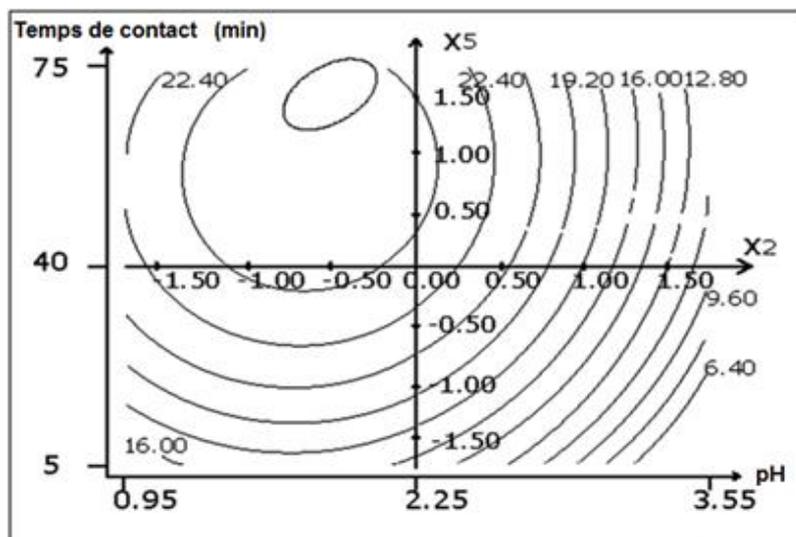


Figure V.7. Variation de la réponse (rendement) à température = 94 °C.

Pour finaliser les tests de la validité du modèle, nous avons réalisé une expérience répétée cinq fois aux conditions optimales trouvées par l'étude des surfaces de réponses (pH = 1.78, T = 94°C et t = 48 min). Les résultats des expériences conduisent à une valeur moyenne du rendement en pectine de 25.60 ± 0.44 %, ce qui est proche de la réponse prédite (25.18 ± 1.84 %). Ce résultat a été comparé à ceux rapportés dans la littérature (tableau V.12).

Tableau V.12. Rendement en pectine extraite à partir de différentes espèces végétales.

Espèces végétales	Acide	Rendement (%)	Conditions optimales	Références
Ecorces de citron	Chlorhydrique	25.60	pH= 1.78 T= 94°C t= 48min	Notre étude
Ecorces de pomélo	Citrique	23.19	pH= 2 T= 90°C t= 90 min	Methacanon <i>et al.</i> , 2014.
Marc de pomme	Citrique	18 - 20	C=6.2g /100 mL de l'acide T = 97°C t = 153 min	Canteri Shemin <i>et al.</i> , 2005.
Ecorces d'orange	Sulfurique	16.10	pH = 2.5 T = 97°C t = 120 min	Abid <i>et al.</i> , 2009.
Ecorces de citron	Citrique	10.89	pH = 2.8 T = 84°C t = 214 min	Masmoudi <i>et al.</i> , 2008.

Les résultats donnés dans ce tableau montrent que le rendement maximum en pectine obtenu dans notre étude est légèrement supérieur à celui rapporté par Methacanon et al (2014). A l'exception de la durée de l'extraction qui est deux fois plus élevée, les autres valeurs, c'est-à-dire : celles du pH et de la température données par ces auteurs sont proches de celles que nous avons obtenues. Les autres études (Canteri Shemin *et al.*, 2005 ; Abid *et al.*, 2009 ; Masmoudi *et al.*, 2008) ont montrées des rendements plus faibles, lesquels sont obtenus à des temps d'extraction plus longs.

V.7. Caractérisation de la pectine extraite

V.7.1. Infrarouge

Les spectres IR de la pectine commerciale et de celle extraite sont représentés par la figure V.8. Ces spectres font apparaitre une bande d'absorption autour de 3500 cm^{-1} qui peut être attribuée à la vibration d'élongation des OH (groupements hydroxyles).

Les bandes observées au voisinage de 3000 cm^{-1} et 1400 cm^{-1} correspondent aux deux types de vibration (élongation et déformation de groupement méthyle CH de l'acide galacturonique).

La bande observée à 1740 cm^{-1} est attribuée au carbonyle COO^- . Le domaine compris entre $1100 - 1000\text{ cm}^{-1}$ correspond à la vibration d'élongation des groupements latéraux C-OH et à la vibration glycosidique C-O-C. Quant à la bande apparue à 900 cm^{-1} , celle - ci représente la vibration de déformation angulaire de COO^- .

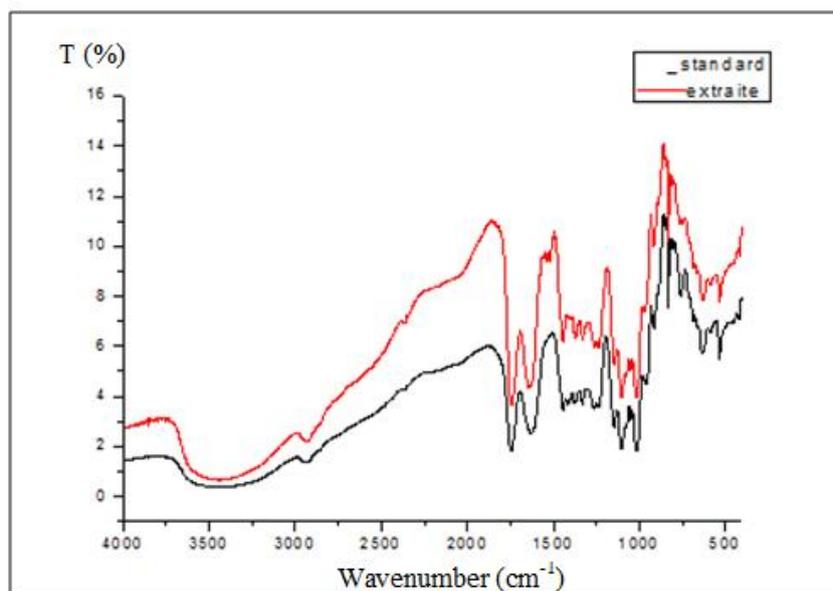


Figure V.8. Spectres IR de la pectine commerciale et de celle extraite.

V.7.2. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les observations au microscope électronique à balayage enregistrées des deux poudres de pectine extraite (a) et commerciale (b) à 200 μm sont illustrées sur la figure V.9. Globalement, les deux images MEB montrent un aspect morphologique semblable.

Toutefois, les particules de la pectine extraite sont de formes laminaires comparativement à celles de la pectine commerciale qui se présentent en granulés. De même, les clichés (a et b) montrent que la taille moyenne des particules de la pectine extraite (100 μm) est plus élevée que celle de la pectine commerciale (70 μm), ceci serait probablement dû au procédé de broyage de la pectine obtenue sous forme de film lors de l'extraction.

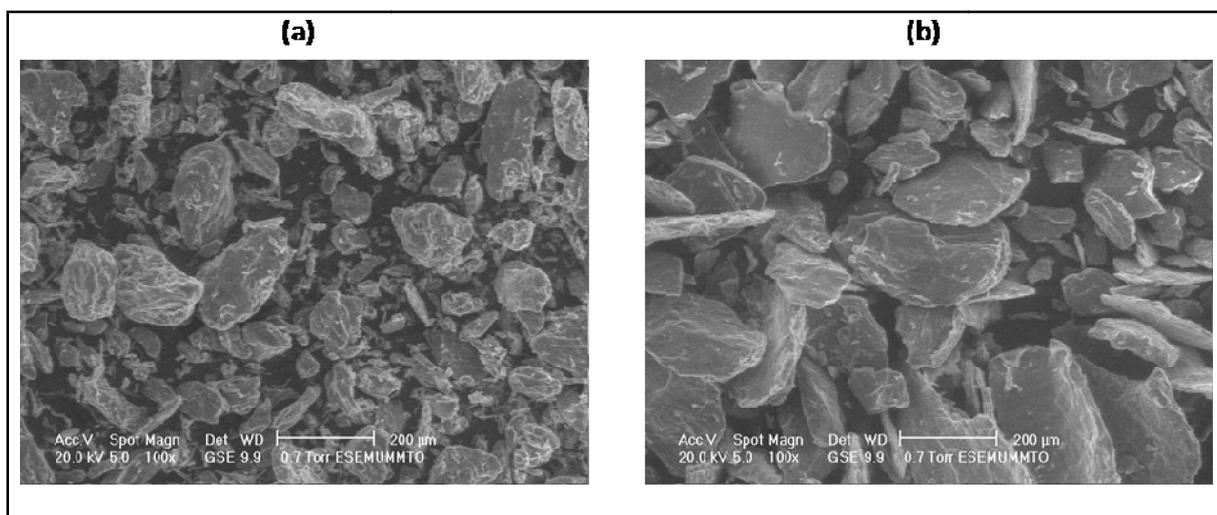


Figure V.9. Images MEB des pectines : commerciale (a) et extraite (b).

V.7.3. Chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC-PAD)

L'analyse qualitative par chromatographie d'échange d'anions à haute performance de la pectine extraite a montré la présence de cinq monosaccharides caractéristiques de la structure de la pectine: acide galacturonique, glucose, arabinose, galactose et rhamnose. La teneur en chacun de ces monosaccharides est donnée par le tableau V.13. Chaque résultat représente la moyenne de trois déterminations. Les écarts types relatifs sont inférieurs à 3 %.

Chapitre V. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron

Tableau V.13. Composition en monosaccharides de la pectine extraite.

Monosaccharide	Acide galacturonique	Glucose	Arabinose	Galactose	Rhamnose
Teneur (%)	36.20 ± 2.10	32.70 ± 1.60	15.80 ± 1.80	10.20 ± 1.60	5.10 ± 1.30

Parmi ces monosaccharides, l'acide galacturonique constitue le composé majoritaire (36.20 ± 2.10 %), ensuite, viennent dans l'ordre : glucose (32.70 ± 1.60 %), arabinose (15.80 ± 1.80 %), galactose (10.20 ± 1.60 %) et rhamnose (5.10 ± 1.30 %). L'obtention d'une teneur élevée en acide galacturonique de la pectine a été aussi rapportée dans d'autres travaux, où les proportions en ce composé sont de l'ordre de 26 % (Sharma *et al.*, 2006) et de 34.30 ± 3.2 % (Kurita *et al.* ; 2008). Ces auteurs ont également notifié une faible teneur en rhamnose respectivement de 1.30 % et 6.40 ± 0.074 %.

D'autre part, nous constatons que la pectine ayant fait l'objet de cette étude est riche en glucose (32.70 ± 1.60 %), ceci, comparativement aux travaux de Kurita qui a obtenu une teneur de l'ordre de 0.5 ± 0.35 % ; cette variation est due probablement à la nature de l'espèce végétale et à la méthode d'extraction employée.

V.8. Conclusion

Dans cette étude, les résultats de criblage obtenus ont montré que le rendement d'extraction de la pectine à partir du zeste de citron dépend essentiellement du pH de la solution, de la température et du temps de contact. Le plan de la matrice composite centrée appliqué à ces trois paramètres nous a permis de déterminer les conditions optimales conduisant au meilleur rendement en pectine. Ces conditions sont : pH = 1.78, T = 94°C et t = 48 min, sachant que le niveau des autres facteurs non influents sur le rendement sont maintenus constant. Le rendement maximal obtenu sous ces conditions est 25.18 ± 1.84 %. Ce résultat est confirmé expérimentalement (25.60 ± 0.44 %).

CHAPITRE VI

CINETIQUE DE L'EXTRACTION DE LA PECTINE A PARTIR DU ZESTE DE CITRON

VI.1. Introduction

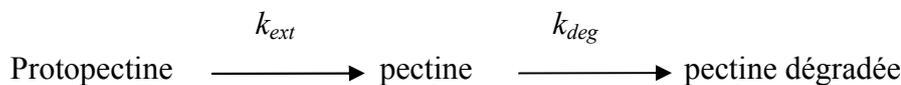
L'étude cinétique de l'extraction de la pectine à différents pH et à différentes températures nécessite la réalisation d'un grand nombre d'essais. Afin de ne pas avoir recours aux expériences, nous avons utilisé le modèle mathématique du second degré validé par l'étude des surfaces de réponses.

VI.2. Utilisation du modèle validé par l'étude des surfaces de réponses

Nous rappelons que la valeur de la fonction de variance d_{\max} trouvée dans l'étude des surfaces de réponses est inférieure à l'unité ($d_{\max} = 0.67$), cela signifie que le modèle validé permet de déterminer le rendement d'extraction en pectine en chaque point du domaine expérimental d'intérêt avec la même qualité que celle que nous aurions eue si nous avions fait l'expérience en ce point.

VI.3. Description du modèle cinétique de l'extraction de la pectine

Le modèle mathématique présenté par Panchev basé sur l'hypothèse des deux phénomènes simultanés d'extraction et de dégradation de la pectine est schématisé comme suit (Panchev *et al.* 1989) :



Supposons que $Y_p(t)$ est la quantité de protopectine présente dans le zeste de citron à l'instant (t), le processus d'hydrolyse peut être décrit par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dY_p(t)}{dt} = -k_{ext} \cdot Y_p(t) \quad (\text{VI.1})$$

Où;

k_{ext} est la constante de vitesse d'extraction de la pectine (min^{-1}). Cette constante correspond à la transformation de la pectine insoluble en pectine soluble.

Comme les processus de formation et de dégradation se produisent simultanément, le rendement de la pectine dissoute $Y_e(t)$ est donné par l'équation VI.2:

$$\frac{dY_e(t)}{dt} = k_{ext} \cdot Y_p(t) - k_{deg} \cdot Y_e(t) \quad (\text{VI.2})$$

Où ;

k_{deg} est la constante de vitesse de dégradation de la pectine (min^{-1}).

Après résolution du système d'équations VI.1 et VI.2, nous obtenons :

$$Y_p(t) = A_0 e^{(-k_{ext} \cdot t)} \tag{VI.3}$$

$$Y_e(t) = A_0 \frac{k_{ext}}{k_{deg} - k_{ext}} (e^{-k_{ext} \cdot t} - e^{-k_{deg} \cdot t}) \tag{VI.4}$$

$$Y_d(t) = A_0 \left(1 + \frac{k_{deg}}{k_{ext} - k_{deg}} e^{-k_{ext} \cdot t} + \frac{k_{ext}}{k_{deg} - k_{ext}} e^{-k_{deg} \cdot t} \right) \tag{VI.5}$$

Où ;

$Y_d(t)$ est la quantité de la pectine dégradée ;

A_0 est la teneur totale en protopectine dans la matière première (zeste de citron), qui est représentée par l'équation suivante :

$$A_0 = Y_p(t) + Y_e(t) + Y_d(t) \tag{VI.6}$$

Expérimentalement cette valeur (A_0) a été déterminée en effectuant une extraction épuisante de la matière première sous les conditions suivantes : pH = 1.80, T = 94°C et t = 40 min. Cette extraction a été répétée quatre fois et les résultats obtenus sont donnés par le tableau VI.1.

Tableau VI.1. Teneur totale en protopectine dans le zeste de citron (A_0).

EXP \ Y_i (%)	1	2	3	4
Y_1	22.00	23.40	23.40	23.20
Y_2	5.20	4.80	4.00	4.40
Y_3	2.80	2.40	3.00	2.40
Y_4	1.80	1.00	0.60	1.40
Y_5	0.60	0.40	0.20	0.20
Y_T	32.40	32.00	31.20	31.60
A_0	31.80 ± 0.60 %			

La teneur totale en protopectine dans le zeste de citron est $A_0 = 31.80 \pm 0.60 \%$.

VI.4. Rendement prédit d'extraction de la pectine

Rappelons que le modèle du second degré obtenu lors de l'étude des surfaces de réponses est le suivant :

$$Y_e = 18.63 - 2.52X_2 + 4.22X_4 + 0.97X_5 - 2.48X_2^2 - 0.85X_4^2 - 1.28X_5^2 - 0.53X_2X_4 + 0.25X_2X_5 + 0.81X_4X_5 \quad (\text{VI.7})$$

En utilisant cette équation, des valeurs prédites du rendement d'extraction de la pectine ont été calculées (Y_{pre}) pour des températures de : 40, 60, 80 et 94 ° C à des pH de : 1.50, 1.80, 2.50 et 3.00, ceci pour un temps de contact qui varie de 20 à 60 min. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure VI.1 (a, b, c et d).

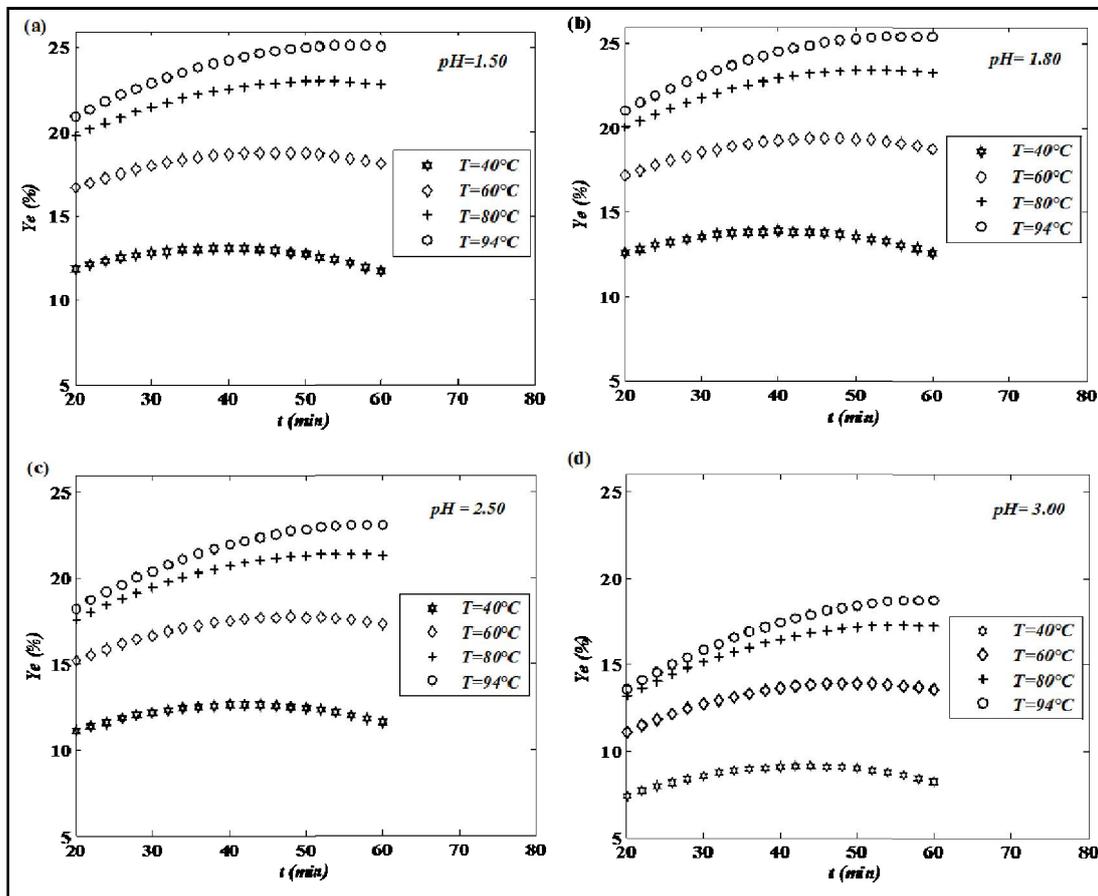


Figure VI.1. Graphique des valeurs prédites du rendement d'extraction de la pectine (a. pH = 1.50 ; b. pH = 1.80; c. pH = 2.50; d. pH = 3.00).

Le profil (allure) des graphiques (figure VI.1) montre que le processus d'extraction de la pectine est accompagné d'une dégradation inévitable de cette dernière. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Panchev et Cho (Panchev *et al.*, 1989; Cho et Hwang, 2000).

Cette figure montre aussi que le rendement augmente avec la température pour les différentes valeurs de pH. D'après ce graphe, nous constatons également qu'à des pH supérieurs à 1.80, le rendement diminue.

VI.5. Etude cinétique

VI.5.1. Détermination des paramètres cinétique du modèle (k_{ext} et k_{deg})

La valeur de A_0 (31.80 ± 0.82) obtenue par l'extraction successive a été remplacée dans l'équation VI.4. Un programme basé sur les algorithmes génétiques a été développé afin de déterminer les valeurs des constantes de vitesse de l'extraction (k_{ext}) et de dégradation (k_{deg}) de la pectine aux différentes conditions de température et de pH. Les résultats de k_{ext} et de k_{deg} obtenus sont donnés dans le tableau VI.2.

Ces résultats montrent que k_{ext} augmente et k_{deg} diminue avec l'augmentation de la température pour les différentes valeurs de pH. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Panchev (Panchev *et al.*, 1989), alors que d'autres travaux ont montré que k_{ext} et k_{deg} augmentent avec l'augmentation de la température (Cho et Hwang, 2000). Nous remarquons aussi que les valeurs de k_{ext} sont plus grandes que celles de k_{deg} , sauf dans le cas où $T = 40^\circ \text{C}$ et $\text{pH} = 3.00$. A pH optimal (≈ 1.80), les valeurs de k_{ext} varient de $3.184 \cdot 10^{-2}$ à $5.384 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ et k_{deg} de $2.152 \cdot 10^{-2}$ à $0.463 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. Ces valeurs de k_{ext} sont supérieures et celles de k_{deg} sont inférieures comparativement à celles trouvées par Pagan (Pagan et Ibarz, 1999).

Tableau VI.2. Paramètres du modèle cinétique et R^2 .

T(K)	pH	$k_{\text{ext}} \cdot 10^{-2}$	$k_{\text{deg}} \cdot 10^{-2}$	R^2
313	1.50	3.035	2.344	0.96
	1.80	3.184	2.152	0.96
	2.50	2.765	2.314	0.97
	3.00	1.868	3.002	0.98
333	1.50	4.171	1.250	0.92
	1.80	4.299	1.163	0.91
	2.50	3.662	1.326	0.93
	3.00	2.572	1.775	0.98
353	1.50	5.041	0.711	0.92
	1.80	5.118	0.665	0.92
	2.50	4.224	0.836	0.94

	3.00	2.945	1.200	0.98
367	1.50	5.357	0.492	0.94
	1.80	5.384	0.463	0.94
	2.50	4.336	0.640	0.95
	3.00	2.973	0,964	0.98

La figure VI.2 (a, b, c et d) présente le rendement théorique (Y_{pre}) d'extraction en pectine trouvés par le modèle des surfaces de réponses et le rendement calculé (Y_{cal}) par le modèle cinétique de Panchev. Dans tous les cas étudiés, les valeurs des coefficients de détermination (R^2) sont supérieures à 0.91 (tableau VI.2). Ces résultats montrent un bon ajustement du modèle adapté.

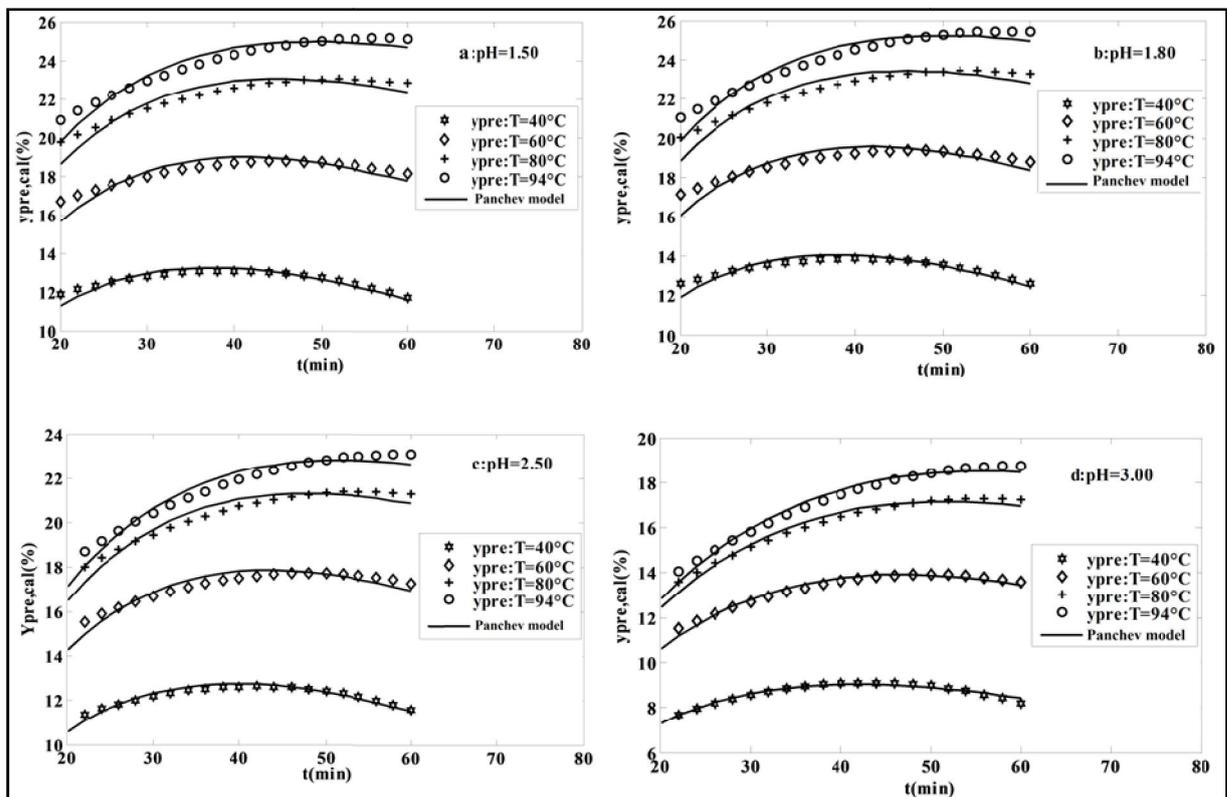


Figure VI.2. Graphique du rendement prédit et calculé à différentes températures pour chaque pH (a. pH =1.50 ; b. pH =1.80 ; c. pH = 2.50 ; d. pH = 3.00).

VI.5.2. Détermination de t_{\max} et $y_{e,\max}$

La dérivée de l'équation VI.4 a été effectuée, afin de déterminer le temps maximum du rendement d'extraction de la pectine (t_{\max}) qui est donnée par l'équation VI.8 pour chaque température à différents pH, le rendement maximale d'extraction correspondant ($y_{e,\max}$) est obtenu, en remplaçant le t_{\max} par sa formule dans l'équation VI.4. Sa valeur est donnée par l'équation VI.9.

$$t_{\max} = \frac{\ln(k_{\text{ext}}/k_{\text{deg}})}{k_{\text{ext}} - k_{\text{deg}}} \quad (\text{VI.8})$$

$$Y_{e,\max} = A_0 \left(\frac{k_{\text{deg}}}{k_{\text{ext}}} \right)^{\left(\frac{k_{\text{deg}}}{k_{\text{ext}}} \right)} / \left(1 - \frac{k_{\text{deg}}}{k_{\text{ext}}} \right) \quad (\text{VI.9})$$

La variation du rendement maximale d'extraction en pectine ($Y_{e,\max}$) en fonction de pH à différentes températures est illustrée par la figure VI.3.

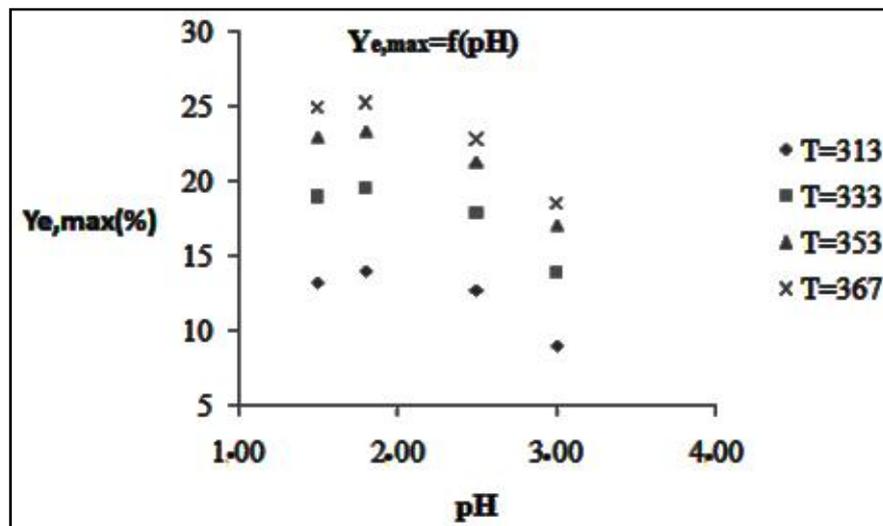


Figure VI.3. Variation de $Y_{e,\max}$ en fonction du pH à différentes températures.

Cette figure montre que $Y_{e,\max}$ croît avec l'augmentation de la température. Il est aussi important de noter que $Y_{e,\max}$ croît avec le pH quand celui-ci varie entre 1,50 à 1,80 mais il diminue pour un pH supérieur à 1,80. Les meilleures conditions ($T \approx 94^\circ \text{C}$, $\text{pH} \approx 1,80$ et $t_{\max} \approx 50 \text{ min}$) données par l'analyse simultanée des figures VI.1 et VI.3 sont les mêmes que celles trouvées par l'étude des surfaces de réponses (optimisation).

VI.5.3. Détermination de $Y_p(t)$, $Y_e(t)$ et $Y_d(t)$

Nous pouvons calculer la quantité de protopectine restante $Y_p(t)$, de pectine dissoute $Y_e(t)$ et celle de pectine dégradée $Y_d(t)$ à différentes conditions de pH et de températures en introduisant les valeurs des constantes de vitesse k_{ext} et k_{deg} correspondantes à ces conditions dans les équations VI.3, VI.4 et VI.5.

Par exemple, à pH optimale (pH \approx 1.80) et aux températures de 94 °C et de 40°C, une représentation graphique des valeurs de $Y_p(t)$, $Y_e(t)$ et $Y_d(t)$ est donnée respectivement par la figure VI.4 (a et b). Les résultats présentés par cette figure confirment ceux rapportés par Panchev (Panchev *et al.*, 1989).

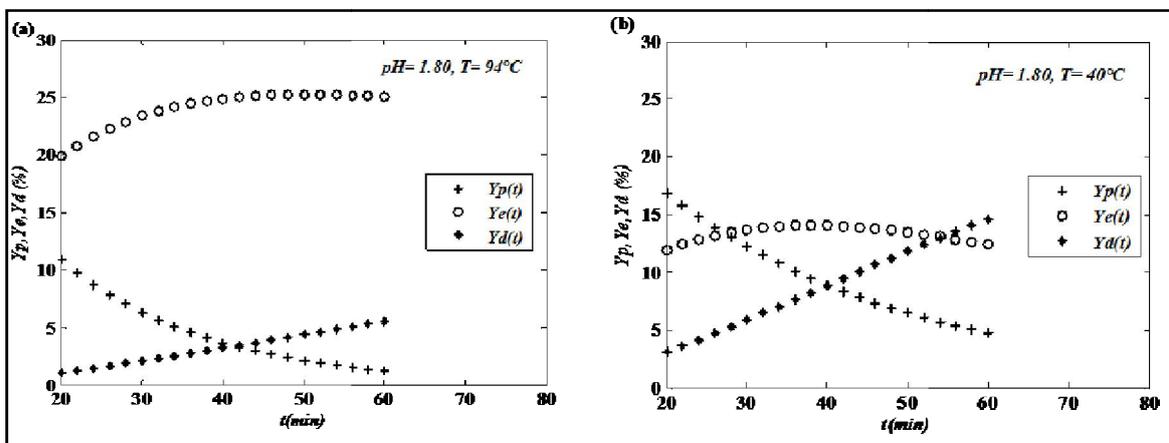


Figure VI.4. Représentation graphique des valeurs de $Y_p(t)$, $Y_e(t)$ et $Y_d(t)$
(a. pH = 1.80 et T = 94°C ; b. pH= 1.80 et T = 40°C).

VI.6. Etude thermodynamique (énergie d'activation)

Les valeurs de la constante de vitesse pour l'extraction (k_{ext}) déterminées précédemment (modèle de Panchev) ont été utilisées pour calculer l'énergie d'activation en utilisant l'équation d'Arrhenius (équation VI.10). Cette équation décrit une droite de pente $-E_a/R$ et d'ordonnée à l'origine $\ln A$ (figure VI.5).

$$k_{ext} = A e^{-E_a/RT} \quad (VI.10)$$

Où ;

k_{ext} : constant de vitesse (min^{-1});

E_a : énergie d'activation (J/mol);

A: facteur de fréquence (min^{-1});

R: constante des gaz parfait (8.314 J / mol K);

T: température en Kelvin (K).

Pour chaque valeur de pH étudiée (1.50, 1.80, 2.50 et 3.00), les valeurs de l'énergie d'activation E_a et la fréquence A obtenues à des températures allant de 40 à 94°C sont données dans le tableau VI.3.

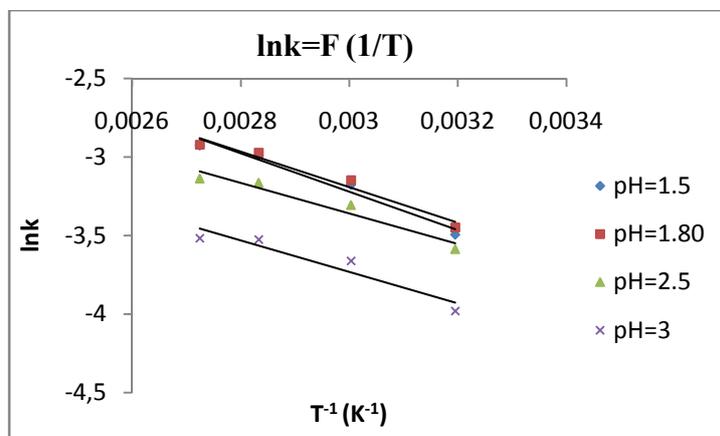


Figure VI.5. Détermination de l'énergie d'activation.

Tableau VI.3. Energie d'activation.

	pH = 1.50	pH = 1.80	pH = 2.50	pH = 3.00
E_a (kJ/mol)	10.16	9.41	8.08	8.34
A (min^{-1})	1.57	1.23	0.64	0.49
R^2	0.97	0.96	0.94	0.90

A pH optimal (pH = 1.80), la valeur d'énergie d'activation trouvée ($E_a = 9.41$ KJ / mol) est 1.89 fois plus petite que celle obtenue par Cho et Hwang (17.77 KJ / mol) lors de l'extraction de la pectine à partir du marc de pomme (Cho et Hwang, 2000). La différence entre la valeur trouvée et celle de Cho et Hwang est due probablement à la nature de la matière première et au procédé d'extraction utilisé.

VI.7. Conclusion

Pour éviter d'avoir recours aux expériences nécessaires à la réalisation de l'étude cinétique de l'extraction de la pectine, nous avons fait appel au modèle mathématique développé lors de l'étude des surfaces de réponses. Cette démarche nous a permis d'obtenir un gain précieux de temps, de réactifs et d'énergie. Les résultats obtenus ont montré que le modèle de Panchev décrit adéquatement le processus d'extraction. Les valeurs du rendement calculées par ce dernier sont en concordance avec les résultats expérimentaux utilisés pour développer le modèle des surfaces de réponses.

CHAPITRE VII

MODELISATION DE L'ENCAPSULATION DES COMPOSES PHENOLIQUES DES MARGINES EN UTILISANT LES SURFACES DE REPOSES

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

VII.1. Introduction

Dans ce chapitre sont présentés les résultats obtenus lors de la modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines prétraitées, en utilisant la technique de gélification de gouttes où la pectine a été employée comme agent d'enrobage.

VII.2. Caractérisation des margines

Les caractéristiques physico-chimiques des margines, utilisées dans notre étude, sont données dans le tableau VII.1.

Tableau VII.1. Caractéristiques des margines utilisées.

Paramètres	Valeurs
pH	4.35
Conductivité	7.47 mS.cm ⁻¹
Matière sèche	40.00 g/L
Humidité	94.57 %
Matière volatile	32.00 g/L
Cendres	8.00 g/L
Demande chimique en oxygène (DCO)	70.00 g d'O ₂ /L
Composés phénoliques	4.50 g/L

D'après les résultats donnés dans le tableau VII.1, nous pouvons faire les remarques suivantes:

Ces margines ont une acidité élevée (pH = 4.35) due en grande partie à la présence des acides organiques (acides phénoliques, acides gras...). Dans les margines, des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques ont lieu (Hamdi, 1991). Ces réactions se manifestent par un changement de la coloration initiale de celles-ci vers un noir très sombre (Assas *et al.* 2002). La valeur de pH obtenue est comparable à celle rapportée par d'autres auteurs (Levi-Minzi *et al.* 1992, Iboukhoulef, 2014).

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Ces margines ont une conductivité électrique de l'ordre de 7.47 mS.cm^{-1} . Cette valeur reflète la présence des sels dans ces effluents.

Les teneurs en matières sèches et en matières volatiles sont respectivement 40.00 g.L^{-1} et 32.00 g.L^{-1} . La teneur en matières volatiles représente 80 % de la matière sèche, ce qui montre la prédominance de la nature organique de ces margines. Ce pourcentage est proche de celui observé par plusieurs auteurs (Hamdi, 1991; Garcia *et al.*, 2000 ; Assas *et al.*, 2002 ; Fountoulakis *et al.*, 2002 ; Fadil *et al.*, 2003).

La forte teneur en humidité de ces effluents (94.57 %) peut s'expliquer par l'eau existant habituellement dans les olives d'une part et d'autre part par celle ajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive.

La teneur en matières organiques dans les margines exprimée en DCO est de $70 \text{ g d'O}_2/\text{L}$. Cette dernière est très élevée par rapport à celle enregistrée dans d'autres types de rejets.

En effet, la DCO ne dépasse pas $4.02 \text{ g d'O}_2.\text{L}^{-1}$ dans les effluents d'abattoir qui sont considérés comme les principaux rejets à caractère organique dominant (Aissam *et al.* 2001). Cependant, elle est comparable à celles obtenues par plusieurs auteurs dans des margines issues du système de centrifugation (Iboukhoulef, 2014 ; Yaakoubi *et al.* 2010).

Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques dont notamment les composés phénoliques (4.50 g/L) qui leur confèrent un pouvoir antimicrobien (Ranalli, 1991 ; Capasso, 1997). Ces antioxydants pourraient limiter toute biodégradation naturelle, et par conséquent pourraient entraîner une perturbation plus ou moins profonde de tout l'écosystème. La teneur en polyphénols de ces effluents est supérieure à celle rapportée par plusieurs auteurs qui notent des valeurs de l'ordre de 0.27 g/L et 3.07 g/L (Moussaoui *et al.*, 2010 ; Mekki *et al.*, 2008). Par contre, d'autres travaux indiquent une valeur beaucoup plus supérieure à savoir 9.7 g/L et 16.50 g/L (Aissam, 2003 ; Iboukhoulef, 2014). Les différences notées peuvent être dues aux conditions climatiques, aux méthodes d'extraction de l'huile d'olive ainsi qu'au temps de stockage des olives avant leur trituration.

VII.3. Caractéristiques macroscopiques des capsules

Les capsules chargées en composés phénoliques des margines obtenues sont illustrées par la figure VII.1 (a, b et c). La figure VII.1a illustre les capsules dans le bain de CaCl_2 . Ces capsules fragiles ayant une couleur brune caractéristique des margines sont homogènes et sphériques. Dans la figure VII.1b, sont représentées les capsules obtenues après refroidissement dans un bain de glace, celles-ci deviennent solides tout en gardant les mêmes caractéristiques. Après séchage (figure VII.1c), elles deviennent plus solides avec un volume réduit.

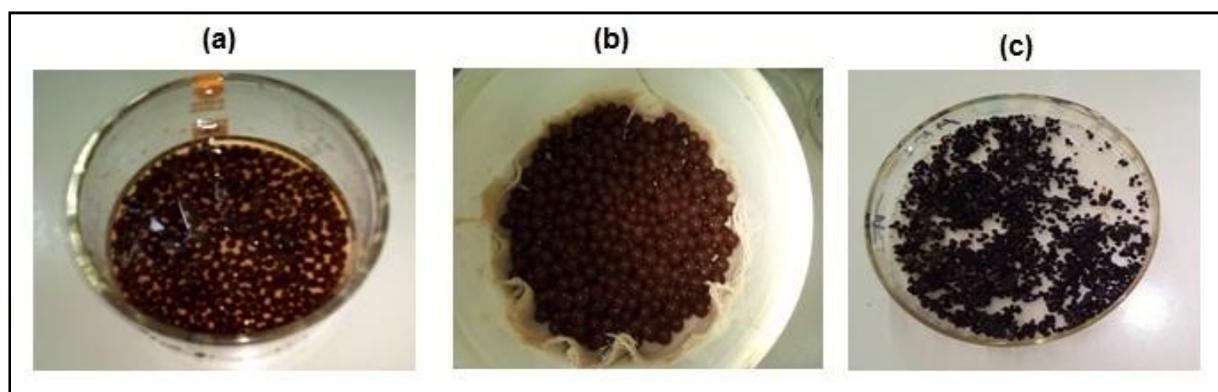


Figure VII.1. Aspect macroscopique des capsules obtenues : (a) capsules dans le bain de CaCl_2 ; (b) capsules après refroidissement et (C) capsules après séchage.

VII.4. Modélisation (étude des surfaces de réponses)

VII.4.1. Matrice d'expériences (matrice composite centrée)

La méthodologie des surfaces de réponse basée sur une matrice composite centrée a été utilisée pour déterminer les conditions optimales de deux réponses, à savoir : la teneur en composés phénoliques encapsulés (Y_1) et leur pouvoir antiradicalaire (Y_2). Des tests préliminaires nous ont permis de recenser les facteurs susceptibles d'avoir une influence sur les deux réponses préalablement citées, en se basant sur des travaux réalisés dans ce sens (Zam *et al.*, 2013 ; Hiorth *et al.*, 2006 ; Diaz-Rojasa *et al.*, 2004; Fontes *et al.*, 2012 ; Anbinder *et al.*, 2011 ; Pawar *et al.*, 2008 ; Deladino *et al.*, 2007). Les principaux facteurs à étudier et leur domaine expérimental sont donnés dans le tableau VII.2.

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Tableau VII.2. Domaine expérimental de la matrice composite centrée.

Facteurs	Symbole	Variable Codée	Unité	Niveau (-)	Niveau (+)	centre	Pas
Rapport margine /pectine	M/P	X ₁	mL/g	30	50	40	10
Concentration en CaCl ₂	[CaCl ₂]	X ₂	%	1	5	3	2
Temps de formulation	t	X ₃	min	25	45	35	10
Température de refroidissement	T	X ₄	°C	5	15	10	5

Nous rappelons que pour une matrice composite centrée, le nombre d'expériences N à réaliser est:

$$N = N_F + N_\alpha + N_0 \quad (\text{VII.1})$$

Pour un nombre de facteur k égal à quatre (k = 4), nous aurons :

$$N_F = 2^4 = 16 \text{ points factoriels ;}$$

$$N_\alpha = 2 \times 4 = 8 \text{ points axiaux ;}$$

$$N_0 = 5 \text{ points au centre.}$$

Donc, le nombre d'expériences N à réaliser est $N = 29 = (16 + 8 + 5)$. Afin de vérifier la validité du modèle postulé, nous avons ajouté à cette matrice cinq points tests répartis uniformément dans le domaine expérimental. Dans l'ensemble, nous aurons au total 34 expériences. La matrice d'expériences en variables codées et réelles est donnée dans le tableau VII.3.

Si on prenait un domaine sphérique, on devrait avoir $\alpha = (N_F)^{1/4} = 2$. Avec cette valeur de α , nous aurons des contraintes de rapport M/P. Ce type de difficulté nous impose l'utilisation d'un domaine cubique, dont $\alpha = 1$.

VII.4.2. Modèle mathématique

Le modèle mathématique postulé qui est un polynôme du second degré est donné par l'équation suivante (pour k = 4):

$$\begin{aligned}
 Y = & b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2 + b_{12}X_1X_2 \\
 & + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4
 \end{aligned} \quad (\text{VII.2})$$

**Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines
en utilisant les surfaces de réponses**

Tableau VII.3. Matrice composite centrée en variables codées et réelles.

N° exp	Variables codées				Variables réelles			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	M/P	[CaCl ₂]	t	T
1	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	30	1	25	5
2	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	50	1	25	5
3	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	30	5	25	5
4	1.00	1.00	-1.00	-1.00	50	5	25	5
5	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	30	1	45	5
6	1.00	-1.00	1.00	-1.00	50	1	45	5
7	-1.00	1.00	1.00	-1.00	30	5	45	5
8	1.00	1.00	1.00	-1.00	50	5	45	5
9	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	30	1	25	15
10	1.00	-1.00	-1.00	1.00	50	1	25	15
11	-1.00	1.00	-1.00	1.00	30	5	25	15
12	1.00	1.00	-1.00	1.00	50	5	25	15
13	-1.00	-1.00	1.00	1.00	30	1	45	15
14	1.00	-1.00	1.00	1.00	50	1	45	15
15	-1.00	1.00	1.00	1.00	30	5	45	15
16	1.00	1.00	1.00	1.00	50	5	45	15
17	-1.00	0.00	0.00	0.00	30	3	35	10
18	1.00	0.00	0.00	0.00	50	3	35	10
19	0.00	-1.00	0.00	0.00	40	1	35	10
20	0.00	1.00	0.00	0.00	40	5	35	10
21	0.00	0.00	-1.00	0.00	40	3	25	10
22	0.00	0.00	1.00	0.00	40	3	45	10
23	0.00	0.00	0.00	-1.00	40	3	35	5
24	0.00	0.00	0.00	1.00	40	3	35	15
25	0.00	0.00	0.00	0.00	40	3	35	10
26	0.00	0.00	0.00	0.00	40	3	35	10
27	0.00	0.00	0.00	0.00	40	3	35	10
28	0.00	0.00	0.00	0.00	40	3	35	10
29	0.00	0.00	0.00	0.00	40	3	35	10
30	-0.40	-0.23	-0.16	-0.13	36.05	2.54	33	9
31	0.40	-0.23	-0.16	-0.13	43.95	2.54	33	9
32	0.00	0.46	-0.16	-0.13	40	3.91	33	9
33	0.00	0.00	0.48	-0.13	40	3	40	9
34	0.00	0.00	0.00	0.50	40	3	35	13

VII.4.3. Critère à priori (fonction de variance)

Avant l'expérimentation, il est nécessaire de connaître la variance de la valeur calculée de la réponse. Par exemple, pour le point A du domaine expérimental, la variance est donnée par la relation :

$$\text{Var}(Y_A) = d_A \sigma^2 \quad (\text{VII.3})$$

Où ;

σ^2 : variance expérimentale de la réponse

d_A : est la fonction de variance au point A, donnée par :

$$d_A = X_A^t (X_A^t X_A)^{-1} X_A \quad (\text{VII.4})$$

Où ;

X^t est la matrice transposée de X ;

$X^t X$ est la matrice d'information ;

$(X^t X)^{-1}$ est la matrice de dispersion.

La fonction de la variance d_A ne dépend que des coordonnées du point considéré, de la matrice d'expériences et du modèle postulé. Elle est indépendante des coefficients du modèle et donc du résultat des expériences. De ce fait, on déterminera la fonction de variance maximale d_{\max} qui doit être inférieure ou voisine de l'unité ($d_{\max} \leq 1$) dans tout le domaine expérimentale.

Comme, dans notre cas, d_{\max} est égal à 0.76, nous pouvons donc passer à l'expérimentation.

VII.4.4. Expérimentation

Les résultats des réponses mesurées avec les différentes combinaisons des quatre variables étudiées, à savoir, le rapport margine / pectine (mL/g), la concentration en CaCl_2 (%), le temps de formulation (min) et la température de refroidissement (min) sont répertoriés dans le tableau VII.4.

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Tableau VII.4. Résultats expérimentaux des deux réponses Y_1 et Y_2 .

N° exp	Réponses		N° exp	Réponses	
	Y_1 (%)	Y_2 (%)		Y_1 (%)	Y_2 (%)
1	32.96	29.39	18	28.99	28.62
2	26.32	28.19	19	27.55	27.87
3	36.12	39.09	20	32.58	33.81
4	32.57	36.78	21	29.70	29.18
5	32.30	30.76	22	29.40	29.66
6	24.48	24.15	23	31.22	34.18
7	34.42	38.70	24	29.99	28.62
8	29.65	37.04	25	31.64	29.87
9	29.07	26.55	26	30.61	30.16
10	24.83	25.57	27	32.45	29.09
11	33.38	32.20	28	31.15	29.64
12	33.35	29.16	29	31.46	30.54
13	28.86	25.42	30	30.37	31.34
14	27.58	23.44	31	29.59	28.94
15	34.84	33.99	32	31.19	33.19
16	33.58	30.66	33	29.53	30.77
17	32.49	33.04	34	30.37	28.55

VII.4.5. Validation du modèle pour les deux réponses Y_1 et Y_2

VII.4.5.1. Réponse Y_1

a. Equation du modèle sans les points tests pour Y_1

Les résultats expérimentaux donnés dans le tableau VII.4 pour Y_1 sans les points tests, sont utilisés pour déterminer les 15 coefficients du polynôme du second degré en utilisant le logiciel Nemrodw. Les valeurs des coefficients de détermination (R^2) et de détermination ajusté (R_a^2) obtenus sont respectivement : $R^2 = 0.95$ et $R_a^2 = 0.91$, ce qui indique que l'ajustement est de bonne qualité. Les résultats sont reportés dans le tableau VII.5.

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Tableau VII.5. Estimations des coefficients du modèle sans les points tests pour Y_1 .

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t_{exp}	Signif. %
b_0	30.79		0.28	108.39	< 0.01
b_1	-1.84	1.00	0.21	-8.97	< 0.01
b_2	2.59	1.00	0.21	12.62	< 0.01
b_3	-0.18	1.00	0.21	-0.87	40.20
b_4	-0.25	1.00	0.21	-1.24	23.70
b_{1-1}	0.51	2.64	0.54	0.94	36.30
b_{2-2}	-0.17	2.64	0.54	-0.31	76.20
b_{3-3}	-0.68	2.64	0.54	-1.26	22.80
b_{4-4}	0.37	2.64	0.54	0.69	50.10
b_{1-2}	0.65	1.00	0.22	2.98	0.989
b_{1-3}	-0.04	1.00	0.22	-0.19	85.00
b_{1-4}	1.00	1.00	0.22	4.59	0.0418
b_{2-3}	-0.19	1.00	0.22	-0.85	40.70
b_{2-4}	0.51	1.00	0.22	2.33	3.51
b_{3-4}	0.71	1.00	0.22	3.26	0.565

L'équation du modèle en termes de variables codées peut être écrite comme suit:

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & 30.79 - 1.84X_1 + 2.59X_2 - 0.18X_3 - 0.25X_4 + 0.51X_1^2 - 0.17X_2^2 - 0.68X_3^2 + 0.37X_4^2 \\
 & + 0.65X_1X_2 - 0.04X_1X_3 + 1.00X_1X_4 - 0.19X_2X_3 + 0.51X_2X_4 + 0.71X_3X_4
 \end{aligned}
 \tag{VII.5}$$

Les réponses expérimentales trouvées aux points tests ont été utilisées pour valider le modèle postulé. La méthode consiste à appliquer des tests statistiques à la différence entre les valeurs expérimentales et calculées en ces points ($Y_{exp} - Y_{cal}$). Les résultats de ces tests représentés dans le tableau VII.6 montrent que les tests statistiques appliqués à la différence ($Y_{exp} - Y_{cal}$) ne permettent pas de dire que les points tests sont mal représentés par le modèle.

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Tableau VII.6. Tests statistiques appliqués aux points tests pour Y_1 .

N° exp	Y_{exp}	Y_{cal}	différence	t_{exp}	dU	ddl	Ecart-type	(Signif. %)
30	30.37	31.24	-0.87	-0.95	0.11	14.00	0.92	35.70
31	29.59	29.52	0.07	0.07	0.11	14.00	0.92	94.30
32	31.19	32.01	-0.82	-0.89	0.12	14.00	0.92	39.00
33	29.53	30.53	-1.00	-1.08	0.13	14.00	0.92	29.90
34	30.37	30.77	-0.40	-0.43	0.16	14.00	0.94	67.30

b. Modèle mathématique affiné pour Y_1

Nous pouvons obtenir un modèle mathématique affiné en introduisant dans le calcul des coefficients les valeurs des réponses obtenues aux points tests. Les résultats sont répertoriés dans le tableau VII.7.

Tableau VII.7. Estimations des coefficients du modèle affiné pour Y_1 .

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t_{exp}	Signif. %
b_0	30.59		0.22	138.40	< 0.01
b_1	-1.82	1.00	0.19	-9.56	< 0.01
b_2	2.58	1.00	0.19	13.55	< 0.01
b_3	-0.19	1.00	0.19	-0.99	33.60
b_4	-0.24	1.00	0.19	-1.27	21.90
b_{1-1}	0.60	3.08	0.50	1.21	24.10
b_{2-2}	-0.11	3.08	0.50	-0.22	82.40
b_{3-3}	-0.67	3.05	0.50	-1.35	19.30
b_{4-4}	0.43	2.97	0.49	0.86	39.90
b_{1-2}	0.64	1.00	0.20	3.16	0.51
b_{1-3}	-0.05	1.00	0.20	-0.23	82.20
b_{1-4}	0.99	1.00	0.20	4.89	0.01
b_{2-3}	-0.18	1.00	0.20	-0.90	37.80
b_{2-4}	0.51	1.00	0.20	2.50	2.15
b_{3-4}	0.71	1.00	0.20	3.50	0.24

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

L'équation du modèle affiné avec les nouveaux coefficients est :

$$Y_1 = 30.59 - 1.82X_1 + 2.58X_2 - 0.19X_3 - 0.24X_4 + 0.60X_1^2 - 0.11X_2^2 - 0.67X_3^2 + 0.43X_4^2 + 0.64X_1X_2 - 0.05X_1X_3 + 0.99X_1X_4 - 0.18X_2X_3 + 0.51X_2X_4 + 0.71X_3X_4 \quad (\text{VII.6})$$

c. Analyse de la variance pour Y_1

Les résultats de l'analyse de la variance appliquée au modèle affiné sont regroupés dans le tableau VII.8.

Tableau VII.8. Analyse de la variance pour Y_1 .

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif (%)
Régression	221.48	14.00	15.82	23.90	< 0.01 **
Résidus	12.57	19.00	0.66		
Validité	10.74	15.00	0.72	1.56	35.70
Erreur	1.83	4.00	0.46		
Total	234.05	33.00			

** Significatif au niveau de 99.90%

La somme des carrés due aux résidus peut être décomposée en somme de deux variabilités: la première est due au manque d'ajustement et la deuxième à l'erreur pure. Les résultats donnés dans ce tableau montrent que le modèle ne présente pas un manque d'ajustement puisque la probabilité de la signification du risque (p-value = 35.70 %) est supérieure à 5 %. Les résultats obtenus montrent aussi que l'effet principal de la régression est significatif car la probabilité de la signification du risque p-value est inférieure à 0.05. Donc, la variation de la réponse calculée n'est pas due à l'erreur expérimentale.

Les valeurs des coefficients de détermination (R^2) et de détermination ajusté (R_a^2) obtenues sont respectivement $R^2 = 0.95$ et $R_a^2 = 0.91$, ce qui indique que l'ajustement est de bonne qualité.

Après validation du modèle, nous pouvons l'utiliser pour calculer la valeur de la réponse en tout point du domaine expérimental.

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

VII.4.5.2. Réponse Y_2

a. Equation du modèle sans les points tests pour Y_2

Les estimations des 15 coefficients du modèle sans les points tests pour Y_2 sont données dans le tableau VII.9. Les valeurs des coefficients de détermination (R^2) et de détermination ajusté (R^2_a) sont respectivement : 0.96 et 0.93, cela signifie qu'il ya une bonne compatibilité entre les valeurs expérimentales et prévues du modèle.

Tableau VII.9. Estimations des coefficients du modèle sans les points tests pour Y_2 .

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t_{exp}	Signif. %
b_0	30.20		0.35	85.99	< 0.01
b_1	-1.42	1.00	0.25	-5.60	< 0.01
b_2	3.89	1.00	0.25	15.37	< 0.01
b_3	-0.13	1.00	0.25	-0.50	62.30
b_4	-2.37	1.00	0.25	-9.36	< 0.01
b_{1-1}	0.34	2.64	0.67	0.51	62.00
b_{2-2}	0.35	2.64	0.67	0.52	61.00
b_{3-3}	-1.07	2.64	0.67	-1.60	13.10
b_{4-4}	0.91	2.64	0.67	1.36	19.60
b_{1-2}	0.03	1.00	0.27	0.10	92.20
b_{1-3}	-0.38	1.00	0.27	-1.41	18.10
b_{1-4}	0.15	1.00	0.27	0.57	57.80
b_{2-3}	0.57	1.00	0.27	2.11	5.30
b_{2-4}	-0.88	1.00	0.27	-3.28	0.551
b_{3-4}	0.18	1.00	0.27	0.66	52.10

L'équation du modèle sans les points tests est :

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & 30.20 - 1.42X_1 + 3.89X_2 - 0.13X_3 - 2.37X_4 + 0.34X_1^2 + 0.35X_2^2 - 1.07X_3^2 + 0.91X_4^2 \\
 & + 0.03X_1X_2 - 0.38X_1X_3 + 0.15 X_1X_4 + 0.57X_2X_3 - 0.88X_2X_4 + 0.18X_3X_4
 \end{aligned}
 \tag{VII.7}$$

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Pour valider le modèle, nous appliquons également la méthode des points tests. Ces points (expériences) sont choisis d'une manière à ce qu'ils soient le plus possible éloignés des points expérimentaux. Les résultats obtenus en ces points n'ont pas participé au calcul des estimations des coefficients du modèle.

Les tests statistiques appliqués à la différence ($Y_{\text{exp}} - Y_{\text{cal}}$) en ces points ne permettent pas de dire que les points tests sont mal représentés par le modèle (tableau VII.10).

Tableau VII.10. Tests statistiques appliqués aux points tests pour Y_2 .

N° exp	Y_{exp}	Y_{cal}	Différence	t_{exp}	dU	ddl	Ecart-type	(Signif. %)
30	31.34	30.41	0.93	0.82	0.11	14.00	1.13	42.60
31	28.94	29.32	-0.38	-0.34	0.11	14.00	1.13	74.20
32	33.19	32.58	0.61	0.54	0.12	14.00	1.14	59.80
33	30.77	30.37	0.40	0.35	0.13	14.00	1.14	72.90
34	28.55	29.11	-0.56	-0.48	0.16	14.00	1.16	63.60

b. Modèle mathématique affiné pour Y_2

Afin d'obtenir un modèle mathématique plus précis, nous avons intégré dans l'estimation des coefficients, les valeurs des réponses obtenues aux points tests. Les coefficients du modèle affiné sont répertoriés dans le tableau VII.11.

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Tableau VII.11. Estimations des coefficients du modèle affiné pour Y_2 .

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t_{exp} .	Signif. %
b_0	30.27		0.26	114.81	< 0.01
b_1	-1.45	1.00	0.23	-6.38	< 0.01
b_2	3.90	1.00	0.23	17.20	< 0.01
b_3	-0.13	1.00	0.23	-0.57	57.70
b_4	-2.40	1.00	0.23	-10.65	< 0.01
b_{1-1}	0.33	3.08	0.60	0.56	58.30
b_{2-2}	0.38	3.08	0.60	0.63	53.50
b_{3-3}	-1.05	3.05	0.59	-1.77	9.30
b_{4-4}	0.79	2.97	0.59	1.35	19.40
b_{1-2}	0.03	1.00	0.24	0.14	88.90
b_{1-3}	-0.37	1.00	0.24	-1.53	14.20
b_{1-4}	0.16	1.00	0.24	0.66	51.90
b_{2-3}	0.57	1.00	0.24	2.33	3.07
b_{2-4}	-0.88	1.00	0.24	-3.64	0.175
b_{3-4}	0.18	1.00	0.24	0.73	47.40

L'équation du modèle affiné est la suivante :

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & 30.27 - 1.45X_1 + 3.90X_2 - 0.13X_3 - 2.40X_4 + 0.33X_1^2 + 0.38X_2^2 - 1.05X_3^2 + 0.79X_4^2 + \\
 & 0.03X_1X_2 - 0.37X_1X_3 + 0.16 X_1X_4 + 0.57X_2X_3 - 0.88X_2X_4 + 0.18X_3X_4
 \end{aligned}
 \tag{VII.8}$$

c. Analyse de la variance pour Y_2

Les résultats de l'analyse de la variance (tableau VII.12) obtenus afin de valider le modèle affiné montrent que le modèle prédictif ne présente pas un manque d'ajustement puisque la probabilité de la signification du risque est supérieure à 5% (p-value= 10.60 %) et l'effet principal de la régression est significatif (p-value < 0.05). Les valeurs des coefficients de détermination (R^2) et de détermination ajusté (R^2_a) obtenues sont respectivement $R^2= 0.96$ et $R^2_a = 0.93$, ce qui indique que l'ajustement est de bonne qualité.

Chapitre VII. Modélisation de l'encapsulation des composés phénoliques des margines en utilisant les surfaces de réponses

Tableau VII.12. Analyse de la variance pour Y_2 .

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif (%)
Régression	449.58	14.00	32.11	34.08	< 0.01 **
Résidus	17.90	19.00	0.94		
Validité	16.71	15.00	1.11	3.73	10.60
Erreur	1.19	4.00	0.30		
Total	467.48	33.00			

** Significatif au niveau de 99.90 %.

Le modèle étant validé, nous pouvons donc l'utiliser pour prédire le pourcentage en activité antiradicalaire (réponse) en tous points du domaine expérimental.

VII.5. Optimisation simultanée des deux réponses Y_1 et Y_2

L'optimisation a été effectuée à l'aide de la fonction de désirabilité, qui est l'une des approches les plus utilisées lors de l'optimisation simultanée de plusieurs réponses (Harrington, 1965 ; Derringer et Suich, 1980). Les valeurs des fonctions de désirabilité (d_i) sont comprises entre 0 et 1. Une désirabilité de 0 appelée aussi "désirabilité élémentaire" prenant la valeur nulle, représente une solution inacceptable pour l'objectif choisi ; alors qu'une désirabilité prenant la valeur 1 indique la performance maximale souhaitée donc aucune amélioration n'est plus possible.

Dans notre cas, l'objectif est de maximiser le rendement en quantité de composés phénoliques encapsulés (Y_1) et leur activité antiradicalaire (Y_2) afin qu'ils atteignent une désirabilité (cible) de 50 %. Le graphe (figure VII.2) définit le domaine qui permet d'atteindre la désirabilité souhaité (cible) pour les deux réponses étudiées (Y_1 et Y_2).

La fonction de désirabilité appliquée aux modèles affinis (Y_1 et Y_2) a montré que les conditions optimales conduisant aux meilleurs rendements sont : rapport M/P = 30 mL/g, concentration en $[\text{CaCl}_2]$ = 5 %, temps de formulation = 33 min et température de refroidissement = 5°C (tableau VII.13).

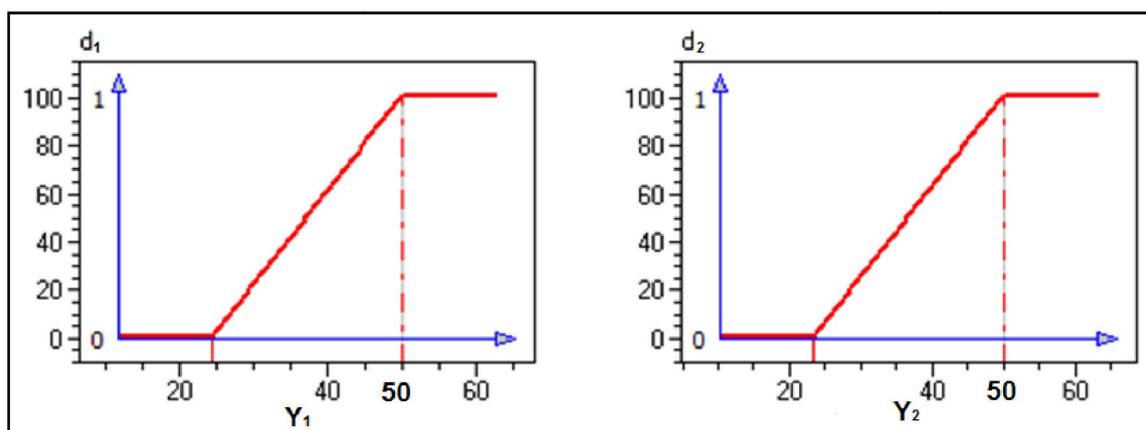


Figure VII.2. Profil de la désirabilité des deux réponses Y_1 et Y_2 .

Tableau VII.13. Coordonnées de l'optimum.

Variabes	Valeurs codées	Facteurs	Valeurs réelles
X_1	-1	M/P (mL/g)	30
X_2	+1	[CaCl ₂] (%)	5
X_3	-0.16	t (min)	33
X_4	-1	T (°C)	5

Afin de vérifier la validité des deux modèles (Y_1 et Y_2), nous avons réalisé une expérience répétée cinq fois aux conditions optimales données dans le tableau VII.13. Les résultats obtenus sont : 36.97 ± 0.73 % en composés phénoliques (Y_1) et 40.90 ± 0.92 % en activité antiradicalaire (Y_2). Ces valeurs correspondent à celles trouvées par les deux modèles validés ($Y_1 = 36.17 \pm 1.46$ % et $Y_2 = 40.36 \pm 1.74$ %). La teneur en composés phénoliques encapsulés au cours de cette étude est inférieure à celles obtenues par Liang (44 - 83 %) et Zam (50%). Ces auteurs ont travaillé sur l'étude de l'encapsulation des composés phénoliques extraits à partir du thé (Liang *et al.*, 2011) et des pelures de grenade (Zam *et al.*, 2013). Concernant l'activité antioxydante, la valeur trouvée dans notre cas est supérieure à celle obtenue par Zam (33.33 %).

Les écarts observés entre nos résultats et ceux de ces précédents auteurs seraient probablement dus au procédé d'encapsulation utilisé, à la nature de l'agent d'enrobage, à la source des composés phénoliques mais également à la nature de la substance encapsulée.

VII.6. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons préparé des capsules chargées en composés phénoliques des margines sans passer par leur extraction, ceci, en utilisant la pectine comme agent d'enrobage. L'optimisation du procédé d'encapsulation a permis l'obtention d'un taux d'encapsulation maximal de 36.17 ± 1.46 % en composés phénoliques qui ont une activité antiradicalaire de 40.36 ± 1.74 %. Ces résultats sont obtenus sous les conditions optimales suivante : rapport M/P = 30 mL/g, concentration en $[\text{CaCl}_2]$ = 5 %, temps de formulation = 33 min et température de refroidissement = 5°C.

Cette technique de récupération des composés phénoliques présente un double objectif : protection de l'environnement et valorisation des antioxydants, d'où l'intérêt que manifeste la valorisation de ce déchet oléicole.

CHAPITRE VIII

UTILISATION DE LA PECTINE POUR L'ELABORATION D'UN BIOMATERIAU

VIII.1. Introduction

Dans cette partie, sont présentés les résultats obtenus lors de la mise au point du procédé d'élaboration d'un biomatériau composite pectine / hydroxyapatite / adjuvants en vue d'améliorer la résistance à la rupture en compression de l'hydroxyapatite seule. Les adjuvants utilisés sont : talc, silicate, borax et glycérol.

VIII.2. Forme des biomatériaux

Dans la figure VIII.1 est représentée la forme des différents biomatériaux préparés avant le test consistant en la détermination de leur résistance à la rupture en compression. Il s'agit de l'hydroxyapatite seule, du composite pectine / HA ainsi que d'autres biomatériaux préparés à partir de l'ensemble pectine / HA auquel sont rajoutés séparément le talc, le silicate, le glycérol et le borax à une proportion de 10 %.

Les biomatériaux obtenus ont une forme parallélépipédique de dimensions d'environ: 20 mm de longueur, 18 mm de largeur et 26 mm de hauteur.



Figure VIII.1. Forme des biomatériaux.

VIII.3. Contrainte - déformation

Les courbes de contrainte - déformation obtenues pour les différents biomatériaux préparés ont présenté la même allure. A l'issue de ce test, nous avons pu déterminer le biomatériau composite qui présente la meilleure résistance à la rupture en compression (figure VIII.2). Ce biomatériau correspond au composite pectine / HA / talc et sa résistance à la rupture est de 3.64 MPa.

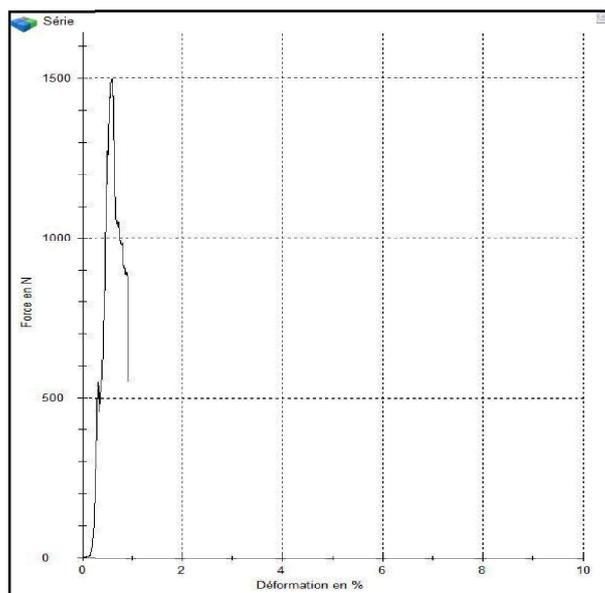


Figure VIII.2. Courbe contrainte - déformation de composite pectine / HA / talc (10 %).

VIII.4. Résistance à la rupture en compression et densité des biomatériaux

La figure VIII.3 illustre les résultats de la résistance à la rupture (R_r) et ceux de la densité de l'hydroxyapatite seule (HA) et des matériaux composites : pectine / HA, pectine / HA / talc, pectine / HA / silicate, pectine / HA / borax et pectine / HA / glycérol. La teneur en chacun de ces agents de solidification est 10 %.

Les résultats consignés dans cette figure montrent l'effet positif notable de l'ajout de la pectine à l'hydroxyapatite sur sa résistance à la rupture. L'augmentation de la résistance à la rupture constatée dans ce cas est de 2.28 MPa.

Parmi les adjuvants ajoutés au composite pectine / HA, le talc permet d'améliorer sensiblement cette résistance à la rupture (37 %). Les autres agents de solidification utilisés ont pour effet de diminuer cette résistance.

Nous remarquons aussi sur cette figure que les composites pectine / HA et pectine / HA / talc ayant une bonne résistance à la rupture présente des densités comparables à celle de l'hydroxyapatite seule (1.68).

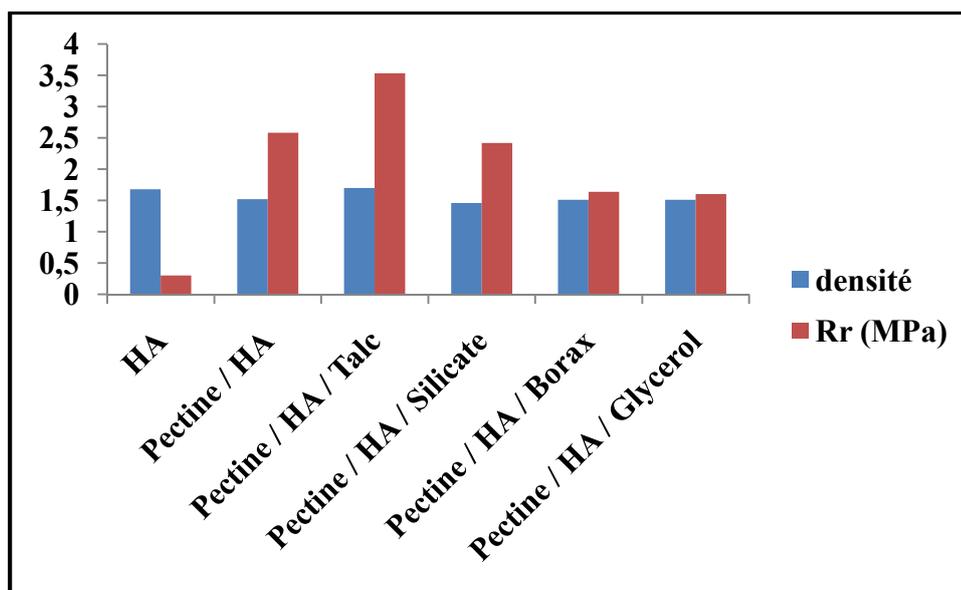


Figure VIII.3. Résistance à la rupture en compression et densité des biomatériaux préparés.

VIII.5. Conclusion

L'association de la pectine à l'hydroxyapatite, nous a permis d'améliorer la résistance à la rupture en compression de ce matériau. Cette dernière est nettement améliorée en ajoutant le talc au composite pectine / hydroxyapatite. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré aussi que l'augmentation des valeurs de la résistance à la rupture de ce matériau n'affectent en rien sa densité.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats de la méthodologie de la recherche expérimentale (plans d'expériences) appliquée à l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron ont fait ressortir à l'issue de l'étude de criblage des sept paramètres pris en considération (temps de coagulation, pH, rapport L/S, température, temps de contact, vitesse d'agitation et température de séchage) trois facteurs qui ont une influence sur la réponse (rendement de l'extraction). Ces paramètres sont : le pH, la température et le temps de contact. Cette étape (criblage) nous a permis de réduire le nombre de facteurs à étudier dans les surfaces de réponses (matrice composite centrée) afin de valider le modèle mathématique postulé qui est un polynôme du second degré.

La validation de ce modèle par les points tests et par l'analyse de la variance, une fois le modèle affiné, en intégrant les résultats expérimentaux dans le calcul des coefficients, atteste que l'équation empirique mise en place peut permettre le calcul de la valeur de la réponse en tout point du domaine expérimental.

Les conditions optimales déterminées en utilisant l'analyse canonique et le chemin optimal sont: pH= 1.78, T= 94°C et t= 48 min. Sous ces conditions, la valeur de la réponse (rendement de l'extraction) prédite par le modèle est de 25.18 ± 1.84 %. Celle - ci est confirmée expérimentalement ($25.60 \pm 0.44\%$).

Les analyses par spectrophotométrie infra rouge et microscopie électronique à balayage ont montré que la pectine extraite et celle commerciale possèdent des groupements fonctionnels et une morphologie semblables. L'analyse par chromatographie d'échange d'anions à haute performance de la pectine obtenue a montré la présence de cinq monosaccharides caractéristiques de la structure de la pectine.

Les résultats de l'étude cinétique de l'extraction de la pectine ayant fait l'objet de ce travail, en utilisant les valeurs prédites par le modèle mathématique affiné validé lors de l'étude des surfaces de réponses sont en accord avec ceux trouvé par Panchev, lequel a développé un modèle qui décrit simultanément les phénomènes d'extraction et de dégradation des pectines au cours du procédé d'extraction. Les paramètres cinétiques du modèle de Panchev (k_{ext} et k_{deg}) obtenus au cours de cette étude à pH optimal (≈ 1.80) varient de $3.184 \cdot 10^{-2}$ à $5.384 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ pour k_{ext} et de $2.152 \cdot 10^{-2}$ à $0.463 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ pour k_{deg} . A cette valeur de pH, l'énergie d'activation obtenue est de 9.41 KJ / mol.

Les résultats de la modélisation de l'encapsulation (principe d'extrusion) des composés phénoliques des margines par la pectine en utilisant la même approche qui est la méthodologie des surfaces de réponses basée sur une matrice composite centrée, nous ont permis de valider le modèle mathématique postulé pour les deux réponses (teneur en composés phénoliques encapsulés (Y_1) et leur activité antiradicalaire correspondante (Y_2)). La fonction de désirabilité appliquée aux modèles affinés a montré que les conditions optimales conduisant aux meilleurs rendements sont : rapport M/P = 30 mL/g, concentration en $[CaCl_2]$ = 5 %, temps de formulation = 33 min et température de refroidissement = 5°C. Sous ces conditions, l'optimum obtenu en composés phénoliques est de 36.17 ± 1.46 % et celui en activité antiradicalaire est de 40.36 ± 1.74 %. Ces résultats ont été confirmés par l'expérimentation (36.97 ± 0.73 % en Y_1 et 40.90 ± 0.92 % en Y_2).

Concernant l'application de la pectine dans le domaine de l'élaboration des biomatériaux, les résultats de la résistance à la rupture du composite pectine / hydroxyapatite obtenus ont montré l'effet positif notable de l'ajout de la pectine à l'hydroxyapatite. L'association du talc au composite pectine / hydroxyapatite permet d'améliorer encore cette résistance à raison de 37 %.

En conclusion, nous pouvons affirmer que l'originalité de ce travail réside aussi dans la valorisation de deux déchets de nature différente : nous avons utilisé la pectine extraite à partir du zeste de citron pour encapsuler les composés phénoliques des margines qui sont un rejet hautement polluant. Par ailleurs, la puissance des plans d'expériences nous a permis de réaliser une étude cinétique de l'extraction de la pectine sans passer par l'expérimentation excepté pour la détermination de la teneur totale en protopectine dans le zeste de citron (A_0) pour laquelle nous avons réalisé quatre essais. Cette méthode peut constituer une alternative pour gagner du temps et réduire la consommation de produits et d'énergie. Comme en Algérie, l'énergie est produite à partir du gaz naturel, cette méthode peut contribuer à la réduction de l'émission de CO_2 dans l'atmosphère.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abid, H., Hussain, A., Ali, S., Ali, J. (2009). Technique for optimum extraction of pectin from sour orange peels and its chemical evaluation. *J. Chem. Soc. Pak.* 31, 459 - 461.

Agroligne. (2014). L'essentiel de l'agroalimentaire et l'agriculture. http://www.agroligne.com/IMG/pdf/AGROLIGNE_87_web.pdf. Accessed 20 Oct 2015. 87, 16 - 17.

Aissam, H., Sendide, K., Benlemlih, M. (2001). Etude et traitement biologique préliminaire de la pollution azotée et phosphorée contenue dans les effluents d'industries agro-alimentaires. *Ann. Chim. Sci. Mat.* 26, 391 - 396.

Aissam, H. (2003). Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah (Marroc).

Akhtar, M., Dickinson, E., Mazoyer, J., Langendorff, V. (2002). Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. *Food Hydrocolloids.* 16, 249 - 256.

Amirante, D.F. (1999). Traitement et utilisation des sous produits. Instituto di Meccanica Araria, Bari. Conseil Oléicole Internatinal. 1 - 44.

Amrita, K., Dabur, R.S., Kapoor, C.M. (1999). Application of microencapsulation technology in dairy industry. *Indian Food Industry.* 18, 57 - 64.

Anbinder, P.S. Deladino, L., Navarro, A.S., Amalvy, J.I., Martino, M.N. (2011). Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1, 80 - 87.

Aruoma, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxic.* 32, 671 - 683.

Assas, N., Ayed, L., Marouani, L., Hamdi, M. (2002). Decolorization of fresh and stored and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry.* 38, 361 - 365.

Augustin, M.A., Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews.* 38, 892 - 901.

- Axelos, M.A.V., Thibault, J.F. (1991). The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. *The Chemistry and Technology of Pectin*. Editeur: Walter, R.H., New York, Academic Press. 109 - 118.
- Azabou, S., Najjar, W., Gargoubi, A., Ghorbel, A., Sayadi, S. (2007). Catalytic wet peroxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in model and real effluent *Applied Catalysis B: Environmental*. 77, 166 - 174.
- Bagde, P.P., Dhenge, S., Bhivgade, S. (2017). Extraction of pectin from orange peel and lemon peel. *International Journal of Engineering Technology Science and Research*. 4.
- Balice, V., Boari, G., Cera, O., Abbaticchio, P. (1982) Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1. *Inquinamento*. 7, 49 - 53.
- Benyahia, N., Zein, K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse).
- Benzie, I.F.F., Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70 - 76.
- Bicu, I., Mustata, F. (2011). Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresour. Technol*. 102 (21), 10013 -10019.
- Boh, B., Sumiga, B. (2008). Microencapsulation technology and its applications in building construction materials, *RMZ Materials and Geoenvironment*. 55, 329 - 344.
- Bonnin, E., Dolo, E., Le Goff, A., Thibault, J.F. (2002). Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. *Carbohydr. Res*. 337, 1687 - 1696.
- Bonnin, E., Renard, C.M.J.C., Thibault, J.F., Ducro, P. (1997). Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisation alimentaires. *Enzymes en Agro-alimentaire*. Larreta-Garde V., Eds. Techniques et Documentations Lavoisier. 6, 168 - 200.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. 1217, 7972 - 7980.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, E. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25 - 30.
- Brazel, C.S. (1999). Microencapsulation: offering solution for the food industry. *Cereal. Foods World.* 44, 388 - 393.
- Canteri - Schemin, M.H., Fertoni, H.R.C., Waszczynskyj, N., Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. *Food Science and Technology. Braz. arch. biol. technol.* 48, N° 2. 1678 - 4324.
- Capasso, R., De Martino, A., Arienzo, M. (2002). Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *J Agric Food Chem.* 50, 2846 - 2855.
- Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenger, P., Langendorff, V. (2006). Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxy pectin. *Food Hydrocolloids.* 20, 901 - 907.
- Celli, G.B., Ghanem, A., Brooks, M.S.L. (2015). Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods - a Review of Methods and Current Limitations. 8, 1825 - 1837.
- Charumanee, S., Titwan, A., Sirithunyalug, J., Weiss-Greiler, P., Wolschann, P., Viernstein, H., Okonogi, S. (2006). Thermodynamics of the encapsulation by cyclodextrins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 81, 523 - 529.
- Chimi, H., Rahmani, M. (1990). Autoxydation des huiles d'olives: rôles des composés phénoliques. *Revue française des corps gras.* N°11/12, 363 - 367.
- Cho, Y.J., Hwang, J.K. (2000). Modeling the yield and intrinsic viscosity of pectin in acidic solubilization of apple pomace. *J. Food Eng.* 44, 85 - 89.
- Coimbra, M., Isacchi, B., van Bloois, L., Torano, J.S., Ket, A., Wu, X., Broere, F., et al. (2011). Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics.* 416, 433 - 442.
- Courtois, J. (2009). Oligosaccharides from l and plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 261 - 273.
- D'Angelo, S., Ingrosso, D., Migliardi, V., Sorrentino, A., Donnarumma, G., Baroni, A., Masella, L., et al. (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents

protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 38, 908 - 919.

Da Silva, J.M.R., Darmon, N., Fernandez, Y., Mitjavila, S. (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 1549 - 1552.

Dacosta, E. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Yves Dacosta (éd). Paris, 317.

Dagga, F.A, Böhmer, B. (2001). Hazardous olive-mill wastewater problem and solution. <http://www.euro-arab.com/studies/english/water/02-0015/02-0015-1.html>.

Dashora, A., Jain, C.P. (2009). Development and characterization of pectin prednisolone microspheres for colon targeted delivery. *International Journal of ChemTech Research*. 1, 751 - 757.

De Oliveira, C.F., Giordani, D., Lutkemier, R., Gurak, P.D., Olivera F.C., Ferreira Marcza, L D. (2016). Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. 71, 110 - 115.

De Souza, J.R.R., Feitosa, J.P.A., Ricardo, N.M.P.S., Trevisan, M.T.S., De Paula, H.C.B., Ulrich, C.M., Owen, R.W. (2013). Spray - drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. *Food Hydrocolloids*. 33, 10 - 18.

De Vries, J.A., Rombouts, F.M., Voragen, A.G.J., Pilnik, W. (1982). Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers*, 2(1), 25 - 33.

Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., Martino, M.N. (2007). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*. 71, 126 - 134.

Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technologie*.12, 214 - 219.

Díaz - Rojas, E.I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Arguelles-Monal, W., Valdez, M.A., Rinaudod, M., Goycoolea, F.M., (2004). Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*. 18, 293 - 304.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*. 28, 350 - 356.

- Dumville, J.C., Fry, S.C. (2000). Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 38 (1/2), 125 - 140.
- Dziezak, J.D. (1988). Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technology.* 42, 136 - 151.
- El Alami, B. (2000). Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. Mémoire de 3^{ème} cycle, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. 93.
- El-Nawawi, S.A., Shehata, F.R. (1987). Extraction of pectin from egyptian orange peel. Factors affecting the extraction. *Biol. Wastes.* 20, 281 - 290.
- Espitia, P.P.J., Du, W.X., Avena - Bustillos, R.D.J., Soares, N.D.F.F., McHugh, T.H. (2014). Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties – A review. *Food Hydrocolloids.* 35, 287 - 296.
- Fadil, K., Chahlaoui, A., Ouahbi, A., Zaid, A., Borja, R. (2003). Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International biodeterioration and biodegradation.* 51, 37 - 41.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols. *Trends in Food Science and Technology.* 21, 510 - 523.
- FAO. (1983). Valorisations des produits de l'olivier, réunion du comité technique de Madrid.
- FAO. (2012). Citrus fruit fresh and processed. *Annu. Stat. CCP: CI/ST/2012*. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf. Accessed 15 Oct 2015.
- Fedeli, E., Camurati, F. (1981). In : Séminaire International sur la Valorisation des Sous Produits de l'olivier. PNUDFAO. Monastir, Tunisie. 111 - 113.
- Filaha innove. (2009). Le trait d'union des opérateurs économiques pour le renouveau du monde agricole et rural. N° 1111, 4762.
- Finch, C.A., Bodmeier, R. (2005), *Microencapsulation.* Wiley-VCH Verlag GmbH et Co. KGaA, Weinheim 10.1002/14356007. a16 - 575.

Fishman, M.L., Chau, H.K., Hoagland, P., Ayyad, K. (2000). Characterization of pectin, flash extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. *Carbohydr. Res.* 323, 126 - 138.

Fishman, M.L., Jen, J.J. (1986). *Chemistry and Function of Pectins*. American Chemical Society. Washington.

Fki, I., Allouche, N., Sayadi, S. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3, 4 - dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*. 93, 197 - 204.

Fontes, G.C., Finotelli, P.V., Rossi, A.M., Helena, M.M., Leão, R. (2012). Optimization of Penicillin G Microencapsulation with OSA Starch by Factorial Design. 27, 85 - 90.

Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G., Lyberatos, G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 36, 4735 - 4744.

Frei, B., Higdon, J.V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *J. Nutr.* 133, 3275 - 3284.

Garcia, I.G., Pena, P.R.J., Venceslada, J.L.B., Martin, M.A, Santos, M.M.A, Gomez, E.R. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.* 35, 751 - 758.

Giraud. S. (2002). *Microencapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphate d'ammonium, application: élaboration d'un système polyuréthane monocomposant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile*. Thèse de doctorat. Université des sciences et technologies de Lille.

Gognies, S., Gainvors, A., Aigle, M., Belarbi, A. (1999). Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1). *Yeast*. 15, 11 - 22.

Goupy, J. (1999). *Plans d'expériences pour surface de réponse*. Dunod (Ed.), Paris.

Goupy, J. (2001). *Introduction aux plans d'expériences*. Dunod (Ed.), Paris.

Green, B.K., Scheicher, L. (1955). Pressure Sensitive Record Materials. US Patent. Ncr C. N°2, 217, 507.

Guéry, J. (2006). Emulsions doubles cristallisables : stabilité, encapsulation et relargage. Thèse de doctorat en Physique et chimie des matériaux. Université Paris VI.

Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., Elfeki, A. (2009). Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 180, 421 - 432.

Hamdi, M. (1991). Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de l'université de Provence. Marseille, France.

Hamdi, M. (1996). Anaerobic Digestion of Olive Mill Wastewaters. *Process Biochemistry*. 31, 105 - 110.

Harrington, E. (1965). The desirability function, *Industrial Quality Control*. 21, 494 - 498.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1, 3 - 6.

Hiorth, M., Versland, T., Heikkilä, J., Ingunn, T., Sande, S.A. (2006). Immersion coating of pellets with calcium pectinate and chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*. 308, 25 - 32.

Hotchkiss, A.T., Savary, B.J., Cameron, R.G., Chau, H.K., Brouillette, J., Luzio, G.A., Fishman, M.L. (2002). Enzymatic Modification of Pectin To Increase Its Calcium Sensitivity while Preserving Its Molecular Weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10), 2931 - 2937.

Hrabovska, O., Pastukh, H., Demenyuk, O., Miroshnyk, V., Halatenko, T., Babii, A., Dobrydnuk, A. (2015). Kinetics of hydrolysis-extraction of pectin substances from the potato raw materials. *Ukrainian Food Journal*. 4, 596 - 604.

Hügela, H.M., Jackson, N., May, B., Zhang, A.L. Xue. C C. (2016). Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*. 23, 220 - 231.

- Iboukhoulef, H. (2014). Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancée basés sur le système Fenton-like (H_2O_2/Cu). Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- Iwasaki, K., Inoue, M., Matsubara, Y. (1998). Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endopolygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 262 - 276.
- Jackson, L.S., Lee, K. (1991). Microencapsulation in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 24, 289 - 297.
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Crowther, J.C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Review in environmental science biotechnology.* 7 (1), 1 - 26.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 215 - 227.
- Kim, W.C., Lee, D.Y., Lee, C.H., Kim, C.W. (2004). Optimization of narirutin extraction during washing step of the pectin production from citrus peels. *J. Food Eng.* 63, 191 - 197.
- Kim, W.J., Rao, V.N.M., Smit, C.J.B. (1978). Demethylation of pectin using acid and ammonia. *Journal of Food Science.* 43, 74 - 78.
- Kirk, Othmen, Eneyel. (1967). Pectic substances, *Chem. Technol.* 14, 636 - 651.
- Kratchanova, M., Pavlova, E., Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extraction pectin. *Carbohydr. Polym.* 56, 181-185.
- Kreuter, J. (1994). Nanoparticles, in: J. Kreuter (Ed.), *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York. 219 - 343.
- Kurita, O., Fujiwara, T., Yamazaki, E. (2008). Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid *Carbohydrate Polymers.* 74, 725 - 730.
- Kushwaha, P., Fareed, S., Nanda, S., Mishra, A. (2011). Design and Fabrication of Tramadol HCl loaded Multiparticulate Colon Targeted Drug Delivery System. *J. Chem. Pharm. Res.* 3(5), 584 - 595.
- Lafka, T.L., Lazou, A.E., Sinanoglou, V.J., Lazos, E.S. (2010). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry.* 125, 92 - 98.

- Lakhtar, H. (2009). Culture du *Lentinula edodes* (berk) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines. Thèse de doctorat de l'université Paul Cézanne, Marseille.
- Leifert, W.R., Abeywardena, M.Y. (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*. 28, 729 - 737.
- Levi-Minzi, R., Saviozzi, A., Riffaldi, R., falzo, L. (1992). L'épandage au champs des margines : effet sur les propriétés du sol. *Olivae*. 40, 20 - 25.
- Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., Xin, Z., et al. (2011). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82, 297 - 301.
- Liu, L.S., Fishman, M.L., Kost, J., Hicks, K.B. (2003). Pectin - based systems for colon-specific drugdelivery via oral route. *Biomaterials* . 24, 3333 - 3343.
- Liu, Y., Shi, J., Langrish. T.A.G. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering*. 120, 203 - 209.
- Louvet, F., Delplanque, L. (2006). Design of experiments : the French touch/ Les plans d'expériences : une approche pragmatique et illustrée. Témoignage de l'association Expérimentique.
- Luca, A., Cilek, B., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2014). Storage and baking stability of encapsulated sour cherry phenolic compounds prepared from micro- and nano suspensions. *Food and Bioprocess Technology*. 7, 204 - 211.
- Maran, P.J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., Sridhar, R. (2014). Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers*. 101, 786 - 791.
- Martins, A., Barros, L., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I.P., Barreiro, F., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: Characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food and Function*. 5, 1091 - 1100.
- Masmoudi, M., Besbes, S., Chaabouni, M., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., Attia, H. (2008). Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 74, 185 - 192.

- Mathieu, D., Nony, J., Phan-tan-luu R Nemrodw software. (2007). LPRAI, Marseille.
- May, C.D. (1990). Industrial Pectins : Sources, Productions and applications. *Carbohydrate Polymers*. 12, 79 - 99.
- Mazoyer, J., Leroux, J., Bruneau, G. (1999). Use of depolymerised citrus fruit and apple pectins as emulsifiers and emulsion stabilisers. *SKW Biosystems*. 5, 900 - 268.
- Mebirouk, M. (2002). Rejets des huileries, développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans la margine, *CMPP News*, 11.
- Mechichi, T., Sayadi S., (2005). Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Prod Biochem*. 40, 139 - 145.
- Mekki, H., Anderson, M., Ben Zina, M., Ammar, E. (2008). Valorization of olive mill wastewater by its incorporation in building bricks. *Journal of Hazardous Materials*. 158, 308 - 315.
- Mesbahi, G., Jamalian, J., Farahnaky, A., (2005). A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids*. 19, 731 - 738.
- Methacanon, P., Krongsin, J., Gamonpilas, C. (2014). Pomelo (*Citrus maxima*) pectin: Effects of extraction parameters and its properties. *Food Hydrocolloids*. 35, 383 - 391.
- Min, K., Ebeler, S.E. (2008). Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 96 - 104.
- Minkov, S., Minchev, A., Paev, K. (1996). Modelling of the hydrolysis and extraction of apple pectin. *J. Food Eng.* 29, 107 - 113.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 266 - 277.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 82, 25 - 39.
- Morris, G.A., Foster, T.J. Harding, S.E. (2002). A hydrodynamic study of the depolymerisation of a high methoxyl pectin at elevated temperature. *Carbohydrate Polymers*. 48, 361 - 367.

- Moussaoui, R., Siziani, D., Youyou, A., Sharrock, P., Fiallo, M. (2010). Antioxidant effect of phenolic compounds recovered from olive mill wastewater of Chemlal variety cultivated in Kabylia (Algeria) on the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 8, 86 - 89.
- Moutsatsou, P. (2007). The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones*. 6 (3), 173 - 193.
- Munarin, F., Guerreiro, S.G., Grellier, M.A., Tanzi, M.C., Barbosa, M.A., Petrini, P., Granja, P.L. (2011). Pectin - Based Injectable Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. 12, 568 - 577.
- Munarin, F., Giuliano, L., Bozzini, S., Tanzi, M.C., Petrini, P. (2010). Mineral phase deposition on pectin microspheres. *Materials Science and Engineering: C*. 30 (3), 491 - 496.
- Nefzaoui, A. (1984). Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. In : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude FAO production et santé animales 43, Rome.
- Nefzaoui, A. (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous produits. *Revue Olivae*. 19, 17 - 28.
- Ngouemazong, E.D., Christiaens, S., Shpigelman, A., Loey, A.V., Hendrickx, M. (2015). The emulsifying and emulsion - stabilizing properties of pectin: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14, 705 - 718.
- O'Neill, M.A, Ishii, T., Albersheim, P., Darvill A.G. (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 109 - 139.
- Oakenfull, D., Scott, A. (1984). Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. *Journal of Food Science*. 49 (4), 1093 - 1098.
- Olano-Martin, E., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J. Appl. Microb.* 93, 505 - 511.
- Oosterveld, A., Beldman, G.B., Schols, H.A., Voragen, A.J. (1996). Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*. 288 (19), 143 - 153.

- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E., Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem.* 100 (2), 579 - 583.
- Pagan, J., Ibarz, A. (1999). Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *J. Food Eng.* 39, 193 - 201.
- Panchev, I.N., Kirtchev, N.A., Kratchanov, C. (1989). Kinetic model of pectin extraction. *Carbohydr. Polym.* 11, 193 - 204.
- Pang, S.F., Yusoff, M.M., Gimbin, J. (2014). Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Food Hydrocolloids.* 37, 159 - 165.
- Paraskeva, P., Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 81, 1475 -1485.
- Pawar, A., Gadhe, A., Venkatachalam, P., Sher, P., Mahadik, K., (2008). Effect of core and surface cross-linking on the entrapment of metronidazole in pectin beads. *Acta Pharm.* 58, 75 - 85.
- Perrone, P., Hewage, C.M., Thomson, A.R., Bailey, K., Sadler, I.H., Fry, S.C. (2002). Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry.* 60, 67 - 77.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63 (7), 1035 - 1042.
- Pincemail, J., Degruene, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., Defraigne, J.O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 21, 66 - 75.
- Plackett, R.L., Burman, J.P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika.* 33, 302 - 325.
- Ralet, M.C., Bonin, E., Thibault, J.F. (2002). Pectins, dans : *Biopolymers Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. 8 (12), 345 - 380.
- Ralet, M.C., Bonnin, E., Thibault, J.F. (2001). Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography. B: Biomedical Sciences and Applications.* 753, 157 - 166.

- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*. 545, 51 - 64.
- Ranalli, A. (1991). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*. 37, 30 - 39.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231 - 1237.
- Redgwell, R.J., Melton, L.D., Brasch, D.J. (1992). Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of pectic polymers, *Plant Physiol*. 98, 71 - 81.
- Renard, C. (2010). Les pectines dans la paroi végétale. UMR SQPOV, Avignon.
- Rezwana, K., Chena, Q.Z., Blakera, J.J., Boccaccinia, A.R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 27, 3413 - 3431.
- Richard, J., Benoit, J.P. (2013). Microencapsulation. *Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés*.
- Ridley, B.L., O'Neil, M.A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*. 57, 929 - 967.
- Risch, S.J. (1995). Encapsulation: Overview of Uses and techniques. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* [online] (Risch, S.J., Reineccius, G.A., edit.), American Chemical Society, Minnessota. 2 - 7.
- Rivas, J., Beltran, F., Acedo, B., Gimeno, O. (2000). Two step Waste water treatment : Sequential ozonation-Aerobic biodegradation. *Ozone Science and Engineering*. 22, 617 - 636.
- Sabbah, I., Marsook, T., Basheer, S. (2004). The effect of pre-treatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process Biochemistry*. 39, 1947 - 1951.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E.J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol*. 39, 213 - 294.

- Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C.A. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 339 - 346.
- Samperdro, I., Aranda, E., Martin, J., Garcia Garrido, J.M., Garcia Romero, I., Ocampo, J.A. (2004). Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology*. 26, 149 - 156.
- Santos, J.D.G., Espeleta, A.F., Branco, A., De Assis, S.A. (2013). Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*. 92, 1997 - 2001.
- Sassi, A.B., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G., Boussaid, A. (2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*. 41, 74 - 78.
- Sato, Y., Miyawaki, O. (2008). Analysis of Intermolecular Interaction among Pectin Molecules in Aqueous Sugar Solutions. *Food Science and Technology Research*. 14 (3), 232 - 238.
- Saviozzi, A., Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Scagnozzi, A., Vanni, G. (1993). Decomposition of vegetation - water sludge in soil. *Bioresource Technology*. 44, 223 - 228.
- Schols, H.A., Bakx, E.J., Schipper, D., Voragen, A.G. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*. 279, 265 - 279.
- Schwartz, C. (2010). Bilan de 15 ans d'utilisation des substituts osseux de synthèse en chirurgie orthopédique et en traumatologie. *e-mémoires de l'académie nationale de chirurgie*, 9 (2), 76 - 86.
- Serguschenko, I., Kolenchenko, E., Khotimchenko, M. (2007). Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats. *Nutrition Research*. 27 (10), 633 - 639.
- Shahidi, F., Han, X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33, 501 - 547.
- Sharma, B.R., Naresh L., Dhuldhoya, N.C., Merchant, S.U., Merchant, U.C. (2006). An Overview on Pectins. *Times Food Processing Journal*. 44 - 51.

- Sharma, O.P., Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*. 113 (4), 1202 - 1205.
- Sjoberg, A.M. (1987). The effects of γ irradiation on the structure of apple pectin. *Food Hydrocolloids*. 4, 271 - 276.
- Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*. 500, 299 - 313.
- Sumathraa, M., Govindaraja, D., Jeyarajb, M., Al Arfajc, A., Munusamyc, M.A., Selvaraj Suresh K.S., Rajana. M. (2017). Sustainable pectin fascinating hydroxyapatite nanocomposite scaffolds to enhance tissue regeneration *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 5, 46 - 53.
- Sundararaman, S., Narendrakumar, G., Sundari, N., Mohindra, A., Philip, J.T. (2016). Extraction of Pectin from used Citrus Limon and optimization of process parameters using Response Surface Methodolog. *Research Journal of Pharmaceutical and technologie*. 9 (12), 2246 - 2251.
- Tanchev, S., Joncheva, N., Genov, N., Codounis, M. (1980). Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*. 4, 5 - 13.
- Thakur, B.R., Singh, R.K. Handa, A.K. (1997). Chemistry and uses of pectin: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37 (1), 47 - 73.
- Thibault, J.F., Ralet, M.C. (2001). Pectins: Their origin, structure and functions. Dans: *Advanced Dietary Fibres*. Mc Cleary, B.V. and Prosky L., Eds. Oxford Blackwell Science, 32, 369 - 378.
- Thibault, J.F., Renard, C.M.G.C., Axelos, M.A.V., Roger, P., Crépeau, M.J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*. 238, 271 - 286.
- Thibault, J.F., Renard, C.M.G.C., Axelos, M.A.V., Bonnin, E. (2000). *Les pectines*. INRA, Centre de Recherche Agro-alimentaire.
- Thibault, J.F., Petit, R. (1979). *Les substances pectiques : Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, (Monties, B. eds. Bordas), Paris.

- Thibault, J.F., Saulnier, L., Axelos, M.A.V., Renard, C.M.G.C. (1991). Difficultés expérimentales de l'étude des macromolécules pectiques. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 138, Actual. bot. 138, 319 - 337.
- Tilly. (2010). Pectines. *Technique d'ingénieur*. F 5000.
- Turakhozhaev, M.T., Khodzhaev, M.A. (1993). Plant pectin substances methods of isolating pectin substances *Chemistry of Natural Compounds*. 29, 558 - 565.
- Versic, R.J. (1988). Flavor encapsulation : an overview. In : *Flavour Encapsulation* (edited by S.J. Risch and G.A. Reineccius). ACS Symposium Series 370. Washington, D C: American Chemical Society. 1 - 6.
- Vincken, J.P. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*.132, 1781 - 1789.
- Voragen, A., Thibault, J.F., Pilnik, W., Axelos, M.A.V., Renard, C.M.G.C. (1995). Pectins. *Food polysaccharides and their applications*. Editeur: Stephen, A.M., New York, Marcel Dekker, 287 - 339.
- Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang , Z., Liao , X., Hu , X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *Journal of Food Engineering*. 78, 693 - 700.
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., Ye, X., Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method *Food Chemistry*.178, 106 - 114.
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol*. 47, 9 - 27.
- Wong, D. (2008). Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *The Protein Journal*. 27 (1), 30 - 42.
- Yaakoubi, A, Elyachioui, A, Chahlaoui, A, Elyachioui, M., Chaouch, A. (2010). Traitement des margines à pH neutre et en conditions d'aérobic par la microflore du sol avant épandage. *Bull. Soc. Pharm*. 149, 43 - 56.
- Yeoh, S., Shi, J., Langrish, T.A.G. (2008). Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*. 218, 229 - 237.

- Yi, W., Fischer, J., Akoh, C.C. (2005). Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8804 - 8812.
- Yoo, S.H., Fishman, M.L., Hotchkiss, J., Arland, T., Lee, H.G. (2006). Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids.* 20 (1), 62 - 67.
- Zam, W., Bashour, G., Abdelwahed, W., Khayata. W. (2013). Formulation and in-vitro release of pomegranate peels' polyphénols microbeads. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 4 (9), 3536 - 3540.
- Zandleven, J., Sørensen, S.O., Harholt, J., Beldman, G., Schols, H., Scheller, H., Voragen, A. (2007). Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry.* 68, 1219 - 1226.
- Zuidam, N.J., Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In N.J. Zuidam, and V.A. Nedovic (Eds.), *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing.* 3 - 29.

Résumé

L'objectif de cette étude consiste en la valorisation du zeste de citron par extraction de la pectine en vue de son utilisation pour l'encapsulation des composés phénoliques des margines issues de l'industrie oléicoles et l'élaboration d'un biomatériau composite pectine / hydroxyapatite.

Les résultats de l'optimisation du procédé de l'extraction en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses ont montré qu'un rendement maximum en pectine de 25.18 ± 1.84 % est obtenu en assurant comme conditions optimales un : pH = 1.80, T = 94 °C et t = 48 min. Celle-ci est confirmée expérimentalement.

L'étude cinétique de cette extraction en utilisant le modèle validé lors de l'étude des surfaces de réponses a montré que les valeurs calculées du rendement en utilisant les constantes de vitesse (K_{ext} et K_{deg}) du modèle cinétique (Panchev) sont en accord avec les résultats expérimentaux utilisés pour développer le modèle des surfaces de réponses, avec des valeurs des coefficients de détermination (R^2) supérieures à 0.91.

Les résultats de la modélisation du procédé d'encapsulation des composés phénoliques des margines par la pectine sans passer par leur extraction ont montré que des maximums de 36.17 ± 1.46 % en composés phénoliques et 40.36 ± 1.74 % en activité antiradicalaire sont obtenus sous les conditions optimales suivantes : rapport M/P = 30 ml/g, concentration en $[\text{CaCl}_2]$ = 5 %, temps de formulation = 33 min et température de refroidissement = 5°C. Ces valeurs correspondent à celles trouvées expérimentalement (36.97 ± 0.73 % en composés phénoliques et 40.90 ± 0.92 % en activité antiradicalaire).

L'utilisation de la pectine dans l'élaboration d'un biomatériau composite a montré une bonne amélioration de la résistance à la rupture en compression de l'hydroxyapatite.

Mots clés : Extraction, Zeste de citron, Pectine, Cinétique, Margines, Composés phénoliques, Encapsulation, Biomatiériau, Plans d'expériences.

Abstract

The aim of this study was to extract by acidic treatment the pectin from Lemon peels. This pectin was used in the encapsulation of phenolic compounds from olive mill wastewater and in the development of a biomaterial pectin / hydroxyapatite composite.

The effects of process factors on pectin yield have been examined using Hadamard matrix (screening). Three major factors, namely pH, temperature (T) and extraction time (t) identified as influential factors were studied using response surface methodology (central composite design). The selected optimal conditions were: pH = 1.78, T = 94°C and t = 48 min. Under these conditions, the corresponding response value (extraction yield) predicted by the model (25.18 ± 1.84 %) was confirmed by validation experiments.

The yield values of extracted pectin predicted by RSM model at different pH and temperatures were used to determine k_{ext} (rate constant of pectin extraction) and k_{deg} (rate constant of pectin degradation) of the kinetic model. The obtained results indicated that this model described adequately the pectin extraction process from citrus lemon peels and gave yield values that are in good agreement with the experimental results used to develop the RSM model.

The response surface methodology (RSM) based in central composite design was applied to optimize the encapsulation process of phenolic compounds from olive mill wastewater using pectin as a coating agent. The optimal conditions obtained by desirability function were M/P ratio = 30 ml/g, $[\text{CaCl}_2]$ = 5 %, T= 5°C and t= 33min. Under these conditions, the experimental values of encapsulated phenolic compounds contents and their antiradical activity obtained were $36.97 \pm 0.73\%$ and $40.90 \pm 0.92\%$ respectively, which was close to the 36.17 ± 1.46 % and 40.36 ± 1.74 % values predicted by the models.

The use of pectin in the biomaterials development showed the pectin positive effect in terms of stiffness and strength of hydroxyapatite.

Key words: Extraction, Lemon peel, Pectin, Kinetic, Olive mill wastewater, Phenolic compounds, Encapsulation, Biomaterial, Experimental design.