

Université Lille 1
Sciences et Technologies

Ecole Doctorale
Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Année 2013

N° B.U. :

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue publiquement par :

Leandro Galván D'Alessandro

le 4 Décembre 2013 à Villeneuve d'Ascq

Titre

**Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants
à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits**

Jury

Président :	DELMAS H., Professeur	INP Toulouse	(France)
Rapporteurs :	ALEXANDROVA S., Professeur	ENSGTI Pau	(France)
	KARCHEVA M., Professeur	UCTM Sofia	(Bulgarie)
Examineurs :	TIERCE P., Président-Directeur Général	Société Sinaptec	(France)
	DHULSTER P., Professeur	Université Lille 1	(France)
	VAUCHEL P., Maître de Conférences	Université Lille 1	(France)
	DIMITROV K., Maître de Conférences	Université Lille 1	(France)
	NIKOV I., Professeur	Université Lille 1	(France)

Directeurs de thèse :	NIKOV Iordan
	DIMITROV Krasimir
Co-encadrant :	VAUCHEL Peggy
Laboratoire :	ProBioGEM, UPRES-EA 1026 – Polytech'Lille – Université Lille 1

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été effectué au sein du Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM) à Polytech'Lille, Université Lille 1. J'adresse mes remerciements aux directeurs du laboratoire, M. Pascal Dhulster et M. Philippe Jacques de m'avoir accueilli dans leur établissement.

Mes chaleureux remerciements vont à mes directeurs et encadrants de thèse, Iordan Nikov, Krasimir Dimitrov et Peggy Vauchel qui ont été à mes côtés pour me guider dans les activités de recherche mais également pour m'accompagner spirituellement à tout moment de mon séjour dans le laboratoire. Ils sont sans aucun doute les auteurs des meilleurs moments de ma vie au laboratoire. Je leurs suis profondément reconnaissant pour leur confiance, leur patience, leur dynamisme, leur sympathie et leur dévouement. J'espère pouvoir imiter leur altruisme, dévotion et passion pour le travail ainsi que pour la construction d'une ambiance sereine qui soulage le stress de chaque jour.

Je souhaite remercier Mme Silvia Alexandrova et Mme Maria Karcheva qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail, ainsi que M. Henri Delmas, M. Pascal Dhulster et M. Pascal Tierce qui ont accepté de participer au jury en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier tous les thésards et ex-thésards : François, Cédric, Thibault, Marwan, Amirouche, Qassim, Ameen, Alaa, Imad, Omar, Aurelien, Pauline, Delphine, Luiz, Kalim, Rémi et Adil, Gracias pour les bons moments partagés, les chercheurs invités, les stagiaires, et plus généralement le personnel scientifique et administratif pour l'ambiance très chaleureuse qu'ils ont assuré au sein du laboratoire (Gaby, Cathy, Corinne, Marianne Catte, Blandine Kowalski, Bertrand Fertin et Hugues Mandavid). J'adresse aussi mes vifs remerciements à toutes les personnes de l'équipe Deinove.

Je remercie mes collègues du Pôle Agroalimentaire du Groupe ISA-Lille avec lesquels je partage de nouvelles aventures, où M. Pierre Vandendriessche prend le rôle de capitaine d'équipe (équipe composée de Sylvie, Céline, Valérie, Maud, Laureen, Lucile, Elise, Emmanuelle, Marie-Noëlle, Caroline, Corine, Mohamed, Vincent, Charles et Damien).

Egalement je tiens à remercier tous les professeurs du Departamento de Tecnologia y Calidad de Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA, qui m'ont donné une très bonne formation académique dont je suis fier, mais surtout je suis infiniment heureux de les compter parmi mes amis. Je souhaite remercier le programme Erasmus Mundus ECW lot 16, pour le financement de mon doctorat.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à quelques personnes chères qui comptent énormément pour moi. Je pense tout particulièrement à ma famille, mis abuelos que todo hicieron por mi educacion, mis padres que siempre estuvieron conmigo, pero sobre todo quiero agradecer a mis hermanos que pese a la distancia nunca fallaron, es con ellos y gracias a ellos que mi vida es una alegría constante. Je remercie aussi ma petite amie Lucille et sa famille qui m'ont apporté leur soutien. Et plus généralement tous mes amis qui m'ont soutenu depuis toujours et que je suis très fier d'avoir à mes côtés (Ramiro qui a toujours été présent, Kim « Kimera », Emma, Pernia, Daglio, Coccocho, Guille, Matias, Francisc, Francesco, Pietro, Hugues, Roman, Jeannie, Isabel, Julia, Emeline, Bertrand, Matteo et Giuliano).

« Proceder con honestidad en aras de la dignidad del hombre es el compromiso más trascendente en nuestro corto paso por este mundo ».

« Agir avec honnêteté pour le bien de la dignité humaine est l'engagement le plus important dans notre court séjour sur cette planète ».

René Geronimo Favaloro

(1923 - 2000)

Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits

Résumé

Les fruits d'*Aronia melanocarpa* sont une des sources végétales les plus riches en substances phénoliques antioxydantes et notamment en anthocyanines. L'influence des principaux paramètres opératoires sur la cinétique et les rendements d'extraction assistée par ultrasons des anthocyanines et des polyphénols totaux à partir d'aronia et ses co-produits a été étudiée. La cinétique d'extraction a été décrite par des équations basées sur le modèle de Peleg. Le développement d'un modèle global (intégrant le temps, la température, la composition du solvant et la puissance des ultrasons) a été proposé comme un outil pour l'optimisation des conditions d'extraction des antioxydants. Après une étude préliminaire d'enrichissement des extraits en utilisant différents supports solides, la résine macroporeuse Amberlite XAD7HP a été choisie comme la plus appropriée pour l'adsorption des molécules antioxydantes d'aronia. Finalement, un nouveau procédé écologique intégré extraction-adsorption a été proposé pour la récupération sélective des molécules antioxydantes. Ce procédé a permis d'extraire les antioxydants et de purifier simultanément les extraits, permettant d'enrichir plus de 15 fois la teneur des anthocyanines dans les extraits. La faisabilité de cet eco-procédé à l'échelle pilote a également été démontrée.

Mots clés : antioxydants, polyphénols, anthocyanines, eco-extraction, *Aronia melanocarpa*, optimisation, modélisation, adsorption, procédé intégré extraction-adsorption.

Eco-processes for the selective recovery of antioxidants from *Aronia melanocarpa* and its by-products

Abstract

Black Chokeberry fruits are one of the richest sources in phenolic antioxidant compounds, particularly in anthocyanins. The influence of the main operating parameters on the kinetics and yields of anthocyanins and total polyphenols extraction with ultrasound assistance was studied. The extraction kinetics was described by equations based on the Peleg's model. The development of a global model (including time, temperature, solvent composition and ultrasound power) was proposed as a tool for optimizing the conditions of antioxidants extraction. After preliminary studies on extract enrichment using different solid supports, Amberlite XAD7HP macroporous resins was chosen as the most suitable for the adsorption of aronia antioxidant molecules. Finally, a new ecological integrated extraction-adsorption process was proposed for selective recovery of antioxidant molecules. This process enabled to extract antioxidant substances and to purify simultaneously the extracts, allowing to enrich more than 15 times the anthocyanins in the extracts. Feasibility of this new integrated process in a pilot scale was demonstrated, also.

Keywords: antioxidants, polyphenols, anthocyanins, eco-extraction, *Aronia melanocarpa*, optimization, modeling, adsorption, integrated process extraction-adsorption.

Sommaire

Remerciements.....	i
Liste des Figures	xiii
Liste des Tableaux.....	xvi
Liste des Notations et Abréviations	xvii
Introduction Générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	4
<i>I.1. Antioxydants</i>	5
I.1.1. Classifications des antioxydants.....	5
<i>I.1.1.1. Classification en fonction du type d'action</i>	<i>5</i>
<i>I.1.1.2. Classification par voie d'obtention.....</i>	<i>6</i>
I.1.2. Composés antioxydants naturels.....	7
<i>I.1.2.1. Acides phénoliques.....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.2.2. Alcools phénoliques</i>	<i>9</i>
<i>I.1.2.3. Stilbènes.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.2.4. Lignanes.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.2.5. Flavonoïdes.....</i>	<i>11</i>
I.1.3. Activité biologique des composés antioxydants naturels	14
<i>I.2. Sources de composés antioxydants naturels.....</i>	16
I.2.1. Sources végétales d'antioxydants.....	16
I.2.2. Co-produits agricoles et alimentaires	17
I.2.3. Baies d'aronia : une source végétale riche en composés phénoliques	18
<i>I.3. Extraction de biomolécules à partir de sources végétales.....</i>	21
I.3.1. Principe et mécanisme de l'extraction solide-liquide.....	21
I.3.2. Cinétique de l'extraction solide-liquide.....	22
<i>I.3.2.1. Modèle diffusionnel</i>	<i>23</i>

1.3.2.2. <i>Modèle de Peleg</i>	24
I.3.3. Performances de l'extraction solide-liquide	25
1.3.3.1. <i>Productivité</i>	25
1.3.3.2. <i>Rendement</i>	25
1.3.3.3. <i>Teneur en substance d'intérêt (pureté de l'extrait)</i>	26
1.3.3.4. <i>Concentration de l'extrait</i>	26
I.3.4. Paramètres influençant l'extraction solide-liquide	26
1.3.4.1. <i>Nature du solvant</i>	26
1.3.4.2. <i>pH d'extraction</i>	27
1.3.4.3. <i>Taille des particules</i>	28
1.3.4.4. <i>Température</i>	28
1.3.4.5. <i>Agitation</i>	28
1.3.4.6. <i>Rapport solvant-solide</i>	29
1.3.4.7. <i>Temps d'extraction</i>	29
I.3.5. Méthodes d'extraction solide-liquide	29
1.3.5.1. <i>Méthodes classiques</i>	30
1.3.5.1.1. <i>Macération</i>	30
1.3.5.1.2. <i>Extraction Soxhlet</i>	30
1.3.5.2. <i>Méthodes alternatives d'extraction solide-liquide</i>	31
1.3.5.2.1. <i>Extraction assistée par ultrasons (EAU)</i>	31
1.3.5.2.2. <i>Extraction assistée par micro-ondes (EAM)</i>	33
1.3.5.2.3. <i>Extraction par liquide pressurisé (ELP)</i>	33
1.3.5.2.4. <i>Extraction par fluides supercritiques (EFS)</i>	34
I.4. Procédés de purification et de concentration de biomolécules	36
I.4.1. Chromatographie d'exclusion stérique	36
I.4.2. Extraction liquide-liquide	37

I.4.3. Techniques membranaires.....	38
I.4.4. Adsorption sur support solide	39
<i>I.4.4.1. Types d'adsorption.....</i>	<i>39</i>
<i>I.4.4.2. Principaux types d'adsorbants et caractéristiques.....</i>	<i>40</i>
<i>I.4.4.3. Mécanisme général de l'adsorption.....</i>	<i>42</i>
<i>I.4.4.4. Equilibre d'adsorption.....</i>	<i>42</i>
<i>I.4.4.5. Modèles d'adsorption</i>	<i>44</i>
<i>I.4.4.5.1. Modèle de Freundlich</i>	<i>44</i>
<i>I.4.4.5.2. Modèle de Langmuir</i>	<i>45</i>
<i>I.4.4.5.3. Modèle de Langmuir-Freundlich</i>	<i>45</i>
<i>I.4.4.6. Mise en œuvre du procédé d'adsorption.....</i>	<i>46</i>
I.5. Capacité antioxydante	49
I.5.1. Méthodes pour la détermination de la capacité antioxydante	49
I.5.2. Facteurs influençant l'activité antioxydante des extraits	52
<i>I.5.2.1. Variété, plante et le stade de maturité</i>	<i>52</i>
<i>I.5.2.2. Concentration de l'extrait et teneur en composés phénoliques</i>	<i>53</i>
<i>I.5.2.3. Durée de vie et conditions de stockage des extraits</i>	<i>53</i>
<i>I.5.2.4. Accessibilité aux zones actives d'oxydation</i>	<i>53</i>
I.6. Conclusion	54
Chapitre II : Matériels et Méthodes	55
II.1. Source végétale : aronia	56
II.1.1. Etude de l'influence des paramètres opératoires sur l'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de baies d'aronia (Chapitre III.1)	56
II.1.2. Modélisation de la cinétique d'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de co-produits d'aronia (Chapitre III.2)	57
II.1.3. Etude de l'adsorption des antioxydants phénoliques d'aronia et intégration des procédés d'extraction et de purification (Chapitre IV.1 et IV.2).....	57

II.1.4. Optimisation du procédé intégré extraction-adsorption (Chapitre IV.3).....	58
II.2. Extraction solide-liquide classique et assistée par ultrasons	59
II.3. Adsorption sur support solide.....	60
II.3.1. Adsorbants.....	60
II.3.1.1. Nature des adsorbants utilisés.....	60
II.3.1.2. Préparation des résines Amberlite.	61
II.3.2. Etude des équilibres d'adsorption et de désorption (Chapitre IV.1.1)	62
II.3.3. Etude de la cinétique d'adsorption (Chapitre IV.1.2)	63
II.4. Etude de l'impact de l'intégration extraction-adsorption	63
II.4.1. Extraction et adsorption successives (Chapitre IV.2.1).....	63
II.4.2. Procédé intégré extraction-adsorption (Chapitre IV.2.2)	65
II.5. Optimisation du procédé intégré extraction-adsorption et procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote	66
II.5.1. Optimisation du procédé intégré extraction-adsorption (Chapitre IV.3).....	66
II.5.2. Procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote (Chapitre IV.4).....	67
II.6. Techniques analytiques.....	69
II.6.1. Mesure du taux de matières sèches	69
II.6.2. Mesures spectrophotométriques.....	70
II.6.2.1. Capacité antioxydante (CA)	70
II.6.2.2. Polyphénols totaux (PT)	71
II.6.2.3. Anthocyanines totales (AT).....	72
II.6.3. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC).....	74
Chapitre III : Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants phénoliques à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits	76
III.1. Etude de l'influence des paramètres opératoires sur l'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de baies d'aronia.....	77
III.1.1. Effets du temps et de la température d'extraction.....	77

III.1.2. Effet du rapport solide-liquide.....	79
III.1.5. Effet du solvant.....	80
III.1.6. Effet de la taille des particules	82
III.1.7. Effet des ultrasons	83
III.1.8. Capacité Antioxydante des extraits d'aronia.....	87
III.1.9. Conclusions	88
III.2. Modélisation de la cinétique d'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de co-produits d'aronia	89
III.2.1. Données expérimentales pour la construction du modèle	89
III.2.1.1. Effet des paramètres étudiés sur la concentration en anthocyanines	90
III.2.1.2. Effet des paramètres étudiés sur la concentration en polyphénols.....	92
III.2.1.3. Effet des paramètres étudiés sur la capacité antioxydante	93
III.2.1.4. Bilan sur l'effet des ultrasons.....	95
III.2.2. Construction et validation du modèle.....	96
III.2.2.1. Construction du modèle	96
III.2.2.2. Validation du modèle	101
III.2.3. Utilisation du modèle proposé comme outil d'aide à l'optimisation de l'extraction.....	101
III.2.4. Caractérisation des anthocyanines dans les extraits.....	102
III.2.5. Conclusions	104
Chapitre IV : Enrichissement des extraits d'aronia en antioxydants par adsorption et intégration des procédés d'extraction et de purification	106
IV.1. Enrichissement des extraits d'aronia par adsorption.....	107
IV.1.1. Etude d'équilibre adsorption-désorption des composés phénoliques antioxydants d'aronia.....	108
IV.1.1.1. Etude préliminaire pour le choix de l'adsorbant	108
IV.1.1.2. Comparaison de l'efficacité des résines XAD7HP et XAD16.....	111
IV.1.2. Etude de la cinétique d'adsorption	115

IV.1.2.1. Etude en erlenmeyer	116
IV.1.2.2. Etude en colonne d'adsorption.....	117
IV.1.2.2.1. Adsorption.....	117
IV.1.2.2.2. Désorption	118
IV.1.2.2.3. Enrichissement en colonne	119
IV.1.3. Conclusions	120
IV.2. Impact de l'intégration extraction-adsorption sur l'efficacité de récupération des composés phénoliques	122
IV.2.1. Extraction et adsorption successives.....	122
IV.2.2. Procédé intégré extraction-adsorption	123
IV.2.3. Conclusions	129
IV.3. Optimisation de l'éco-procédé intégré extraction-adsorption et réalisation à l'échelle pilote	130
IV.3.1. Optimisation des conditions opératoires à l'échelle laboratoire	130
IV.3.2. Procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote.....	136
IV.3.3. Conclusions	139
Conclusions Générales et Perspectives.....	141
Conclusions	142
Perspectives.....	144
Références	145
Annexes.....	169

Liste des Figures

Figure I.1. Plante et baies d'aronia.....	19
Figure I.2. Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrasons.	32
Figure I.3. Classification des isothermes d'adsorption en 5 grands types.....	44
Figure I.4. Phase d'adsorption jusqu'à saturation de la colonne à lit fixe.....	48
Figure II.1. Extrudeuse de laboratoire utilisée pour obtenir le jus d'aronia.	57
Figure II.2. Représentation schématique du dispositif expérimental pour l'extraction assistée par ultrasons.	59
Figure II.3. Structure chimique des résines Amberlite XAD7HP, XAD16 et XAD1180.	61
Figure II.4. Colonne d'adsorption à l'échelle laboratoire (l'étape de désorption).	64
Figure II.5. Eluant récolté en différentes fractions.....	65
Figure II.6. Représentation schématique du dispositif expérimental pour le procédé intégré extraction-adsorption.	66
Figure II.7. Installation pilote du procédé intégré extraction-adsorption avec (a) une colonne d'adsorption et (b) deux colonnes d'adsorption.	68
Figure II.8. Courbe d'étalonnage pour la détermination des polyphénols totaux.	71
Figure II.9. Transformation de la structure des anthocyanines en milieu aqueux en fonction du pH... (Ananga et al. 2013)	73
Figure II.10. Spectre de UV-vis des anthocyanines en solutions tampon pH 1,0 et 4,5 et les structures cation flavylum (A) et la forme hémicétal (B). R=H ou substituent glycosidique.....	73
Figure II.11. Schéma de principe de la chromatographie liquide de haute performance.	75
Figure III.1. Influence de la température sur la cinétique d'extraction à l'eau des polyphénols d'aronia coupé en deux avec un ratio solide-solvant de 1:20.	78
Figure III.2. Influence de la température sur la cinétique de l'extraction à l'eau des polyphénols à partir d'aronia broyée ($d < 0,5$ mm) avec un ratio solide-solvant de 1:20.	79
Figure III.3. Effet du rapport solide-solvant sur la cinétique d'extraction à l'eau des polyphénols à partir d'aronia broyée ($d = 0,5-1,0$ mm) à 60 °C.....	80
Figure III.4. Effet de la composition de solvant sur la cinétique d'extraction des polyphénols à partir d'aronia broyée ($d = 0,5-1,0$ mm) à 60 °C et un ratio solide-solvant de 1:40.	81
Figure III.5. Effet de la taille des particules sur la cinétique d'extraction à l'eau des polyphénols d'aronia à 60 °C et avec un rapport solide-solvant de 1:20.....	83

Figure III.6. Effet des ultrasons et de la température sur la cinétique d'extraction de polyphénols à partir d'aronia coupée en deux avec un ratio solide-solvant de 1:20 et a) l'eau comme solvant, b) l'éthanol 50% (vol.) comme solvant.	84
Figure III.7. Effet des ultrasons sur la cinétique d'extraction des polyphénols à partir d'aronia broyée ($d < 0,5$ mm) avec un ratio solide-solvant de 1:20.	85
Figure III.8. Effet des ultrasons sur le rendement d'extraction final en polyphénols avec un ratio solide-solvant de 1:20.	86
Figure III.9. Relation entre l'activité antioxydante et la concentration en polyphénols dans les extraits d'aronia.	87
Figure III.10. Cinétique d'extraction d'anthocyanines totales à a) 20 °C et b) 70 °C.	91
Figure III.11. Cinétique d'extraction des polyphénols totaux à a) 20 °C et b) 70 °C.	93
Figure III.12. Cinétique de la capacité antioxydante à a) 20 °C et b) 70 °C.	94
Figure III.13. Effet des ultrasons dans l'extraction d'anthocyanines totales de sous-produits d'aronia.	95
Figure III.14. Comparaison entre la cinétiques expérimentales et cinétiques prédites par le modèle (les symboles représentent les valeurs expérimentales et les lignes représentent les modèles) : a) AT ; b) PT ; c) CA.	100
Figure III.15. Chromatogramme HPLC des anthocyanines d' <i>Aronia melanocarpa</i> à 520 nm. 1) cyanidine-3-galactoside, 2) cyanidine-3-glucoside, 3) cyanidine-3-arabinoside et 4) cyanidine-3-xyloside.	103
Figure III.16. Comparaison de dosage d'anthocyanines par HPLC et par la méthode de pH-différentiel.	104
Figure IV.1. Quantités de composés phénoliques adsorbés et récupérés dans l'éluant pour quatre adsorbants différents (24h d'adsorption à partir de l'extrait natif d'aronia à 20 °C suivi de 24h de désorption à 20 °C avec 70% d'éthanol (vol.); ratio solide-liquide de 1:20): (a) composés phénoliques totaux (GAE), (b) anthocyanines totales (CGE); (c) activité antioxydante (TEAC).	109
Figure IV.2. Isothermes d'adsorption à l'équilibre à partir d'extraits d'aronia à 20 °C et un ratio solide-liquide de 1:20, en utilisant les adsorbants XAD7HP (●) et XAD16 (■) ; les courbes (—) correspondent au modèle de Langmuir pour ces 2 résines ; (a) PT (GAE) (b) AT (CGE)).	112
Figure IV.3. Influence de la température et de la composition d'éthanol dans l'éluant pour la récupération des composés phénoliques d'aronia et de l'activité antioxydante (24h d'adsorption à 20 °C suivi par 24h de désorption à diverses conditions; ratio solide-liquide de 1:20): (a) PT (GAE) après la désorption à 20 °C, (b) AT (CGE) après la désorption à 20 °C, (c) CA (TEAC) après la désorption à 20 °C, (d) PT (GAE) après la désorption à 40 °C, (e) AT (CGE) après la désorption à 40 °C; (f) CA (TEAC) après la désorption à 40 °C.	114

Figure IV.4. Cinétique d'adsorption des polyphénols totaux (a) et des anthocyanines totales (b) sur XAD7HP avec un rapport adsorbant-phase liquide de 1:20 dans le cas d'adsorption en erlenmeyer et de 1:14 dans le cas d'adsorption en colonne.	117
Figure IV.5. Concentrations en polyphénols (GAE) et en anthocyanines (CGE) dans les 10 fractions d'éluent de 10 mL lors de la désorption de la colonne d'adsorption avec 70% éthanol (débit de 0,7 mL.min ⁻¹).....	119
Figure IV.6. Enrichissement en polyphénols et en anthocyanines des 10 fractions d'éluent de 10 mL lors de la désorption de la colonne d'adsorption avec 70% éthanol (débit de 0,7 mL.min ⁻¹) par rapport à l'extrait initial.	120
Figure IV.7. Evolution de la concentration en composés phénoliques d'aronia dans la phase liquide lors des étapes d'extraction (0-8 h) suivi de l'adsorption (9-17 h) (10 g de co-produit d'aronia, 800 mL d'eau ultrapure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C): PT (GAE), AT (CGE).	123
Figure IV.8. Evolution de la concentration en polyphénols totaux (GAE) dans la phase liquide du contacteur d'extraction au cours du procédé intégré extraction-adsorption (10 g de co-produits d'aronia, 800 mL d'eau ultrapure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C).	125
Figure IV.9. Evolution de la concentration en composés phénoliques d'aronia pendant l'élution de la colonne (70% d'éthanol (vol.)) suite au procédé intégré extraction-adsorption et suite aux extraction et adsorption successives (débit de 2 mL.min ⁻¹): (a) PT (GAE); (b) AT (CGE).....	126
Figure IV.10. Evolution de la concentration en composés phénoliques d'aronia pendant l'élution de la colonne (70% d'éthanol (vol.)) suit au procédé intégré extraction-adsorption (temps 5h, débit de recirculation 3 L.h ⁻¹ , débit d'élution de 2 mL.min ⁻¹): (a) PT (GAE); (b) AT (CGE); (c) CA (TEAC).132	
Figure IV.11. Surfaces de réponse pour (a) PT (GAE), (b) AT (CGE), et (c) CA (TEAC), en fonction du débit et du temps.....	135
Figure IV.12. Comparaison de l'évolution de la concentration en composés phénoliques dans l'éluant suite au procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote avec 1 ou 2 colonne(s) (éluant 70% d'éthanol (vol.)), débit de 100 mL.min-1): (a) PT (GAE); (b) AT (CGE).....	138

Liste des Tableaux

Tableau I.1. Structure chimique de certains composés phénoliques d'origine végétale.	10
Tableau I.2. Structure chimique de certains composés flavonoïdes.	12
Tableau I.3. Principaux adsorbants industriels, utilisations et caractéristiques (Ronze 2008, Sun & Meunier 2003).	41
Tableau I.4. Méthodes pour la mesure de la capacité antioxydante (Piñeiro 2009).	50
Tableau II.1. Propriétés des adsorbants.	60
Tableau II.2. Gradient d'éluion.	75
Tableau III.1. Domaine expérimental du plan d'expériences.	90
Tableau III.2. Coefficients de régression pour chaque constante K_i du modèle.	98
Tableau III.3. Valeurs expérimentales et prédictions du modèle pour PT , AT et CA pour l'ensemble du plan d'expériences.	99
Tableau III.4. Extraction du 90% des anthocyanines totales à 17minutes, 70 °C, 100W, 34% éthanol.	102
Tableau III.5. Temps de rétention et proportions moyennes des 4 cyanidines majoritaires dans les extraits.	103
Tableau IV.1. Modélisation des isothermes d'adsorption par l'équation de Langmuir : valeurs de capacité maximale d'adsorption (q_m), constante de Langmuir (k_L) et NRMSD (ratio solide-liquide de 1:20, T = 20 ° C).	113
Tableau IV.2. Impact de l'intégration des procédés: comparaison de (1) extraction et adsorption successives et (2) procédé intégré extraction-adsorption (10 g d'aronia, 800 mL d'eau ultra-pure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C).	127
Tableau IV.3. Teneurs en polyphénols et en anthocyanines dans l'extrait d'aronia et dans différentes fractions d'éluion (10 g de pellets d'aronia, 800 mL d'eau ultra-pure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C; éluion avec éthanol 70% (vol.) avec un débit de 2 mL.min ⁻¹).	128
Tableau IV.4. Variables indépendantes et leurs valeurs codées et réelles utilisées pour l'optimisation.	131
Tableau IV.5. Réponses observées et prédites par le modèle en PT , AT et CA pour les 7 essais du plan d'expériences.	133
Tableau IV.6. Analyse de la variance (Anova) pour le modèle décrit dans l'Equation IV.1.	134
Tableau IV.7. Coefficients estimés du modèle pour PT , AT et CA	134
Tableau IV.8. Comparaison des résultats de récupération de polyphénols et d'anthocyanines entre les procédés intégrés à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote.	139

Liste des Notations et Abréviations

a_0 : coefficient de régression pour les termes d'interception	-
a_1, a_2 et a_3 : coefficients de régression de premier ordre	-
a_{11}, a_{22} et a_{33} : coefficients de régression de second ordre	-
a_{12}, a_{13} et a_{23} : coefficients de régression des interactions	-
A_{t0} : absorbance de la solution méthanolique de DPPH au temps 0 minutes	-
A_f : absorbance du mélange échantillon-DPPH après 30 minutes de réaction	-
A_{510} : valeur d'absorbance à 510 nm	-
A_{700} : valeur d'absorbance à 700 nm	-
A : rendement en polyphénols avec irradiation des ultrasons	%
ABTS : 2,2'-azinobis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)	-
ADN : acide désoxyribonucléique	-
$AT(t)$: anthocyanines totales au temps t	mg ECG.g ⁻¹ (m.s.)
AT : Anthocyanines totales	mg ECG.g ⁻¹ (m.s.)
B : rendement en polyphénols extraits sans irradiation	%
BHA : butylhydroxyanisol	-
TBHQ : ter-butyle hydroquinone	-
BHT : butylhydroxytoluène	-
C_0 : rendement d'extraction initial, modèle de Peleg	mg.g ⁻¹ (m.s.)
$C(t)$: rendement d'extraction à l'instant t , modèle de Peleg	mg.g ⁻¹ (m.s.)
C_e : concentration à l'équilibre du soluté, modèle de Langmuir	mg.L ⁻¹
C_{Trolox} : concentration en équivalent Trolox	μmol
CA : capacité antioxydante	μmol TEAC.g ⁻¹ (m.s.)
$CA(t)$: capacité antioxydante au temps t	μmol TEAC.g ⁻¹ (m.s.)
CCD : central composite design	-
CCF : central composite faced centered design	-
CE ₅₀ : concentration efficace à 50%	-
CGE : cyanidine-3-glucoside equivalent	-

Cyd-3-galactoside : cyanidine-3-galactoside	-
Cyd-3-glucoside : cyanidine-3-glucoside	-
Cyd-3-arabinoside : cyanidine-3-arabinoside	-
Cyd-3-xyloside : cyanidine-3-xyloside	-
D_f : facteur de dilution	-
D_x : coefficient de diffusion moléculaire du soluté, loi de Fick	$m^2.s^{-1}$
DVB : divinylbenzène	-
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrilhydrazil	-
EAM : extraction assistée par microondes	-
EAU : extraction assistée par ultrasons	-
EFP : extraction par fluide pressurisé	-
EFS : extraction par fluides supercritiques	-
ELL : extraction liquide-liquide	-
ELP : extraction par liquide pressurisé	-
EtOH : éthanol	-
F : variation entre groupes	-
FRAP : capacité de réduction ferrique du plasma	-
GAE : gallic acid equivalent	-
HAT : transfert des atomes d'hydrogène	-
HDL : lipoprotéines de haute densité (high density lipoproteins)	-
HPLC : high performance liquid chromatography	-
k_L : constante de Langmuir, modèle de Langmuir	$L.mg^{-1}$
k_{LO} : facteur pré-exponentiel, modèle de Langmuir	$L.mg^{-1}$
K_f : constante de Freundlich (constante empirique)	$mg.g^{-1}$
K_1 : coefficient dépendant de la vitesse maximale d'extraction, modèle de Peleg	$min.g(m.s.).mg^{-1}$
K_2 : coefficient dépendant du rendement maximal d'extraction, modèle de Peleg	$g(m.s.).mg^{-1}$
$K_{1,PT}$: vitesse maximale d'extraction pour les polyphenols totaux	min^{-1}

$K_{I,CA}$: vitesse maximale d'extraction pour la capacité antioxydante	min^{-1}
$K_{I,AT}$: vitesse maximale d'extraction pour les anthocyanines totales	min^{-1}
K_{2PT} : rendement maximal d'extraction pour les polyphénols totaux	$\text{mg GAE.g}^{-1}(\text{m.s.})$
K_{2CA} : rendement maximal d'extraction pour la capacité antioxydante	$\mu\text{mol.g}^{-1}(\text{m.s.})$
K_{2AT} : rendement maximal d'extraction pour les anthocyanines totales	$\text{mg CGE.g}^{-1}(\text{m.s.})$
$K_{3,AT}$: coefficient représentant la dégradation des anthocyanines totales	$\text{mgCGE.g}^{-1}(\text{m.s.}).\text{min}^{-1}$
l : longueur de trajet optique de la cuvette de mesure	cm
LDL : low density lipoproteins)	-
M_w : masse molaire	g.mol^{-1}
n : constante empirique dépendant du système adsorbant/molécule (indice d'affinité entre molécule et adsorbant)	-
NRMSD : normalized root mean squared deviation	-
ORAC : oxygen radical absorbance capacity	-
PG : propyl gallate	-
$PT(t)$: polyphenols totaux au temps t	$\text{mg GAE.g}^{-1}(\text{m.s.})$
PT : polyphénols totaux	$\text{mg GAE.g}^{-1}(\text{m.s.})$
PSDVB : polystyrène divinylbenzène	-
Q_e : teneur dans l'adsorbant à l'équilibre, modèle de Langmuir	mg.g^{-1}
Q_{max} : teneur maximale dans l'adsorbant, modèle de Langmuir	mg.g^{-1}
R^2 : Coefficient de détermination	-
S : pourcentage d'éthanol dans le solvant	% vol
t : temps d'extraction, équation de Peleg	min
T : température	°C
TEAC : trolox equivalent antioxidant capacity	μmol
TRAP: total radical trapping antioxidant parameter	-
US : ultrasons	-
UV : ultraviolet	-
UV-v : ultraviolet-visible	-

% vol.: pourcentage volumique	-
X : teneur en soluté du solide, loi de Fick	mg.g ⁻¹ (m.s.)
X ₁ : variable indépendante, température (chapitre III.2)	°C
X ₂ : variable indépendante, rapport eau-éthanol dans le solvant (chapitre III.2)	% vol
X ₃ : variable indépendante, puissance d'ultrasons (chapitre III.2)	W
Y ₁ : réponse, polyphénols totaux (chapitre III.2)	mg GAE.g ⁻¹ (m.s.)
Y ₂ : réponse, anthocyanines totales (chapitre III.2)	mg CGE g ⁻¹ (m.s.)
Y ₃ : réponse, capacité antioxydante (chapitre III.2)	μmol TEAC.g ⁻¹ (m.s.)
ε : absorptivité molaire	L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹
Ø : diamètre	m

Introduction Générale

Les antioxydants naturels connaissent un intérêt croissant pour des applications dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique. En effet, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont, à tort ou à raison, mauvaise presse parmi les consommateurs. Il existe donc un besoin de production d'extraits riches en antioxydants à partir de différentes sources végétales y compris à partir de co-produits d'industries agro-alimentaires.

Les fruits représentent une source importante de composés phénoliques antioxydants. En particulier, les fruits et baies rouges et bleu foncés ont des capacités antioxydantes très importantes, due en grande partie aux anthocyanines très présentes dans ces fruits. Parmi les baies, *Aronia melanocarpa* ressort comme une source encore peu étudiée et une des plus riches en antioxydants, en particulier en anthocyanines. Les antioxydants d'aronia présentent des potentialités de valorisation comme colorants ou antioxydants naturels dans les industries alimentaire et cosmétique. Les polyphénols d'aronia présentent également certaines activités pouvant trouver des applications dans le domaine de la santé. La principale utilisation des baies d'aronia est la production de jus de fruits. Le jus d'aronia est très riche en anthocyanines et présente la plus forte capacité antioxydante parmi les jus de fruits. Le résidu après l'extraction du jus par pressage contient jusqu'à 16 % de la masse initiale des baies et est une source encore très riche en composés phénoliques. L'extraction sélective d'antioxydants à partir de tels co-produits de l'industrie alimentaire pourrait permettre d'obtenir des produits antioxydants de hautes valeurs ajoutées.

La spécificité des problèmes d'isolation de composés bioactifs comme les antioxydants naturels est liée à la nécessité de conserver leurs fonctionnalités au cours de leur extraction et purification. Souvent des conditions d'extraction douces sont donc recommandées. Actuellement, il y a une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et de solvants organiques et une réduction de la pollution. L'extraction assistée par

ultrasons est considérée comme un procédé d'eco-extraction. C'est une méthode simple, efficace et peu coûteuse pour extraire des biomolécules à partir de sources végétales. A rendement identiques, elle consomme nettement moins d'énergie que les méthodes classiques d'extraction. Elle est considérée comme une technique très bien adaptée pour l'extraction des antioxydants phénoliques et est largement utilisée à l'échelle laboratoire pour extraire de tels composés à partir de sources naturelles variées.

Parfois le manque de sélectivité des solvants pour les molécules d'intérêt fait de l'enrichissement des extraits une étape nécessaire pour l'obtention d'un produit de haute valeur ajoutée. Parmi les procédés disponibles, l'adsorption sur support solide semble particulièrement bien adaptée pour un tel enrichissement d'extraits antioxydants. L'adsorption sur résines macroporeuses est une technique largement utilisée permettant la réalisation, d'une manière simple, écologique et peu coûteuse, d'enrichissement d'extraits en composés phénoliques antioxydants.

La présente thèse s'inscrit comme une contribution dans le domaine des éco-procédés d'extraction et de purification de composés bioactifs issues de sources végétales et de co-produits de l'industrie agro-alimentaire. L'extraction assistée par ultrasons a été étudiée et optimisée pour la récupération d'antioxydants phénoliques et notamment d'anthocyanines à partir d'aronia et de ses co-produits. Un modèle a été proposé pour décrire et prédire les cinétiques d'extraction d'anthocyanines et polyphénols totaux à partir de co-produits d'aronia à différentes conditions opératoires (température, composition du solvant et puissance d'ultrasons). L'étude d'adsorption des composés phénoliques extraits a permis d'enrichir considérablement la teneur des antioxydants dans les extraits. Une intégration des deux opérations extraction et adsorption a donné naissance à un nouvel éco-procédé permettant l'extraction d'antioxydants à partir de baies ou leurs co-produits et l'enrichissement simultané des extraits. Cette intégration améliore les rendements d'extraction des molécules antioxydantes, tout en économisant le temps et la consommation énergétique.

Dans le cadre de cette étude, le mémoire est organisé de la manière suivante :

Dans le premier chapitre, une revue des antioxydants naturels, des sources principales de composés phénoliques antioxydants, des techniques d'extraction et de purification de ces molécules, ainsi que des méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante des produits

obtenus a été effectuée. L'analyse bibliographique rassemble et actualise aussi les données utiles à l'évaluation des phénomènes chimiques et physico-chimiques (cinétique, thermodynamique, transfert de matière) intervenant dans la performance et la modélisation des procédés extraction solide-liquide et adsorption.

Le second chapitre concerne les méthodes appliquées dans ce travail et le matériel utilisé dans les différentes études (extraction assisté par ultrasons, adsorption, procédé intégré extraction-adsorption réalisé à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote).

Dans le troisième chapitre sont présentés et discutés les résultats obtenus lors des études d'extraction assistée par ultrasons. D'abord une étude des effets des principaux paramètres opératoires et du prétraitement de la source sur le rendement d'extraction d'antioxydants à partir de baies d'aronia est présentée. Ensuite une modélisation de la cinétique d'extraction assistée par ultrasons en fonction des paramètres opératoires les plus influents, en vue de l'optimisation de l'extraction d'antioxydants à partir de co-produits d'aronia est proposée.

Le quatrième chapitre est dédié à l'application et au développement de procédés propres pour l'obtention d'extraits enrichis en antioxydants phénoliques. L'adsorption sur différents supports solides est étudiée et optimisée avant d'être intégrée à l'extraction. Ensuite l'optimisation du nouveau procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle laboratoire et sa réalisation à l'échelle pilote sont présentées pour démontrer le potentiel de son application pour la production d'extraits riches en antioxydants phénoliques, et notamment en anthocyanines.

Enfin les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail, ainsi que les perspectives de sa continuité ont été dégagées.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

La synthèse bibliographique est organisée en 5 grands axes, correspondant aux thématiques développées dans ce travail de thèse. Tout d'abord seront présentés les composés antioxydants, puis les sources naturelles de composés antioxydants, avec un focus particulier sur l'aronia qui est la source utilisée dans ce travail de thèse. Ensuite, seront exposés les procédés d'extraction de biomolécules à partir de sources végétales, ainsi que les procédés de purification/concentration de ces biomolécules. Enfin, la dernière partie est consacrée aux méthodes de détermination de la capacité antioxydante.

I.1. Antioxydants

Les antioxydants sont des substances permettant de prévenir ou retarder l'oxydation catalytique et le rancissement naturel ou induit par l'action de divers agents (l'air, la lumière, la chaleur) (Madrid & Cenzano 2000). Ces propriétés expliquent le grand intérêt pour leur utilisation comme additif dans les domaines alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Dans cette partie sont présentés les principaux antioxydants, les sources naturelles dans lesquelles ils sont présents, ainsi que des exemples de leurs activités biologiques.

I.1.1. Classifications des antioxydants

I.1.1.1. Classification en fonction du type d'action

Une des classifications est basée sur le mécanisme d'action des antioxydants pour empêcher ou retarder l'oxydation. Les molécules permettant de piéger les radicaux libres sont considérées comme antioxydants primaires et celles qui n'impliquent pas directement la captation des radicaux libres sont considérées comme antioxydants secondaires. Les antioxydants secondaires agissent comme chélateurs d'ions métalliques capables de catalyser l'oxydation, kidnappeurs d'oxygène, en transformant les hydroperoxydes en espèces non radicalaires, en absorbant le rayonnement UV ou en désactivant l'oxygène singulet. Il existe aussi des antioxydants montrant une activité

antioxydante uniquement en présence d'autres antioxydants (en synergie) comme l'acide citrique par exemple (Pokorny 2007).

1.1.1.2. Classification par voie d'obtention

Une autre classification concerne la voie d'obtention des molécules antioxydantes. Elles peuvent être obtenues par: i) synthèse chimique, on parle alors d'antioxydants synthétiques, ou par ii) extraction à partir de sources naturelles, on parle alors d'antioxydants naturels.

Parmi les antioxydants synthétiques, sont distingués les analogues à ceux trouvés dans la nature (acide citrique, acide ascorbique, tocophérols et caroténoïdes) et ceux qui n'ont pas d'analogues dans le milieu naturel. Il est fréquent de trouver l'appellation « antioxydant naturel » pour des substances synthétisées chimiquement lorsqu'il existe un analogue naturel. Les antioxydants synthétiques sont utilisés dans de nombreux produits, notamment les produits pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires, pour leurs propriétés de stabilisation des graisses. Seuls quelques-uns des antioxydants synthétiques sont utilisés dans les aliments. Ils doivent en effet présenter une absence de toxicité pour leurs formes oxydées et pour les produits de leurs réactions avec les constituants alimentaires. Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le gallate de propyle (PG), le ter-butyle hydroquinone (TBHQ) et les tocophérols sont les antioxydants synthétiques les plus fréquemment utilisés pour la conservation des aliments.

Bien que les mécanismes d'action des antioxydants naturels et synthétiques soient les mêmes, la tendance est à éviter ou à réduire au maximum l'utilisation de substances synthétiques comme additifs alimentaires (Frankel 1998, Wanasundara & Shahidi 1998, Sherwin 1990) en raison de:

- leur faible solubilité dans l'eau,

- la sensibilisation des consommateurs sur les questions de sécurité alimentaire, de toxicité et de répercussions sur la santé liées aux actions biologiques de ces substances.

Certaines études chez les animaux ont montré des effets néfastes des antioxydants synthétiques (notamment les 2 antioxydants synthétiques les plus utilisés, le BHA et le BHT) après une longue période d'ingestion (Thompson & Moldeus 1988, Saber & Al-Nughamish 1999). Ainsi, ces dernières années, de nombreux travaux ont été consacrés à l'identification de substances naturelles présentant une capacité antioxydante, dans le but de minimiser la consommation d'antioxydants synthétiques. Les antioxydants d'origine naturelle sont a priori une alternative plus saine et plus sûre par rapport aux antioxydants synthétiques. La sécurité sanitaire des composés naturels ne peut toutefois pas être considérée comme acquise, et des études sur les éventuels effets toxiques des substances d'origine naturelle sont nécessaires (Pokorny & Parkányiová 2004). Les principales familles de composés antioxydants naturels sont présentées ci-dessous.

I.1.2. Composés antioxydants naturels

Les composés antioxydants naturels peuvent être d'origine animale ou végétale. Les antioxydants d'origine animale sont principalement des protéines ou des acides aminés (Ericsson 2002). Les végétaux, quant à eux, offrent une grande variété de composés de hauts et faibles poids moléculaires avec des propriétés antioxydantes, les principaux étant les tocophérols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les composés phénoliques (Ericsson 2002, Hagerman et al. 1998). La plupart des composés antioxydants naturels étudiés pour des applications dans l'industrie alimentaire sont des composés phénoliques. Le terme « polyphénols » est couramment utilisé pour désigner l'ensemble des composés phénoliques. Cependant, suivant les définitions, les polyphénols ne correspondent strictement qu'à une sous-partie du groupe des composés phénoliques. D'après Shahidi & Naczk (1995), le groupe des polyphénols est défini comme l'ensemble des composés phénoliques comportant au moins deux sous-unités phénoliques. Les principaux types de composés phénoliques sont présentés ci-dessous.

1.1.2.1. Acides phénoliques

Ces composés peuvent être divisés en deux catégories: les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Leurs structures chimiques sont présentées dans le Tableau I.1.

Les acides hydroxybenzoïques, comme l'acide gallique et l'acide protocatéchique, ne présentent pas un grand intérêt nutritionnel. Leur teneur dans les plantes comestibles est généralement très faible, sauf pour certains fruits rouges, notamment les mûres et les framboises, qui en contiennent respectivement jusqu'à 270 et 100 mg/kg de matière fraîche (Shahidi & Naczk 1995). Les feuilles de thé sont une source importante d'acide gallique, avec des teneurs allant jusqu'à 4,5 g/kg de matière fraîche (Tomas-Barberan & Clifford 2000), et l'huile d'olive présente une concentration d'environ 0,22 mg/kg d'acide protocatéchique (Macheix et al. 1990, Cabrini et al. 2001). Toutefois, l'acide protocatéchique semble être métabolisé lors de la digestion humaine à partir d'anthocyanines, notamment la cyanidine-3-glucoside. Ainsi, l'ingestion d'aliments riches en cyanidines permettrait indirectement un apport en acide protocatéchique (Vitaglione et al. 2007).

Les acides hydroxycinnamiques correspondent principalement aux acides coumarique, caféique et férulique, qui sont rarement à l'état libre. Les formes liées sont des dérivés glycosylés ou des esters de l'acide quinique, shikimique ou tartrique. L'acide caféique et l'acide quinique se combinent pour former l'acide chlorogénique, qui se trouve dans de nombreux types de fruits (par exemple environ 2 g/kg de matière fraîche d'après Macheix et al. 1990) et à des concentrations élevées dans le café (une seule tasse peut contenir jusqu'à 350 mg d'acide chlorogénique) (Clifford et al. 2000). L'acide caféique est l'acide phénolique le plus abondant, représentant entre 75 et 100% du total des acides hydroxycinnamiques contenus dans la plupart des fruits: par exemple dans les kiwis il est possible de trouver jusqu'à 1 g d'acide caféique par kg de matière fraîche. L'acide férulique est l'acide phénolique le plus abondant dans les grains de céréales: sa teneur dans les grains de blé est d'environ 0,8 à 2 g/kg de matière sèche, ce qui peut représenter jusqu'à 90% des polyphénols totaux (Sosulski et al. 1982, Lempereur et al. 1997).

1.1.2.2. Alcools phénoliques

Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenylethanol) sont les deux principaux alcools phénoliques. Leur structure chimique est présentée dans le Tableau I.1. On les trouve principalement dans l'huile d'olive vierge extra (40,2 et 3,8 mg/kg, respectivement) (Cabrini et al. 2001). Le Tyrosol est également présent dans les vins rouges et blancs et dans la bière (Covas et al. 2003), tandis que l'hydroxytyrosol se trouve aussi dans le vin rouge et est en plus produit *in vivo* après l'ingestion de vin rouge (de la Torre et al. 2006).

1.1.2.3. Stilbènes

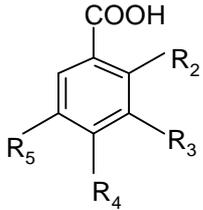
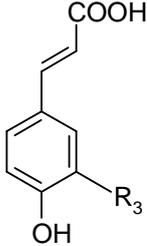
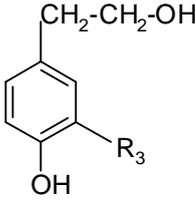
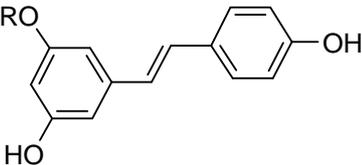
Les stilbènes sont présents en faibles quantités dans l'alimentation humaine (structure chimique dans le Tableau I.1.). Le principal représentant est le resvératrol, qui existe sous forme isomérique *cis* et *trans*, mais surtout sous forme glycosylée. Il est produit par les plantes en réponse à l'infection par des agents pathogènes (Delmas et al. 2006) ou à des conditions de stress (Bavaresco et al. 2003). Il a été détecté dans plus de 70 espèces de plantes, y compris les raisins, les baies et les arachides. La peau des raisins rouges est particulièrement riche en resvératrol (50-100 g/kg) (Baliga et al. 2005), ce qui contribue à une concentration relativement élevée de resvératrol dans le vin rouge et le jus de raisin (jusqu'à 7 mg/L d'aglycones et 15 mg/L de glycosides dans le vin rouge) (Bertelli et al. 1998, Bhat & Pezzuto 2002). De nombreuses études démontrent des effets anticancéreux du resvératrol (Hsieh et al. 2005, Garvin et al. 2006, Atten et al. 2005).

1.1.2.4. Lignanes

Les lignanes sont produites par dimérisation oxydative de deux unités de phénylpropane, et sont essentiellement présentes dans la nature à l'état libre, tandis que leurs dérivés glycosidiques sont peu répandus. Le lin représente la principale source alimentaire, contenant jusqu'à 3,7 g/kg de matière sèche de sécoisolaricirésinol

(Adlercreutz et al. 1997). La microflore intestinale métabolise les lignanes en entérodiol et entérolactone. L'intérêt pour les lignanes et leurs dérivés se développe en raison des leurs applications potentielles dans la chimiothérapie du cancer et divers autres effets pharmacologiques (Saleem et al. 2005).

Tableau I.1. Structure chimique de certains composés phénoliques d'origine végétale.

Acides Hydroxybenzoïques C6-C1					
		<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
	Acide Gallique	H	OH	OH	OH
	Acide Salicilique	OH	H	H	H
	Acide Protocatéchique	H	OH	OH	H
Acides Cinnamiques C6-C3					
		<i>R3</i>			
	Acide Caféique	H			
	Acide <i>p</i> -Coumarique	H			
Alcool Phénolique C6-C2					
		<i>R3</i>			
	Tyrosol	H			
	Hydroxytyrosol	H			
Stilbènes C6-C2-C6					
	Resveratrol	H			
	Picéide	D-glucose			

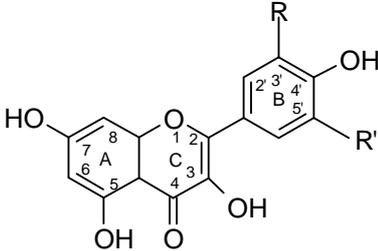
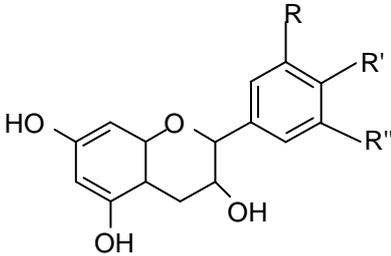
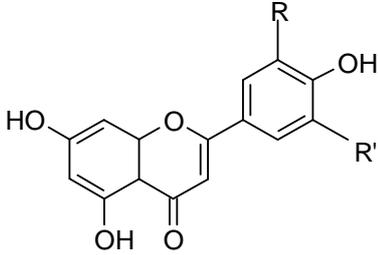
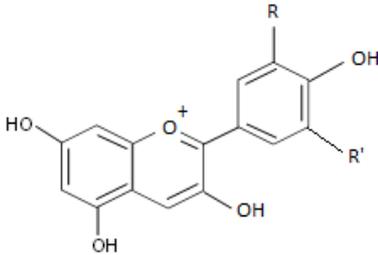
1.1.2.5. Flavonoïdes

La famille des flavonoïdes peut être divisée en 6 sous-classes, en fonction de l'état d'oxydation de l'anneau central pyranique (Tableau I.2): les flavones, les flavanones, les isoflavones, les anthocyanidines et les flavonols (catéchines et proanthocyanidines). Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés chez les plantes, et la liste ne cesse de croître (Harborne & Williams 2000). C'est en raison de l'existence de nombreux schémas de substitution, dans lesquels les substituants primaires (comme le groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (par exemple glycosylés ou acylés), ce qui donne parfois des structures très complexes.

Les flavonols ont une double liaison entre C2 et C3, par un groupe hydroxyle en position C3 (Tableau I.2.). Ils représentent les flavonoïdes les plus présents dans les aliments, en particulier la quercétine. Les principales sources de flavonols sont les oignons (jusqu'à 1,2 g/kg de matière fraîche), les choux frisés, les poireaux, les brocolis et les bleuets. Le thé et le vin rouge contiennent également jusqu'à 45 et 30 mg/L de flavonols, respectivement. Il est important de noter que la biosynthèse des flavonols est stimulée par la lumière, de sorte qu'ils s'accumulent dans les tissus externes des fruits. Des différences de concentration peuvent exister entre les fruits sur le même arbre, et même entre les différentes parties d'un même fruit, en fonction de l'exposition au soleil (Cortell & Kennedy 2006).

Les flavones ont une double liaison entre C2 et C3, et sont les flavonoïdes les moins fréquents. Le persil et le céleri représentent les seules sources alimentaires importantes de flavones. La peau des fruits contient de grandes quantités de flavones polyméthoxylés: par exemple leur teneur est de 6,5 g/L d'huile essentielle de peau de mandarine.

Tableau I.2. Structure chimique de certains composés flavonoïdes.

Flavones				
		<i>R</i>	<i>R'</i>	
	Kaempférol	H	H	
	Quercétine	OH	H	
Flavan-3-ols				
		<i>R</i>	<i>R'</i>	<i>R''</i>
	Catéchine	OH	OH	
	Gallocatechine	OH	OH	OH
Flavonones				
		<i>R</i>	<i>R''</i>	
	Apigénine	H	H	
	Lutéoline	OH	H	
Anthocyanidines				
		<i>R</i>	<i>R'</i>	
	Cyanidine	OH	H	
	Malvidine	OCH ₃	OCH ₃	

Les flavanones sont caractérisés par la présence d'une chaîne de trois atomes de carbone saturés et un atome d'oxygène dans le C4. Ils sont généralement glycosylés par

un disaccharide en C7. Les flavanones sont présents en concentrations élevées uniquement dans les agrumes, mais ils sont également présents dans les tomates et certaines plantes aromatiques comme la menthe. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespérétine dans les oranges et l'ériodictyol dans les citrons. Le jus d'orange contient 470 à 761 mg/L d'hespéridine et 20 à 86 mg/L de narirutine (Leuzzi et al. 2000). Les parties solides d'agrumes, en particulier la partie spongieuse blanche (albédo) et les membranes séparant les segments, ont une très forte teneur en flavanone; le fruit entier peut en contenir jusqu'à 5 fois plus qu'un verre de jus d'orange.

Les isoflavones ont des similarités structurelles avec les œstrogènes (groupes hydroxyles en C7 et C4). Ils peuvent se lier aux récepteurs des œstrogènes et être classés comme des phytoestrogènes. Les isoflavones se trouvent presque exclusivement chez les légumineuses. Le soja et ses produits transformés représentent la principale source d'isoflavones, et contiennent les trois principales molécules (génistéine, daidzéine et glycitéine). Le soja contient entre 140 et 1530 mg d'isoflavones par kg de matière fraîche et le lait de soja peut en contenir entre 12 et 130 mg/L (Reinli & Block 1996, Eisen et al. 2003). Les isoflavones sont sensibles à la chaleur et sont souvent hydrolysés en glycosides au cours du traitement et du stockage industriel, tels que la production de lait de soja (Eisen et al. 2003).

Parmi les anthocyanidines, le groupe le plus connu est celui des anthocyanines, qui sont des pigments solubles dans l'eau, responsables de la couleur rouge, bleue et violette des fruits, légumes, fleurs et autres tissus végétaux (Mazza et al. 2004). Les anthocyanines sont largement présentes dans l'alimentation humaine: elles se trouvent dans le vin rouge, certaines variétés de céréales et certains légumes (choux, haricots, oignons, radis), mais sont plus abondantes dans les fruits, et en particulier dans les fruits rouges. La teneur en anthocyanines dans les aliments est généralement proportionnelle à l'intensité des couleurs, et peut atteindre jusqu'à 4 g/kg de matière fraîche dans le cassis ou les mûres. Les anthocyanines se trouvent principalement dans la peau, à l'exception de quelques fruits rouges (cerises et fraises) pour lesquels on les trouve également dans la chair. Le vin peut contenir jusqu'à 350 mg/L d'anthocyanines qui se transforment en diverses structures complexes lorsque le vin vieillit (Es-Safi et al. 2002, Brouillard et al. 1997).

Les flavanols contiennent une chaîne à trois carbones saturés avec un groupe hydroxyle en C3. Il existe des flavonols monomériques (catéchines) et polymériques (proanthocyanidines). Contrairement à d'autres classes de flavonoïdes, les flavanols ne sont pas glycosylés dans les aliments. Les principaux flavanols présents dans les fruits sont la catéchine et l'épicatéchine, alors que la gallocatéchine, l'épigallocatéchine et le gallate d'épigallocatéchine se trouvent surtout dans le thé (Arts et al. 2000a, Arts et al. 2000b). Les catéchines sont présentes dans de nombreux fruits comme les abricots (250 mg/kg de matière fraîche) et les cerises (250 mg/kg de matière fraîche). Le thé vert (jusqu'à 800 mg/L) et le chocolat (jusqu'à 600 mg/L) sont les sources les plus riches en catéchines, qui sont également présentes dans le vin rouge (jusqu'à 300 mg/L). Les proanthocyanidines, aussi connues comme tanins condensés, sont des dimères, oligomères et polymères de catéchines. Il est très difficile d'évaluer la teneur en proanthocyanidines des aliments parce-qu'elles présentent des structures et des poids moléculaires très divers: par exemple dans les pommes à cidre, le degré de polymérisation varie entre 4 et 11 (Guyot et al. 2001). Les proanthocyanidines sont responsables du caractère astringent des fruits (raisins, pommes, petits fruits, etc) et des boissons (vin, cidre, thé, bière, etc), et de l'amertume du chocolat (Rasmussen et al. 2005). Cette astringence évolue au cours de la maturation et souvent disparaît lorsque le fruit arrive à maturité.

I.1.3. Activité biologique des composés antioxydants naturels

Les bénéfices liés à la consommation des fruits et des légumes contre certaines maladies (cancer, maladies cardiovasculaires, cataracte, diabète, hépatite, arthrite, immunodéficiences et maladies dégénératives) ont été attribués notamment à la présence d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, le β -carotène, l' α -tocophérol et les composés phénoliques (Youdim et al. 2003, Di Matteo & Esposito 2003, Middleton et al. 2000, Aruoma 1999). Il a été démontré que les composés phénoliques réduisent l'oxydation in vitro des lipoprotéines de basse densité (« low density lipoproteins » LDL) (Meyer et al. 1998), cet effet étant plus important avec les composés phénoliques ayants plusieurs groupes hydroxyles. La régénération de l' α -tocophérol dans les LDL des humains en présence de catéchines provenant du thé a été

confirmée (Zhu et al. 1999). D'autres activités physiologiques des antioxydants naturels ont été démontrées comme l'activité antibactérienne (Ulubelen 2003), antivirale, anti-mutagène (Ikken et al. 1999), antiallergique (Noguchi et al. 1999), anticancéreuse (Cai et al. 2004), inhibitrice de l'augmentation de la pression artérielle, anti-ulcère (Vilegas et al. 1999) et anti-cariogène (Tanabe et al. 1995).

I.2. Sources de composés antioxydants naturels

Les composés antioxydants naturels peuvent être issus de sources animales ou végétales. La plupart des molécules d'origine animale valorisées comme antioxydants sont des protéines ou des acides aminés (Ericsson 2002). Chez les végétaux, il y a un grand potentiel de composés ayant une activité antioxydante, et les sources sont très nombreuses et variées : plantes, fruits, légumes, céréales, graines... Un panorama des sources végétales contenant des composés antioxydants est présenté ci-dessous.

I.2.1. Sources végétales d'antioxydants

Les fruits représentent une source importante de composés phénoliques. En particulier, les fruits et baies rouge et bleu foncé ont les capacités antioxydantes les plus importantes (Wu et al. 2004). Différentes familles de composés phénoliques (acides hydroxycinamiques, hydroxybenzoïques, flavonoïdes, alcools phénoliques) ayant une activité antioxydante élevée ont été identifiées dans des fruits très divers : baies (Mattila et al. 2006, Taruscio et al. 2004), cerises (Wang et al. 1999), mûres (Zhishen et al. 1999), grenades (Singh et al. 2002, Chidambara et al. 2002), raisins (Connor et al. 2002, Saint-Cricq de Gaulejac et al. 1999, Jayaprakasha et al. 2003, Talcott et al. 2002), agrumes (Jayaprakasha & Patil 2007, Gorinstein et al. 2004), kiwis (Imeh & Khokhar 2002, Dawes & Keene 1999), olives et huiles d'olive (Obied et al. 2007, Morello et al. 2005). Une activité antioxydante a également été détectée dans la partie fibreuse de différents légumes et céréales (Yu et al. 2002, Peterson 2001, Zielinski & Kozłowska 2000).

Les composés phénoliques provenant de plantes aromatiques et médicinales ont également fait l'objet de nombreux travaux pour des utilisations potentielles dans les domaines alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Des composés phénoliques ayant une activité antioxydante ont été identifiés dans des plantes médicinales comme la sauge (Ollanketo et al 2002, Lu & Foo 2001, Aruoma 1999), le thym (Miura et al. 2002, Yanishlieva et al. 1999), le basilic (Juntachote & Berghofer 2005, Javanmardi et al. 2003), le romarin (Wellwood & Cole 2004), la zédoaire (curcuma) (Mau et al. 2003) et le millepertuis (hypericum) (Silva et al. 2005). Certaines graines de plantes sont

également sources de molécules antioxydantes, comme les graines de canola (Naczki et al. 1998), de sésame (Chang et al. 2002), de lupin (Tsaliki et al. 1999), de moringa (*oleifera*) (Lalas & Tsaknis 2002) et de tournesol (Kubicka et al. 1999).

Les feuilles, racines, tiges et écorces de divers arbres sont également une source potentielle de composés antioxydants (Moure et al. 2005, Siddhuraju et al. 2002, Chung et al. 1999, Zainol et al. 2003, Mohd Zin et al. 2002).

I.2.2. Co-produits agricoles et alimentaires

Les déchets agricoles et les co-produits alimentaires représentent aussi une source intéressante d'antioxydants naturels. Des antioxydants phénoliques ont été identifiés dans des co-produits très divers comme des pelures de pomme de terre (Kanatt et al. 2005), des alpechines (résidus du pressage d'huile d'olive) (Visioli et al. 1999), des pépins de raisin et autres résidus solides obtenus après le pressage du raisin pour la production de vin ou de jus de raisin (Jayaprakasha et al. 2003, Jayaprakasha et al. 2001, Yamaguchi et al. 1999, Shaker 2006, Louli et al. 2004, Larrauri et al. 1998), des pelures de pomme (Lu & Foo 1999), des graines et peaux d'agrumes (Bocco et al. 1998), des déchets de carotte (Chen & Tang 1998), des résidus de feuilles de thé (après infusion) (Farhoosh et al. 2006), des sous-produits de coco (Azizah et al. 1999), des résidus de production d'huiles essentielles d'orange (Arispuro Vargas et al. 1998) et d'huiles de graines (Matthaeus 2002), de la mélasse de soja (Hosny & Rosazza 1999), des coquilles d'arachides (Xing & White 1997), des coquilles d'amandes (Moure et al. 2007, Pinelo et al. 2004) et des cosses de fèves (Duh et al. 1997).

Certains travaux étudient la possibilité de valoriser des co-produits d'origine animale en récupérant des protéines bioactives (Flaczyk et al. 2003, Sakanaka et al. 2004), notamment à partir de co-produits de poisson (Wu et al. 2003, Jun et al. 2004).

I.2.3. Baies d'aronia : une source végétale riche en composés phénoliques

Dans cette partie, l'aronia est présentée de façon plus détaillée, puisqu'il s'agit de la source qui a été retenue pour ce travail de thèse. L'ensemble des expérimentations ont été conduites à partir de baies d'aronia ou de co-produits de ces baies (résidus du pressage de jus d'aronia).

L'aronia est une baie originaire d'Amérique du Nord. Dans la première partie du 20^{ème} siècle, elle fut introduite dans l'Est de l'Europe, et plus particulièrement en Union Soviétique où elle est notamment utilisée comme source de colorants naturels (Kokotkiewicz et al. 2010).

Aronia désigne à la fois la baie et la plante dont elle est issue, qui fait partie de la famille des *Rosaceae*. Deux espèces peuvent être distinguées: *Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliot (black chokeberry, aronia noire) et *Aronia arbutifolia* [L.] Elliot (red chokeberry, aronia rouge) (Hardin 1973). Les autres noms communément utilisés pour désigner la baie d'aronia sont black apple berry et rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.). L'espèce utilisée pour la production de fruits est *Aronia melanocarpa* (Lehmann 1982, McKay 2008, Ara 2002, Lehmann 1990). Les arbustes d'Aronia ont des fleurs blanches et peuvent atteindre une hauteur de 2-3 m (Figure I.1). Ils donnent des baies rouges vif (aronia rouge) ou noires violacées (aronia noire ; Ø 6-13 mm ; 0,5-2 g) (Seidemann 1993, Strigl 1995, Ara 2002, Fan-Yung & Rechits 1977). La récolte est effectuée mécaniquement entre Août et Septembre. Cinq à douze tonnes par hectare peuvent être obtenues (pour des plantes matures) (McKay 2008, Ara 2002). A titre d'exemple, la production d'aronia en Pologne dans la période 2009-2012 est de 45 000 t/an (Sojka et al. 2013).

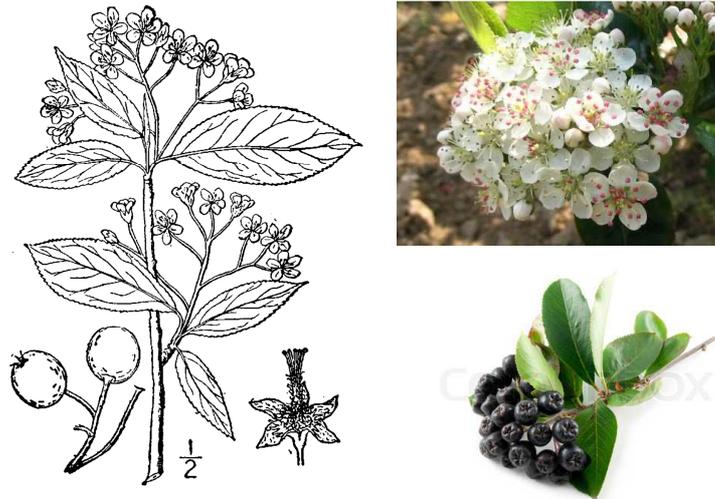


Figure I.1. Plante et baies d'aronia.

Les baies d'aronia sont comestibles et reconnues comme une bonne source de fibres, avec des quantités importantes de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Elles contiennent également du sorbitol, substitut du sucre n'augmentant pas la glycémie. Elles sont très riches en de nombreuses substances phénoliques, majoritairement des polyphénols (Kulling & Rawel 2008), qui participent à des fonctions protectrices et structurales des plantes, et sont responsables des saveurs d'astringence et d'amertume des baies (Soto et al. 2011). Les baies contiennent en particulier de fortes teneurs en anthocyanines, pigments violet intense, qui donnent leur couleur aux baies.

Ainsi, initialement les baies d'aronia ont été cultivées pour une utilisation comme colorant alimentaire naturel (Ara 2002, Bridle & Timberlake 1997). Aujourd'hui la principale utilisation des baies d'aronia est la production de jus de fruits (environ 90%) (Makarenko 2008). Le jus d'aronia est très riche en anthocyanines et présente la plus forte capacité antioxydante parmi les jus de fruits (Kulling and Rawel, 2008). Le résidu après l'extraction du jus par pressage (co-produit de l'industrie alimentaire) représente jusqu'à 16 % de la masse initiale des baies (Baranowski et al. 2009) et est une source très riche en composés phénoliques (8,19 g/100 g m.s., Oszmianski & Wojdylo, 2005). Les baies d'aronia peuvent également être utilisées pour la production de liqueurs, de thé fruité, de vins et de produits cosmétiques (Ara 2002, Makarenko 2008).

La teneur élevée en polyphénols des baies d'aronia (jusqu'à 7,85 g/100 g m.s.), en particulier en anthocyanines (jusqu'à 1,96 g/100 g m.s.), en fait un fruit d'intérêt, et de nombreuses études ont été menées pour étudier les activités biologiques des anthocyanines issues d'extraits d'aronia (Kulling & Rawel 2008). Les anthocyanines se montrent particulièrement intéressantes par leur activité similaire à celle de la vitamine P en renforçant la paroi capillaire (Wagner 1985), mais également pour une potentielle utilisation dans le traitement des glaucomes et autres troubles oculaires (Ghosh & Konishi 2007). Des études ont également décrit d'autres effets dans le domaine de la santé pour les anthocyanines contenues dans des extraits d'aronia : inhibition de la prolifération du cancer du côlon (Malik et al. 2003), anti-mutagène (Gasiorowski et al. 1997), anti-diabète et cardioprotecteur (Kulling & Rawel 2008). Cela serait principalement lié à leur capacité antioxydante (Gasiorowski et al. 1997).

I.3. Extraction de biomolécules à partir de sources végétales

En raison de son efficacité et de sa facilité de mise en œuvre, l'extraction solide-liquide est la technique la plus utilisée pour la récupération de molécules bioactives à partir de sources végétales. Elle est largement appliquée en industries agro-alimentaire et pharmaceutique pour extraire des composés d'intérêt à partir des plantes pour la production de boissons et de médicaments, par exemple.

I.3.1. Principe et mécanisme de l'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une opération physique de transfert de matière entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction (Leybros & Frémeaux 1990). Suite au contact entre le solvant et le solide hétérogène, les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et passent de la phase solide dans la phase liquide. Au cours de l'extraction, leurs teneurs (fractions) dans la phase solide diminuent et leurs concentrations dans la phase liquide augmentent. Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire et par convection. L'extraction est un processus non stationnaire qui s'arrête au moment où s'établit un équilibre entre les deux phases. Cependant si le solvant est continuellement renouvelé, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide (Dibert 1989).

Généralement, l'extraction n'est pas très sélective. En plus des molécules d'intérêt, d'autres substances sont également co-extraites à partir de la phase solide vers le solvant. La solution obtenue est appelée extrait. La matière solide obtenue après évaporation du solvant est aussi appelée extrait ou extrait sec. La source solide épuisée après l'extraction contient très peu ou pas de soluté. Elle est appelée raffinat ou résidu.

Dans certains cas, la matière végétale est prétraitée avant l'extraction pour améliorer le contact entre les phases. Le séchage, le broyage et le morcellement sont souvent utilisés comme opérations de prétraitement. Parfois, des prétraitements enzymatiques sont également utilisés pour faciliter la dissolution des molécules d'intérêt dans le solvant. La rupture des parois cellulaires sous l'action de pectinases et cellulases favorise l'extraction des polyphénols (Bonilla et al. 1999).

Après l'extraction, l'extrait obtenu est séparé du solide épuisé par sédimentation, filtration ou centrifugation. Finalement, un extrait sec peut être obtenu par un séchage approprié (atomisation ou lyophilisation, par exemple). Les extraits secs peuvent être conservés longtemps et utilisés comme des ingrédients dans des industries alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique.

Au cours de l'extraction plusieurs étapes successives peuvent être distinguées :

- pénétration du solvant dans la matrice solide,
- dissolution du soluté dans le solvant,
- diffusion du soluté vers l'extérieur de la matrice solide,
- transfert du soluté vers le cœur de la phase liquide (par diffusion ou convection)

La durée de l'extraction solide-liquide est déterminée par l'étape la plus lente qui contrôle la vitesse de l'opération. Le plus souvent il s'agit de l'étape de diffusion interne dans la matrice végétale.

I.3.2. Cinétique de l'extraction solide-liquide

La vitesse d'extraction peut être exprimée en termes de masse de solutés dissous par unité de temps ou par la variation de la fraction de ces molécules dans le solide par unité de temps.

La vitesse de transfert, mesurée par le flux de matière transférée par unité de temps et par unité de surface d'interface, dépend directement des écarts à l'équilibre, appelés potentiels de transfert globaux ou potentiels d'échange. Le potentiel de transfert propre à chaque phase s'exprime par la différence positive entre la concentration moyenne du soluté dans la phase considérée et sa concentration à l'interface.

A toute expression définissant le potentiel d'échange correspond un coefficient de transfert, qui dépend des propriétés physico-chimiques du système et des conditions hydrodynamiques (Poirot 2007).

La description mathématique de l'extraction solide-liquide est très complexe à cause de nombreuses difficultés :

- la forme irrégulière de la source solide ;
- la polydispersion de la phase solide (particules de tailles différentes) ;
- la structure spécifique de chaque source solide ;

- l'anisotropie du solide dans certains cas ;
- le changement de la structure au cours de l'extraction (gonflement considérable de la matrice végétale suite à la pénétration du solvant) ;
- les variations de la teneur de la substance d'intérêt dans la source solide ;
- l'extraction simultanée compétitive d'autres substances du solide ;
- l'influence du traitement préliminaire mécanique ou thermique.

Il est donc pratiquement impossible à prédire exactement la vitesse d'extraction dans un système non étudié. Deux solutions sont envisageables :

- proposer une modélisation mathématique avec plusieurs hypothèses simplificatrices (souvent un tel modèle ne correspond pas vraiment à la situation réelle d'extraction) ;
- réaliser une approche expérimentale pour chaque couple solide-liquide afin de trouver les meilleures conditions opératoires en variant les paramètres opératoires du procédé (l'expression de la concentration en fonction du temps de contact entre les deux phases permet de décrire la cinétique d'extraction).

Plusieurs modèles ont été développés pour simuler les situations réelles et représenter au mieux les caractéristiques du transfert de matière entre les deux phases. Etant donné que généralement c'est la diffusion interne qui est l'étape limitant la vitesse d'extraction, c'est le modèle diffusionnel qui est souvent utilisé (Cacace & Mazza 2003, Cisse et al. 2012).

1.3.2.1. *Modèle diffusionnel*

Le concept de vitesse de diffusion à l'intérieur d'une matrice solide est difficile à étudier. Dans les situations pratiques, les conditions ne sont pas stationnaires, avec une concentration du soluté qui varie avec le temps et la position dans la particule. Cette diffusion est généralement décrite par la seconde loi de Fick :

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -D_x \nabla^2 X \quad (\text{I.1})$$

où X est la teneur en soluté du solide et D_x le coefficient de diffusion moléculaire du soluté.

Cette équation est valide pour la diffusion d'un soluté dans un corps poreux rigide à condition que la structure soit considérée comme quasi homogène et macroscopiquement isotrope. Dans le cas de la matière végétale, le coefficient de diffusion moléculaire utilisé habituellement est un coefficient de diffusion apparent qui tient compte de la porosité et de la tortuosité de la matrice solide (Wongkittipong et al. 2004).

Une résolution analytique est accessible lorsque le transfert est supposé monodirectionnel et le coefficient de diffusion constant. Par contre, dans le cas où celui-ci est variable, des résolutions numériques sont nécessaires.

Ce modèle physique est bien adapté pour décrire l'extraction à partir de particules de forme et taille uniformes. Cependant il est difficile d'utiliser un tel modèle dans les cas de taille et forme irrégulières des particules et lorsque la structure, la forme et la taille des particules changent considérablement au cours de l'extraction pour différentes raisons : gonflement de la matrice végétale sous l'action du solvant, agglomération des particules ou réduction de leur taille et modification de leur structure provoquées par l'application d'ultrasons ou par des collisions dans le cas d'agitation importante etc. Dans des cas aussi complexes, il s'avère plus pratique d'utiliser des équations empiriques comme le modèle de Peleg.

1.3.2.2. Modèle de Peleg

Le modèle de Peleg a été proposé pour la description du processus de sorption (déshydratation / réhydratation) (Peleg 1988). Même si ce modèle ne dérive pas des lois physiques, l'intérêt de son application pour décrire le transfert de matière a été démontré par plusieurs chercheurs (Bucic-Kojic et al. 2007, Vega-Gálvez et al. 2009, Mahir et al. 2002). En raison de la similitude entre les cinétiques de l'extraction et de la sorption, il est possible de modéliser la cinétique d'extraction en utilisant l'équation de Peleg, adaptée pour l'extraction solide-liquide (Bucic-Kojic et al. 2007) :

$$C(t) = C_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t} \quad (I.2),$$

où t est le temps d'extraction, C_0 est la concentration initiale, $C(t)$ est la concentration à l'instant t , K_1 est un coefficient dépendant de la vitesse maximale d'extraction et K_2 est un coefficient dépendant de la concentration maximale.

I.3.3. Performances de l'extraction solide-liquide

L'extraction idéale est caractérisée par une productivité élevée, un rendement maximum, une sélectivité adaptée à l'objectif visé et une concentration maximale de l'extrait. Cependant certains de ces facteurs peuvent être antagonistes comme par exemple le rendement et la concentration. Un compromis est à définir dans la pratique (Cissé 2010).

I.3.3.1. Productivité

La productivité correspond à la masse d'extrait obtenu par unité de temps. Elle est évidemment liée à la cinétique de l'extraction.

I.3.3.2. Rendement

Le rendement est un paramètre qui tient compte de l'efficacité de l'opération. Dans le cas de l'extraction solide-liquide différents types de rendement peuvent être utilisés :

- la quantité d'extrait sec par rapport à la quantité initiale de la source végétale ;
- la quantité de la substance d'intérêt extraite (ou du groupe de substances d'intérêt) par rapport à la quantité initiale de la source végétale ;
- la quantité de la substance d'intérêt extraite par rapport à la quantité de cette substance initialement présente dans la source végétale.

1.3.3.3. Teneur en substance d'intérêt (pureté de l'extrait)

La quantité de la substance d'intérêt extraite par rapport à la quantité d'extrait sec total correspond à la teneur (ou la fraction) de cette substance dans l'extrait. Ce paramètre est utilisé pour caractériser la sélectivité de l'extraction.

1.3.3.4. Concentration de l'extrait

L'extrait obtenu après l'extraction subit généralement d'autres opérations telles que la concentration, le séchage, etc. Il est donc important d'avoir un extrait aussi concentré que possible. En effet, la consommation énergétique des procédés de concentration qui suivent l'étape d'extraction sera d'autant plus importante que l'extrait sera plus dilué (Cissé 2010).

1.3.4. Paramètres influençant l'extraction solide-liquide

1.3.4.1. Nature du solvant

La solubilité des composés phénoliques est régie par leur nature chimique dans la plante, qui peut varier du simple au très fortement polymérisé. Il y a aussi toujours la possibilité d'interaction entre les composés phénoliques et d'autres composants tels que les glucides et les protéines qui peuvent conduire à la formation de complexes insolubles. Les rendements d'extraction et l'activité antioxydante des extraits dépendent du type de solvant utilisé, en raison de différences de potentiel antioxydant des composés en fonction de la polarité (Julkunen-Tiito 1985, Marinova & Yanishlieva 1997).

La nature du solvant est très importante pour pouvoir extraire les molécules d'intérêt et, si possible, de façon sélective. Le solvant doit avoir une affinité importante pour les molécules ciblées et posséder une grande capacité de dissolution. Une faible viscosité facilitera la pénétration du solvant dans la matrice solide ainsi que le transfert de matière au sein de la phase liquide. Une température d'ébullition peu élevée permettra de séparer les molécules extraites et le solvant en utilisant moins d'énergie. Il est toujours préférable d'utiliser des solvants ininflammables et non explosifs. En vue d'application des extraits dans les industries alimentaires, cosmétiques ou

pharmaceutiques, il est important d'utiliser des solvants non toxiques. Généralement, pour l'extraction d'antioxydants, des solvants « food grade » sont utilisés.

L'eau est souvent utilisée comme solvant pour l'extraction de biomolécules à partir de sources végétales. Sa polarité permet de dissoudre beaucoup de composés phénoliques antioxydants polaires. Pour des antioxydants peu polaires ou apolaires des solvants plus hydrophobes sont mieux adaptés. Les solvants tels que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, ainsi que leurs mélanges avec l'eau sont largement utilisés pour l'extraction des composés phénoliques. Les mélanges extraient souvent mieux les substances ciblées que les solvants purs (Yilmaz & Toledo 2006, Pinelo et al. 2005, Penchev et al. 2010). Par exemple, l'extraction des composés phénoliques à partir des légumineuses est optimale en utilisant un mélange éthanol / eau 70/30 vol. comme solvant (Prati et al. 2007).

Pour l'obtention d'extraits d'antioxydants phénoliques, l'eau et l'éthanol sont les solvants les plus couramment utilisés pour des raisons d'absence de toxicité et d'abondance, même si parfois il y a des solvants plus efficaces. Lorsque l'objectif de l'extraction est d'analyser la teneur de certains composés phénoliques dans les sources végétales les restrictions sont moindres et dans ces cas d'autres solvants (méthanol, acétate d'éthyle, éther éthylique etc.) sont aussi utilisés (Wang & Weller 2006).

1.3.4.2. pH d'extraction

La polarité de beaucoup de composés varie avec le pH du solvant. Par conséquent, leur solubilité dépend aussi de l'acidité/basicité du solvant. Par exemple, Sheabar & Neeman (1988) ont constaté une extraction maximale de polyphénols à partir de grignons d'olive à pH 4. L'extraction à différents pH peut aussi permettre d'obtenir des extraits riches en différents groupes de substances. Par exemple, une extraction à pH 6 a permis d'obtenir de meilleurs rendements en composés phénoliques, tandis que le pH 10 a été optimal pour extraire les acides gras et les protéines à partir de fibres d'avoine (Lehtinen & Laakso 1988).

1.3.4.3. Taille des particules

La source est souvent préalablement découpée ou broyée pour faciliter l'extraction. La réduction de la taille des particules augmente la surface d'échange et ainsi la vitesse d'extraction (Bucic-Kojic et al. 2007). La diffusion interne est aussi plus rapide dans le cas de particules fines. Cependant les particules de taille très fine posent des problèmes technologiques comme par exemple, un tassement du lit de solides provoquant une diminution de la perméabilité du lit au solvant et l'établissement de courants préférentiels et d'endroits du lit où le solvant ne circule pas (Mafart & Béliard, 1992). Les particules très fines sont également plus difficiles à séparer de l'extrait liquide après la fin de l'extraction.

1.3.4.4. Température

L'augmentation de la température accroît la solubilité et la diffusivité dans la solution et réduit sa viscosité. La chaleur facilite l'extraction aussi car elle augmente la perméabilité des parois cellulaires. Cependant cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction.

Une température excessive peut provoquer une dénaturation des produits à extraire. Des températures élevées au cours de l'extraction ou du séchage affectent la stabilité de certains composés phénoliques en raison de réactions impliquant des dégradations chimique et enzymatique, ou une décomposition thermique. Larrauri et al. (1997) ont constaté que la température est le paramètre le plus influant sur la modification des polyphénols. Plusieurs études ont montré une thermodestruction de certaines anthocyanines à températures élevées (de 45 à 100 °C) (Fischer et al. 2013, Kechinski et al. 2010, Cisse et al. 2012)). Les hautes températures peuvent avoir aussi un effet bénéfique sur l'activité antioxydante. Certains polyphénols augmentent leur capacité antioxydante par le processus de pyrolyse doux notamment dans le cas de l'acide caféique (Wang & Ho 2009, Nićiforović & Abramovič 2014).

1.3.4.5. Agitation

L'agitation mécanique des particules dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu. Elle a un effet toujours favorable sur

l'opération car elle permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide-liquide (couche limite) et d'augmenter le coefficient de transfert. Si l'agitation est très intense et/ou maintenue durant une longue période, elle peut favoriser des chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (Dibert 1989, Leybros & Frémeaux 1990).

1.3.4.6. Rapport solvant-solide

Le rapport solvant-solide a également un effet sur le rendement d'extraction, lorsque le ratio entre le solvant et le solide est grand, la quantité totale de composés extraits est plus élevée. Cependant, même si les rendements sont plus grands dans les cas de rapports solvant-solide importants, l'utilisation de grandes quantités de solvant n'est pas souhaitable car les concentrations des molécules d'intérêt dans les extraits sont faibles et plus d'énergie est nécessaire pour éliminer le solvant et obtenir l'extrait sec (Sparr Eskilsson & Björklund 2000). Une optimisation de ce paramètre est donc souvent nécessaire.

1.3.4.7. Temps d'extraction

Le temps de contact entre les deux phases est aussi un des paramètres très importants à maîtriser. Ce paramètre est étroitement lié à la cinétique de l'extraction. La connaissance de la cinétique permettra d'arrêter l'extraction lorsque le rendement souhaité est atteint et de ne pas continuer l'opération au delà. Ainsi des économies d'énergie et de main d'œuvre seront réalisées.

1.3.5. Méthodes d'extraction solide-liquide

Il existe plusieurs techniques d'extraction des biomolécules à partir de sources végétales. Les techniques d'extraction à pression ambiante, sans ou avec agitation et/ou chauffage utilisées depuis longtemps sont considérées comme techniques classiques (conventionnelles). Les techniques plus récentes sont appelées alternatives. Dans les techniques alternatives, on trouve des opérations sous pression (en utilisant comme de solvants liquides pressurisés ou fluides supercritiques), ainsi que des techniques

permettant d'intensifier l'extraction (par assistance d'ultrasons ou micro-ondes, par exemple).

1.3.5.1. Méthodes classiques

1.3.5.1.1. Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, habituellement à température ambiante. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles. Pour être efficace, une macération sans agitation, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est de l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur (Groubert 1984, Leybros & Frémeaux 1990).

1.3.5.1.2. Extraction Soxhlet

L'extraction Soxhlet, utilisée pendant des décennies, est une technique standard qui sert de référence pour évaluer les résultats d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. C'est la technique qui permet d'avoir les meilleurs rendements parmi les techniques classiques (Luque de Castro & Garcia-Ayuso 1998). L'utilisation de différents solvants donne lieu à des extraits ayant différentes compositions (Zarnowski & Suzuki 2004). Par exemple, l'hexane est le solvant le plus couramment utilisé pour extraire les huiles comestibles de plantes.

L'extraction Soxhlet présente les avantages suivants :

- l'échantillon est en contact de manière répétée avec du solvant frais (déchargé des solutés déjà extraits) ;
- l'extraction est effectuée avec du solvant chaud favorisant la dissolution des composés recherchés ;
- aucune filtration n'est nécessaire après l'extraction (Luque de Castro & Garcia-Ayuso 1998).

Cette méthode a aussi certains inconvénients comme la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques, mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental. Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction des molécules recherchées n'est pas à négliger (Penchev 2010). Un autre inconvénient majeur de l'extraction Soxhlet est qu'elle n'est pas appropriée lorsque des mélanges sont utilisés comme solvants.

1.3.5.2. Méthodes alternatives d'extraction solide-liquide

Actuellement, il y a une demande croissante concernant la mise au point de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et de solvants organiques et une réduction de la pollution. Ces opérations sont considérées comme des eco-extractions (green extractions). Généralement ce type d'eco-procédés sont aussi appelés procédés durables ou procédés propres. Certaines techniques alternatives d'extraction comme l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction accélérée par solvant et l'extraction par fluide supercritique sont considérées comme des eco-extractions.

1.3.5.2.1. Extraction assistée par ultrasons (EAU)

L'extraction par sonication est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Cette technique utilise des ondes sonores à fréquence supérieure à 20 kHz. La vibration se propage dans le milieu en transportant de l'énergie mécanique sous forme de rapides variations de pression. Le milieu de propagation de l'onde ultrasonore est soumis à une succession de compressions et de décompressions provoquant la formation de bulles (Poux et al. 2010). Les ultrasons entraînent de très fortes modifications de la température et de la pression à l'intérieur des bulles. Au moment où la dimension critique est atteinte, les bulles implosent (Figure I.2). Ce processus est appelé « cavitation » (Masson 1996).



Figure I.2. Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrasons.

Les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matrices végétales et améliorent le transfert de matière. La « pulsation » du milieu permet d'améliorer les coefficients de transfert de matière. Les ultrasons peuvent également provoquer la rupture des parois cellulaires, facilitant ainsi la libération de leur contenu. La destruction des parois cellulaires favorise l'extraction des composés d'intérêt vers le solvant. Ainsi l'application des ultrasons accélère l'extraction à partir de sources végétales et dans certains cas permet aussi d'augmenter les rendements (Vinatoru 2001, Poux et al. 2010, Vilku et al. 2008).

L'EAU permet de travailler avec différents types de solvants et leurs mélanges. A rendements équivalents, l'EAU consomme nettement moins d'énergie que les méthodes classiques (Poux et al. 2010, Diouf et al. 2009). Elle permet l'extraction de composés thermosensibles car elle est très efficace à températures relativement basses. L'application des ultrasons permet aussi la destruction de la charge bactérienne et aide pour la meilleure préservation des molécules d'intérêt.

L'EAU est considérée comme l'une des techniques d'extraction les plus simples, car il est facile de la réaliser dans des équipements de laboratoire commun (bains à ultrasons). L'échantillon broyé est mélangé avec le solvant approprié dans un récipient et placé dans un bain à ultrasons, où la température de travail et le temps d'extraction sont réglés (Klejdusa et al. 2009). Il existe aussi des extracteurs fermés équipés d'un ou plusieurs transducteurs d'ultrasons (Poux et al. 2010).

En outre, beaucoup de facteurs régissent l'action des ultrasons à savoir la fréquence, la puissance, la température et le temps d'application des ultrasons (Romdhane & Gourdon, 2002). De nombreuses études ont examiné la stabilité des biomolécules soumises aux ultrasons. Dans des conditions de haute fréquence et/ou haute puissance des ultrasons, une dégradation de certains composés phénoliques a été enregistrée (Pingret et al. 2013). Néanmoins, l'EAU est considérée comme une technique très bien adaptée pour l'extraction des antioxydants phénoliques et est largement utilisée à l'échelle laboratoire pour les extraire à partir de différentes sources naturelles comme la peau d'orange, les olives, la peau de citron (Chemat et al. 2011,

Japon-Lujan et al. 2006, Vinatoru 2001, Khan et al. 2010, Sun et al. 2011). Il existe également des extracteurs pilotes et industriels équipés d'émetteurs à ultrasons (Vinatoru 2001, Virot et al. 2010).

1.3.5.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

Dans cette technique d'extraction alternative, la matrice solide est immergée dans un solvant chauffé par micro-ondes (Poux et al. 2010). Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de fréquences entre 300 MHz et 300 GHz. Leur assistance permet de chauffer le solvant très rapidement et en utilisant peu d'énergie. Cette technique a été brevetée par Paré et Bélanger en 1990 pour l'extraction de produits naturels (Paré & Bélanger 1990). En général, les échantillons sont homogénéisés et mélangés avec un solvant et la suspension est irradiée à plus de 2000 MHz pour une courte période de temps. Le chauffage est généralement répété plusieurs fois avec des périodes de refroidissement pour éviter l'ébullition. L'efficacité de cette technique s'approche de celle de l'extraction classique Soxhlet, mais avec l'avantage de pouvoir être réalisée beaucoup plus rapidement (Pan et al. 2003, Poux et al. 2010). Les inconvénients de cette technique sont la nécessité de maîtriser parfaitement le temps de chauffage par micro-ondes, l'inhomogénéité du chauffage par les micro-ondes et le fait qu'elle n'est peut pas être utilisée pour l'extraction de composés thermosensibles (vitamines, protéines, anthocyanines etc). Il faut aussi bien connaître les propriétés diélectriques des molécules dans le système (Poux et al. 2010).

1.3.5.2.3. Extraction par liquide pressurisé (ELP)

Cette technique alternative d'extraction est réalisée à pression élevée. Cela permet d'augmenter la température d'ébullition du solvant et de réaliser l'extraction à températures plus élevées qu'à pression ambiante. La haute pression appliquée, le plus souvent comprise entre 4 et 20 MPa, assure que le solvant se maintient à l'état liquide à la température appliquée (Ramos et al. 2002). Les températures élevées d'extraction favorisent le transfert de matière et augmentent les taux d'extraction, parce qu'elles impliquent généralement: i) une augmentation de la capacité des solvants pour la solubilisation de solutés, ii) une augmentation des taux de diffusion, iii) une meilleure

rupture des liaisons soluté-matrice, iv) une diminution de la viscosité du solvant et v) une diminution de la tension superficielle (Ramos et al. 2002, Richter et al. 1996).

L'extraction par liquide pressurisé est également connue comme extraction par solvant sous pression, extraction par solvant sous-critique ou extraction accélérée par solvant. Lorsque l'eau est utilisée comme solvant, l'ELP est généralement appelée extraction à l'eau surchauffée, extraction avec de l'eau sous-critique, extraction avec de l'eau pressurisée ou extraction avec de l'eau chaude sous pression (Pronyk & Mazza 2009).

L'ELP nécessite généralement moins de temps et une plus faible consommation de solvants organiques par rapport aux techniques conventionnelles (Mendiola et al. 2007). Récemment, l'utilisation de l'ELP pour l'extraction de polyphénols à partir de co-produits de fruits et légumes a été brevetée (King & Grabiél 2007).

Même si cette technique est très efficace, elle nécessite des équipements spécifiques pour travailler sous pression et elle n'est pas adaptée pour l'extraction de substances thermosensibles.

1.3.5.2.4. Extraction par fluides supercritiques (EFS)

L'extraction par fluides supercritiques utilise comme solvants des fluides en état supercritique (l'état du fluide lorsque sa température et sa pression sont supérieures à la température et à la pression critiques de ce fluide). Cet état n'existe pas à pression atmosphérique. Les propriétés des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celles des gaz et des liquides (Taylor 1996). Les taux de transfert de matière sont plus grands que dans des solvants liquides classiques à cause des coefficients de diffusion plus élevés et de faibles valeurs de viscosités (Diaz-Reinoso et al. 2006, Herrero et al. 2006). Le pouvoir solvant des fluides peut varier en modifiant la densité du solvant. Elle peut être aussi fortement modifiée en variant la pression et la température. Les fortes variations des solubilités des molécules d'intérêt, mais également des autres molécules extractibles de la source végétale permettent de trouver des conditions pour obtenir de très bonnes sélectivités. Elles permettent aussi lors d'une décompression après

l'extraction de diminuer le pouvoir solvant et de récupérer ainsi les molécules extraites par précipitation.

Malgré ces propriétés favorables pour l'extraction de molécules bioactives, un frein majeur au développement de cette technologie est le fait que les fluides envisageables ont une pression critique relativement élevée qui entraîne des investissements importants pour construire les appareillages sous pression correspondants (Poux et al. 2010). Le fluide supercritique le plus utilisé comme solvant est le CO₂ à cause de ses nombreux avantages : abondant, bon marché, inerte, inodore, pas toxique et température et pression critiques relativement basses (31,1 °C et 7,3 MPa) (Diaz-Reinoso et al. 2006). Le grand inconvénient de l'utilisation du CO₂ comme solvant est qu'il est apolaire et donc non adapté pour l'extraction de composés polaires. Souvent, pour l'extraction de telles substances, l'éthanol est ajouté au CO₂ comme co-solvant (Diaz-Reinoso et al. 2006). L'eau supercritique a été également utilisée pour extraire des composés polaires (Henry & Yonker 2006). Le point critique de l'eau est très élevé (374 °C, 22,1 MPa), par conséquent l'eau supercritique ne peut pas être utilisée pour extraire des composés thermiquement labiles (Lang & Wai 2001).

I.4. Procédés de purification et de concentration de biomolécules

A la suite du procédé d'extraction, il est très souvent nécessaire d'avoir recours à des techniques de purification et de concentration, de manière à éliminer les impuretés (molécules autres que les biomolécules cibles) et à obtenir un extrait enrichi en biomolécule cible. L'optimisation du procédé d'extraction peut donner un extrait ayant déjà une teneur importante en composés actifs, ce qui facilitera la/les étape(s) de purification-concentration en aval. Différentes méthodes de purification-concentration peuvent être utilisées en fonction notamment de la nature des molécules présentes dans l'extrait et des biomolécules cibles, et de la nature du solvant. Les principales techniques appliquées pour la purification-concentration de biomolécules sont présentées ci-dessous : la chromatographie d'exclusion stérique, l'extraction liquide-liquide, les techniques membranaires et l'adsorption sur support solide. Une présentation plus détaillée sera proposée pour l'adsorption sur support solide, qui est une méthode bien adaptée à la récupération d'antioxydants phénoliques, et qui a par conséquent été utilisée dans ce travail de thèse.

Suivant les cas et les exigences sur le produit final, il peut être nécessaire d'utiliser plusieurs techniques de purification-concentration. Les procédés peuvent alors être mis en œuvre à la suite, de manière couplée, voire intégrée. L'intégration de procédés peut permettre d'obtenir une opération globale intensifiée (optimisation en terme d'efficacité, d'impacts économique et environnemental).

I.4.1. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (ou chromatographie de filtration sur gel, ou gel filtration) permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme (volume hydrodynamique). Cette méthode est basée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans les pores de la phase stationnaire. Les molécules sont entraînées par la phase mobile à travers la phase stationnaire (également appelée gel) constituée de grains polymériques poreux. Des gels avec des propriétés différentes sont disponibles, notamment avec différentes gammes de fractionnement, ce qui permet une adaptation suivant la nature des molécules cibles.

La chromatographie d'exclusion stérique est appliquée pour la séparation de diverses macromolécules naturelles et synthétiques : polypeptides, protéines, sucres, polymères... En ce qui concerne les composés phénoliques, on a recours à cette technique plutôt à des fins analytiques (caractérisation de composés phénoliques dans une solution) (Yanagida et al. 2002, 2003). La SEC n'est pas la technique privilégiée pour l'enrichissement d'extraits phénoliques ; on utilise plutôt dans ce cas l'extraction liquide-liquide, les techniques membranaires ou l'adsorption sur support solide.

I.4.2. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une technique de séparation largement utilisée en laboratoire et à l'échelle industrielle, dans des domaines très variés incluant l'industrie agroalimentaire.

Elle permet la séparation de deux ou plusieurs constituants d'un mélange en mettant à profit leurs différentes affinités pour deux solvants non ou très peu miscibles. En pratique, on met en contact intime une solution d'alimentation contenant les constituants à séparer (solutés) avec un solvant non-miscible qui extrait préférentiellement un ou plusieurs des solutés. À l'équilibre, le rapport des concentrations du soluté dans l'extrait et le raffinat, appelé rapport (ou coefficient) de distribution, donne une mesure de l'affinité relative du soluté pour chacune des deux phases. Les deux liquides (extrait et raffinat) sont ensuite séparés, généralement sous l'effet de la gravité, auquel on peut dans certains cas ajouter l'effet d'autres forces: force centrifuge, champ électrique, etc (Mafart & Béliard 1992, Ronze et al. 2008).

Concernant les applications de l'extraction liquide-liquide pour la séparation des substances bioactives à partir des extraits natifs, elle est utilisée pour la purification des extraits d'alcaloïdes (Lazarova et Dimitrov 2009), mais rarement appliquée pour séparer des composés phénoliques des autres substances des extraits végétaux (Krishnan et Maru 2006). Cependant elle est souvent utilisée comme un moyen d'analyser les composés phénoliques dans des extraits végétaux (Nave et al. 2007, Van Beek et al. 2009). Dans ces cas sont utilisés les meilleurs solvants qui sont habituellement plus ou moins toxiques.

I.4.3. Techniques membranaires

Par définition, une membrane est une barrière sélective qui va permettre ou interdire le passage de certains composants entre deux milieux qu'elle sépare.

Le principe de fonctionnement consiste en la division de la solution à traiter par la membrane en deux solutions de concentrations différentes :

- une solution qui passe à travers la membrane appelée perméat,
- une solution qui ne passe pas à travers la membrane, appelée concentrat ou rétentat, où se concentrent les molécules ou particules retenues par la membrane.

Suivant les cas, la solution d'intérêt peut être le perméat (élimination de certaines molécules) ou le rétentat (concentration en molécules cibles).

Différents procédés de séparation par membrane sont distingués en fonction des forces de transfert mises en œuvre (gradient de pression, de concentration ou de potentiel électrique) et du diamètre des pores. Les principales techniques membranaires (à gradient de pression) sont l'osmose inverse, la nanofiltration, l'ultrafiltration et la microfiltration. L'ultrafiltration et la microfiltration sont les techniques les plus adaptées pour le traitement d'extraits phénoliques. On parle d'ultrafiltration pour les membranes avec des tailles de pores entre 1 et 100 nm, et de microfiltration pour des diamètres de pores de 0.1 à 10 μ m (Aimar et al. 2010, Mafart & Béliard 1992).

Ces techniques sont utilisées industriellement, notamment pour le fractionnement et la concentration de jus de fruits, d'arômes, de colorants et d'acides organiques (Albagnac et al. 2002). Plusieurs travaux ont montré l'efficacité des techniques membranaires pour la séparation de composés phénoliques à partir d'extraits de différentes sources comme le thym (Achour et al. 2012), le sorgho (Agbangnan et al. 2011) ou des effluents de pressage d'olive (Mudimu et al. 2012). Les techniques membranaires, qu'on qualifie souvent de « procédés propres », sont en effet bien adaptées aux exigences liées aux applications alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. La limitation principale est liée aux problèmes d'encrassement des membranes (colmatage), qui peuvent engendrer des pertes d'efficacité.

I.4.4. Adsorption sur support solide

L'adsorption est un processus par lequel un soluté présent dans une phase fluide (liquide ou gaz) est retenu à la surface d'un support solide. La substance qui se fixe (s'adsorbe) sur le support solide est appelé adsorbat, et le support solide est appelé adsorbant.

L'adsorption peut être envisagée pour éliminer un constituant présent dans un fluide (« dépollution »), ou au contraire pour récupérer un constituant d'intérêt, en le fixant sur un adsorbant, puis en le récupérant dans un éluant. Une part importante des applications industrielles concerne plutôt des « dépollutions », comme la purification de gaz (par exemple un air chargé de solvants, d'acides...) ou d'effluents liquides (élimination de matières organiques, de colorants...) (Ronze 2008). Le procédé d'adsorption est appliqué industriellement pour la récupération de molécules d'intérêt, notamment pour la concentration de colorants (Albagnac et al. 2002). Il est aussi largement utilisé en laboratoire, pour le même type d'application, mais aussi en tant que méthode analytique avec le développement des techniques chromatographiques (Ronze, 2008).

I.4.4.1. Types d'adsorption

D'une manière générale, l'adsorption est régie par les affinités du soluté avec le solvant et avec la surface du support solide. On peut distinguer trois types d'interaction entre le soluté et le support solide :

- une interaction de type électrique, on parle alors d'échange d'ions,
- une interaction mettant en jeu des forces de van der Waals ou des liaisons hydrogène, on parle alors d'adsorption physique,
- une interaction mettant en jeu des liaisons chimiques, on parle alors d'adsorption chimique ou de chimisorption.

Dans le cas de l'adsorption physique, les énergies de liaison sont en général inférieure à 40 kJ.mol^{-1} (de l'ordre d'une chaleur de vaporisation standard), alors qu'elle peut atteindre jusqu'à 400 kJ.mol^{-1} dans le cas de la chimisorption (Ronze 2008, Sun & Meunier 2003). Les liaisons fortes établies entre soluté et adsorbant dans le cas de la chimisorption ne permettent pas une récupération du soluté dans un éluant, et ce type

d'adsorption ne peut être considéré que pour des applications de type « dépollution ». L'adsorption utilisée en tant que procédé de séparation pour la récupération de molécules cibles ne peut être envisagée que pour des adsorptions de type physique (Ronze 2008). Ainsi, seuls ces aspects seront développés ci-dessous.

1.4.4.2. Principaux types d'adsorbants et caractéristiques

L'une des propriétés les plus importantes pour un adsorbant est sa capacité d'adsorption, qui est directement liée à la surface de l'adsorbant. Ainsi, les matériaux sous forme de petites particules pour augmenter la surface externe, et ayant une porosité élevée pour augmenter la surface interne sont privilégiés. Le soluté pourra s'adsorber sur tous les sites présents sur la surface externe et sur la surface interne (dans les pores) de l'adsorbant. Pour la plupart des adsorbants, la surface externe ne correspond qu'à une faible part de la capacité d'adsorption, la majeure part étant liée à la surface interne de l'adsorbant. La capacité d'adsorption est généralement caractérisée par l'aire spécifique du matériau, c'est-à-dire la surface totale accessible au soluté (surface externe et surface interne) par unité de masse d'adsorbant (Ronze 2008).

Les autres caractéristiques importantes dans le choix d'un adsorbant sont :

- sa sélectivité pour le soluté cible par rapport à l'ensemble des composés présents dans le mélange,
- ses propriétés en lien avec son comportement hydrodynamique, notamment sa masse volumique, la dimension des particules, leur résistance,
- la facilité de mise en œuvre (stockage, activation...),
- son coût et la possibilité de régénération (réutilisation).

Le Tableau I.3 présente les adsorbants les plus utilisés avec des exemples d'applications et les ordres de grandeurs des aires spécifiques et de la taille des pores.

Tableau I.3. Principaux adsorbants industriels, utilisations et caractéristiques (Ronze 2008, Sun & Meunier 2003).

Type d'adsorbant	Exemples d'application	Aire spécifique (m ² .g ⁻¹)	Taille des pores (nm)
Charbons actifs	Traitement de gaz, récupération de vapeurs de solvants et d'hydrocarbures, décoloration, purification d'eau, élimination d'odeurs...	400-2000	1-4
Silices	Séparation de molécules polaires, composés aromatiques et hydrocarbures non saturés, deshumidification de gaz...	600-800	2-5
Alumines activées	Déshydratation de fluides	200-400	1-6
Zéolites, tamis moléculaires carbonés	Séparation de molécules par effet stérique	300-800	0,3-0,8
Adsorbants polymériques	Élimination ou récupération de composés organiques, purification des eaux, fabrication de médicaments...	100-700	4-20

Il a été démontré que les adsorbants polymériques, en particulier de type Amberlite XAD, peuvent permettre de récupérer des quantités importantes de composés phénoliques à partir de solutions aqueuses (Paleos et al. 1969). Ils ont également l'avantage de permettre la récupération par élution avec des solvants non aqueux. L'utilisation de solvants d'élution alcooliques est appropriée en raison de la forte solubilité des composés phénoliques dans ce type de solvants. Pour les applications alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques, le solvant privilégié est l'éthanol, qui présente également des facilités de traitement en aval (distillation) à la fois pour la récupération des polyphénols et pour la réutilisation du solvant. Dans de nombreux cas, cela permet la récupération des composés phénoliques sous une forme facilement utilisable. Les adsorbants Amberlite XAD se présentent sous la forme de petites billes insolubles d'un polymère poreux. Un large éventail est disponible, avec différentes

propriétés de surface, porosités, et distribution de la taille des pores, permettant l'adaptation à la nature de l'extrait phénolique à traiter (Albright 1972, Gustafson 1970).

1.4.4.3. Mécanisme général de l'adsorption

Au cours de l'adsorption plusieurs étapes successives peuvent être distinguées :

- transfert du soluté à partir de la phase liquide vers le film liquide qui entoure l'adsorbant (transfert par convection et diffusion),
- transfert par diffusion du soluté à travers le film liquide vers la surface de l'adsorbant (caractérisé par la résistance au transfert du film liquide, qui dépend de son épaisseur et du régime d'écoulement de la phase liquide),
- transfert par diffusion du soluté dans le grain d'adsorbant (due au gradient de concentration),
- adsorption du soluté à la surface de l'adsorbant (liaisons de type Van der Waals ou pont hydrogène).

On considère généralement que la première et la dernière étape sont rapides, et que ce sont les étapes de transfert par diffusion à travers le film et dans les pores du grain d'adsorbant qui contrôlent la cinétique d'adsorption.

A noter que le transfert de matière s'accompagne d'un transfert de chaleur, le processus d'adsorption étant exothermique. La chaleur dégagée est appelée chaleur d'adsorption. La chaleur générée en surface du solide est dissipée par conduction interne dans les grains d'adsorbant et par convection externe de la surface des grains vers le fluide.

1.4.4.4. Equilibre d'adsorption

L'efficacité d'une opération d'adsorption dépend beaucoup de l'équilibre qui s'établit entre la phase solide et la phase fluide. La capacité maximale d'adsorption est

liée à cet équilibre. Il est essentiel de bien connaître cet équilibre adsorbant-adsorbat pour pouvoir concevoir et dimensionner un procédé d'adsorption.

L'équilibre d'adsorption est généralement représenté à l'aide de graphiques reliant la concentration en soluté dans la phase fluide et la quantité de soluté adsorbée sur le solide. La représentation la plus utilisée est l'isotherme, qui présente l'évolution de la quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant (q) en fonction de la concentration de soluté dans la phase liquide C (ou pression partielle dans le cas d'adsorption à partir d'un gaz) à température constante.

Les isothermes d'adsorption sont généralement classés suivant leur forme en 5 grands types (Sun & Meunier 2003), qui peuvent renseigner sur les mécanismes d'adsorption mis en jeu (Calvet 1989) (Figure I.3) :

- **Type 1 ou Langmuir**

La courbe approche asymptotiquement une valeur limite q_{max} , la capacité maximale d'adsorption (en une seule couche). Cela correspond à une adsorption en monocouche avec une saturation progressive des sites d'adsorption (sites équivalents).

- **Type 2 ou sigmoïde**

La courbe présente une asymptote en $C=C_0$, C_0 étant la concentration initiale en soluté dans la phase liquide. Selon Brunauer, Emmet et Tellet (BET), la 1^{ère} partie de la courbe correspond à une adsorption monomoléculaire ; ensuite il se forme une couche multimoléculaire d'épaisseur indéfinie.

- **Type 3**

La quantité de soluté adsorbée croît jusqu'à ce que C tende vers C_0 . Une couche moléculaire infinie peut se former à la surface du solide.

- **Type 4**

Semblable au type 2, mais la quantité de soluté adsorbée atteint une valeur finie pour $C=C_0$. Il y a adsorption en couche d'épaisseur finie.

- **Type 5**

Similaire au type 3 pour les plus faibles valeurs de C , similaire au type 4 pour les valeurs les plus élevées de C . Il y a adsorption en couche d'épaisseur finie.

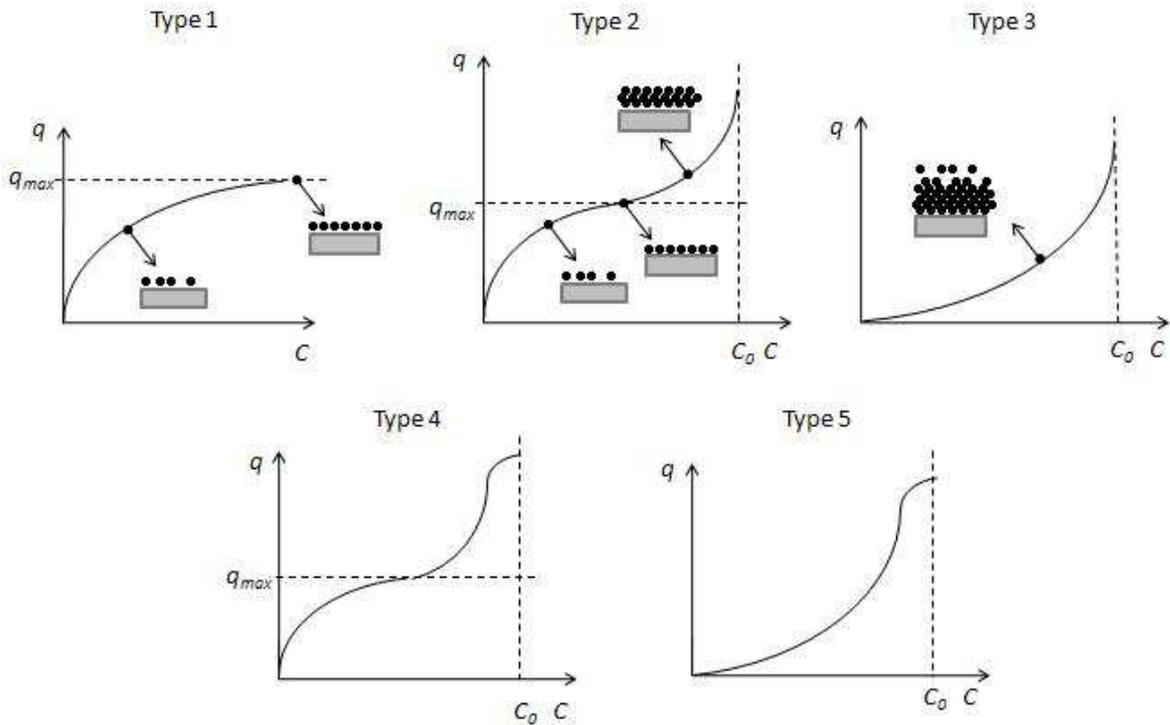


Figure I.3. Classification des isothermes d'adsorption en 5 grands types.

1.4.4.5. Modèles d'adsorption

Les isothermes d'adsorption obtenus expérimentalement peuvent être corrélés par des modèles mathématiques. En pratique, on cherche à trouver le modèle le plus adapté du point de vue de la signification physique. Les modèles les plus couramment utilisés dans le cas d'adsorption à partir d'un liquide sont présentés ci-dessous.

1.4.4.5.1. Modèle de Freundlich

Dans de nombreux cas, les données expérimentales peuvent être décrites de manière satisfaisante par le modèle de Freundlich :

$$q = K \cdot C^n \quad (I.3),$$

où q est la quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant correspondant à la concentration C en phase liquide, K et n sont des constantes empiriques caractéristiques

du système soluté-adsorbant et des conditions physico-chimiques (température, pH, etc.) (Giles et al. 1960, Calvet 1989).

La constante K est un indicateur de la capacité d'adsorption du solide : plus K est élevé, plus la capacité d'adsorption est importante. La constante n est un indice d'affinité soluté-adsorbant. Le modèle de Freundlich ne permet qu'une approche empirique, le modèle n'a pas de signification physique rigoureuse.

1.4.4.5.2. Modèle de Langmuir

Le modèle de Langmuir correspond aux isothermes de type 1, c'est-à-dire une adsorption en une seule couche, à raison d'une molécule par site, tous les sites étant équivalents, et sans interaction entre les molécules adsorbées. Le modèle de Langmuir traduit l'existence d'un équilibre dynamique entre les molécules qui s'adsorbent à la surface du solide et celles qui se désorbent. L'adsorption est proportionnelle à la surface encore libre, la désorption est proportionnelle à la surface occupée.

$$\frac{q}{q_{\max}} = \frac{k_L \cdot C}{1 + k_L \cdot C} \quad (\text{I.4})$$

où q est la quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant correspondant à la concentration C en phase liquide, q_{\max} est la quantité de soluté maximum adsorbée lorsque toute la surface d'adsorbant est recouverte par une couche monomoléculaire, k_L est la constante de Langmuir, qui dépend de la température T et de l'enthalpie d'adsorption E d'une molécule de soluté suivant la relation de Van't Hoff :

$$k_L = k_{L0} \cdot \exp\left(\frac{E}{R \cdot T}\right) \quad (\text{I.5})$$

où k_{L0} est le facteur préexponentiel.

Si la concentration C est très faible, on peut faire l'approximation d'une isotherme linéaire, et on retrouve alors la loi de Henry :

$$q = k_L \cdot q_{\max} \cdot C \quad (\text{I.6})$$

1.4.4.5.3. Modèle de Langmuir-Freundlich

Il s'agit d'une variante du modèle de Langmuir, dans le cas d'un adsorbant avec des surfaces hétérogènes (tous les sites d'adsorption ne sont pas de même nature ou énergétiquement équivalents).

$$\frac{q}{q_{\max}} = \frac{k_L \cdot C^m}{1 + k_L \cdot C^m} \quad (\text{I.7})$$

où q est la quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant correspondant à la concentration C en phase liquide, q_{\max} est la quantité de soluté maximum adsorbée lorsque toute la surface d'adsorbant est recouverte par une couche monomoléculaire, k_L est la constante de Langmuir, m est une constante caractéristique des interactions soluté-adsorbant.

Tous les modèles présentés précédemment sont relatifs aux isothermes d'adsorption de corps purs. Les procédés d'adsorption impliquent le plus souvent des mélanges de plusieurs solutés ayant des interactions entre eux. Dans ce cas, il est important de connaître à la fois les isothermes d'adsorption des corps purs, mais aussi les isothermes de co-adsorption du mélange pour avoir une prédiction précise de la performance du procédé. Cependant, l'établissement d'isothermes de co-adsorption est beaucoup plus complexe que dans le cas des corps purs. Les modèles établis sont le plus souvent limités en raison des non-linéarités liées à la complexité de la phase fluide (mélange) et à l'hétérogénéité de la surface de l'adsorbant (différents solutés adsorbés). Ainsi l'utilisation des modèles de co-adsorption est peu développée, et on se réfère le plus souvent aux modèles prévus pour des corps purs, en prenant des hypothèses simplificatrices.

1.4.4.6. Mise en œuvre du procédé d'adsorption

La mise en œuvre du procédé d'adsorption consiste à mettre en contact la solution contenant le(s) soluté(s) cible(s) et l'adsorbant. Deux grands modes de fonctionnement existent: le mode batch, et le mode dynamique. Le mode batch consiste à la mise en contact de la solution et de l'adsorbant dans un contenant, qui pourra être mis sous agitation pour maintenir l'adsorbant en suspension. Le mode batch est généralement utilisé dans le cadre d'études préliminaires à petite échelle, afin de déterminer les conditions optimales de fonctionnement avant une mise œuvre en mode dynamique à plus grande échelle. Pour un fonctionnement en mode dynamique, on utilise une colonne d'adsorption, dans laquelle l'adsorbant pourra se présenter sous forme de lit fluidisé, ou plus fréquemment sous forme de lit fixe. Dans le cas du lit fixe,

l'adsorbant joue le rôle de garnissage, qui est traversé par le courant de fluide contenant le(s) soluté(s) cible(s).

Les grandes étapes de mise en œuvre d'un procédé d'adsorption en colonne à lit fixe sont les suivantes (Figure I.4) :

- Phase d'adsorption : la solution circule à travers le lit d'adsorbant, le(s) soluté(s) cible(s) se fixe(nt) sur l'adsorbant, entraînant la saturation progressive de l'adsorbant ; la concentration en soluté(s) dans la solution en sortie de colonne est nulle ou quasi-nulle ;
- Saturation de l'adsorbant : lorsque le lit d'adsorbant est entièrement (ou presque entièrement) saturé, la concentration en soluté(s) dans la solution en sortie de colonne n'est plus nulle : c'est ce qu'on appelle la « percée » ; l'adsorption peut être arrêtée et passer à la phase d'élution ;
- Phase d'élution : le lit d'adsorbant est déchargé du/des soluté(s) par passage d'une solution d'élution
- Régénération de l'adsorbant : suivant les cas, on pourra prévoir une étape de régénération de l'adsorbant, qui consiste s'assurer que l'adsorbant est bien déchargé de tout soluté, de manière à retrouver une capacité d'adsorption élevée ; la régénération peut être réalisée par passage de solvants ou par chauffage (régénération thermique).

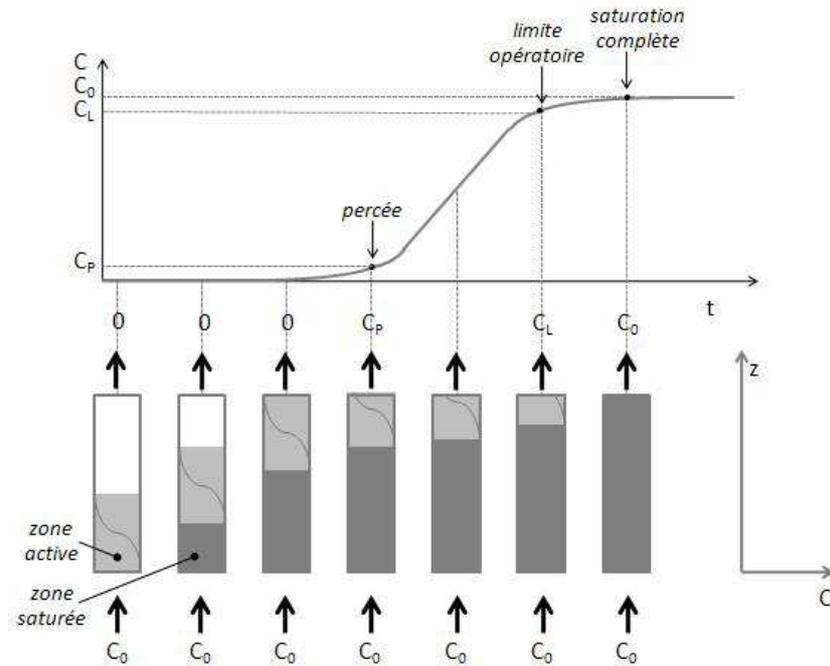


Figure I.4. Phase d'adsorption jusqu'à saturation de la colonne à lit fixe.

Un cycle d'adsorption correspond à la succession de ces différentes étapes. Un lit d'adsorbant peut être utilisé durant plusieurs cycles, tant que la capacité d'adsorption reste suffisamment importante. Le fonctionnement est souvent optimisé en combinant plusieurs colonnes d'adsorption, de manière à pouvoir alterner en fonction des phases d'adsorption et d'éluion.

I.5. Capacité antioxydante

I.5.1. Méthodes pour la détermination de la capacité antioxydante

L'action antioxydante est régie par plusieurs mécanismes, qui ne se produisent généralement pas de manière isolée mais sont impliqués en même temps provoquant une synergie. Dans les systèmes alimentaires, l'activité antioxydante exprime l'inhibition de l'oxydation des lipides (rupture des chaînes lipidiques), tandis que dans des systèmes *in vivo*, les protéines, l'ADN et autres molécules peuvent être sujettes à une détérioration par l'action de radicaux libres.

Etant donné la complexité des actions antioxydantes, la capacité (activité) antioxydante est évaluée par des méthodes différentes pour les différents mécanismes. La plupart des méthodes chimiques sont basées sur la possibilité de piégeage des radicaux libres bien qu'il existe des méthodes développées pour les systèmes oléagineux tels que ceux basés sur l'agent chélateur et ceux concernant l'absorption du rayonnement ultraviolet. Les méthodes biologiques sont plus fréquemment utilisées pour évaluer les niveaux de dégradation oxydative dans les dommages humains (en protéines, dans l'ADN et les lipides). Les méthodes les plus utilisées sont regroupées dans le Tableau I.4.

Tableau I.4. Méthodes pour la mesure de la capacité antioxydante (Piñeiro 2009).

Oxydation dans des systèmes hydrophobes, hydrophiles et en émulsions	
Essai	Références
Oxydation des acides gras, éster méthyliques des acides gras, triglycérides et phospholipides	Farombi et Britton 1999; Kuo et al. 1999; Ponginebbi 1999; Heinonen et al. 1997; Foti et al. 1996
Oxydation du citronenal	Bocco et al. 1998
Oxydation du gras de porc	von Gadow et al. 1997a; Kim et al. 1994
Oxydation des huiles de poissons et végétales	Luther et al. 2007; Suja et al. 2003; Frankel 1996
Oxydation du β -carotène en émulsions d'acide linoléique	Kabouche et al. 2007; Siddhuraju et Becker 2006; Louli et al. 2004; Zancan et al. 2002; von Gadow et al. 1997b
Méthodes de captation des radicaux	
Essai	Référence
Captation des radicaux alquille et pyroxyle	Caldwell 2003; Sawa et al. 1999; Milic et al. 1998
Captation du radical DPPH	Silva et al. 2005; Hu et al. 2004; Lai et al. 2001; Duh 1998; Larrauri et al. 1998; von Gadow et al. 1997a, c
Captation du radical ABTS	Siddhuraju et Becker 2006; Miliuskas et al. 2003
Captation du radical hydroxyle	Dasgupta et De 2004; Chyau et al. 2002; Duh 1998
Captation du radical oxygène	Mamelona et al. 2007; Pandjaitan et al. 2005; Prior et al. 1998
Captation du radical superoxyde	Kabouche et al. 2007; Juntachote et Berghofer 2005; Yamaguchi et al. 1999; Okada et Okada 1998 ; Yen et Duh 1994
Essai de la metmioglobine	Rapisarda et al. 1999; Hagerman et al. 1998
Oxydation en membranes biologiques modèle, essaies en cellules et essaies in vivo	
Essai	Références
Activité antiulcéreuse	Saito et al. 1998
Essais avec plasma humaine ou animal	Talavera et al. 2005; Lotito et Frei 2004; Koga et al. 1999; Miyake et Shibamoto 1998
Essais d'oxydation et fragmentation de l'ADN	Yen et al. 2004; Kitagawa et al. 2004; Aruoma 1999; Saint-Cricq de Gualejac et al. 1999; Hagerman et al. 1998
Inhibition de l'oxydation des cellules humaines	Muanza et al. 1998
Oxydation des mitochondries des cellules de fois de rat	Yen et Hsieh 1998
Oxydation des lipoprotéines humaines et	Wang et al. 2007; Srivastava et al. 2006;

animales de basse densité	Takashi et al. 2005; Murthy et al. 2002; Visioli et al. 1999; Abuja et al. 1998
Oxydation des liposomes	Chung et al. 2005; Baublis et al. 2000; Gabrielska et al. 1997
Oxydation des lipides en microsomes	Ajila et al. 2007; Cai et al. 2002; Yen et Hsieh 1998; Chambers et al. 1996
Production de leucotriennes par neutrophiles humaines	Visioli et al. 1999
Réduction des toxines urémiques en sang de rat	Yokozawa et al. 1998

Méthodes basés en la mesure de la stabilité des aliments

Essaie	Référence
Stabilité des huiles durant la friture	Che-Man et al. 1999; Zandi et Gordon 1999
Stabilité de la couleur des matériaux contenant caroténoïdes	Han et al. 1998; Osuna-García et al. 1998
Stabilité de couleur et oxydation lipidique de poisson	Li et al. 1998; Seymour et al. 1996
Stabilité lipidique pendant le stockage de la viande	Lee et al. 1998; Lee et Hendricks 1997
Stabilité lipidique en maïs extrudé	Camire et Dougherty 1998
Oxydation lipidique en mélanges farine-lipides	Lehtinen et Laakso 1998

Autres

Essai	Références
Activité de chélation du Fe ⁺² ou Cu ⁺²	Chyau et al. 2002; Lai et al. 2001; Lin et Yen 1999; Yen et Wu 1999; Chen et Ahn 1998; Okada et Okada 1998
Pouvoir réducteur	Juntachote et Berghofer 2005; Chyau et al. 2002; Duh et al. 1997; Duh 1998
Potentiel redox	Hagerman et al. 1998

Fondamentalement il y a deux types de réactions qui sous-tendent les principales méthodes *in vitro* proposées pour la détermination de la capacité antioxydante, tels que le transfert d'atomes d'hydrogène, dans les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) et le transfert d'électrons individuels, dans les méthodes DPPH (2,2-diphényl-1picrilhydrazil), ABTS (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) et FRAP (Capacité de Réduction Ferrique du Plasma). Les différentes méthodes se distinguent par l'agent oxydant utilisé, le substrat utilisé, la technique instrumentale utilisée et les potentielles interactions de l'échantillon avec le milieu réactionnel (Frankel & Meyer

2000, Perez et al. 2000, Schwarz et al. 2001, Wang et al. 2004). La plupart de ces méthodes n'utilisent pas des radicaux biologiques. Il s'agit des radicaux étrangers à l'organisme humain, comme le DPPH et l'ABTS. Le test DPPH présente l'avantage d'être simple et peu coûteux, ce qui explique sa popularité et l'étendue de son utilisation (Nenadis & Tsimidou 2002, Villaño et al 2007).

La plupart des méthodes pour la détermination de la capacité antioxydante mesurent uniquement les composés solubilisés dans l'eau en raison de la nature hydrophile des molécules et des substrats.

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme d'indices ou de valeurs équivalentes. Donc, dans le cas des méthodes ABTS, DPPH et FRAP, il est courant d'utiliser la valeur TEAC (Capacité Antioxydante Equivalent Trolox). Le Trolox est un analogue hydrosoluble de la vitamine E, utilisé comme standard antioxydant. Il est largement utilisé en raison de sa bonne solubilisation dans l'eau et dans des solutions lipidiques (Karvela et al. 2008, Thaipong et al. 2006).

I.5.2. Facteurs influençant l'activité antioxydante des extraits

Plusieurs facteurs tels que la concentration d'antioxydants, la température, la présence de lumière, le type de substrat lipidique, l'état physique du système, la présence de promoteurs d'oxydation ou synergistes, déterminent l'efficacité des antioxydants et des extraits antioxydants (Pokorny et al. 2001).

I.5.2.1. Variété, plante et le stade de maturité

La composition et la teneur en composés phénoliques et respectivement l'activité antioxydante sont différentes pour les différents organes des plantes. Par exemple, des compositions assez variées des composés phénoliques sont observées dans les feuilles, l'écorce, le liège et les aiguilles des pins (Kähkönen et al. 1999). Respectivement, les rendements d'extraction et les teneurs en molécules antioxydantes varient beaucoup. Des différences ont également été observées en fonction de la phase de maturation de la plante comme la teneur en polyphénols entre jeunes et vieilles feuilles de différentes matrices végétales (Sawa et al. 1999).

1.5.2.2. Concentration de l'extrait et teneur en composés phénoliques

Généralement la capacité antioxydante augmente avec l'augmentation de la teneur des composés phénoliques. Cependant, des résultats contradictoires ont été cités: alors que certains auteurs ont constaté une corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante (Andarwulan et al. 1999, Tsaliki et al. 1999), d'autres auteurs n'ont pas trouvé une telle corrélation (Bocco et al. 1998, Kähkönen et al. 1999). Certains auteurs ont évoqué aussi une augmentation de la capacité antioxydante de certains composés phénoliques lorsque leur teneur dans les extraits augmente (Gasiorowski et al. 1997, Aehle et al. 2004).

1.5.2.3. Durée de vie et conditions de stockage des extraits

La température et la lumière affectent les extraits antioxydants pendant le stockage. Rodriguez de Sotillo et al. (1994b) ont constaté qu'à l'exposition de lumière, l'acide chlorogénique des extraits de pomme de terre est complètement dégradé en une semaine et l'acide caféique, disparaît complètement au bout de 20 jours. Isolés hermétiquement à l'abri de la lumière ces extraits ont été stables pendant une période de trois ans à température ambiante (23 °C). Des extraits de la même source peuvent avoir une stabilité différente en fonction du solvant utilisé pour l'extraction des composés phénoliques. Par exemple, les extraits méthanoliques de noix de coco sont plus stables que les extraits obtenus en utilisant chloroforme ou dichloroéthane comme solvants (Azizah et al. 1999).

1.5.2.4. Accessibilité aux zones actives d'oxydation

L'accessibilité aux sites actifs de l'oxydation est un facteur critique pour l'efficacité de l'antioxydant (Frankel 1998). Ainsi, la distribution des antioxydants dans le système détermine que les composés hydrophiles soient plus efficaces dans des milieux apolaires, par exemple les huiles, car ils se placent à l'interface active air/huile. Les antioxydants lipophiles sont moins actifs pour l'inhibition de rancissement des huiles, car ils se diluent dans la phase huileuse. Cependant, dans les émulsions d'huile dans l'eau, les antioxydants lipophiles sont plus efficaces que les antioxydants

hydrophiles, parce qu'ils se concentrent aux interfaces huile/eau, contrairement aux antioxydants hydrophiles, qui sont dans le volume de la phase aqueuse. A l'interface huile/eau a lieu l'interaction entre les promoteurs de l'oxydation (ions métalliques, peroxyde de hydrogène) et le substrat lipidique. Ce comportement des molécules antioxydantes dans les émulsions d'huile dans l'eau et dans les systèmes homogènes d'huile est appelé « paradoxe polaire ».

I.6. Conclusion

La synthèse bibliographique a permis de mettre en avant les points importants suivant vis-à-vis du contexte et des objectifs de cette thèse.

Les antioxydants naturels apparaissent comme des ingrédients à fort intérêt dans les industries alimentaires et cosmétiques pour remplacer les antioxydants synthétiques. On peut trouver des antioxydants naturels dans diverses sources végétales, mais leur teneur dans les fruits rouges est particulièrement importante. Parmi les fruits rouges, *Aronia melanocarpa* ressort comme une source encore peu étudiée et très riche en antioxydants, en particulier en anthocyanines. Les antioxydants d'aronia présentent des potentialités de valorisation comme colorants ou antioxydants naturels dans les industries alimentaire et cosmétique. Les activités anti-cancer, anti-mutagène, anti-diabète et cardioprotectrice des polyphénols d'aronia peuvent également trouver des applications dans le domaine de la santé.

Ainsi, l'intérêt d'extraire ces molécules de façon sélective apparait clairement. En vue des applications potentielles visées, il est nécessaire de s'orienter vers des procédés écologiques, aussi bien pour l'étape d'extraction que pour les étapes de purification des molécules. L'extraction assistée par ultrasons a montré son efficacité pour l'extraction de composés phénoliques à partir de sources variées. Elle ressort donc comme un procédé intéressant pour extraire les polyphénols d'aronia. En raison de la faible sélectivité de l'étape d'extraction en général, il est nécessaire d'envisager une ou des étapes de purification des extraits. L'adsorption sur support solide apparait comme l'une des méthodes les plus efficaces pour les composés phénoliques, y compris en utilisant des solvants de grade alimentaire. L'intégration des procédés d'extraction et de purification pourrait permettre d'obtenir une opération globale intensifiée (optimisation en terme d'efficacité, d'impacts économique et environnemental).

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

II.1. Source végétale : aronia

Différents lots de baies d'aronia (cultivées dans la région d'Elena en Bulgarie) ont été utilisés pour la réalisation des expériences. La description des différents lots (différentes récoltes) et des différents prétraitements est donnée ci-dessous pour chaque grande partie du travail expérimental.

II.1.1. Etude de l'influence des paramètres opératoires sur l'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de baies d'aronia (Chapitre III.1)

Pour cette partie du travail, les expériences ont été menées sur des baies *d'Aronia melanocarpa* récoltés en 2010, puis stockées à température ambiante. La taille des baies était de $6,0 \pm 0,5$ mm et leur teneur en humidité était de $9,0 \pm 1,5\%$. L'extraction des polyphénols a été étudiée pour des baies prétraitées de deux manières différentes : baies broyées et baies coupées en deux.

Dans le premier cas, les baies ont été d'abord séchées pendant 4 heures à $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis broyées par portions d'environ 3 g pendant 15 s dans un broyeur de laboratoire (Yellow line, A10, IKA-Werke, Staufen, Allemagne). Les particules obtenues ont été séparées par tamisage en cinq fractions selon leur diamètre moyen d : $d < 0,5$ mm, $d = 0,5-1,0$ mm, $d = 1,0-1,4$ mm, $d = 1,4-2,0$ mm et $d > 2,0$ mm. Une tamiseuse Vibratory Sieve Shaker AS 200 Basic (Haan, Allemagne) a été utilisée. Les échantillons ont été conditionnés et conservés à température ambiante ($20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) avant l'extraction.

Le deuxième type de pré-traitement a consisté à couper les fruits en deux, juste avant le processus d'extraction. Ce type de prétraitement est intéressant du point de vue technologique, car on évite l'étape de séchage nécessaire avant le broyage (ce qui peut permettre d'éviter une dégradation thermique), et parce qu'il est plus facile de séparer l'extrait natif obtenu et la source végétale épuisée en fin d'extraction (moins de particules fines).

La majeure partie des résultats a été exprimée en rendement, défini comme le rapport entre la quantité de polyphénols extraits et la quantité totale de polyphénols dans la source. Les deux lots d'aronia (broyées ou coupées en deux) utilisées avaient des teneurs en polyphénols différentes :

- Lot 1, Aronia coupée en deux : 4,2 g de polyphénols pour 100 g(m.s.) de source,
- Lot 2, Aronia broyée : 2,8 g de polyphénols pour 100 g(m.s.) de source.

Ces teneurs initialement présentes dans la source ont été déterminées par une extraction à l'ébullition sous reflux de 4 h, avec de 5,0 g de baies et 100 ml de solvant (mélange eau-éthanol 50-50% (vol.)).

II.1.2. Modélisation de la cinétique d'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de co-produits d'aronia (Chapitre III.2)

Pour cette partie du travail, des baies d'*Aronia melanocarpa* sèches récoltées en septembre 2011 ont été utilisées. Les baies ont été passées dans une petite extrudeuse de laboratoire (Figure II.1) pour obtenir un jus d'aronia de degré alimentaire. Le résidu, sous forme de pellets d'environ 0,3-0,4 cm de diamètre, a été séché à 45 °C pendant 2 jours dans un four (Function Line Heraeus T6, IMLAB, Lille, France). Les pellets séchés ont ensuite été réduits en taille de façon à obtenir un mélange de particules de taille d'environ 0,3-0,4 cm de diamètre et de 0,5 à 1,0 cm de longueur. Le mélange de particules d'aronia obtenu (96,3% de matière sèche) a été fractionné en lots d'environ 7,5 g stockés dans l'obscurité à température ambiante jusqu'au moment de l'utilisation. La teneur de composés phénoliques et anthocyanines totales dans le résidu, déterminée après 3 extractions consécutives à 45 °C avec 7,66 g de co-produits de baies et 300 mL de solvant (mélange eau-éthanol 50-50% (vol.)), a été de 8,754 g/100 g m.s. (GAE) et 1,977 g/100 g m.s. (CGE), respectivement.



Figure II.1. Extrudeuse de laboratoire utilisée pour obtenir le jus d'aronia.

II.1.3. Etude de l'adsorption des antioxydants phénoliques d'aronia et intégration des procédés d'extraction et de purification (Chapitre IV.1 et IV.2)

Les baies d'*Aronia melanocarpa* utilisées pour cette partie du travail ont été récoltées en 2011 (lot différent par rapport à ceux utilisés dans les études d'extraction). Les baies ont

été extrudées (appareil décrit précédemment) pour obtenir des pellets d'environ 0,3-0,4 cm de diamètre et de 0,5 à 1,0 cm de longueur, qui ont ensuite été séchés à 45 °C pendant 2 jours dans un four (Function Line Heraeus T6, IMLAB, Lille, France). Les pellets d'aronia (97,4% matière sèche) ont été stockés dans l'obscurité, à température ambiante jusqu'à l'utilisation. La teneur de composés phénoliques et anthocyanines totales dans le résidu déterminée après 5 extractions consécutives à 45 °C avec 2,00 g de pellets d'aronia et 35 mL de solvant (mélange eau-éthanol 50-50% (vol.)) a été de 5,583 g/100 g m.s. (GAE) et 0,172 g/100 g m.s. (CGE), respectivement.

II.1.4. Optimisation du procédé intégré extraction-adsorption (Chapitre IV.3)

Pour cette partie du travail, un lot d'aronia récolté en septembre 2012 a été utilisé. Les baies ont été traitées de la même façon que décrit précédemment (cf §II.1.3 ci-dessus). Le mélange de particules d'aronia sèche (94,7% de matière sèche) a été fractionné en lots de 4,0 g stockés à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à l'utilisation. La teneur de composés phénoliques et anthocyanines totales dans le résidu déterminée après 4 extractions consécutives à 30 °C avec 1,04 g de co-produits d'aronia et 40 mL d'eau ultrapure a été de 0,891 g/100 g m.s. (GAE) et 0,508 g/100 g m.s. (CGE), respectivement.

II.2. Extraction solide-liquide classique et assistée par ultrasons

L'ensemble des expériences d'extraction solide-liquide ont été réalisées dans un contacteur en verre agité de 1 L, équipé d'un générateur d'ultrasons (SinapTec, France), et d'une double enveloppe, permettant une régulation de la température par circulation d'eau entre la double enveloppe et un bain thermostaté (Figure II.2).

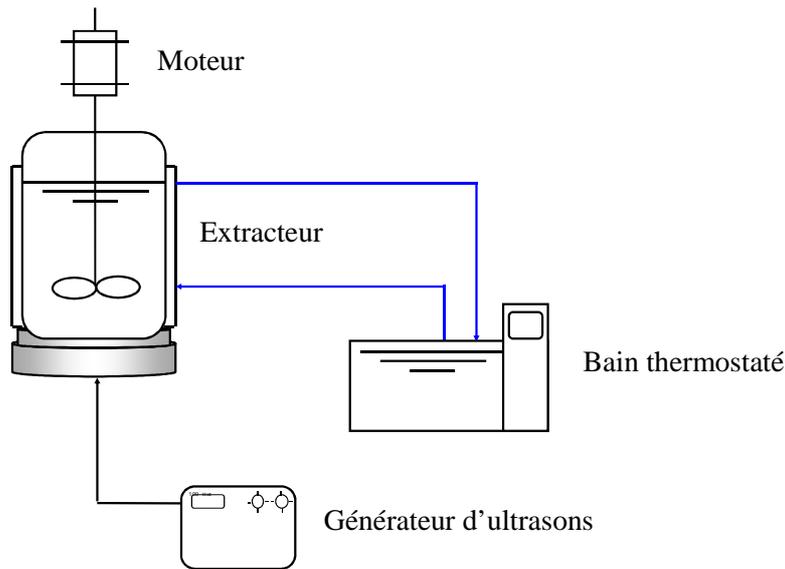


Figure II.2. Représentation schématique du dispositif expérimental pour l'extraction assistée par ultrasons.

Pour toutes les expériences, la vitesse d'agitation a été fixée à 120 tr.min^{-1} (permettant d'obtenir la mise en suspension des particules dans le volume du solvant). Le générateur d'ultrasons a fonctionné à une fréquence fixe de $30,8 \text{ kHz}$. Suivant les expériences, la puissance des ultrasons a été réglée entre 0 et 100 W , la température d'extraction a été réglée entre 20 et 80 °C , le ratio solide-solvant a été fixé à $1/10$, $1/20$ ou $1/40$, les solvants utilisés ont été l'eau, l'éthanol ou des mélanges eau-éthanol, et le volume de solvant a été constant dans chaque série d'expériences (300 ou 400 mL).

Les extraits liquides obtenus ont été centrifugés pendant 10 min à $10000 \text{ tr.min}^{-1}$ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hambourg, Allemagne) de manière à éliminer les particules solides en suspension. Le surnageant a été récupéré et conservé à -20 °C dans l'obscurité jusqu'à l'utilisation.

II.3. Adsorption sur support solide

Différents protocoles expérimentaux d'adsorption sur support solide ont été utilisés en fonction des études réalisées : étude des équilibres d'adsorption et de désorption, étude en colonne à l'échelle laboratoire, et enfin étude en colonne à l'échelle pilote. Après la description des adsorbants utilisés et de leur préparation, les protocoles expérimentaux correspondant à chaque étude sont détaillés ci-dessous.

II.3.1. Adsorbants

II.3.1.1. Nature des adsorbants utilisés

Quatre adsorbants de qualité alimentaire ont été utilisés : 1 adsorbant de type charbon actif et 3 adsorbants de type résine polymérique. Les propriétés des 4 adsorbants sont détaillées dans le Tableau II.1.

Tableau II.1. Propriétés des adsorbants.

	charbon actif	XAD7HP	XAD16	XAD1180
Forme physique	Grains	perles blanches translucides		
Densité (g/L)	400 (environ)	655	720	690
Taille moyenne des particules (mm)	1,4 – 1,6	0,56 - 0,71	0,56 - 0,71	0,35 - 0,60
Surface spécifique (m ² /g)	960	≥ 380	≥ 800	≥ 450
Porosité (mL/mL)	-	≥ 0,5	≥ 0,55	≥ 0,6
Polarité	apolaire	légèrement polaire	apolaire	apolaire

Le charbon actif (fourni par Merck, France) a été tamisé avec un tamiseur vibrant (AS200 basic, Retsch, Allemagne) de manière à obtenir des fractions de particules de différentes tailles. Seule la fraction 1,4-1,6 mm a été utilisée pour les expériences. La structure chimique des 3 résines Amberlite XAD7HP, XAD16 et XAD1180 (fournies par Rohm and Haas, France) est donnée en Figure II.3. La résine Amberlite XAD7HP est un

polymère acrylique non ionique aliphatique, qui peut adsorber des composés de polarités variées à partir de systèmes aqueux, et peut également adsorber des composés polaires à partir de solvants non polaires. Les résines XAD16 et XAD1180 sont des polymères réticulés non ioniques hydrophobes, qui peuvent adsorber des molécules hydrophobes à partir de solvants polaires.

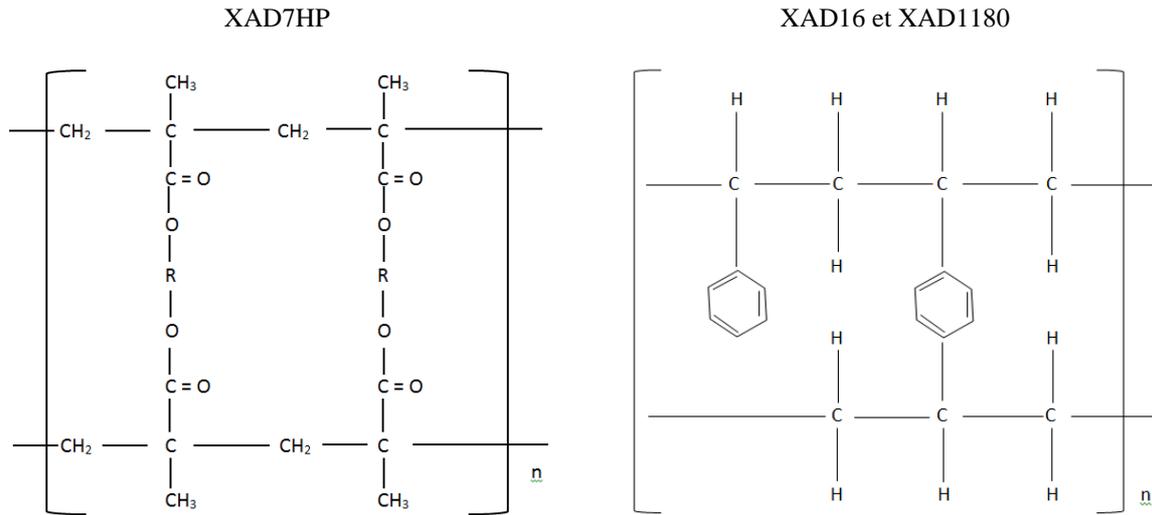


Figure II.3. Structure chimique des résines Amberlite XAD7HP, XAD16 et XAD1180.

II.3.1.2. Préparation des résines Amberlite.

Avant utilisation dans les expériences, les résines Amberlite ont dû être préparées. Elles ont été activées suivant la procédure suivante : lavage à l'eau ultrapure pendant 3 h (5 mL.g⁻¹ d'adsorbant), rinçage à l'eau ultrapure (2 mL.g⁻¹ d'adsorbant, 3 fois), lavage à l'eau ultrapure pendant 12 h (7,5 mL.g⁻¹ d'adsorbant), rinçage au méthanol (2 mL.g⁻¹ d'adsorbant, 3 fois), lavage au méthanol pendant 3 h (5 mL.g⁻¹ d'adsorbant), rinçage à l'eau ultrapure (2 mL.g⁻¹ d'adsorbant, 3 fois). Pour toutes les étapes de lavage, un incubateur agité (Multitron II Infors HT, Infors SARL, Massy, France) a été utilisé de manière à maintenir l'agitation à 160 tr.min⁻¹ et la température à 20 °C. Les résines ont été stockées dans une solution d'azide de sodium (0,1%, 3 mL.g⁻¹ d'adsorbant) à 4 °C jusqu'à utilisation. Avant utilisation, les résines ont été rincées à l'eau ultrapure (20 mL.g⁻¹ d'adsorbant, 3 fois) pour éliminer l'azide de sodium, puis rincées à l'éthanol 96% (20 mL.g⁻¹ d'adsorbant, 3 fois) sur un système Büchner avec pompe à vide (Laboport SUE 300Q, France). Cette dernière étape a permis d'assécher

les résines afin de déterminer précisément la masse sèche d'adsorbant utilisée dans chaque expérience.

II.3.2. Etude des équilibres d'adsorption et de désorption (*Chapitre IV.1.1*)

Ces études ont été réalisées à partir d'un extrait d'aronia obtenu avec le dispositif expérimental présenté précédemment (cf §II.2) et dans les conditions opératoires suivantes : 40 g de pellets d'aronia (cf §II.1.3), 400 mL d'eau ultrapure, 45 °C, 2 h avec application d'ultrasons pendant les 30 premières minutes (30,8 Hz, 100 W). L'extrait obtenu a été centrifugé et stocké comme indiqué précédemment (cf §II.2). Il a été utilisé tel quel ou dilué avec de l'eau ultrapure afin d'obtenir des extraits avec différentes concentrations initiales en polyphénols, nécessaires pour les études d'équilibre d'adsorption.

Les études d'équilibre d'adsorption et de désorption ont été réalisées en erlenmeyers de 100 mL placés dans un incubateur agité (Multitron II Infors HT, Infors SARL, Massy, France) de manière à maintenir l'agitation à 160 tr.min⁻¹ et la température à la valeur souhaitée (20 °C pour les adsorptions, 20 ou 40 °C pour les désorptions). Les expériences ont été réalisées sur une durée de 24 h afin de s'assurer d'avoir atteint l'équilibre (des études préliminaires ont montré que l'équilibre était atteint au bout d'environ 8 h). Les adsorbants utilisés ont été les résines macroporeuses amberlite XAD7HP et amberlite XAD16, le rapport adsorbant-liquide a été fixé à 1/20, c'est-à-dire 0,8 g d'adsorbant pour 16 mL de phase liquide (extrait d'aronia pour les expériences d'adsorption, ou mélanges eau-éthanol pour les expériences de désorption). Pour les désorptions et la régénération des adsorbants, différents mélanges eau-éthanol ont été utilisés : 20, 40, 50, 60, 70, 80 et 96% (vol.) en éthanol.

A la fin des expériences, les phases liquides ont été récupérées et stockées à -20 °C dans l'obscurité jusqu'à analyse. Chaque échantillon a été analysé pour déterminer les concentrations en polyphénols, en anthocyanines et la capacité antioxydante des extraits (cf §III.5).

Toutes les expériences ont été dupliquées.

II.3.3. Etude de la cinétique d'adsorption (*Chapitre IV.1.2*)

Ces études ont été réalisées en utilisant des extraits obtenus à partir de pellets d'aronia. Une partie des études cinétiques a été réalisée dans de fioles erlenmeyer sous agitation dans les mêmes conditions que dans les études d'équilibre (cf §II.3.2) en utilisant comme adsorbant la résine XAD7HP.

Une autre étude cinétique a été réalisée dans une colonne d'adsorption. La colonne utilisée a été un tube en verre de 33 cm de hauteur avec un diamètre interne de 0,8 cm. Le lit d'adsorption a été de 30 cm, correspondant à 7 g de résine XAD7HP. L'extrait d'aronia (100 mL) a été initialement mis dans un récipient et agité à l'aide d'un agitateur magnétique pour homogénéiser la phase liquide tout au long de l'opération. La solution a été ensuite mise en recirculation à travers la colonne d'adsorption par une pompe péristaltique de modèle Reglo Analog (Ismatec, France). Le débit a été fixé à 3,5 mL.min⁻¹. L'adsorption a fait l'objet d'une étude cinétique sur 24 h avec un système en boucle à température ambiante. Des échantillons ont été pris à 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 360, 480 et 1440 minutes et ensuite analysés (cf §II.6). A la fin de l'adsorption, les composés phénoliques ont été récupérés en éluant la colonne par 100 mL d'éthanol à 70%. Ainsi 10 fractions de 10 mL ont été récupérées. Le débit de la pompe (même pompe que dans l'étape d'adsorption) a été réduit à 0,7 mL.min⁻¹ afin de favoriser un temps de contact prolongé avec l'adsorbant.

II.4. Etude de l'impact de l'intégration extraction-adsorption

Cette étude a consisté à comparer 2 procédés : extraction et adsorption successives d'une part, procédé intégré extraction-adsorption d'autre part.

II.4.1. Extraction et adsorption successives (*Chapitre IV.2.1*)

Pour cette étude, l'extraction a été réalisée dans l'extracteur décrit précédemment (cf §II.2), avec 800 mL d'eau ultrapure, 10 g de pellets d'aronia (cf §II.1.3), une agitation à 40 tr.min⁻¹, sans ultrasons et à température ambiante (22 °C environ). L'extraction a duré 8 h, durant lesquelles des échantillons ont été prélevés régulièrement pour le suivi cinétique. Tous les échantillons prélevés ont été centrifugés pendant 10 minutes à 10000 tr.min⁻¹ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hambourg, Allemagne) de manière à éliminer les particules solides en suspension, puis stockés à -20 °C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse. A la fin de l'extraction,

l'extrait a été récupéré et centrifugé (mêmes conditions que précédemment). Seulement 750 mL ayant pu être récupérés, 50 mL d'eau ultrapure ont été ajoutés, de manière obtenir un volume d'extrait de 800 mL pour l'étape d'adsorption, l'objectif étant d'avoir les mêmes volumes pour l'extraction et adsorption successives et pour le procédé intégré extraction-adsorption afin de pouvoir les comparer.

L'étape d'adsorption a été réalisée dans une colonne de laboratoire en verre (30,5 cm de hauteur, 1,1 cm de diamètre) (Figure II.4). Le lit d'adsorbant a été réalisé avec 10g de résine Amberlite XAD7HP (lit fixe de 28 cm de haut). L'extrait de 800 mL a été passé en boucle fermée dans la colonne (de bas en haut) pendant 8 h, à température ambiante (environ 22 °C), à un débit de 1 L.h⁻¹ grâce à une pompe péristaltique (Masterflex L/S, Cole Parmer Instrument Company, Barrington, USA). Des échantillons ont été prélevés régulièrement pour le suivi cinétique et stockés à -20 °C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse.

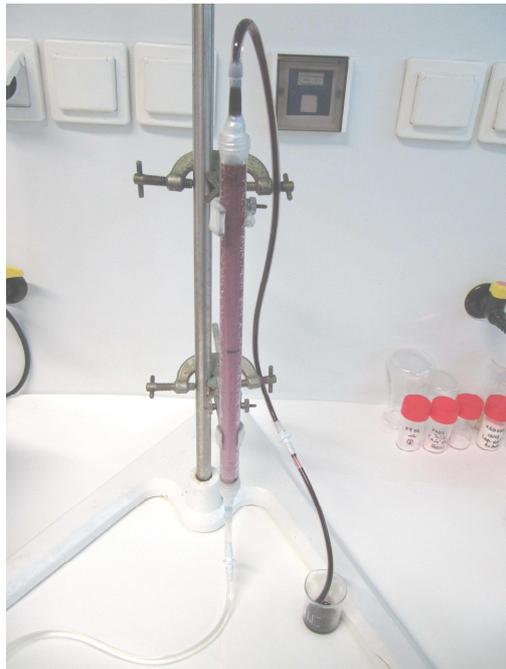


Figure II.4. Colonne d'adsorption à l'échelle laboratoire (l'étape de désorption).

Après l'étape d'adsorption, la colonne a été éluée avec 180 mL d'éthanol 70% (vol.) à un débit de 2 mL.min⁻¹ (même pompe péristaltique que précédemment). L'éluant a été collecté en plusieurs fractions (12 fractions de 10 mL puis 1 fraction de 60 mL) afin de suivre

le profil d'éluion (Figure II.5). Les échantillons ont été stockés à -20°C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse.



Figure II.5. Eluant récolté en différentes fractions.

II.4.2. Procédé intégré extraction-adsorption (*Chapitre IV.2.2*)

Le dispositif expérimental pour le procédé intégré est présenté schématiquement Figure II.6. Les dispositifs et protocoles opératoires sont les mêmes que pour l'extraction et l'adsorption successives (cf §II.4.1), excepté que la phase liquide a circulé en boucle fermée entre l'extracteur et la colonne d'adsorption.

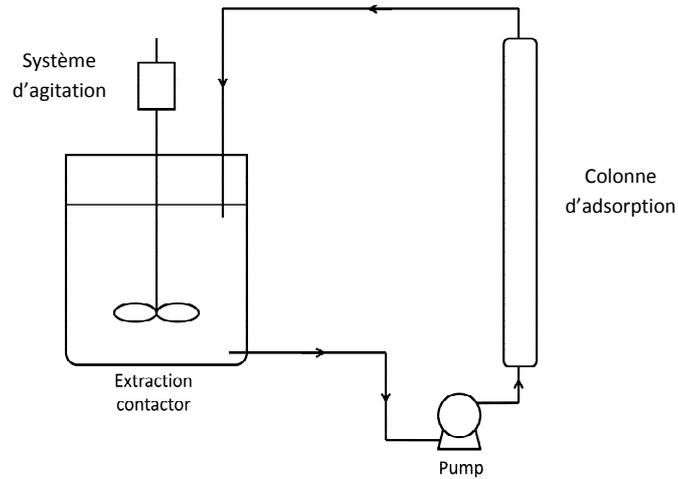


Figure II.6. Représentation schématique du dispositif expérimental pour le procédé intégré extraction-adsorption.

L'élution a également été menée comme indiqué dans le §II.3.3, excepté que l'éluant a été récolté en fractions plus nombreuses : 30 fractions de 2 mL, puis 6 fractions de 10 mL et enfin 1 fraction de 60 mL.

II.5. Optimisation du procédé intégré extraction-adsorption et procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote

II.5.1. Optimisation du procédé intégré extraction-adsorption (Chapitre IV.3)

Les travaux d'optimisation du procédé intégré extraction-adsorption ont été réalisés à l'échelle laboratoire, avec le dispositif et les protocoles opératoires décrit précédemment (cf §II.3.2), à l'exception des points suivants : 4,0 g d'aronia et 4,0 g d'adsorbant dans la colonne, élution avec 100 mL d'éthanol 70% (vol.). D'autre part, l'optimisation a été réalisée sur la base d'un plan d'expérience à 2 variables, la durée d'extraction et le débit de circulation de la phase liquide, et à 3 niveaux. Ainsi les expériences ont été menées sur différentes durées (2, 5 ou 8 h), et avec différents débits de circulation de la phase liquide (1, 3 ou 5 L.h⁻¹).

L'élution a été menée comme indiqué dans le §II.3.3, excepté que 100 mL d'éluant a été utilisé, récolté en fractions suivantes : 15 fractions de 2 mL, puis 7 fractions de 10 mL.

II.5.2. Procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote (Chapitre IV.4)

L'étude expérimentale du passage à l'échelle pilote du procédé intégré extraction-adsorption a été réalisée dans une cuve d'extraction de 100 L (équipée d'un agitateur) couplée à une colonne d'adsorption, ou deux colonnes d'adsorption en série (colonnes identiques de 0,6 m de haut et 4 cm de diamètre interne) (Figure II.7). La circulation de la phase liquide a été assurée par une pompe péristaltique.

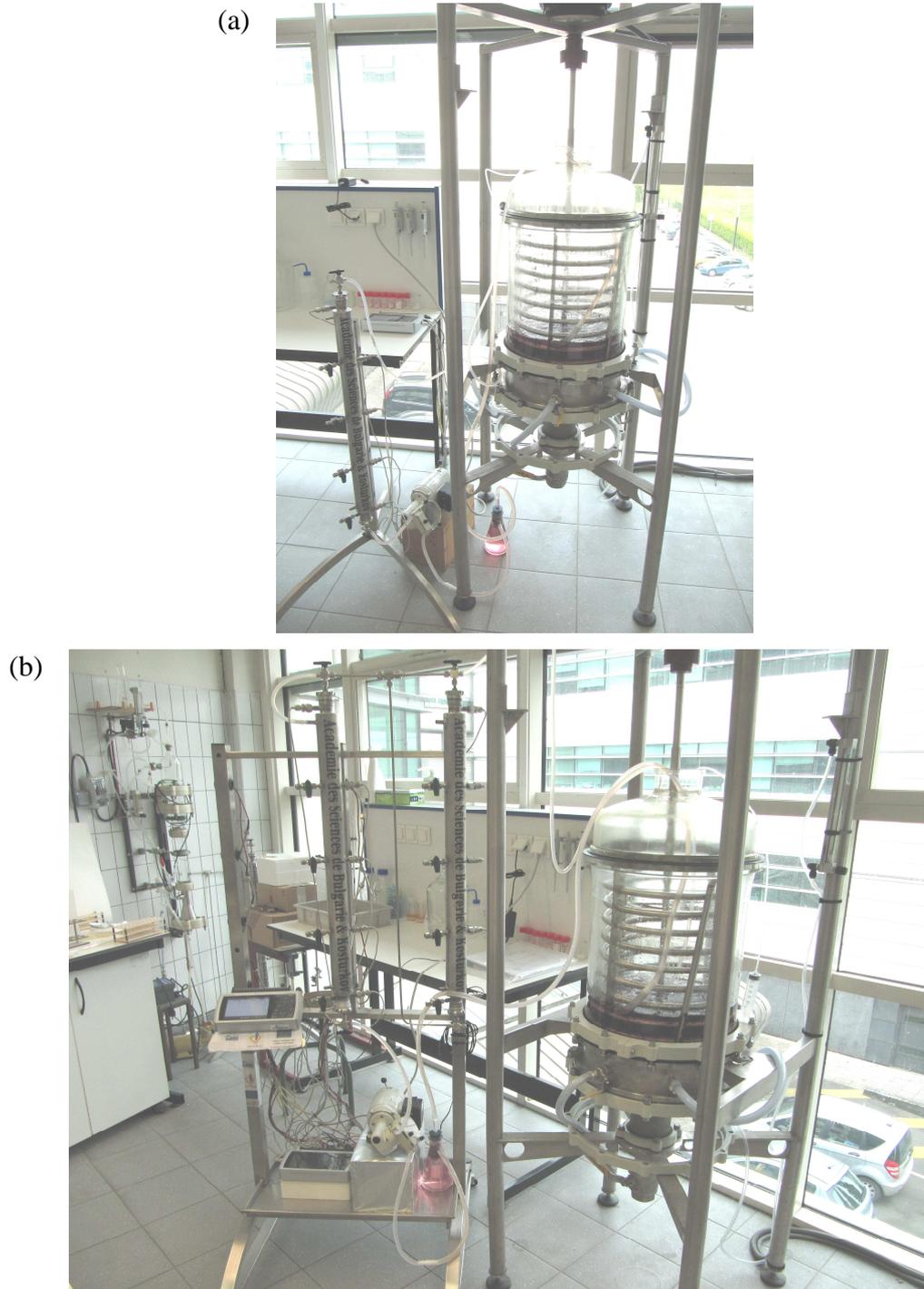


Figure II.7. Installation pilote du procédé intégré extraction-adsorption avec (a) une colonne d'adsorption et (b) deux colonnes d'adsorption.

Les expériences ont été réalisées avec 200 g d'aronia (cf §II.1.4) et 40 L d'eau déminéralisée. Le débit de circulation entre la cuve et la(les) colonne(s) a été fixé à $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, afin de se placer dans des conditions similaires aux expériences à l'échelle laboratoire du

point de vue du nombre de cycles. 200 g de résine Amberlite XAD7HP ont été placés dans chaque colonne. Chaque expérience a duré 480 minutes, durant lesquelles des échantillons ont été prélevés régulièrement dans la cuve d'extraction pour analyse afin de réaliser un suivi cinétique du procédé (10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 et 480 minutes). Les échantillons prélevés ont été centrifugés pendant 10 minutes à $10000 \text{ tr.min}^{-1}$ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hambourg, Allemagne) de manière à éliminer les particules solides en suspension, puis stockés à $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dans l'obscurité jusqu'à l'analyse.

Après la fin du procédé intégré, les colonnes d'adsorption ont été éluées avec 5 L d'éthanol 70% (vol.) à un débit de 100 mL.min^{-1} . L'éluant a été récupéré en sortie de colonne(s) en plusieurs fractions (15 fractions de 100 mL puis 7 fractions de 500 mL) afin de suivre le profil d'éluion. Des échantillons de 10 mL de chaque fraction ont été stockés à $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dans l'obscurité jusqu'à l'analyse et le reste des fractions a été rassemblé. La majeure part de l'éthanol de l'extrait ainsi obtenu (la solution d'éluion) a été évaporé dans un rotavapor (Heidolph instrument, GmbH & Co.KG, Allemagne) sous vide à $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ et 160 tr.min^{-1} . L'extrait ainsi concentré a été lyophilisé (lyophilisateur Heto power dry PL9000 Thermo Scientific Brand Products) pour conservation sous forme de poudre déshydratée.

II.6. Techniques analytiques

L'ensemble des extraits et des échantillons prélevés au cours des expériences d'extraction, d'adsorption et d'éluion ont été caractérisés en déterminant leur capacité antioxydante et leur concentration en polyphénols, en particulier en anthocyanines. Les méthodes analytiques utilisées sont détaillées ci-dessous.

II.6.1. Mesure du taux de matières sèches

La mesure du taux de matières sèches a été réalisée grâce à un dessiccateur XM60 de marque Precisa (Poissy, France). Environ 5 g de l'échantillon à analyser y a été déposé dans une coupelle en aluminium et exposé à une température de $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à évaporation totale du liquide de ces échantillons. Les résultats sont exprimés en pourcentage de matières sèches. Ainsi a été déterminé le taux de matière sèche de la source végétale, du résidu d'aronia après l'obtention du jus et des extraits.

II.6.2. Mesures spectrophotométriques

La capacité antioxydante des extraits et les concentrations de composés phénoliques totaux et d'anthocyanines totales dans les extraits ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UVmini 1240 (Shimadzu, France). Les microcuvettes utilisées ont été de dimension 10 x 10 x 45 mm, en polystyrène, fournies par Sarstedt & Co (Nümbrecht, Allemagne).

II.6.2.1. Capacité antioxydante (CA)

La capacité antioxydante des échantillons a été déterminée par la méthode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Le DPPH est un radical stable avec une couleur pourpre profond dont la réaction avec d'autres radicaux, agents réducteurs, ou des composés capables de HAT (Transfert des Atomes de Hydrogène) conduit à la perte de la couleur à 515 nm. Le radical DPPH réagit avec ses deux électrons et donneurs d'hydrogène.

Le test a été réalisé suivant le protocole décrit par Brand-Williams et al. (1995). 50 µL d'échantillon ont été ajoutés à 1950 µL d'une solution méthanolique de radical DPPH (100 µM). Après agitation, le mélange a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a ensuite été mesurée à 517 nm. L'activité antioxydante des échantillons a été estimée à partir de la diminution de l'absorbance et les résultats ont été exprimés soit en pourcentage de perte de l'absorbance initiale, soit en équivalent Trolox (TEAC) suivant les expériences. La valeur de la concentration efficace (CE_{50}) a été définie comme celle qui a diminué de 50% de l'absorbance initiale de la solution radicale de DPPH. L'équation permettant de calculer la concentration en équivalent Trolox est la suivante :

$$C_{Trolox} = (\% \text{ d'inhibition du DPPH} - 1,693) / 0,046 \quad (R^2 = 0.99) \quad (\text{II.1})$$

$$\text{avec } \% \text{ d'inhibition du DPPH} = (A_{t0} - A_{tf}) / A_{t0}$$

où C_{Trolox} est la concentration en équivalent Trolox (µM), A_{t0} est l'absorbance initiale de la solution méthanolique de DPPH et A_{tf} est l'absorbance de l'échantillon après 30 minutes de réaction.

II.6.2.2. Polyphénols totaux (PT)

La quantification des polyphénols totaux (composés phénoliques totaux) a été réalisée par une méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette méthode nécessite la présence d'un milieu hautement basique. Dans ce système, les composés phénoliques sont énergétiquement oxydés conduisant à la formation de dérivés d'oxygène (O_2^-). Ceux-ci réagissent avec le molybdate présent dans le réactif de Folin-Ciocalteu, provoquant l'apparition de l'ion MoO^{4+} qui absorbe fortement à 760 nm (Roginsky & Lissi 2005).

Le test a été réalisé suivant le protocole proposé par Singleton et al. (1999) avec de légères modifications. 100 μ L d'échantillon sont placés dans 7,9 mL d'eau ultra-pure, puis sont ajoutés 500 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu et 1,5 mL de solution saturée de carbonate de sodium. L'absorbance de ce mélange est lue à 765 nm après une période d'incubation de 2 h à l'abri de la lumière,.

Les résultats ont été exprimés en équivalent d'acide gallique (GAE) en utilisant une gamme étalon établie à partir de solutions standards d'acide gallique (Figure II.9). La concentration en équivalent d'acide gallique des échantillons a été calculée à partir de l'absorbance à 765 nm par l'équation suivante :

$$C_{GAE} = (A_{765} + 0,001) / 0,00112 \quad (R^2=0,996), \quad (II.2)$$

où A_{765} est l'absorbance à 765 nm et C_{GAE} est la concentration en équivalent d'acide gallique ($mg.L^{-1}$).

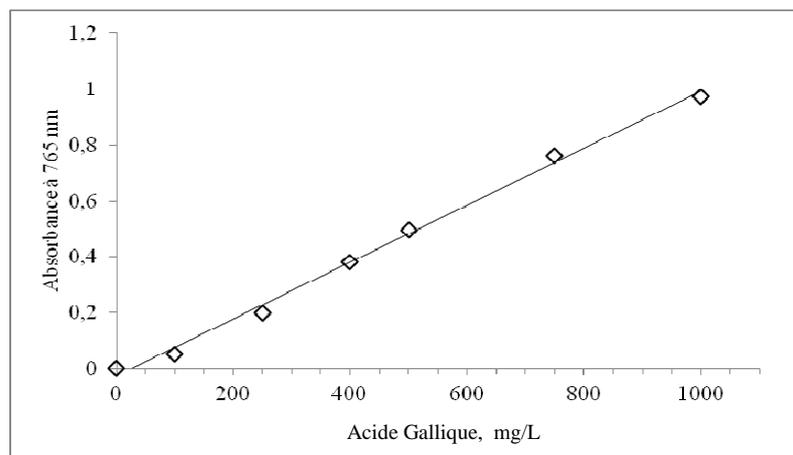


Figure II.8. Courbe d'étalonnage pour la détermination des polyphénols totaux.

II.6.2.3. Anthocyanines totales (AT)

La détermination des anthocyanines totales a été réalisée par la méthode de pH différentiel, qui est largement utilisée, notamment dans le domaine alimentaire (contrôle qualité des boissons riches en anthocyanines, par exemple).

Cette méthode permet de déterminer la teneur totale en anthocyanines monomériques, sur la base du changement structural du chromophore anthocyanine entre les pH 1,0 et 4,5 (Figure II.10). Les anthocyanines monomériques subissent en effet une transformation structurale réversible en fonction du pH : forme flavylium colorée à pH=1,0 et forme hémiacétal incolore à pH=4,5 (Figure II.11). Ainsi, la différence d'absorbance à 510 nm est proportionnelle à la concentration en anthocyanines. Les anthocyanines dégradées en forme polymérique sont résistantes aux changements de couleur en fonction du pH, et ne sont par conséquent pas détectées par cette méthode.

Le protocole utilisé est le suivant (Lee et al. 2005). Des solutions tampon à pH=1,0 et pH=4,5 ont été préparés :

- Tampon pH1,0 (chlorure de potassium, 0,025 M) : 1,86 g de KCl sont dissous dans 980 mL d'eau ultrapure, puis le pH est ajusté à 1,0 ($\pm 0,05$) par ajout d'HCl.
- Tampon pH4,5 (acétate de sodium, 0,4 M) : 54,43 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 960 mL d'eau ultrapure, puis le pH est ajusté à 4,5 ($\pm 0,05$) par ajout d'HCl.

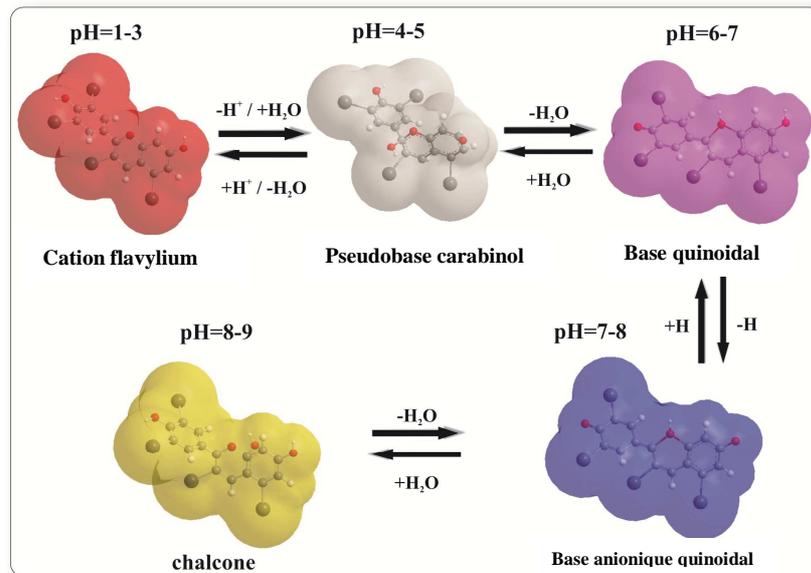


Figure II.9. Transformation de la structure des anthocyanines en milieu aqueux en fonction du pH.
(Ananga et al. 2013)

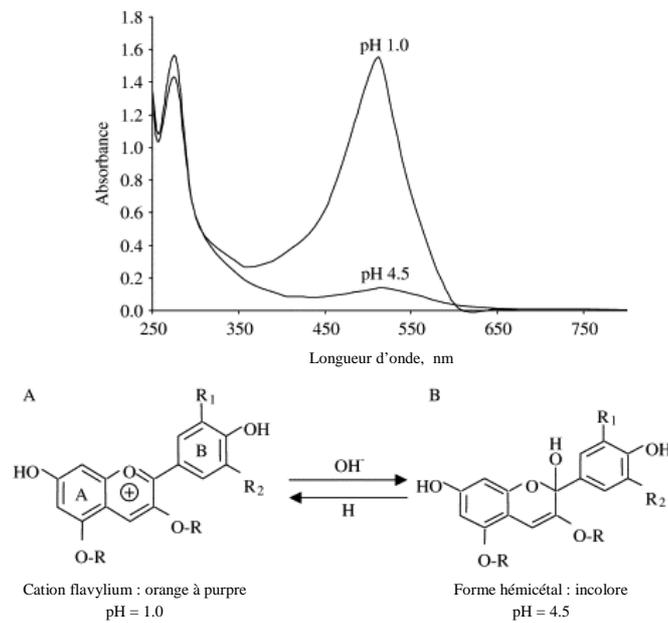


Figure II.10. Spectre de UV-vis des anthocyanines en solutions tampon pH 1,0 et 4,5 et les structures cation flavylum (A) et la forme hémicétal (B). R=H ou substituent glycosidique.

Les échantillons ont été dilués 20 fois (150 μL d'extrait + 2850 μL de solution tampon) avec les différents tampons (pH 1,0 et pH 4,5), et l'absorbance a été mesurée à 510 et 700 nm dans les 20 à 50 min suivant la préparation du mélange (la mesure d'absorbance à 700 nm a été utilisée pour effectuer une correction en cas de turbidité). L'eau ultrapure a été utilisée comme blanc. La concentration en anthocyanines totales dans l'échantillon a été calculée suivant l'équation :

$$AT = \frac{A \cdot M_w \cdot D_f \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} \quad \text{avec} \quad A = (A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}, \quad (\text{II.3})$$

où AT est la concentration en anthocyanines totales exprimée en équivalent cyanidine-3-glucoside (CGE) ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CGE), A_{510} et A_{700} sont les valeurs d'absorbance à 510 et 700 nm, respectivement, M_w est le poids moléculaire de cyanidine-3-glucoside ($449,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), D_f est le facteur de dilution, ε est l'absorptivité molaire de la cyanidine-3-glucoside ($26\,900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l est la longueur du trajet optique (1 cm dans la présente étude) et 10^3 est le facteur de conversion de g en mg.

II.6.3. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide de haute performance (HPLC) a été utilisée pour analyser et confirmer (par rapport à la méthode de pH-différentiel) la concentration en anthocyanines dans les échantillons. Il s'agit d'une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'une solution. L'échantillon à analyser est entraîné par un éluant liquide (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés les uns des autres en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases, stationnaire et mobile. Les composés sont ensuite élués et détectés en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.) (Figure II.12).

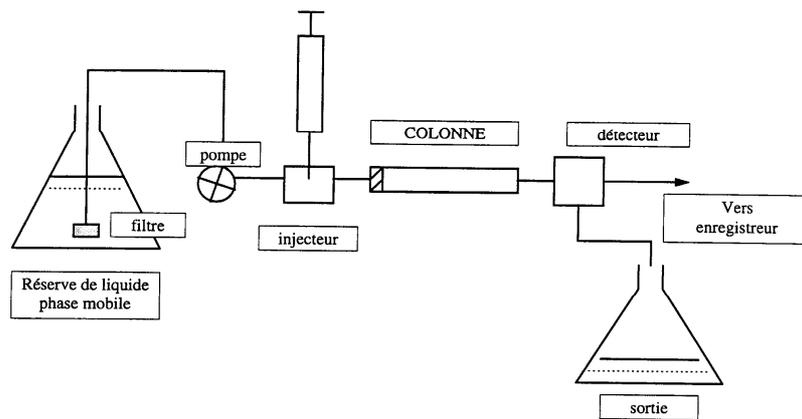


Figure II.11. Schéma de principe de la chromatographie liquide de haute performance.

Le matériel utilisé est le suivant : colonne LiChrospher[®] 100 RP-18 endcapped (5 μ m) et précolonne LiChroCART[®] 250-4 Merck Millipore, injecteur Waters 717 Plus Autosampler, dégazeur Waters In Line Degasser, pompe Waters 600 Pump, détecteur PDA Waters 2996 Photodiode Array Detector, logiciel Empower Pro.

L'élution a été réalisée à débit fixe de 1 mL.min⁻¹ en mode isocratique suivant le gradient décrit dans le Tableau II.2, avec 2 solvants : eau acidifiée à 0,5% d'acide formique (solvant A) et méthanol acidifié à 0,5% d'acide formique (solvant B). Les chromatogrammes ont été enregistrés entre 200 et 600 nm, et analysés à 520 nm. La cyanidine-3-galactoside (Idaein chloride fourni par Sigma-Aldrich) a été utilisée comme standard de référence.

Tableau II.2. Gradient d'élution.

Temps (min)	% solvant A	% solvant B
0	90	10
10	90	10
45	0	100
50	0	100
55	90	10
60	90	10

Chapitre III :

*Extraction assistée par ultrasons d'antioxydants
phénoliques à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-
produits*

L'objectif général développé dans ce chapitre est l'optimisation de l'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir d'aronia. Les travaux sont développés en deux axes principaux :

- l'étude des effets des principaux paramètres opératoires et du prétraitement de la source sur l'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de baies d'aronia,
- la modélisation de la cinétique d'extraction assistée par ultrasons en fonction des paramètres opératoires les plus influents, en vue de l'optimisation de l'extraction d'antioxydants à partir de co-produits d'aronia.

III.1. Etude de l'influence des paramètres opératoires sur l'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de baies d'aronia

L'objectif de cette partie du travail de thèse est d'étudier les effets de différents paramètres opératoires sur l'extraction d'antioxydants à partir de baies d'aronia. Les paramètres étudiés sont la température (20, 40, 60 ou 80 °C), le ratio solide-solvant (1:10, 1:20 ou 1:40), la teneur en éthanol du solvant (0, 20, 50, 80 ou 95% vol.), la taille des particules (baies broyées : $d < 0,5$ mm, $d = 0,5-1,0$ mm, $d = 1,0-1,4$ mm, $d = 1,4-2,0$ mm, $d > 2,0$ mm ; ou baies coupées en deux), l'application ou non d'ultrasons (0 ou 100 W, 30,8 kHz), et enfin le temps avec un suivi cinétique de chaque extraction (échantillons prélevés à 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180 et 240 minutes). L'agitation a été fixée à 120 tr.min^{-1} de manière à obtenir une mise en suspension homogène des particules solides dans le solvant. Le pH n'a pas été considéré parmi les paramètres à étudier, une étude préliminaire ayant montré sa faible influence sur le rendement d'extraction des polyphénols. Les effets des paramètres étudiés sont évalués en termes de rendement d'extraction (quantité de polyphénols extraits par rapport à la quantité disponible dans la source) et de vitesse d'extraction. La capacité antioxydante des extraits obtenus a également été étudiée.

III.1.1. Effets du temps et de la température d'extraction

Le temps et la température d'extraction sont des paramètres importants à optimiser afin de minimiser le coût énergétique du procédé. Les cinétiques d'extraction à l'eau des polyphénols d'aronia coupée en deux pour 3 températures différentes sont présentées sur la Figure III.1. Pour chaque température étudiée, la quantité de polyphénols extraits augmente continuellement avec le

temps. La vitesse d'extraction diminue progressivement, mais l'équilibre n'a pas été atteint après 4 h d'extraction.

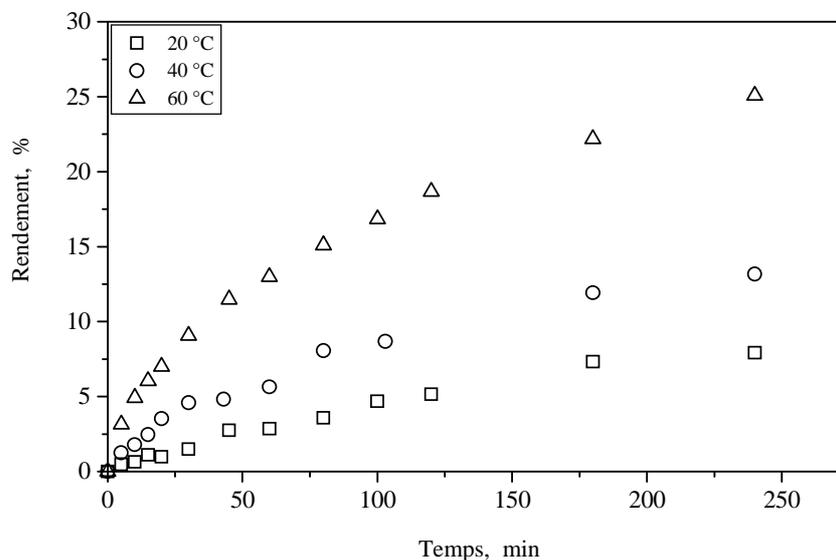


Figure III.1. Influence de la température sur la cinétique d'extraction à l'eau des polyphénols d'aronia coupé en deux avec un ratio solide-solvant de 1:20.

Généralement, la température a un effet positif sur l'extraction des composés phénoliques à partir de sources végétales (Bucic-Kojic et al. 2007, Harbourne et al. 2009, Spigno et al. 2007). Les résultats obtenus montrent également une nette influence de la température moyenne sur l'extraction des polyphénols d'aronia (Figure III.1.). Les rendements en polyphénols à 60 °C sont environ trois fois supérieurs comparés aux rendements obtenus à 20 °C. L'effet positif de la température pourrait être expliqué par la plus grande solubilité des polyphénols dans le solvant, une diffusivité plus élevée des molécules extraites et l'amélioration du transfert de matière à des températures plus élevées. Une augmentation de la température d'extraction pourrait aussi modifier la structure de la matrice végétale, et par conséquent faciliter le processus d'extraction (Prasad et al. 2009). Il faut mentionner que les rendements en polyphénols à ces conditions (à l'eau avec des baies coupées en deux) ne sont pas satisfaisants. Les particules solides n'étant pas assez fines, la pénétration du solvant et le déplacement des molécules dans ces particules de grande taille n'ont probablement pas été efficaces. Les rendements obtenus par extraction avec l'eau comme solvant en utilisant la fraction la plus fine des baies broyées ($d < 0,5$ mm) ont été beaucoup plus élevés (Figure III.2.).

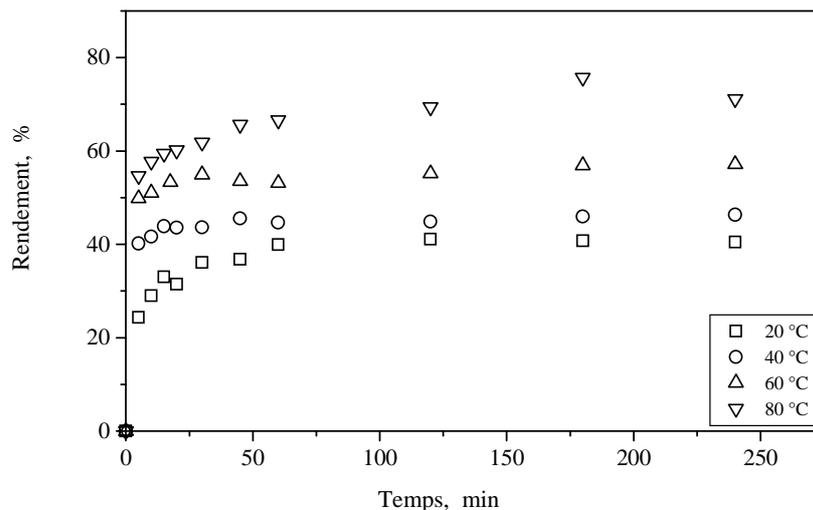


Figure III.2. Influence de la température sur la cinétique de l'extraction à l'eau des polyphénols à partir d'aronia broyée ($d < 0,5$ mm) avec un ratio solide-solvant de 1:20.

La diffusion interne des molécules vers l'extérieur de la particule apparaît comme une étape limitant la vitesse d'extraction. La surface de contact plus élevée entre le solvant et les particules fines favorise l'extraction des polyphénols. La cinétique d'extraction des particules fines est très rapide et les rendements sont presque constants après la première heure d'extraction. On remarque une vitesse initiale d'extraction élevée (15 premières minutes) puis un ralentissement de l'extraction, en s'approchant asymptotiquement de la concentration d'équilibre. L'effet de la température est également très clair pour les baies broyées, mais moins important que dans le cas des baies coupées en deux (dans l'intervalle de temps étudié).

III.1.2. Effet du rapport solide-liquide

L'effet du rapport solide-liquide sur l'extraction des polyphénols d'aronia a été étudié à 60 °C avec des baies broyées (fraction $d = 0,5-1,0$ mm) et de l'eau comme solvant. Les résultats présentés dans la Figure III.3 montrent logiquement que la concentration en polyphénols augmente lorsqu'il y a plus de matière première par rapport à un volume du solvant donné. Toutefois, le rendement des polyphénols pour le rapport solide-liquide 1:10 (44,0%) est sensiblement plus faible que les rendements pour les rapports 1:20 et 1:40 qui sont très similaires (57,5% et 56,9%, respectivement). En conséquence, les rapports 1:20 et 1:40 ont été considérés comme appropriés

pour obtenir des rendements maximaux et ils ont été conservés pour étudier les effets des autres paramètres sur l'extraction des polyphénols d'aronia.

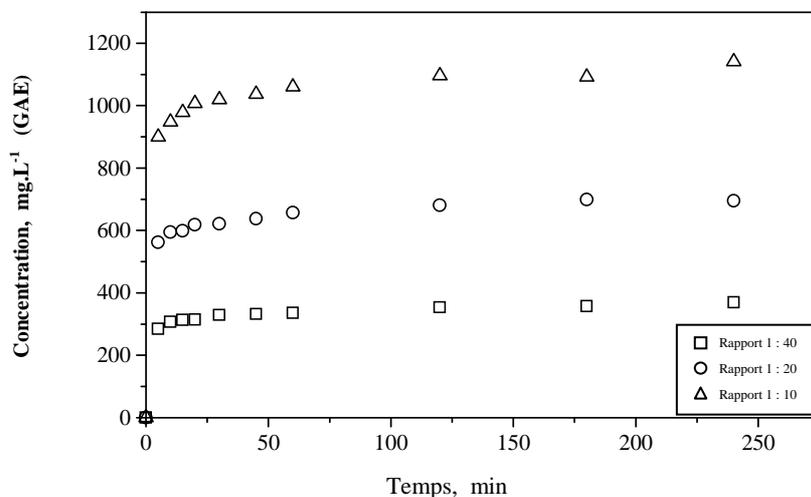


Figure III.3. Effet du rapport solide-solvant sur la cinétique d'extraction à l'eau des polyphénols à partir d'aronia broyée ($d = 0,5-1,0$ mm) à 60 °C.

III.1.5. Effet du solvant

Pour extraire les composés phénoliques antioxydants (anthocyanes, flavonoïdes et leurs glycosides, tanins, etc.) à partir de diverses sources végétales, l'acétone et les solvants éthanoliques sont couramment utilisés (Denev et al. 2010, Spigno et al. 2007, Bazykina et al. 2002). En général, ils donnent des rendements d'extrait sec total assez élevés, même s'ils ne sont pas très sélectifs pour les phénols (Spigno et al. 2007). En particulier, les mélanges éthanol-eau sont plus efficaces pour l'extraction de composés phénoliques que l'eau pure et l'éthanol pur (Yilmaz & Toledo 2006, Pinelo et al. 2005, Penchev et al. 2010). Compte tenu de l'utilisation potentielle des extraits d'aronia dans l'industrie alimentaire, dans cette étude l'éthanol a été préféré comme solvant. En modifiant les proportions eau-éthanol, la polarité du solvant, et par conséquent la solubilité de différents composés phénoliques pourrait être modifiée. Afin d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés, il est très important de trouver le meilleur rapport de mélange de solvants. La Figure III.4 présente la cinétique d'extraction de polyphénols à partir de baies d'aronia (fraction $d = 0,5$ à $1,0$ mm) en utilisant de l'eau et divers mélanges eau-éthanol comme solvant (à 60 °C et avec un rapport solide-liquide de 1:20). Il a été observé que la présence d'éthanol dans le solvant peut

augmenter les rendements en polyphénols. Les rendements obtenus avec 20% (vol.) et surtout ceux avec 50% d'éthanol (vol.) sont beaucoup plus élevés que les rendements de l'extraction à l'eau. Toutefois, l'extraction avec des mélanges eau-éthanol à faible teneur en eau est moins efficace. Les composés phénoliques solubles sont principalement répartis dans les vacuoles des cellules, alors que la plupart des lignines, flavonoïdes et polyphénols insolubles se trouvent dans la paroi cellulaire, combinés par des liaisons hydrogène et hydrophobes avec des protéines et des polysaccharides (Dixon & Paiva, 1995). L'eau et les solvants à faible concentration en éthanol peuvent accéder aux cellules, mais une forte concentration d'éthanol peut provoquer la dénaturation des protéines, ce qui empêche la dissolution des polyphénols et influence l'extraction (Yang et al. 2009).

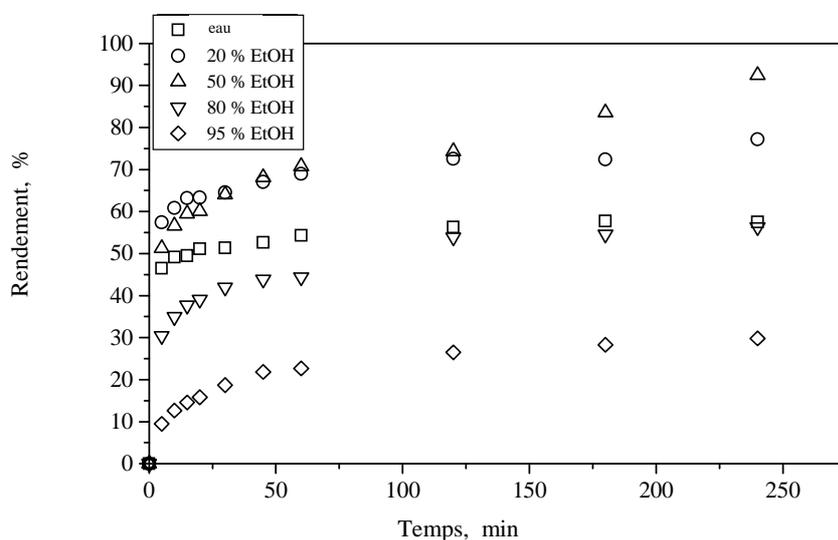


Figure III.4. Effet de la composition de solvant sur la cinétique d'extraction des polyphénols à partir d'aronia broyée (d = 0,5-1,0 mm) à 60 °C et un ratio solide-solvant de 1:40.

Dans le cas des baies coupés en deux, les rendements d'extraction en polyphénols obtenus avec l'éthanol à 50% (vol.) à différentes températures (20, 40 et 60 °C) ont été environ 2 fois supérieurs aux rendements d'extraction obtenus avec l'eau pure.

III.1.6. Effet de la taille des particules

L'influence de la taille des particules sur le taux d'extraction a été étudiée avec 5 fractions d'aronia broyée, à 60 °C, avec un rapport solide-liquide 1:20, et de l'eau comme solvant. Une diminution de la vitesse de transfert de matière peut être observée quand la taille des particules augmente, en particulier dans les 30 premières minutes des expériences (Figure III.5). Cette tendance est logique puisque la surface de contact diminue et le parcours du soluté par diffusion dans les pores augmente avec la taille des particules (Bucic-Kojic et al. 2007, Wongkittipong et al. 2004). Pour toutes les fractions de particules, à l'exception de la plus grande ($d > 2$ mm), les concentrations à l'équilibre ont été atteintes sur la durée des essais expérimentaux. A partir des courbes d'extraction, on peut conclure que la quantité de polyphénols disponibles n'était pas exactement la même dans les fractions de granulométrie différente. En fait, la quantité de polyphénols n'est pas identique dans les différentes parties des baies (pulpe, graines et peau). Bien évidemment, la répartition des différentes parties de la baie dans les fractions de différente taille de particules n'est pas identique (notamment pour les polyphénols). La Figure III.5 confirme également que l'extraction à partir de baies broyées est beaucoup plus efficace que l'extraction à partir de baies coupées en deux montrant l'importance du prétraitement de la matière première avant l'extraction. Des résultats similaires ont été obtenus concernant l'effet de la taille des particules pour l'extraction des polyphénols avec 50% (vol.) d'éthanol comme solvant.

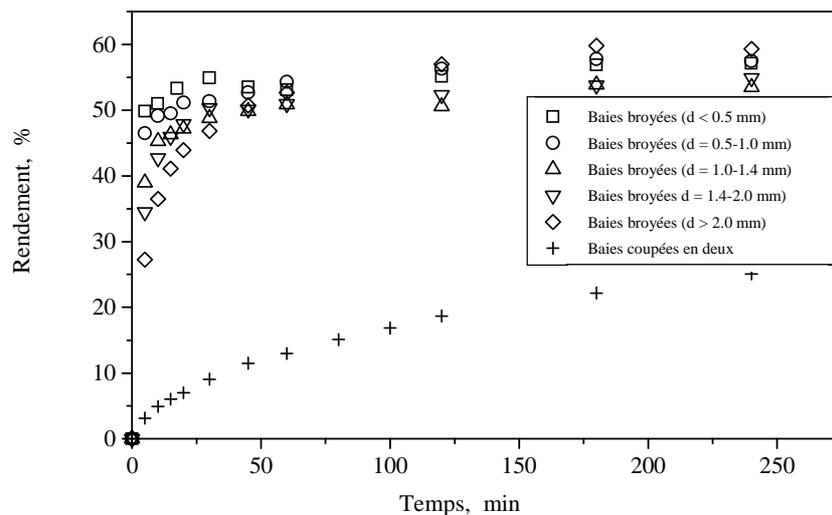


Figure III.5. Effet de la taille des particules sur la cinétique d'extraction à l'eau des polyphénols d'aronia à 60 °C et avec un rapport solide-solvant de 1:20.

III.1.7. Effet des ultrasons

La Figure III.6 permet de comparer les courbes d'extraction obtenues sans et avec l'aide d'ultrasons à différentes températures et avec l'utilisation de différentes compositions de solvant. Dans toutes les conditions étudiées, un effet positif significatif de la sonication a été observé. En fait, les ultrasons suscitent la formation de bulles minuscules soumises à des compressions et expansions adiabatiques rapides, qui provoquent l'augmentation locale de température et de pression en leur sein (Japon-Lujan et al. 2006). Ce phénomène de chauffage local des particules d'aronia exposées au traitement ultrasonique pourrait contribuer à l'accroissement des rendements observés. Toma et al. (2001) ont également rapporté une influence significative des ultrasons sur le processus de gonflement de plantes séchées. En fait, les tissus soumis à la sonication absorbent un volume supplémentaire d'eau. La sonication provoque un gonflement des cellules, une absorption de solvant et un agrandissement des pores des parois cellulaires, ce qui permet une diffusivité élevée à travers les parois des cellules. Les rendements d'extraction améliorés obtenus à l'aide d'ultrasons pourraient également être attribués au fait que la cavitation due aux ultrasons pourrait inciter la rupture des parois cellulaires et faciliter l'accès au contenu des cellules (Vinatoru 2001). En comparant les résultats présentés dans les Figures III.5 et III.6b on peut voir que les rendements obtenus au bout de 4 h pour l'extraction assistée par ultrasons avec 50% d'éthanol à partir de baies

coupées en deux ont été très similaires à ceux obtenus pour l'extraction à l'eau à partir de baies broyées à la même température sans ultrasons.

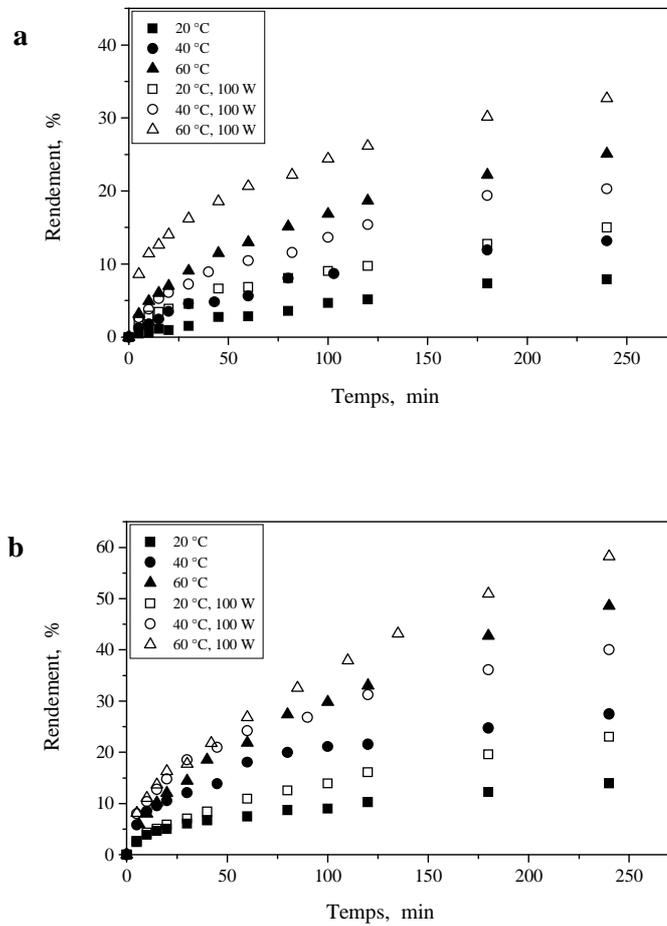


Figure III.6. Effet des ultrasons et de la température sur la cinétique d'extraction de polyphénols à partir d'aronia coupée en deux avec un ratio solide-solvant de 1:20 et a) l'eau comme solvant, b) l'éthanol 50% (vol.) comme solvant.

Lorsque les baies broyées ont été soumises à une extraction assistée par ultrasons (particules de $d < 0,5$ mm) l'effet positif de la sonication a été moins évident, surtout à des conditions favorables à l'extraction des polyphénols (Figure III.7).

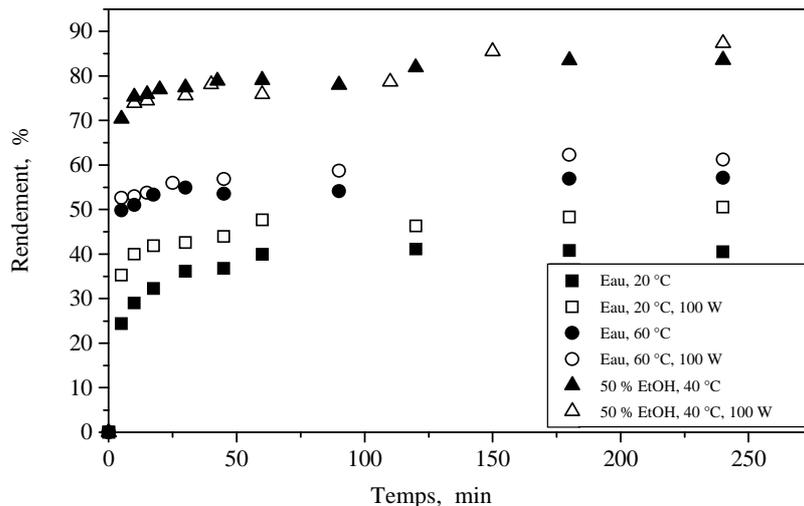


Figure III.7. Effet des ultrasons sur la cinétique d'extraction des polyphénols à partir d'aronia broyée ($d < 0,5$ mm) avec un ratio solide-solvant de 1:20.

Finalement, l'application d'ultrasons a permis de réduire la durée nécessaire pour atteindre le rendement maximum. Pour toutes les études d'extraction avec de l'eau comme solvant, les rendements après 15 minutes avec sonication ont été équivalents à ceux après 60 minutes sans ultrasons. Les économies de temps et d'énergie sont très importantes pour la production d'extraits naturels. En considérant le niveau de CO_2 rejeté dans l'atmosphère lors de l'extraction des polyphénols à partir de bouleau jaune, Diouf et al. (2009) ont démontré que l'extraction assistée par ultrasons mérite d'être considérée comme une méthode d'extraction « écologique » par rapport à la macération classique (jusqu'à 55% d'économie d'énergie).

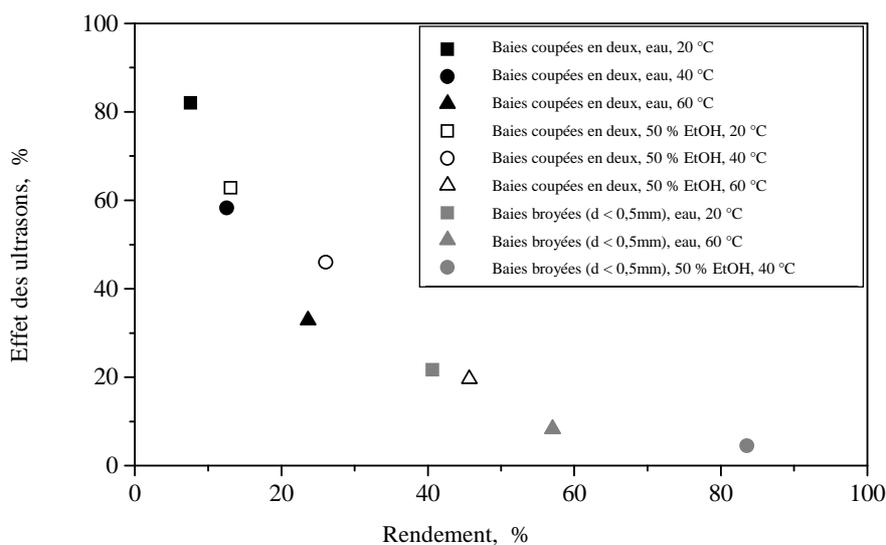


Figure III.8. Effet des ultrasons sur le rendement d'extraction final en polyphénols avec un ratio solide-solvant de 1:20.

La Figure III.8 présente un vue synthétique de l'influence des ultrasons sur la base des rendements finaux (après 4 h d'extraction) pour les différentes conditions étudiées. L'effet des ultrasons a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Effet des ultrasons (\%)} = \frac{A - B}{B} \cdot 100, \quad (\text{III.1})$$

où A est le rendement final en polyphénols avec application d'ultrasons (%) et B le rendement final en polyphénols sans application d'ultrasons (%).

Pour les baies coupées en deux, l'effet des ultrasons varie entre 20 et 85%, et il est plus important à des températures plus basses et en utilisant de l'eau comme solvant (donc quand les conditions sont moins favorables pour l'extraction des polyphénols). Pour les baies broyées, une amélioration maximale des rendements d'extraction d'environ 20% a été obtenue à 20 °C et en utilisant de l'eau comme solvant. Koiwai & Masuzawa (2007) ont également signalé un faible effet des ultrasons (jusqu'à 17%) sur l'extraction des composés phénoliques à partir de poudre de thé vert en utilisant l'eau comme solvant, alors que l'effet des ultrasons sur l'extraction des polyphénols à partir des feuilles de thé vert a été plus important (jusqu'à 36%). Néanmoins l'extraction à partir de poudre a été plus efficace en terme de quantités extraites (Koiwai & Masuzawa, 2007).

III.1.8. Capacité Antioxydante des extraits d'aronia

La majeure partie des extraits obtenus à l'aide des ultrasons ont montré des activités antioxydantes supérieures à 80%, en liaison avec des concentrations élevées en composés phénoliques dans ces extraits. Des résultats plus faibles ont été enregistrés principalement dans les cas des extractions sans l'assistance d'ultrasons, à faibles températures et/ou en utilisant des solvants peu efficaces. Des dilutions appropriées des extraits natifs obtenus ont permis d'évaluer la concentration efficace (CE_{50}) et la relation entre l'activité antioxydante et la concentration de polyphénols dans les extraits obtenus dans différentes conditions (prétraitement, temps, température, solvant, avec ou sans ultrasons). Une très bonne corrélation entre la concentration en polyphénols et l'activité anti-oxydante a été observée (Figure III.9). Une relation linéaire a été établie pour des concentrations en composés phénoliques totaux dans les extraits inférieures à 400 mg.L^{-1} (GAE). La valeur de concentration efficace moyenne (CE_{50}) était d'environ 200 mg.L^{-1} (GAE). Les composés phénoliques récupérés dans des conditions différentes ont montré des activités antioxydantes comparables, ce qui suggère une composition des extraits assez similaire. A concentrations égales en polyphénols, la différence d'activité pour différentes conditions d'extraction (prétraitement, temps, température, solvant, assistance ou pas des ultrasons) a été faible.

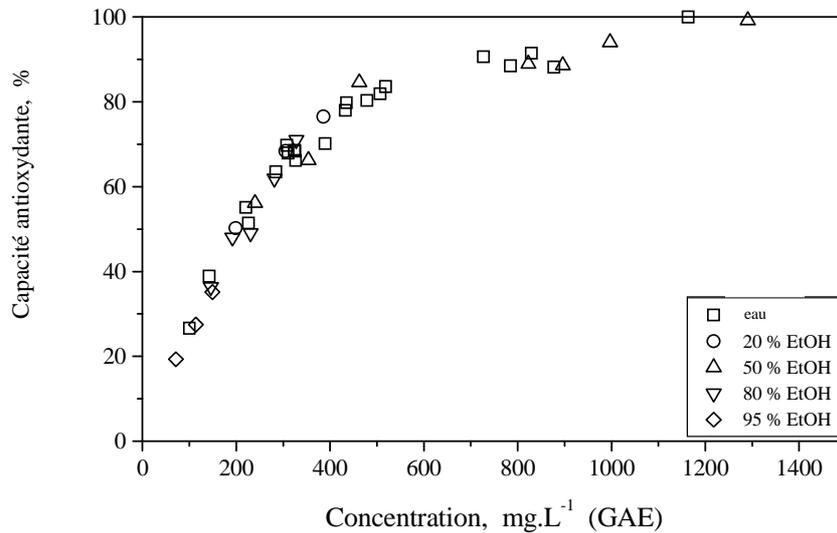


Figure III.9. Relation entre l'activité antioxydante et la concentration en polyphénols dans les extraits d'aronia.

III.1.9. Conclusions

Les résultats obtenus dans cette première partie du travail de thèse ont montré tout d'abord le potentiel des baies d'aronia en termes de quantité de polyphénols potentiellement valorisables comme substances antioxydantes. La capacité antioxydante des extraits est apparue comme fortement corrélée à la concentration en polyphénols.

Le procédé d'extraction solide-liquide utilisant un solvant éthanolique s'est montré efficace pour la récupération des polyphénols d'aronia, avec une amélioration du rendement d'extraction de deux fois lorsqu'on utilise le mélange eau-éthanol 50% par rapport une extraction à mêmes conditions mais en utilisant de l'eau comme solvant. L'assistance des ultrasons améliore considérablement les cinétiques et les rendements d'extraction des composés phénoliques, en particulier quand les conditions opératoires sont a priori moins favorables pour l'extraction. La sonication a permis de réduire le temps et l'énergie consommés. L'extraction assistée par ultrasons avec un solvant éthanolique apparaît donc comme un procédé écologique performant pour produire des extraits riches en antioxydants à partir d'aronia.

L'étude des effets des principaux paramètres opératoires a permis d'identifier les paramètres les plus influents, qui sont la température, la composition du solvant (% d'éthanol), l'application d'ultrasons et le temps. Ces derniers ont par conséquent été pris en compte dans la suite des travaux, qui vise à optimiser l'extraction par la modélisation des cinétiques.

III.2. Modélisation de la cinétique d'extraction assistée par ultrasons d'antioxydants à partir de co-produits d'aronia

L'objectif de cette partie du travail de thèse est de proposer un modèle permettant de décrire les cinétiques d'extractions en fonction des paramètres opératoires les plus influents, à savoir la température, la teneur en éthanol du solvant et l'application d'ultrasons. Ainsi, des expériences ont été menées en faisant varier ces 3 paramètres sur la base de la méthodologie des plans d'expérience. Cette base de données expérimentale a permis de construire le modèle, puis de le valider. Le modèle proposé a ensuite été utilisé comme outil d'optimisation, dans le cadre de la recherche de conditions opératoires optimales pour le procédé d'extraction avec différentes contraintes technologiques.

Dans cette partie, le potentiel de valorisation des co-produits d'aronia a été étudié. Les expérimentations ont été menées avec les résidus de baies issus de la production de jus d'aronia. Les baies ont été pressées (par extrusion) pour extraire le jus d'aronia. Les pellets de co-produits ont été utilisés dans les extractions sans broyage supplémentaire de manière à éviter les problèmes technologiques engendrés par les fines particules, et considérant que le passage dans l'extrudeur a déjà permis une déstructuration de la matrice végétale facilitant potentiellement l'extraction des polyphénols. Ainsi, la taille des particules solides n'a pas été intégrée dans les paramètres étudiés.

III.2.1. Données expérimentales pour la construction du modèle

La construction du modèle a nécessité de générer des données expérimentales, en faisant varier les paramètres opératoires retenus (température, teneur en éthanol du solvant, application d'ultrasons). Les données expérimentales. La méthodologie des plans d'expériences a été utilisée afin de limiter le nombre d'expérimentations. Un plan de type composite à faces centrées (Box-Wilson) a été choisi, de manière à pouvoir prendre en compte toutes les interactions entre paramètres. Le domaine expérimental couvert est présenté dans le Tableau III.1. Les réponses considérées sont la concentration en polyphénols totaux (*PT*), la concentration en anthocyanines totales (*AT*) et la capacité antioxydante (*CA*).

Tableau III.1. Domaine expérimental du plan d'expériences.

Paramètre	Niveau -1	Niveau 0	Niveau +1
X_1 : température (°C)	20	45	70
X_2 : nature du solvant (% vol. d'éthanol)	0	25	50
X_3 : Puissance des ultrasons (W)	0	50	100

Les autres paramètres opératoires (non pris en compte dans le plan d'expériences) ont été fixés comme suit : rapport solide-liquide de 1:40 (7,5 g de co-produits d'aronia dans 300 mL de solvant), agitation à 120 tr.min⁻¹, fréquence des ultrasons de 30,8 kHz.

Pour toutes les expériences, la cinétique d'extraction a été suivie pendant 4 heures et des échantillons ont été prélevés régulièrement (à 5, 10, 15, 25, 45, 60, 120, 180 et 240 minutes). Les résultats expérimentaux obtenus et les effets des paramètres étudiés sont présentés ci-après.

III.2.1.1. Effet des paramètres étudiés sur la concentration en anthocyanines

L'évolution des concentrations en anthocyanines totales extraites en fonction du temps pour différentes conditions opératoires sont présentées Figure III.10. A une température de 20 °C, les courbes de cinétiques obtenues ont des allures typiques pour des procédés de transfert de matière, avec des concentrations tendant vers l'équilibre. Les vitesses d'extraction des anthocyanines diminuent avec le temps et les rendements tendent vers des valeurs constantes, correspondant aux rendements maximaux pour les conditions expérimentales appliquées. Les rendements d'extraction obtenus avec l'éthanol à 50% ont été environ 3 fois plus élevés que ceux obtenus avec l'eau pure (probablement en lien avec la polarité des solvants). Sur la Figure III.10a, on peut clairement observer un effet positif des ultrasons sur l'extraction des anthocyanines pour les solvants utilisés. En fait, les ondes ultrasonores modifient les propriétés physiques et chimiques du matériel traité, et leurs effets de cavitation facilitent la libération de composés (Chemat et al. 2011).

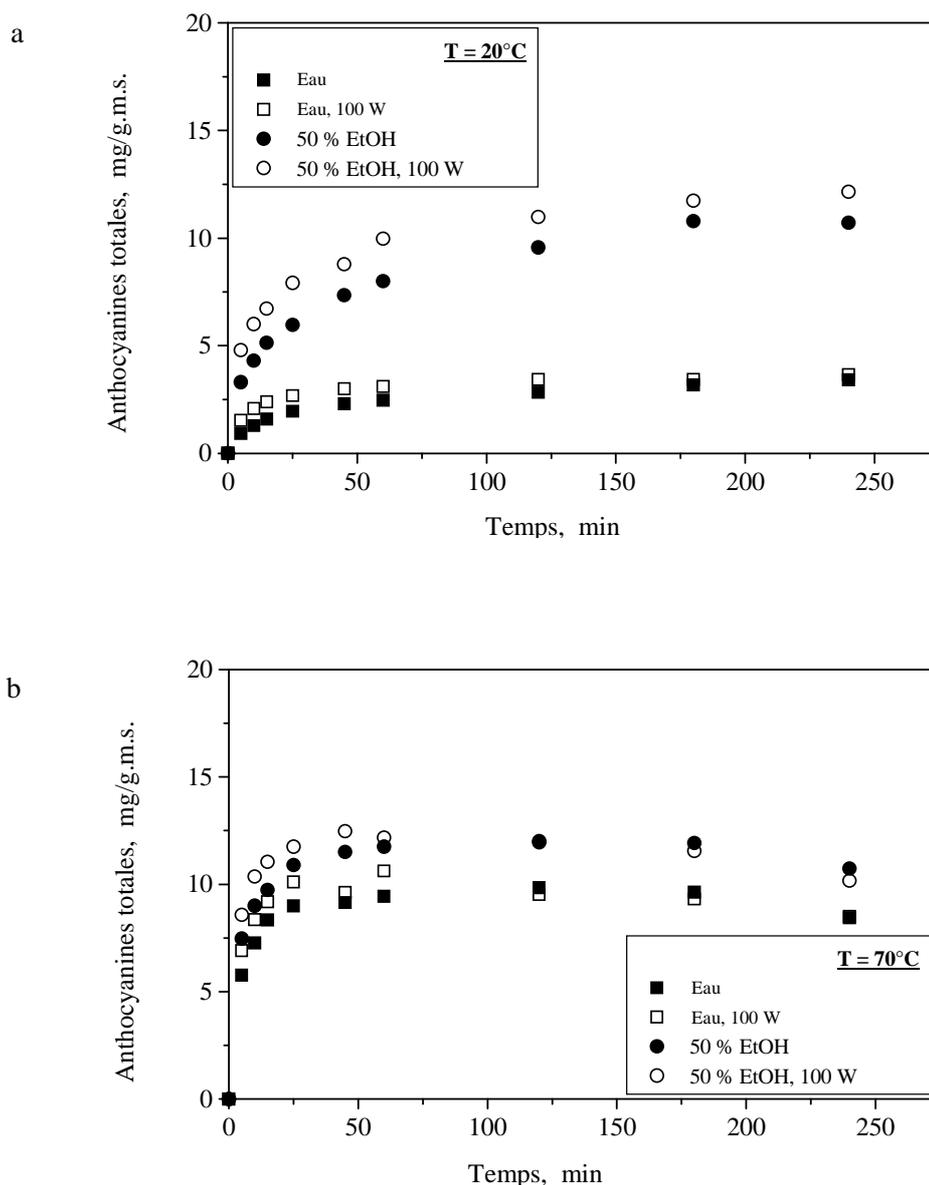


Figure III.10. Cinétique d'extraction d'anthocyanines totales à a) 20 °C et b) 70 °C.

À une température de 70 °C (Figure III.10b), l'allure des courbes cinétiques obtenues est visiblement différente de celle obtenue à 20 °C. Après une très rapide augmentation (15-20 premières minutes), les rendements augmentent moins vite, et au bout d'environ 1 h d'extraction, ils passent par un maximum avant de diminuer lentement jusqu'à la fin des essais expérimentaux. La diminution du rendement en anthocyanines avec le temps suggère que l'extraction est efficace, mais que les anthocyanines d'aronia ne sont pas stables à des températures élevées et, probablement une partie des anthocyanines extraites ont subi une dégradation thermique à ces conditions de

température. Cette instabilité thermique des anthocyanines a été rapportée pour les extraits et jus de fruits provenant d'autres sources végétales, comme la grenade (Fischer et al. 2013), la myrtille (Kechinski et al. 2010) et l'hibiscus (Cissé et al. 2012).

A 70 °C, la différence entre les rendements d'extraction à l'eau et à l'éthanol à 50% est moins évidente. L'effet de l'assistance d'ultrasons sur le rendement d'extraction est également inférieur par rapport à l'extraction à 20 °C. En comparant les rendements d'extraction finaux obtenus à 20 et 70°C avec 50% d'éthanol, il apparaît que l'augmentation de la température n'a pas d'effet positif sur les rendements d'extraction. Cependant, à 70 °C, le taux d'extraction des anthocyanines est nettement supérieur au début de l'extraction.

III.2.1.2. Effet des paramètres étudiés sur la concentration en polyphénols

La Figure III.11 montre les évolutions des concentrations des polyphénols totaux extraits en fonction du temps dans différentes conditions opératoires. Dans tous les cas, la vitesse d'extraction diminue avec le temps et les concentrations en polyphénols tendent vers des valeurs d'équilibre. Les anthocyanines faisant partie des polyphénols, on pourrait s'attendre à voir aussi une diminution du rendement en polyphénols totaux au cours de l'extraction à 70 °C. Toutefois, aucune diminution des polyphénols totaux n'a été observée. Il est possible que les anthocyanines monomériques thermiquement instables aient été transformées en d'autres espèces phénoliques détectés par la méthode analytique utilisée pour déterminer les polyphénols totaux. A 20 °C, l'utilisation de 50% d'éthanol dans le solvant permet d'extraire environ deux fois plus de polyphénols par rapport l'extraction à l'eau (Figure III.11a). Un effet similaire a déjà été observé précédemment (§III.1). Néanmoins, à 20 °C, l'effet de la présence d'éthanol dans le solvant est plus important pour les anthocyanines que pour les polyphénols (Figures III.10a et III.11a), contrairement aux résultats obtenus à 70 °C (Figures III.10b et III.11b). Dans toutes les conditions étudiées, l'assistance des ultrasons et la température ont permis d'augmenter le rendement d'extraction en composés phénoliques. Comme pour les anthocyanines, l'effet de la température sur le rendement en polyphénols totaux est plus élevé dans le cas des extractions à l'eau.

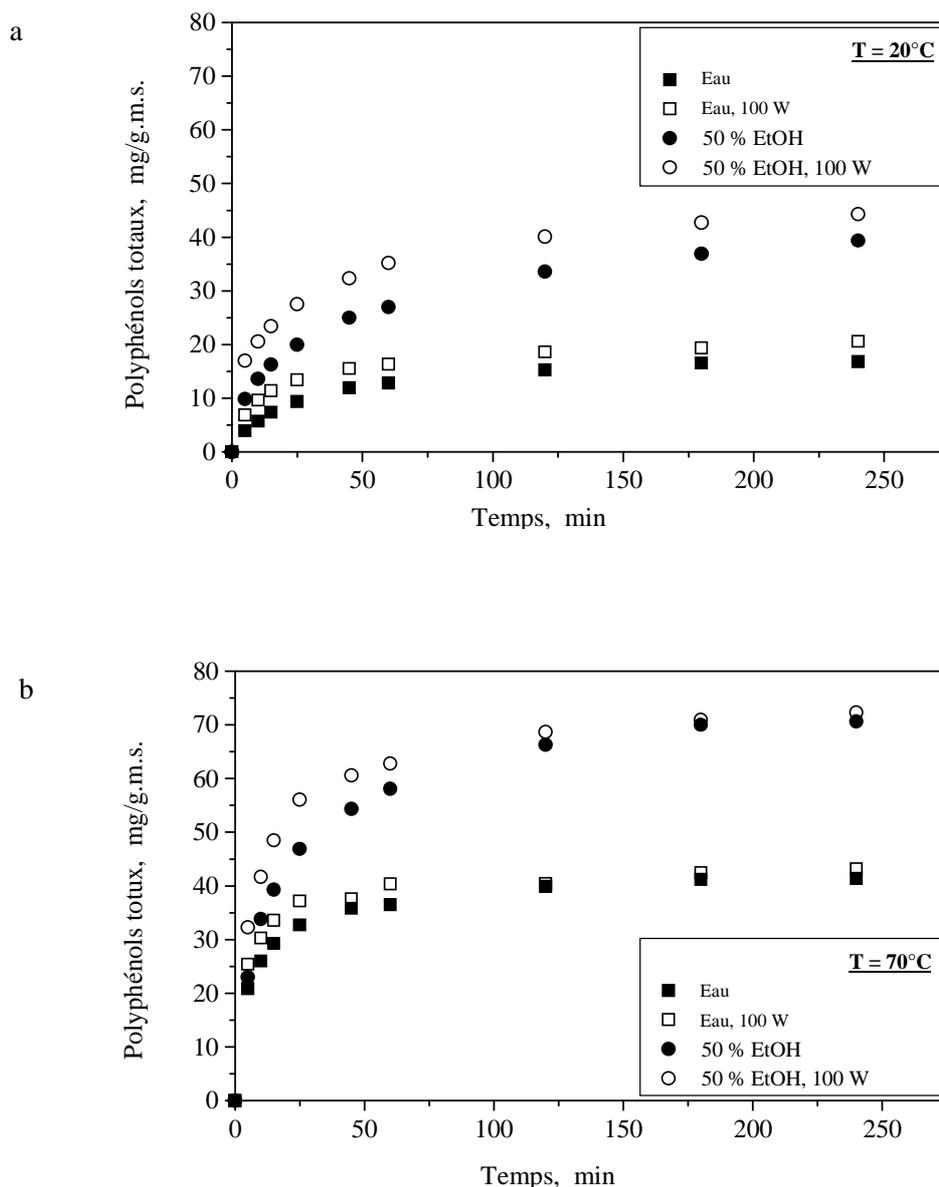


Figure III.11. Cinétique d'extraction des polyphénols totaux à a) 20 °C et b) 70 °C.

III.2.1.3. Effet des paramètres étudiés sur la capacité antioxydante

Sur la Figure III.12 sont présentés les résultats de l'évolution de la capacité antioxydante des extraits obtenus en fonction du temps dans différentes conditions opératoires. Les effets des principaux paramètres du procédé (temps de contact, température, composition du solvant et puissance des ultrasons) sur la capacité antioxydante sont très similaires à ceux observées pour les

polyphénols totaux. Aucune baisse de la capacité antioxydante en fonction du temps n'a été observée à 70 °C. La dégradation thermique des anthocyanines n'a visiblement pas affecté la capacité antioxydante des extraits obtenus.

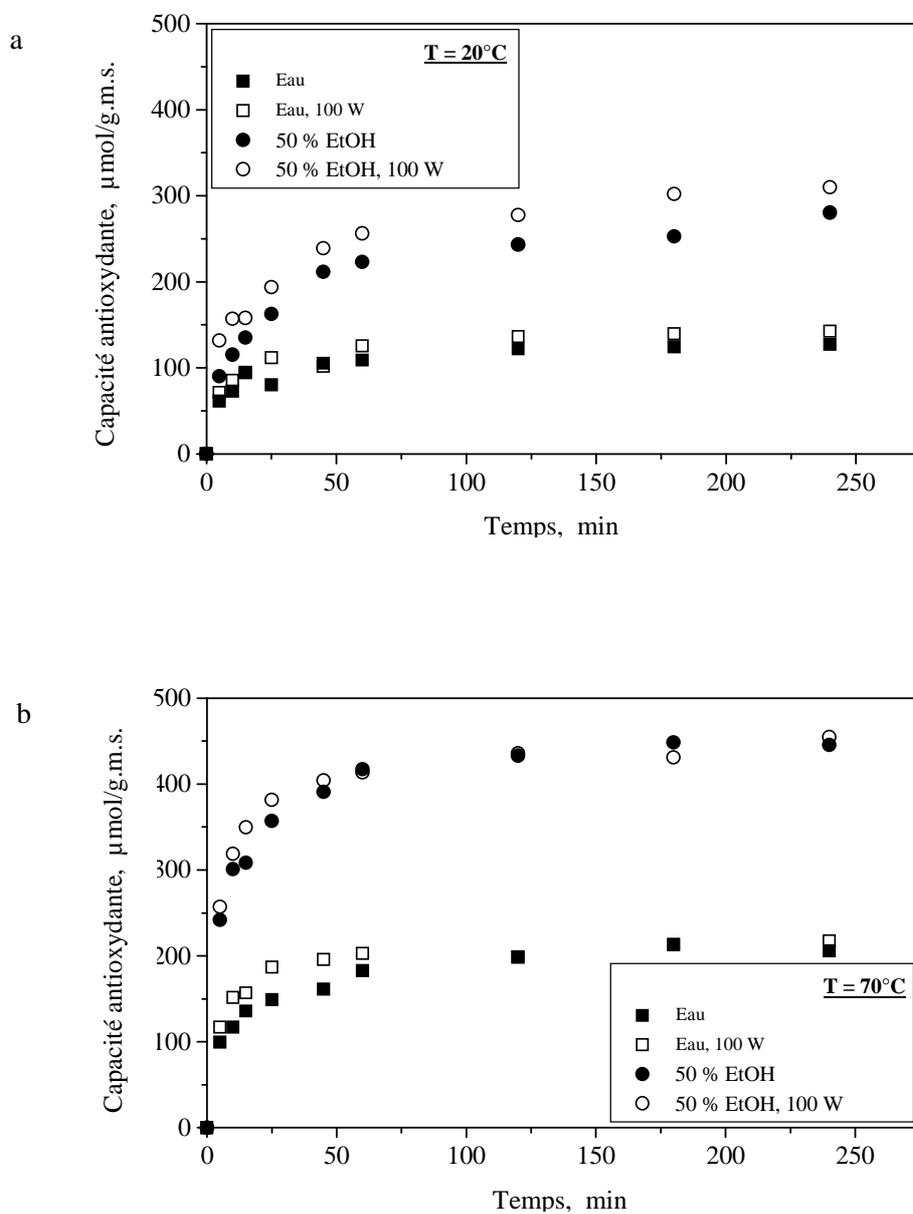


Figure III.12. Cinétique de la capacité antioxydante à a) 20 °C et b) 70 °C.

III.2.1.4. Bilan sur l'effet des ultrasons

Il a été observé que l'effet des ultrasons a été toujours supérieur au début de l'extraction, et qu'il a ensuite diminué considérablement avec le temps. Les résultats obtenus pour les anthocyanines, les polyphénols et la capacité antioxydante ont montré que l'assistance d'ultrasons améliore principalement la vitesse d'extraction et beaucoup moins le rendement maximum atteint. La Figure III.13 montre l'évolution de l'effet d'ultrasons dans le temps sur l'extraction des anthocyanines pour les différents solvants et températures utilisés. On observe que cet effet était plus élevé à des températures basses, en particulier au début de l'extraction. L'effet de la composition du solvant a été moins évident. Des tendances similaires ont été observées pour les polyphénols et la capacité antioxydante des extraits. Cet effet pourrait être expliqué par le processus produit par la cavitation, lequel est induit par l'irradiation des ultrasons, provoquant le gonflement des cellules, l'absorption de solvant, l'élargissement des pores, et donc une augmentation du coefficient de diffusion des composés phénoliques antioxydants à travers les parois cellulaires. Une possible déstructuration de la matrice végétale ou un faible effet positif sur l'extraction de l'augmentation locale de température due aux ultrasons pourraient également être supposés.

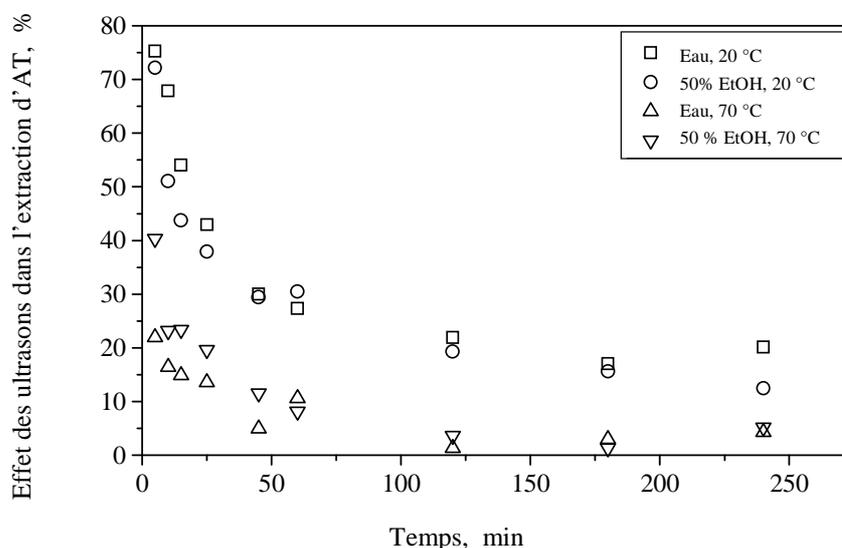


Figure III.13. Effet des ultrasons dans l'extraction d'anthocyanines totales de sous-produits d'aronia.

III.2.2. Construction et validation du modèle

III.2.2.1. Construction du modèle

Les courbes expérimentales de cinétiques d'extraction obtenues présentent une similitude avec celles du processus de sorption, qui peut être bien décrit par le modèle de Peleg. Ainsi, l'évolution dans le temps de la concentration en polyphénols et la capacité antioxydante a été décrite suivant le modèle de Peleg :

$$PT(t) = \frac{t}{\frac{1}{K_{1,PT}} + \frac{1}{K_{2,PT}} \cdot t} \quad (\text{III.2})$$

$$CA(t) = \frac{t}{\frac{1}{K_{1,CA}} + \frac{1}{K_{2,CA}} \cdot t} \quad (\text{III.3})$$

où $PT(t)$ est le rendement en polyphénols totaux au temps t (mg GAE.g⁻¹(m.s.)), $CA(t)$ est la capacité antioxydante au temps t (μmol TEAC.g⁻¹(m.s.)), t est le temps d'extraction (min), $K_{1,PT}$ et $K_{1,CA}$ sont les vitesses maximales d'extraction (min⁻¹), et $K_{2,PT}$ et $K_{2,CA}$ sont les rendements maximaux d'extraction (mg GAE. g⁻¹(m.s.) et μmol TEAC. g⁻¹(m.s.)).

Pour la cinétique d'extraction des anthocyanines totales, il était nécessaire de tenir compte de la dégradation observée des anthocyanines ayant lieu pour certaines des conditions expérimentales. Par conséquent, une vitesse de dégradation ($K_{3,TA}$) a été introduite, et l'évolution dans le temps du rendement en anthocyanines a été décrite suivant l'équation :

$$AT(t) = \frac{t}{\frac{1}{K_{1,AT}} + \frac{t}{K_{2,AT}}} - t.K_{3,AT} \quad (\text{III.4})$$

où $AT(t)$ est le rendement en anthocyanines totales au temps t (mg CGE.g⁻¹(m.s.)), t est le temps d'extraction (min), $K_{1,AT}$ est la vitesse maximale d'extraction (min⁻¹), $K_{2,AT}$ est rendement maximal d'extraction (mg CGE.g⁻¹(m.s.)), et $K_{3,AT}$ est un paramètre représentant la dégradation des anthocyanines (mg CGE.g⁻¹(m.s.).min⁻¹).

Aucune diminution des rendements en anthocyanines n'a été observée à 20 °C et à 45 °C, il a donc été décidé de considérer $K_{3,AT} = 0$ pour $T < 45$ °C. Pour des températures entre 45 et 70 °C, le paramètre $K_{3,AT}$ a été pris en compte. En effet, une dégradation thermique est négligeable à des températures inférieures à 50°C, mais une augmentation progressive de la dégradation à des

températures élevées ($T = 50-80\text{ °C}$) a été rapportée pour les anthocyanines de blueberry (Kechinski et al. 2010).

Chaque coefficient K_i ($K_{1, PT}$, $K_{2, PT}$, $K_{1, CA}$, $K_{2, CA}$, $K_{1, AT}$, $K_{2, AT}$ et $K_{3, AT}$) a été décrit avec une équation polynomiale de second ordre permettant de prendre en compte les effets des paramètres (température X_1 , solvant X_2 , puissance des ultrasons X_3) et de leurs interactions:

$$K_i = a_0 + a_1 \cdot X_1 + a_2 \cdot X_2 + a_3 \cdot X_3 + a_{11} \cdot X_1^2 + a_{22} \cdot X_2^2 + a_{33} \cdot X_3^2 + a_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + a_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + a_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (\text{III.5})$$

où a_0 est le coefficient de régression pour les termes d'interception, a_1 , a_2 et a_3 sont les coefficients de régression linéale, a_{11} , a_{22} et a_{33} sont les coefficients de régression de second ordre, a_{12} , a_{13} et a_{23} sont les coefficients de régression des interactions et X_1 , X_2 et X_3 sont les paramètres (température, nature du solvant et puissance des ultrasons respectivement).

Toutes les données issues du plan d'expériences ont été utilisées pour déterminer les valeurs optimales des coefficients de régression (a_0 , a_1 , a_2 , a_3 , a_{11} , a_{22} , a_{33} , a_{12} , a_{13} and a_{23}) pour chaque constante K_i , de manière à minimiser les écarts entre les cinétiques expérimentales et modèles. Pour caractériser les écarts entre les données expérimentales et le modèle, il a été choisi d'utiliser la variance moyenne normalisée NRMSD (normalized root mean squared deviation), définie comme suit :

$$NRMSD = \frac{RMSD}{\exp_{\max}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{p=1}^n (\exp_p - \text{mod}_p)^2}}{\exp_{\max}} \quad (\text{III.6})$$

où n est le nombre de points expérimentaux composant une courbe cinétique (10 pour chacune des courbes cinétiques, correspondant aux échantillons pris à différents temps d'extraction), \exp_p est la valeur expérimentale au point p , mod_p est la valeur modèle au point p et \exp_{\max} est la valeur maximum parmi les n valeurs expérimentales.

Ainsi, les valeurs des coefficients de régression pour chaque constante K_i ont été déterminées en utilisant une méthode d'estimation multi-paramétrique avec un algorithme de Newton, de façon à minimiser la NRMSD moyenne de l'ensemble des 51 cinétiques (trois réponses (PT , AT et CA) pour chacune des dix-sept expériences) en même temps. L'ensemble des valeurs des coefficients de régression pour chaque constante K_i est donné dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Coefficients de régression pour chaque constante K_i du modèle.

	$K_{1,PT}$	$K_{2,PT}$	$K_{1,AT}$	$K_{2,AT}$	$K_{3,AT}$ (pour $T \geq 45$ °C)*	$K_{1,CA}$	$K_{2,CA}$
a_0	5,65	54,10	1,85	12,36	0	70,01	348,94
$a_1 (X_1)$	3,69	12,13	1,52	2,33	0,0065	21,06	63,30
$a_2 (X_2)$	0	14,86	0,21	2,87	0	16,81	97,91
$a_3 (X_3)$	1,02	0	0,19	0	0	10,33	0
$a_{12} (X_1 * X_2)$	0	0	0	1,24	0,0031	15,79	19,69
$a_{23} (X_2 * X_3)$	0	0	0	0	0	0	0
$a_{13} (X_1 * X_3)$	0	0	0	0	0	0	0
$a_{11} (X_1^2)$	0	0	0	0	0,0043	0	39,24
$a_{22} (X_2^2)$	0	9,53	0	2,41	0	0	39,87
$a_{33} (X_3^2)$	0	0	0,24	0	0	22,19	0

* pour $T < 45$ °C, $K_{3,AT} = 0$

Les valeurs des coefficients de régression permettent d'évaluer l'impact de chaque paramètre (température, composition du solvant et puissance d'ultrasons) sur la vitesse maximale d'extraction (K_1) et sur le rendement maximal d'extraction (K_2). On constate que dans le domaine expérimental étudié, la température et la composition du solvant influencent à la fois la vitesse d'extraction et le rendement maximum. L'assistance d'ultrasons influence quant à elle la vitesse d'extraction, mais pas de façon significative le rendement maximum. La température est le paramètre le plus influent sur la dégradation des anthocyanines, mais l'interaction température-composition du solvant a également été indiquée comme significative par le modèle.

Dans le Tableau III.3 sont indiquées les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par le modèle de PT , AT et CA à la fin des extractions (240 minutes) pour toutes les conditions étudiées. Les valeurs moyenne, minimale et maximale de NRMSD obtenues pour les 51 cinétiques d'extraction utilisées pour la construction du modèle sont également présentées dans le Tableau III.3. Les NRMSD moyennes obtenues pour PT , AT et CA sont d'environ 5%, ce qui représente une bonne concordance entre les données expérimentales et les prédictions du modèle. La bonne corrélation entre les données expérimentales et les prédictions du modèle est illustrée dans la Figure III.14. Les trois conditions opératoires présentées correspondent aux deux conditions extrêmes (niveaux -1 ; -1 ; -1 et +1 ; +1 ; +1), et à un point central (0 ; 0 ; 0). On peut constater que, à 45 °C, aucune dégradation thermique n'est observée pour les données expérimentales, ni prédite par le modèle.

Tableau III.3. Valeurs expérimentales et prédictions du modèle pour *PT*, *AT* et *CA* pour l'ensemble du plan d'expériences.

<i>Essai</i>	Température,	Pourcentage	Puissance	<i>PT</i> à t=240min		<i>AT</i> à t= 240min		<i>CA</i> à t=240min	
	<i>X1</i>	d'éthanol,	d'ultrasons,						
	°C (valeur codé)	% vol (valeur codé)	W (valeur codé)	mg GAE.g ⁻¹ (m.s.)		mg CGE.g ⁻¹ (m.s.)		μmol TEAC.g ⁻¹ (m.s.)	
				Expérimental	prédiction	Expérimental	prédiction	expérimental	prédiction
1	20 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	16,85	16,31	3,41	3,23	127,10	124,01
2	70 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	41,40	40,98	8,45	8,64	205,82	208,32
3	20 (-1)	50 (+1)	0 (-1)	39,36	39,06	10,41	10,83	280,33	266,64
4	70 (+1)	50 (+1)	0 (-1)	70,63	69,08	10,73	10,33	445,41	434,63
5	20 (-1)	0 (-1)	100 (+1)	20,58	17,16	3,64	3,41	142,59	126,43
6	70 (+1)	0 (-1)	100 (+1)	43,17	41,15	8,50	8,66	217,55	211,45
7	20 (-1)	50 (+1)	100 (+1)	44,27	44,36	12,15	11,17	309,69	276,16
8	70 (+1)	50 (+1)	100 (+1)	74,28	69,55	10,17	10,35	454,55	443,28
9	45 (0)	25 (0)	50 (0)	52,82	52,03	12,42	12,02	347,91	341,84
10	45 (0)	25 (0)	50 (0)	54,57	52,03	12,28	12,02	340,34	341,84
11	45 (0)	25 (0)	50 (0)	54,74	52,03	13,08	12,02	371,72	341,84
12	20 (-1)	25 (0)	50 (0)	32,53	38,53	7,95	8,9	252,11	241,34
13	70 (+1)	25 (0)	50 (0)	65,63	64,33	10,48	11,82	422,16	366,74
14	45 (0)	0 (-1)	50 (0)	29,03	29,08	7,14	6,95	219,51	207,72
15	45 (0)	50 (+1)	50 (0)	57,12	56,93	12,37	12,5	405,72	399,18
16	45 (0)	25 (0)	0 (-1)	52,26	51,59	12,67	12,03	332,07	335,91
17	45 (0)	25 (0)	100 (+1)	53,12	52,33	12,54	12,08	356,14	340,43
<i>moyenne NRMSD (min; max)</i>				5,03% (1,98%; 12,97%)		4,61% (1,83%; 8,81%)		4,83% (1,61%; 11,07%)	
validation 1 NRMSD	45 (0)	50 (+1)	100 (+1)	58,97	57,3	13,82	12,55	357,62	397,98
				4,02%		7,51%		9,85%	
validation 2 NRMSD	40 (-0.2)	0 (-1)	75 (+0.5)	28,08	26,73	6,07	6,25	191,22	197,67
				3,39%		6,41%		7,00%	

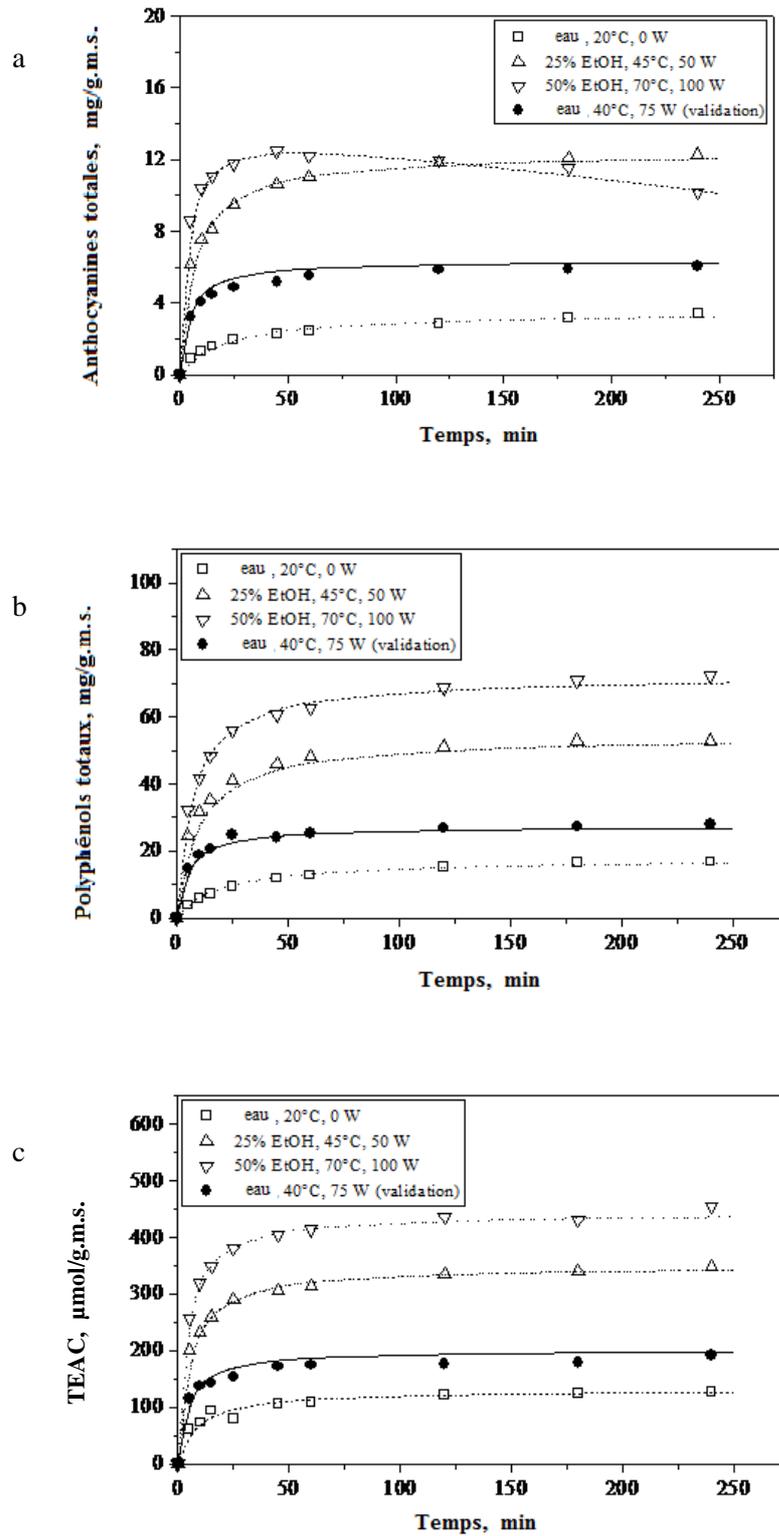


Figure III.14. Comparaison entre la cinétique expérimentales et cinétique prédites par le modèle (les symboles représentent les valeurs expérimentales et les lignes représentent les modèles) : a) AT ; b) PT ; c) CA.

III.2.2.2. Validation du modèle

Le modèle a été validé en effectuant deux expériences supplémentaires incluses dans le domaine expérimental étudié, mais différentes des 17 expériences du plan d'expériences utilisées pour construire le modèle. Pour ces 2 expériences de validation, les valeurs des paramètres ont été fixées comme suit : $X_1 = 0$, $X_2 = +1$ et $X_3 = +1$ pour la première expérience de validation et $X_1 = -0,2$, $X_2 = -1$ et $X_3 = +0,5$ pour la deuxième expérience de validation. Les résultats expérimentaux obtenus pour *PT*, *AT* et *CA* dans ces deux expériences de validation sont comparés aux prédictions du modèle dans le Tableau III.3. Les cinétiques expérimentale et prédite de la deuxième expérience de validation sont également présentées sur la Figure III.14. Il apparaît que le modèle prédit de façon satisfaisante les cinétiques d'extraction des polyphénols et des anthocyanines et la capacité antioxydante des extraits. Les NRMSD des expériences de validation ont été inférieures aux NRMSD maximum des expériences utilisées dans la construction du modèle.

Ainsi, le modèle proposé peut être considéré comme valide pour prédire les cinétiques de *PT*, *AT* et *CA* lors de l'extraction d'antioxydants à partir des co-produits d'aronia dans le domaine opératoire étudié (temps d'extraction entre 0 et 240 minutes, températures de 20 à 70 °C, composition du solvant de 0 à 50% d'éthanol (vol.) et puissance des ultrasons entre 0 et 100 W). Ce modèle peut être utilisé comme un outil d'aide à l'optimisation du procédé d'extraction étudié.

III.2.3. Utilisation du modèle proposé comme outil d'aide à l'optimisation de l'extraction

Le modèle proposé peut permettre d'optimiser le procédé d'extraction étudié avec diverses restrictions technologiques (pas de chauffage, faible teneur en éthanol dans le solvant, extraction aqueuse, l'assistance d'ultrasons ou pas, etc.).

Des exemples de simulations ont été réalisés pour le cas d'extractions à l'eau (pour éviter l'utilisation de l'éthanol) avec et sans l'aide d'ultrasons. Pour obtenir 90% des anthocyanes extractibles avec de l'eau (9,58 mg CGE. g⁻¹ (m.s.)), 38 minutes seraient nécessaires avec l'aide des ultrasons (100 W), tandis que 48 minutes seraient nécessaires pour le même résultat sans assistance d'ultrasons. Cela correspond à une réduction d'environ 20% du temps d'extraction quand l'extraction est intensifiée par les ultrasons. Dans les deux cas, la température optimale serait de 70 °C. Si l'objectif est de réaliser l'extraction avec de l'eau à 20

°C (sans utilisation de chauffage, ni d'éthanol dans le solvant), l'effet des ultrasons serait très important, permettant de diviser par 3 le temps d'extraction : 55 minutes seraient nécessaires pour obtenir 90% des anthocyanines extractibles (3,15 mg CGE. g⁻¹ (m.s.)) avec ultrasons (100 W), contre 184 minutes sans ultrasons.

Un deuxième exemple peut être donné, avec l'objectif de réduire au minimum le temps d'extraction nécessaire pour obtenir 90% des anthocyanines extractibles (12,00 mg CGE. g⁻¹ (m.s.)). Le modèle prédit que seulement 17 minutes sont nécessaires pour obtenir un tel résultat dans les conditions suivantes: 70 °C, 34% d'éthanol et 100 W. Une expérience a été réalisée dans ces conditions opératoires pour vérifier la prédiction du modèle. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.4. Les résultats prédits pour *AT* et *PT* ont bien été confirmés expérimentalement (écart < 1%). La valeur obtenue pour la *CA* après 17 minutes d'extraction a été environ 12% plus élevée que la valeur prédite, cet écart est possiblement dû à des erreurs liées à la méthode de mesure de la capacité antioxydante.

Tableau III.4. Extraction du 90% des anthocyanines totales à 17minutes, 70 °C, 100W, 34% éthanol.

	Prédiction du modèle	Résultat expérimental	% écart
Anthocyanines totales, mg CGE. g ⁻¹ (m.s.)	11,987	11,995	0,07
Polyphénols totaux, mg GAE. g ⁻¹ (m.s.)	50,386	50,639	0,50
Capacité antioxydante, μmol TEAC. g ⁻¹ (m.s.)	326,655	364,682	11,64

Ces résultats ont également confirmé la validité et la pertinence du modèle proposé, et montrent son utilité pour l'optimisation du procédé d'extraction d'antioxydants à partir d'aronia.

III.2.4. Caractérisation des anthocyanines dans les extraits

Dans cette partie, quelques éléments complémentaires concernant la caractérisation des anthocyanines dans les extraits sont donnés. Les extraits finaux (à 240 minutes) issus du

plan d'expérience ont été analysés par HPLC. La molécule utilisée comme standard est la cyanidine-3-galactoside (anthocyanine majoritaire de l'aronia). Le profil typique des chromatogrammes obtenus est présenté dans la Figure III.15.

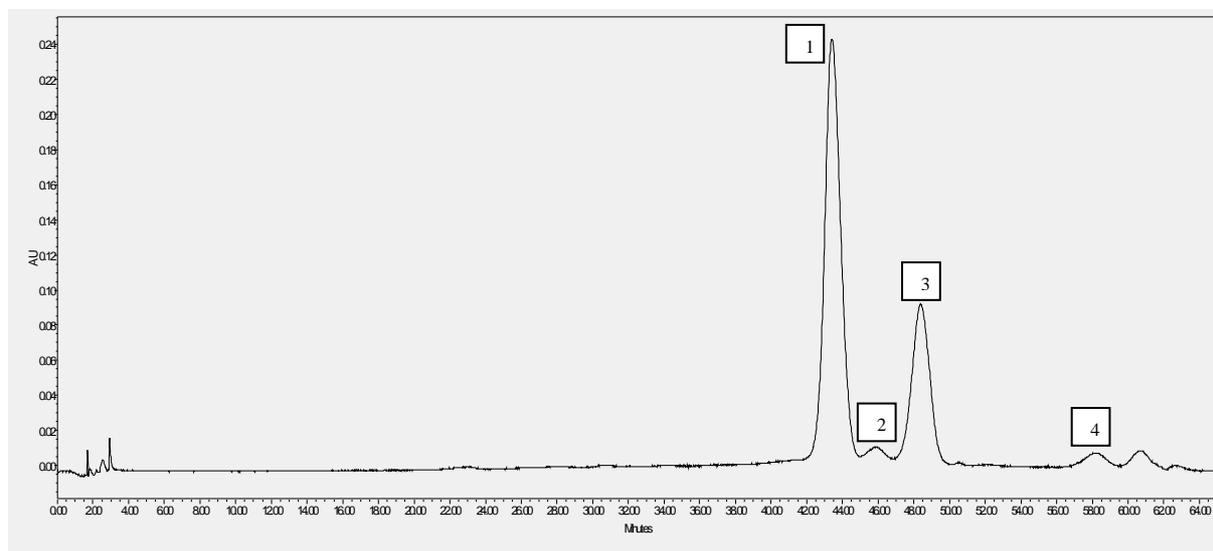


Figure III.15. Chromatogramme HPLC des anthocyanines d'*Aronia melanocarpa* à 520 nm. 1) cyanidine-3-galactoside, 2) cyanidine-3-glucoside, 3) cyanidine-3-arabinoside et 4) cyanidine-3-xyloside.

Les 4 anthocyanines majoritaires dans les extraits sont la cyanidine-3-galactoside, la cyanidine-3-glucoside, la cyanidine-3-arabinoside et la cyanidine-3-xyloside. Les représentations de chacune de ces 4 molécules ont peu varié dans les extraits obtenus. La représentation moyenne exprime le pourcentage de présence d'une cyanidine par rapport à la somme des 4 anthocyanines majeures. Ces valeurs sont données dans le Tableau III.5.

Tableau III.5. Temps de rétention et proportions moyennes des 4 cyanidines majoritaires dans les extraits.

Molécule	Temps de rétention (min)	Représentation moyenne (%)
cyd-3-galactoside	43	64,5
cyd-3-glucoside	45	3,9
cyd-3-arabinoside	48	27,1
cyd-3-xyloside	58	4,5

Les résultats obtenus par HPLC sont comparés avec les résultats obtenus par la méthode de pH-différentiel (anthocyanines totales AT) dans la Figure III.16. Pour l'ensemble des données la tendance entre les deux méthodes est similaire. Les résultats obtenus avec la

méthode spectrophotométrique sont globalement toujours plus importants que ceux obtenus par HPLC. Ceci s'explique probablement par le fait que la méthode HPLC est une mesure des cyanidines exprimée en équivalents cyanidine-3-galactoside, alors que la méthode de pH-différentiel donne une mesure des anthocyanines totales.

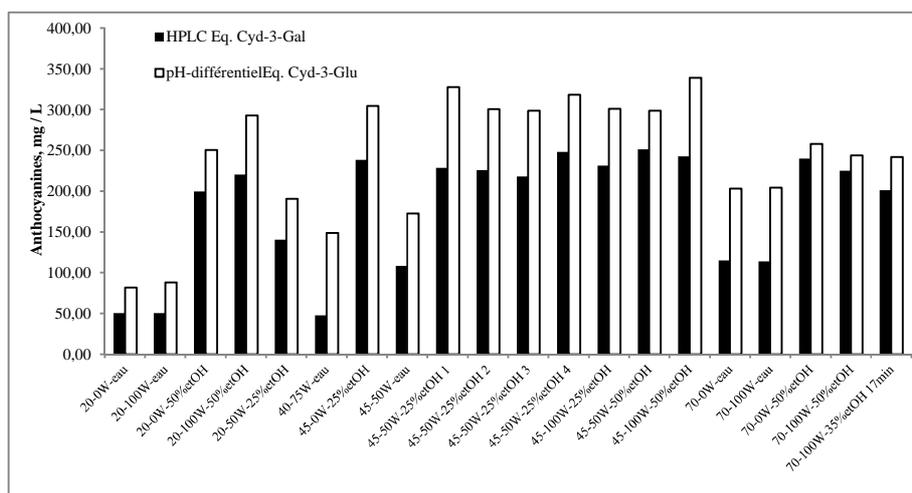


Figure III.16. Comparaison de dosage d'anthocyanines par HPLC et par la méthode de pH-différentiel.

III.2.5. Conclusions

Dans cette partie du travail de thèse, le potentiel de valorisation des co-produits d'aronia (résidus de baies issus de la production de jus d'aronia) a été confirmé, puisque des extraits riches en polyphénols ($> 70 \text{ mg GAE. g}^{-1} \text{ (m.s.)}$), et en particulier en anthocyanines ($> 13 \text{ mg CGE. g}^{-1} \text{ (m.s.)}$), montrant des capacités antioxydantes importantes ($> 450 \text{ } \mu\text{mol TEAC. g}^{-1} \text{ (m.s.)}$) ont été obtenus.

Les effets positifs de la température, de la puissance d'ultrasons et du taux d'éthanol dans le solvant observés lors de l'extraction à partir de baies d'aronia ont été confirmés dans le cas d'extraction à partir de co-produits d'aronia. A noter qu'une dégradation des anthocyanines a été observée pour des températures élevées ($70 \text{ }^\circ\text{C}$).

Le modèle proposé permet de décrire et de prédire les cinétiques de *PT*, *AT* et *CA* lors de l'extraction d'antioxydants à partir des co-produits d'aronia dans le domaine opératoire étudié (temps d'extraction entre 0 et 240 minutes, températures de 20 à $70 \text{ }^\circ\text{C}$, composition du

solvant de 0 à 50% d'éthanol (vol.) et puissance des ultrasons entre 0 et 100 W). L'utilité de ce modèle dans le cadre de l'optimisation du procédé d'extraction d'antioxydants à partir d'aronia a été démontrée, à travers des exemples de recherche de conditions opératoires optimales dans le cadre de différentes contraintes technologique.

Chapitre IV :

*Enrichissement des extraits d'aronia en antioxydants
par adsorption
et intégration des procédés d'extraction et de
purification*

L'objectif général du travail développé dans ce chapitre est l'obtention d'extraits très riches en antioxydants phénoliques à partir de co-produits d'aronia en utilisant des procédés propres.

Les travaux sont développés en trois axes principaux :

- l'étude de l'enrichissement des extraits d'aronia par adsorption en utilisant 4 adsorbants et en variant les conditions opératoires (temps, température, composition de l'éluant),
- le couplage de l'extraction avec l'adsorption et l'intégration de ces deux opérations en proposant un nouveau procédé intégré écologique pour l'obtention d'extraits riches en molécules antioxydantes à partir de baies ou leurs co-produits,
- l'optimisation du procédé intégré à l'échelle laboratoire et sa réalisation à l'échelle pilote pour démontrer le potentiel de son application pour la production d'extraits riches en antioxydants phénoliques, et notamment en anthocyanines.

IV.1. Enrichissement des extraits d'aronia par adsorption

L'extraction des anthocyanines et d'autres composés phénoliques à partir d'aronia et ses co-produits en utilisant comme solvant l'eau ou des mélanges eau-éthanol n'est pas très sélective. L'objectif de cette étude a été d'enrichir en polyphénols, en anthocyanines et en activité antioxydante les extraits de co-produits d'*Aronia melanocarpa* par adsorption.

Ces études ont été réalisées à partir d'extraits aqueux préalablement obtenus à partir de pellets d'aronia. D'abord l'influence de différents paramètres (concentration initiale de l'extrait en polyphénols, température, éluant) sur l'équilibre d'adsorption a été étudiée avec des résines d'adsorption et du charbon actif. Ces études ont été réalisées en mode batch en mettant l'adsorbant en suspension dans la phase liquide pour assurer un contact maximal entre les deux phases. Ensuite, des études cinétiques de l'adsorption et de la desorption ont été réalisées avec l'adsorbant sélectionné.

IV.1.1. Etude d'équilibre adsorption-désorption des composés phénoliques antioxydants d'aronia

IV.1.1.1. Etude préliminaire pour le choix de l'adsorbant

Le charbon actif et trois résines macroporeuses, à savoir Amberlite XAD7HP, XAD16 et XAD 1180, ont été testés pour la récupération de molécules phénoliques à partir d'extraits d'*Aronia melanocarpa*. Les résultats obtenus après 24 h d'adsorption à 20 °C suivi par 24 h de désorption à 20 °C avec 70% d'éthanol (vol.) en utilisant un rapport adsorbant-liquide fixé à 1/20 (0,8 g d'adsorbant pour 16 mL de phase liquide, extrait d'aronia pour les expériences d'adsorption, ou mélanges eau-éthanol pour les expériences de désorption), sont présentés sur la Figure IV.1.

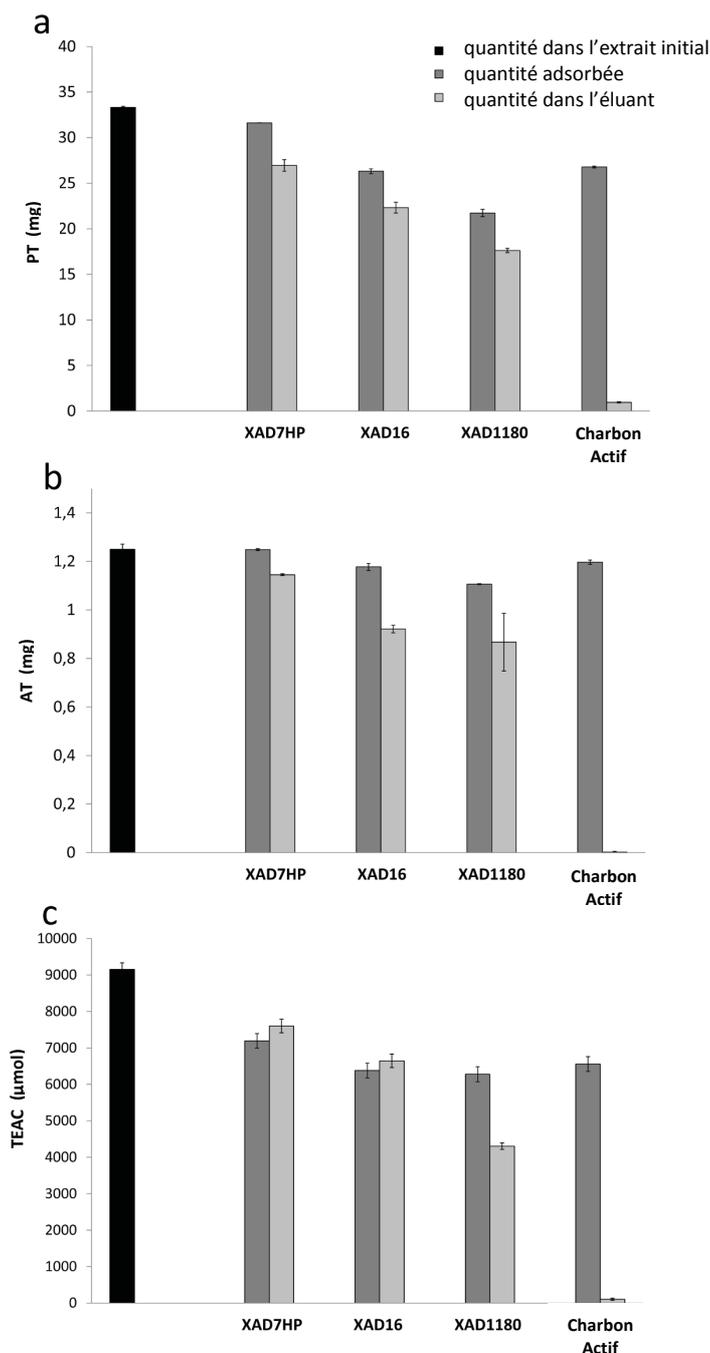


Figure IV.1. Quantités de composés phénoliques adsorbés et récupérés dans l'éluant pour quatre adsorbants différents (24h d'adsorption à partir de l'extrait natif d'aronia à 20 °C suivi de 24h de désorption à 20 °C avec 70% d'éthanol (vol.); ratio solide-liquide de 1:20): (a) composés phénoliques totaux (GAE), (b) anthocyanines totales (CGE); (c) activité antioxydante (TEAC).

Il est apparu clairement que le charbon actif n'est pas approprié pour la récupération des molécules antioxydantes des extraits d'aronia. Même si l'adsorption a été assez efficace

(environ 80% PT et 96% AT adsorbés), les composés phénoliques n'ont pas pu être désorbés de l'adsorbant et donc l'activité antioxydante a été presque totalement perdue. Cette impossibilité de désorption des polyphénols peut s'expliquer par de fortes interactions entre les polyphénols et le charbon actif. Puisque le but est de proposer un procédé d'extraction-purification écologique, il a été choisi d'utiliser seulement des solvants de qualité alimentaire (mélanges éthanol-eau) pour la désorption des composés phénoliques d'aronia. Par conséquent, d'autres solvants plus hydrophobes n'ont pas été utilisés pour désorber les polyphénols du charbon actif et cet adsorbant n'a pas été considéré par la suite. En ce qui concerne les résines macroporeuses, en général des quantités très élevées de polyphénols ont été adsorbées et désorbées (Figure IV.1a). XAD7HP est apparu comme l'adsorbant le plus efficace. Environ 95% des polyphénols initialement présents dans l'extrait ont été adsorbés, puis environ 81% récupérés dans la solution d'élution. Concernant les anthocyanines, les différences entre les différents types de résines sont moins importants (Figure IV.1b), mais XAD7HP a toujours donné les meilleurs résultats: les anthocyanines ont été presque complètement adsorbées et environ 92% ont été récupérées après la désorption. Les résultats obtenus sont très proches de ceux rapportés par Denev et al., soit 91% d'anthocyanines récupérées à partir d'extraits d'aronia par adsorption avec Amberlite XAD7HP et de l'éthanol à 96% (vol.) comme éluant (Denev et al. 2010). Il semble difficile d'expliquer les différences observées entre les rendements de récupération obtenus en utilisant les différents types de résines Amberlite. Les interactions qui ont lieu entre les différentes molécules présentes dans l'extrait et l'adsorbant peuvent être complexes. Néanmoins, les meilleurs rendements de récupération observés en utilisant XAD16 par rapport aux rendements de récupération avec XAD 1180 pourrait être expliqués par la plus grande surface spécifique de la résine XAD16 (ces adsorbants ont les mêmes structures chimiques) (Tableau II.1 et Figure II.3). On peut supposer également que l'affinité de la plupart des composés phénoliques extraits de la phase liquide (eau) vers la résine faiblement polaire acrylique XAD7HP était supérieure à leur affinité pour les deux autres résines polyaromatiques plus hydrophobes.

En plus des rendements élevés de récupération des composés phénoliques, il est également important de s'assurer que l'activité antioxydante a été préservée au cours des étapes d'adsorption et de désorption. Les résultats obtenus mettent en évidence une perte importante de l'activité antioxydante en utilisant l'adsorbant XAD1180 (Figure IV.1c), correspondant à des pertes de polyphénols et d'anthocyanines. Pour XAD7HP et XAD16, l'activité antioxydante des composés phénoliques désorbés a été complètement retrouvée. Il

semble même qu'à l'aide de ces deux résines la capacité antioxydante des composés phénoliques élués ait été légèrement améliorée grâce à l'enrichissement des extraits par le processus d'adsorption-désorption. Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de la teneur en polyphénols, et plus précisément de la teneur en anthocyanines, dans l'extrait final, comme cela a été suggéré par Gasiorowski et al. (1997), Kähkönen et al. (1999) et Aehle et al. (2004).

Même si, dans les conditions étudiées, les meilleures récupérations des composés phénoliques d'aronia ont été obtenues avec XAD7HP, les résultats avec XAD16 ont été également très bons et probablement que dans d'autres conditions opératoires cette résine pourrait permettre une efficacité de récupération encore plus élevée que XAD7HP. Avant de choisir l'adsorbant le plus pertinent pour la récupération de composés phénoliques d'aronia, des études complémentaires ont été réalisées en utilisant les résines XAD7HP et XAD16.

IV.1.1.2. Comparaison de l'efficacité des résines XAD7HP et XAD16

Les propriétés d'adsorption de XAD7HP et XAD16 ont été caractérisées par des isothermes d'équilibre en polyphénols totaux (Figure IV.2a) et en anthocyanines totales (Figure IV.2b). XAD7HP présente clairement des capacités d'adsorption plus élevées pour les polyphénols et les anthocyanines à partir des extraits d'aronia (Tableau IV.1). En appliquant le modèle de Langmuir, il a été constaté que les capacités maximales d'adsorption sont de près de 140 mg de polyphénols et 2,5 mg d'anthocyanines par gramme d'adsorbant.

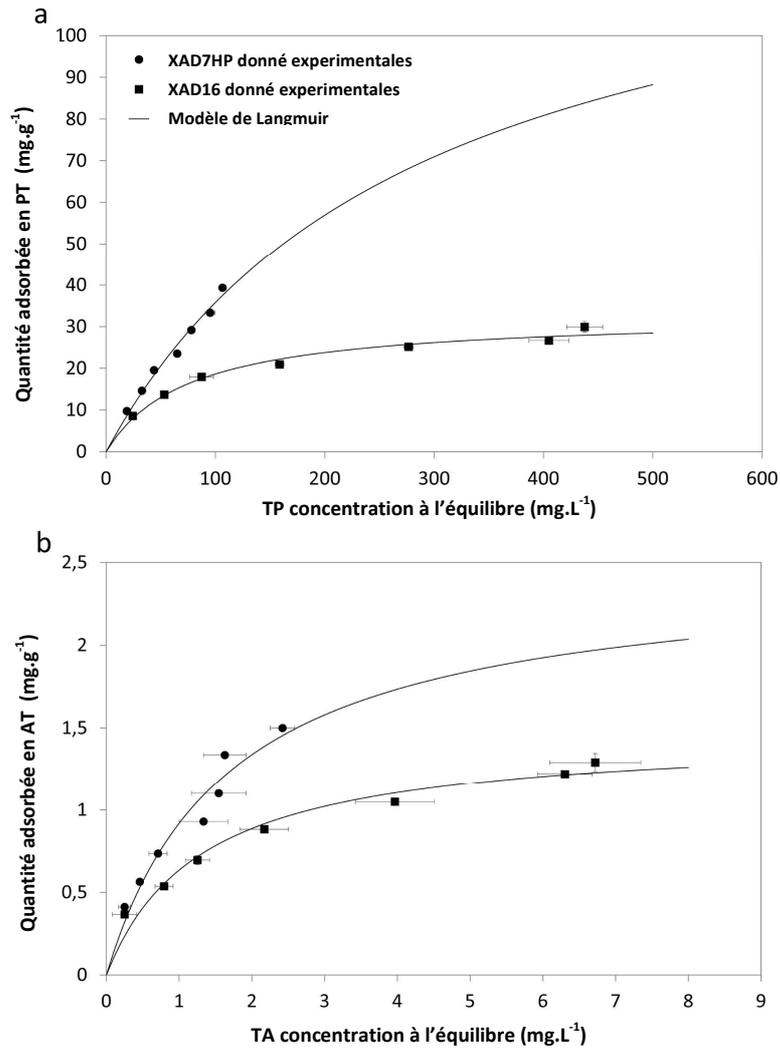


Figure IV.2. Isothermes d'adsorption à l'équilibre à partir d'extraits d'aronia à 20 °C et un ratio solide-liquide de 1:20, en utilisant les adsorbants XAD7HP (●) et XAD16 (■) ; les courbes (—) correspondent au modèle de Langmuir pour ces 2 résines ; (a) PT (GAE) (b) AT (CGE)).

Tableau IV.1. Modélisation des isothermes d'adsorption par l'équation de Langmuir : valeurs de capacité maximale d'adsorption (q_m), constante de Langmuir (k_L) et NRMSD (ratio solide-liquide de 1:20, T = 20 ° C).

		q_m (mg.g ⁻¹ adsorbent)	k_L (L.g ⁻¹ adsorbent)	NRMSD (%)
XAD7HP	PT	139,3	0,004	4,5
	AT	2,5	0,595	8,5
XAD16	PT	32,7	0,013	4,8
	AT	1,47	0,762	6,6

Pour comparer les rendements de récupération des ces deux résines, des études complémentaires à différentes conditions de désorption ont été effectuées. L'influence de la température et de la composition de l'éluant (pourcentage d'éthanol) sur la récupération des composés phénoliques est présentée sur la Figure IV.3. Aucune amélioration dans les rendements de désorption n'a été obtenue en augmentant la température de 20 à 40°C, sauf pour les polyphénols en utilisant XAD16. Cependant, l'augmentation de la température à 40°C a permis d'étendre la plage de fraction d'éthanol dans l'éluant où la désorption est efficace. Pour la récupération des polyphénols à 40°C (Figure IV.3d), les deux adsorbants testés ont présenté des efficacités similaires en fonction de la fraction de l'éthanol, atteignant jusqu'à 82% de rendement de récupération. L'influence du pourcentage d'éthanol dans l'éluant sur la récupération de polyphénols est très marquée à 20°C (Figure IV.3a). La fraction optimale d'éthanol est d'environ 70% pour XAD7HP, alors qu'elle est d'environ 50% pour XAD16. En outre, à 20 °C, XAD7HP a montré des rendements de récupération plus élevés (jusqu'à 82%) que XAD16 (jusqu'à 71%). En ce qui concerne la récupération spécifique des anthocyanines d'aronia (Figure IV.3b et IV.3e), il est apparu que XAD7HP est plus efficace quelle que soit la température. Des rendements de récupération très élevés pour les anthocyanines (plus de 90% d'anthocyanines récupérées avec 70% et 80% d'éthanol (vol.)) ont été obtenus en utilisant cette résine à 20°C pour l'adsorption et la désorption.

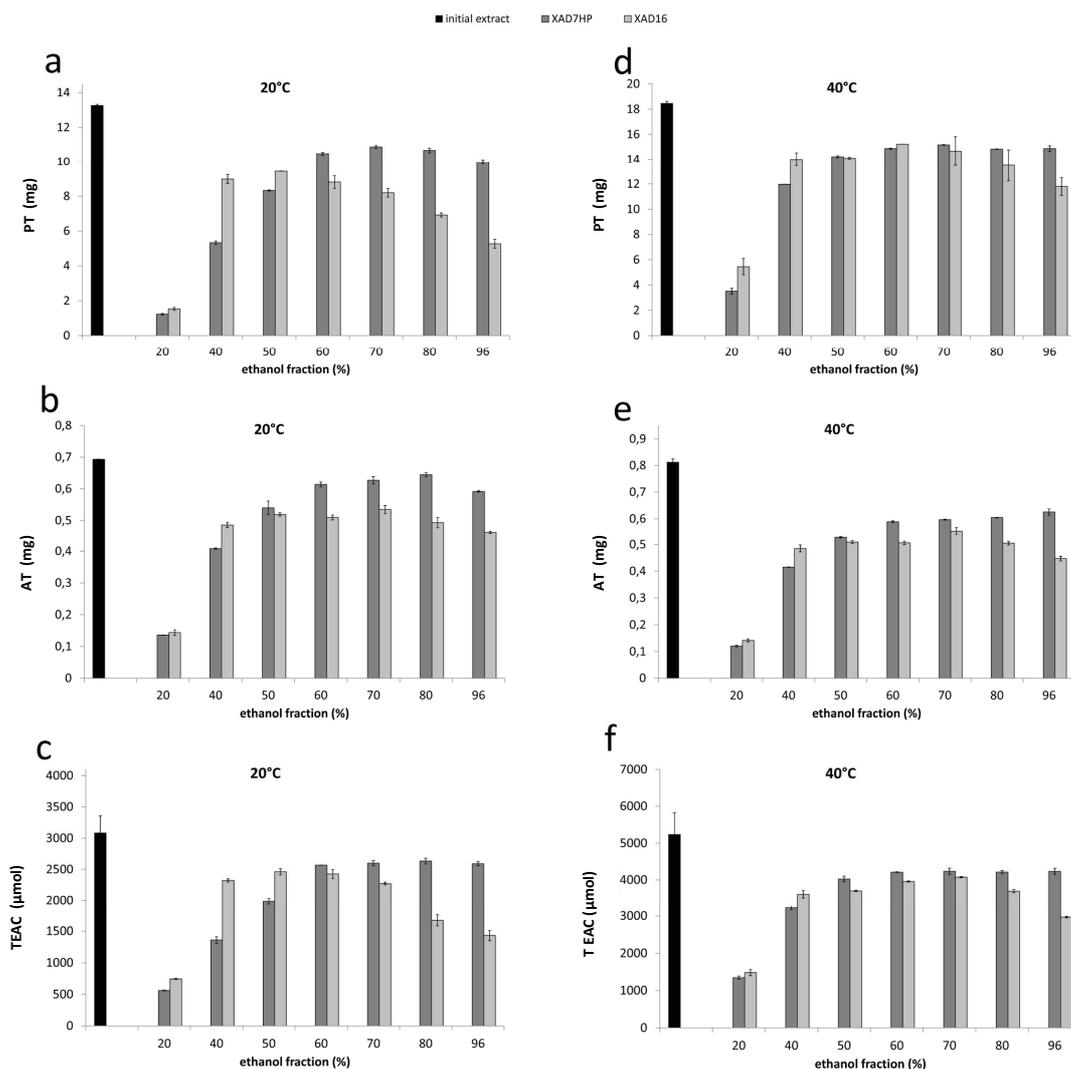


Figure IV.3. Influence de la température et de la composition d'éthanol dans l'éluant pour la récupération des composés phénoliques d'aronia et de l'activité antioxydante (24h d'adsorption à 20 °C suivi par 24h de désorption à diverses conditions; ratio solide-liquide de 1:20): (a) PT (GAE) après la désorption à 20 °C, (b) AT (CGE) après la désorption à 20 °C, (c) CA (TEAC) après la désorption à 20 °C, (d) PT (GAE) après la désorption à 40 °C, (e) AT (CGE) après la désorption à 40 °C; (f) CA (TEAC) après la désorption à 40 °C.

Il semblerait que l'effet des conditions de désorption (température, composition du solvant) sur l'activité antioxydante des extraits obtenus (Figure IV.3c et IV.3f) était très similaire à celle de la récupération des polyphénols totaux (Figure IV.3a et IV.3d). Puisque la teneur en anthocyanines dans la source d'aronia utilisée dans cette étude était relativement faible comparée à la teneur correspondante de polyphénols totaux (0,21% m.s. anthocyanines et 3,93% m.s. polyphénols dans l'extrait aqueux native), l'impact des anthocyanines sur la

capacité antioxydante des extraits semble être inférieur à celui des polyphénols. Les valeurs de récupération de la capacité antioxydante (jusqu'à 85%) ont généralement été plus élevées que celles de récupération des polyphénols (jusqu'à 82%) et plus faibles que celles de récupération des anthocyanines (jusqu'à 93%), ce qui suppose que l'activité antioxydante des anthocyanines est plus élevée que l'activité moyenne des polyphénols totaux des extraits d'aronia.

Finalement, il semblerait que les conditions de désorption préliminaires testées pour XAD7HP (à 20 °C avec 70% d'éthanol (vol.) comme solvant d'élution) sont optimales parmi toutes les conditions testées, en permettant un enrichissement très important des extraits en composés phénoliques antioxydants. La bonne sélectivité d'Amberlite XAD7HP envers les molécules phénoliques a permis d'enrichir considérablement la teneur en polyphénols et en anthocyanines dans les extraits. La teneur en polyphénols (64,8% m.s.) et en anthocyanines (3,94% m.s.) dans les extraits enrichis est respectivement environ 16 et 18 fois plus élevée que dans l'extrait d'aronia initial. De toute évidence, l'affinité de l'adsorbant utilisé envers les composés antioxydants ciblés était nettement plus élevée que son affinité envers la majeure partie des autres composés co-extraits à partir de baies d'aronia tels que des sucres (plus hydrophiles), par exemple.

Par ailleurs, effectuer l'étape de désorption à 20 °C semble aussi être intéressant en raison de la faible consommation d'énergie (pas de chauffage), en vue de proposer des procédés propres pour la récupération sélective des antioxydants naturels. Les conditions d'adsorption-désorption optimales établies ont été utilisées dans la suite des études sur l'intégration des procédés d'extraction et d'adsorption.

IV.1.2. Etude de la cinétique d'adsorption

Dans le but d'une meilleure maîtrise de l'adsorption, des études de la cinétique d'adsorption ont été réalisées avec l'adsorbant sélectionné : la résine XAD7HP. Tout d'abord une étude a été réalisée dans les mêmes conditions que les études d'équilibre, mais à différents temps d'adsorption. Etant donné qu'en industrie l'adsorption est habituellement réalisée en colonne, la cinétique d'adsorption a ensuite été étudiée en colonne à lit fixe (échelle laboratoire). La cinétique de désorption des composés phénoliques et des anthocyanines en particulier a été également étudiée.

IV.1.2.1. Etude en erlenmeyer

La cinétique d'adsorption réalisée en erlenmeyer est présentée dans la Figure IV.4. Les résultats pour les polyphénols et les anthocyanines sont présentés en pourcentages (leurs concentrations dans la phase liquide C par rapport à leur concentration initiale C_0). Les concentrations des composés phénoliques dans la phase liquide diminuent rapidement. Les cinétiques d'adsorption des polyphénols totaux et des anthocyanines totales se présentent sous forme de courbes asymptotiques et après un temps de contact d'environ 8 h, un équilibre est établi. Il peut être estimé que ce temps correspond à un bon compromis de durée au niveau des expériences, le taux d'adsorption étant presque au maximum. Cette étude a également montré que les résultats après 24 h de contact entre les extraits d'aronia et adsorbant correspondent bien à l'équilibre d'adsorption.

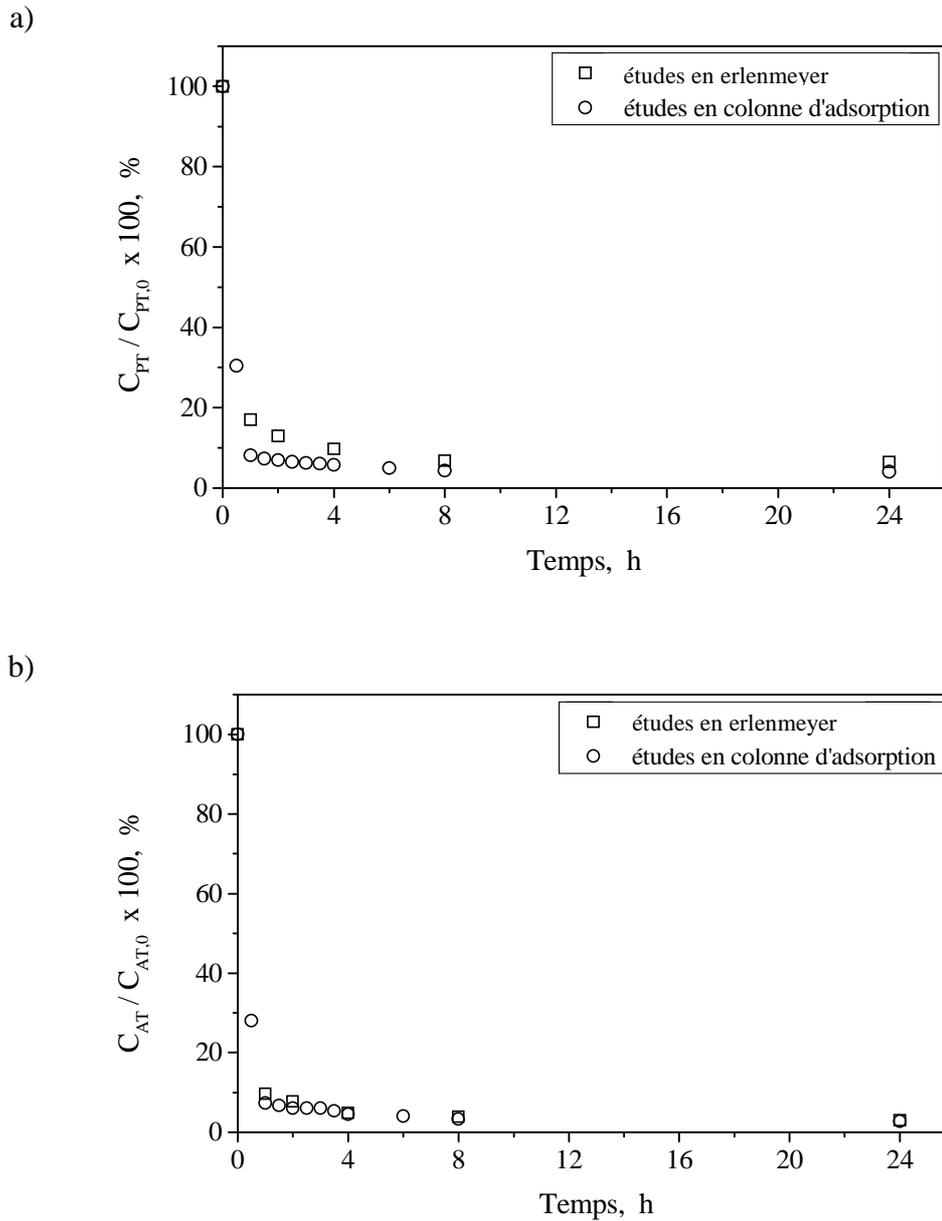


Figure IV.4. Cinétique d'adsorption des polyphénols totaux (a) et des anthocyanines totales (b) sur XAD7HP avec un rapport adsorbant-phase liquide de 1:20 dans le cas d'adsorption en erlenmeyer et de 1:14 dans le cas d'adsorption en colonne.

IV.1.2.2. Etude en colonne d'adsorption

IV.1.2.2.1. Adsorption

Sur la Figure IV.4 sont présentés également les résultats de la cinétique réalisée en colonne d'adsorption. Etant donné que le contact entre les deux phases et l'agitation sont

meilleurs dans le cas d'essais en erlenmeyer que dans le cas de la colonne à lit fixe, il a été choisi pour les études en colonne d'utiliser un plus grand rapport adsorbant : liquide (1:14). Pour mieux comparer les études cinétiques en erlenmeyer et en colonne, les résultats ont été présentés en taux d'adsorption (les extraits d'aronia utilisés n'ont pas été de même origine). Les résultats obtenus ont montré que l'adsorption en colonne a été aussi rapide que l'adsorption en erlenmeyer. Les taux d'adsorption en colonne ont même été légèrement supérieurs (environ 96 % de polyphénols et d'anthocyanines adsorbés), sans doute à cause de la plus grande capacité d'adsorption (rapport adsorbant : liquide 1:14 en colonne et 1:20 en erlenmeyer). L'adsorption en colonne peut donc être considérée comme très efficace et rapide puisque plus de 90% des polyphénols totaux et des anthocyanines ont été adsorbés au cours de la première une heure.

IV.1.2.2.2. Désorption

La désorption de la colonne après la fin de l'étape d'adsorption a été réalisée avec 70% d'éthanol et un débit faible ($0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) (Figure IV.5). L'éluant a été collecté en fractions successives de 10 mL. Une forte concentration en polyphénols et en anthocyanines a été observée dans les premières fractions (la concentration de polyphénols totaux dans l'extrait natif avant l'adsorption était de $690 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et celle d'anthocyanines de $149 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Par rapport à l'extrait initial, les polyphénols et les anthocyanines ont été concentrés 5,3 et 4,9 fois respectivement dans les 10 premiers mL récoltés en sortie de colonne (fraction 1). Malgré le débit faible d'élution, la désorption au sein de la colonne a été assez rapide. Environ 97 % des polyphénols et 98% des anthocyanines désorbés ont été récupérés dans la première heure d'élution. La désorption en colonne a été efficace puisque les résultats de récupération après les étapes d'adsorption et de désorption sont très proches des résultats obtenus lors des études d'équilibre (cf §IV.1.1).

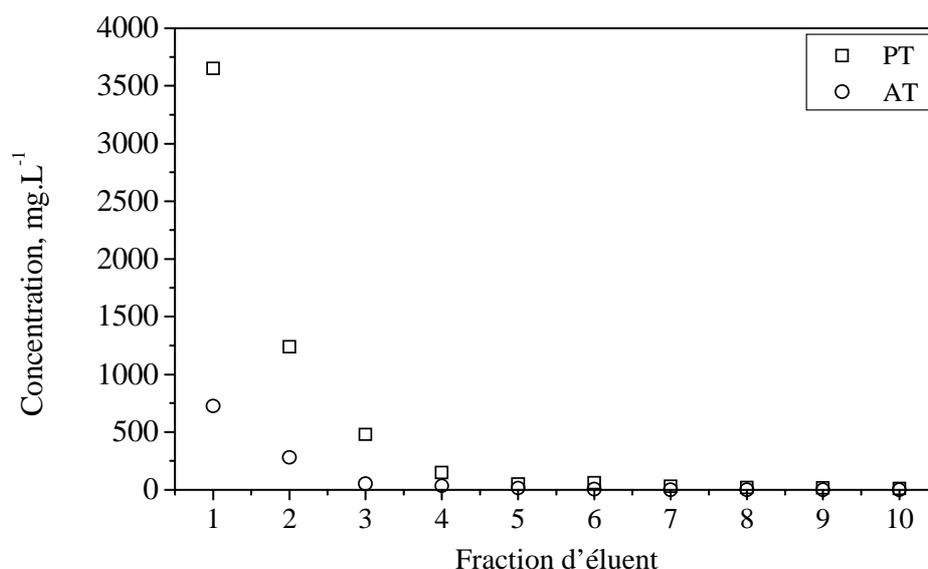


Figure IV.5. Concentrations en polyphénols (GAE) et en anthocyanines (CGE) dans les 10 fractions d'éluent de 10 mL lors de la désorption de la colonne d'adsorption avec 70% éthanol (débit de 0,7 mL.min⁻¹).

IV.1.2.2.3. Enrichissement en colonne

Les teneurs de l'extrait natif utilisé dans cette étude étaient de 2,8% pour les polyphénols totaux et de 0,6% pour les anthocyanines. Les teneurs de ces composés dans chaque fraction récupérée lors de l'élution de la colonne ont été déterminées en tenant compte des taux de matière sèche de ces fractions. Les enrichissements en polyphénols totaux et en anthocyanines obtenus en colonne sont représentés dans la Figure IV.6.

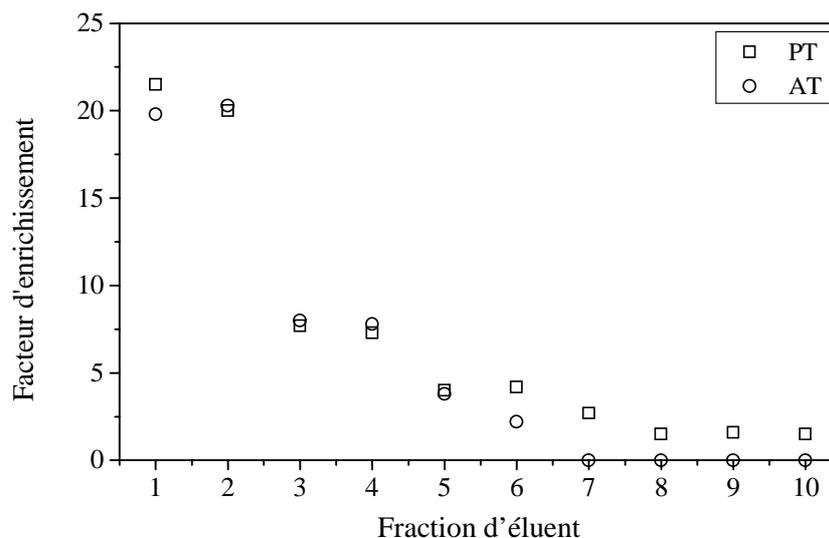


Figure IV.6. Enrichissement en polyphénols et en anthocyanines des 10 fractions d'éluent de 10 mL lors de la désorption de la colonne d'adsorption avec 70% éthanol (débit de 0,7 mL.min⁻¹) par rapport à l'extrait initial.

Il peut être observé, pour les deux premières fractions de 10 mL, des enrichissements en polyphénols totaux et en anthocyanines égaux voire supérieurs à 20. Ces enrichissements plus élevés au début de la désorption sont probablement dû à la plus rapide désorption des composés phénoliques d'intérêt par rapport aux autres composés adsorbés. En effet, les polyphénols totaux et les anthocyanines sont récupérés majoritairement au début de l'expérience, ce qui laisse supposer que d'autres composés sont désorbés par la suite. Les teneurs obtenues dans les deux premières fractions ont alors été supérieures à 56% pour les polyphénols totaux et supérieures à 12% pour les anthocyanines.

IV.1.3. Conclusions

Les études d'adsorption et de désorption pour la récupération de composés phénoliques antioxydants des extraits de baies d'*Aronia melanocarpa* ont mis en évidence que la résine Amberlite XAD7HP est l'adsorbant le plus pertinent parmi ceux qui ont été testés, en tenant compte de la récupération des composés phénoliques et de la préservation de l'activité antioxydante. Dans les conditions optimales d'équilibre (adsorption à 20 °C et désorption à 20 °C avec 70% d'éthanol (vol.)), environ 82% des polyphénols et 92% des anthocyanines peuvent être récupérés des extraits d'aronia. Les études cinétiques en colonne d'adsorption à

lit fixe ont montré que les deux étapes d'adsorption et de désorption sont relativement rapides et permettent de récupérer la majeure partie des antioxydants phénoliques lors de la première heure de chaque étape. Grâce à la sélectivité importante de la résine XAD7HP, des enrichissements très importants en polyphénols et en anthocyanines des extraits d'aronia peuvent être obtenus.

IV.2. Impact de l'intégration extraction-adsorption sur l'efficacité de récupération des composés phénoliques

Un des objectifs principaux de ce travail est de proposer un procédé intégré, combinant l'extraction des composés phénoliques antioxydants d'aronia et l'enrichissement simultané des extraits natifs par adsorption. L'impact de l'intégration sur l'efficacité des procédés a été estimé en comparant les résultats obtenus dans les mêmes conditions lorsque (1) les étapes d'extraction et d'adsorption sont réalisées successivement, et quand (2) l'extraction et l'adsorption sont intégrées dans le même procédé.

IV.2.1. Extraction et adsorption successives

Dans cette partie, l'adsorption a été réalisée après l'extraction. Chacune des deux opérations a été menée pendant 8 h. Environ 1 h a été nécessaire entre les deux étapes pour séparer l'extrait liquide obtenu de la source végétale solide, centrifuger et ajuster le volume de la phase liquide à 800 mL avant de commencer l'étape d'adsorption. Dans la Figure IV.7 est présentée l'évolution des concentrations de polyphénols et d'anthocyanines dans la phase liquide en fonction du temps lorsque l'extraction est suivie par l'étape d'adsorption. On peut observer que la cinétique de ces deux opérations est assez semblable: environ 3-4 h ont été nécessaires pour s'approcher de l'équilibre dans chaque étape pour les polyphénols et les anthocyanines. Il semble que l'extraction des anthocyanines ait été un peu plus rapide que celle des polyphénols totaux, alors que l'adsorption des anthocyanines semble être légèrement plus lente que l'adsorption des polyphénols. Cependant, les cinétiques des étapes d'extraction et d'adsorption pour les polyphénols et les anthocyanines n'étaient pas suffisamment différentes pour permettre l'obtention d'extraits avec des rapports entre anthocyanines et polyphénols très différents.

Après la fin de l'étape d'adsorption, une élution de la colonne a été effectuée pour récupérer les composés phénoliques extraits. Les rendements de récupération après l'adsorption-désorption ont été d'environ 86% pour les polyphénols et 94% pour les anthocyanines, ce qui est proche des rendements de récupération obtenus dans les études d'équilibre préliminaires. La teneur en composés phénoliques dans l'extrait obtenu à la fin de l'étape d'extraction a été d'environ 3,08% m.s. pour les polyphénols et 0,13% m.s. pour les anthocyanines, tandis que leurs teneurs dans la solution d'élution obtenue après l'adsorption-

désorption ont été de 37,7% et de 1,67% m.s., respectivement, ce qui correspond à un enrichissement des extraits de plus de 12 fois grâce à cette opération. En ce qui concerne les résultats d'activité antioxydante, environ 1920 $\mu\text{mol TEAC}$ ont été extraites et 84% ont été récupérées après l'étape d'élution (également en accord avec les rendements de récupération de la capacité antioxydante obtenus lors des études d'équilibre d'adsorption (cf §IV.1.1)).

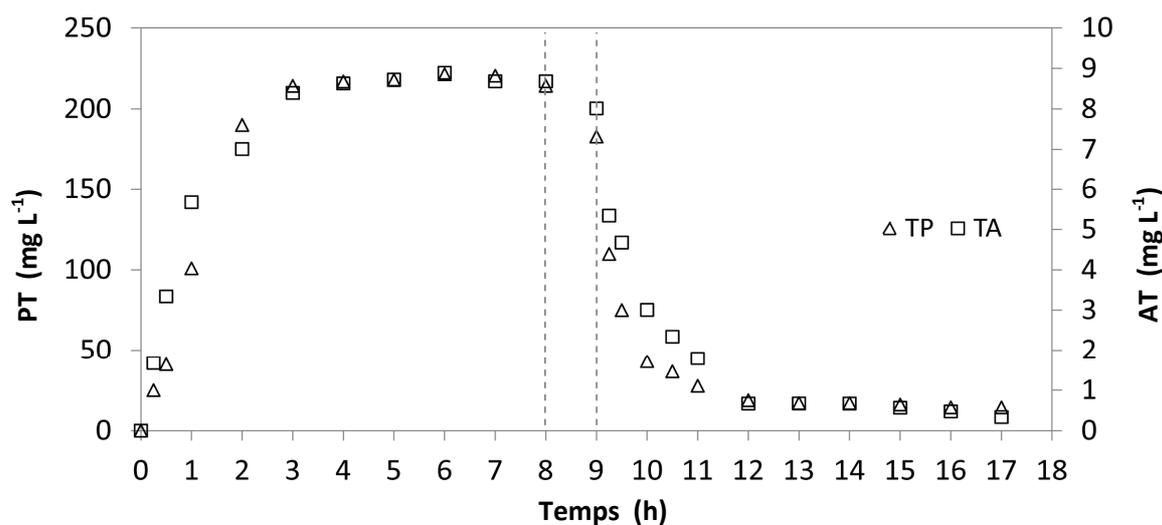


Figure IV.7. Evolution de la concentration en composés phénoliques d'aronia dans la phase liquide lors des étapes d'extraction (0-8 h) suivi de l'adsorption (9-17 h) (10 g de co-produit d'aronia, 800 mL d'eau ultrapure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C): PT (GAE), AT (CGE).

IV.2.2. Procédé intégré extraction-adsorption

L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que dans le cas des extraction et adsorption successives, à savoir pendant 8 h à température ambiante (22 °C), avec 10 g de pellets d'aronia dans l'extracteur (même matière première que dans le cas des extraction et adsorption successives), 10 g d'adsorbant Amberlite XAD7HP dans la colonne, et de 800 mL de liquide (eau ultrapure) circulant grâce à une pompe péristaltique (Figure II.6) avec un débit de 1,0 L.h⁻¹. Des échantillons de phase liquide dans l'extracteur ont été pris régulièrement pour l'analyse ultérieure.

Après la fin du procédé d'extraction-adsorption intégré, la colonne a été éluée comme décrit précédemment avec 70 % d'éthanol. Pour essayer de mieux maîtriser l'étape de désorption, de nombreuses fractions ont été recueillies, de la manière suivante: 30 fractions de 2 mL, puis 6 fractions de 10 mL et une dernière fraction de 60 mL.

Le nouveau procédé intégré proposé combine l'extraction des composés phénoliques antioxydants à partir de pellets d'aronia avec l'enrichissement simultané de l'extrait natif par adsorption. La phase liquide circule à travers le contacteur d'extraction et une colonne d'adsorption. Dans l'extracteur, ce liquide (initialement eau ultrapure) extrait les composés phénoliques antioxydants provenant de la matière première. La fixation des composés phénoliques extraits sur l'adsorbant dans la colonne permet de décharger la phase liquide en continu. Ce phénomène a également permis d'améliorer l'efficacité de l'extraction par le maintien d'une faible concentration dans la phase liquide et, par conséquent, un gradient de concentration maximal pour le procédé d'extraction.

Sur la Figure IV.8 est présentée l'évolution de la concentration en polyphénols de la phase liquide dans l'extracteur pendant le procédé intégré extraction-adsorption. La concentration en polyphénols a augmenté rapidement, et a atteint sa valeur maximale (environ 90 mg.L^{-1}) à environ 1,0-1,5 h, puis elle a diminué lentement avant de se stabiliser autour de sa valeur minimale (environ 25 mg.L^{-1}) à environ 5-6 h. En fait, la concentration en composés phénoliques dans la phase aqueuse a augmenté au cours de la première heure du processus puisque, à ce stade, la vitesse d'extraction est élevée en raison de la quantité initiale importante de composés phénoliques dans les pellets d'aronia et donc d'un gradient élevé de concentrations favorable à l'extraction. L'augmentation de la concentration en polyphénols dans la phase aqueuse conduit à une augmentation progressive du gradient pour le procédé d'adsorption et après environ 1,5 h, la vitesse d'adsorption est devenue plus élevée que la vitesse d'extraction. A ce moment commence la diminution de la concentration en polyphénols dans la phase aqueuse. Cette baisse a été relativement rapide pendant les 3 h suivantes. Finalement, la concentration en polyphénols tend vers une valeur relativement faible et stable alors que les vitesses d'extraction et d'adsorption étaient très similaires et tendant probablement vers zéro. La tendance observée pour les anthocyanines dans la phase liquide était très semblable à celle des polyphénols.

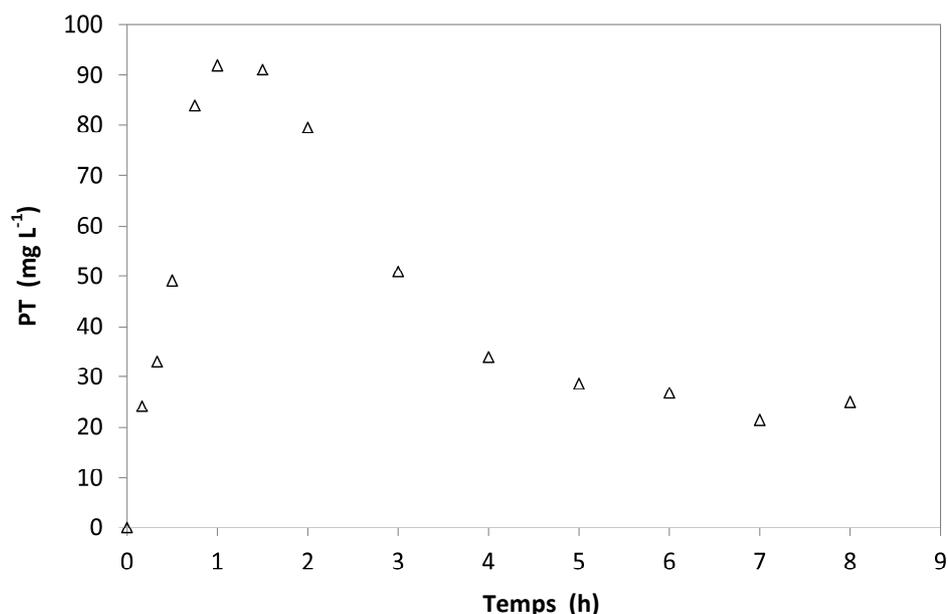


Figure IV.8. Evolution de la concentration en polyphénols totaux (GAE) dans la phase liquide du contacteur d'extraction au cours du procédé intégré extraction-adsorption (10 g de co-produits d'aronia, 800 mL d'eau ultrapure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C).

Après la fin du procédé intégré extraction-adsorption, la colonne a été éluée avec 70% d'éthanol pour récupérer les composés phénoliques extraits. L'évolution des concentrations de polyphénols et d'anthocyanines en fonction du volume d'élution à un débit constant de 2 mL.min⁻¹ est présentée dans la Figure IV.9. Des profils similaires ont été observés pour les polyphénols et les anthocyanines avec des pics autour d'un volume d'élution de 18 mL. Des concentrations très élevées en composés phénoliques ont été obtenues dans la fraction d'élution de 2 mL à 9 min: près de 12 g.L⁻¹ en polyphénols et 380 mg.L⁻¹ en anthocyanines. La majeure partie des composés phénoliques fixés sur la résine XAD7HP ont été désorbés durant les premiers 20-25 minutes d'élution. Des résultats similaires ont été obtenus au cours de l'élution de la colonne après les étapes successives d'extraction et adsorption (même débit, même solvant d'élution) (Figure IV.9).

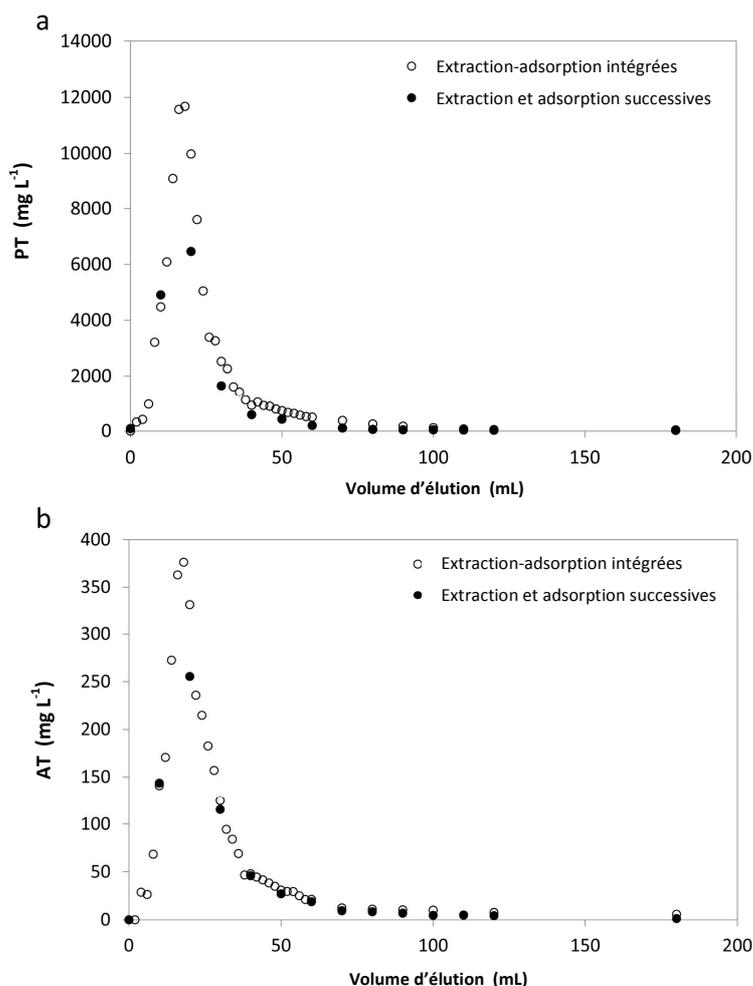


Figure IV.9. Evolution de la concentration en composés phénoliques d'aronia pendant l'élution de la colonne (70% d'éthanol (vol.)) suite au procédé intégré extraction-adsorption et suite aux extraction et adsorption successives (débit de 2 mL.min⁻¹): (a) PT (GAE); (b) AT (CGE).

Dans le Tableau IV.2 sont présentées les quantités de polyphénols et d'anthocyanines extraites à partir des pellets d'aronia en utilisant le procédé intégré proposé et ensuite récupérés après élution. L'impact de l'intégration a été estimé en comparant ces résultats aux résultats obtenus dans le cas d'extraction et adsorption successives. L'intégration a eu un impact positif important sur les rendements d'extraction, puisque des augmentations de plus de 25% pour les deux groupes de molécules phénoliques antioxydantes étudiés ont été enregistrées (Tableau IV.2.). L'effet de l'intégration sur les rendements de récupération (après l'élution de la colonne d'adsorption) a été également considérable, conduisant à des augmentations de l'ordre de 33% pour les polyphénols et 21% pour les anthocyanines. Les molécules phénoliques récupérées par le procédé intégré extraction-adsorption n'ont pas

perdu leurs capacités antioxydantes. L'intégration de l'extraction et l'adsorption a même conduit à une augmentation d'environ 7% de la capacité antioxydante des extraits obtenus, comme cela a été observé lors des études d'adsorption. En comparant les deux procédés en terme de productivité, l'intégration a permis d'augmenter d'environ de 2,7 et 2,4 la productivité concernant les polyphénols et les anthocyanines, respectivement (environ 10,0 $\text{g.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ de polyphénols dans le cas des extraction et adsorption successives et environ 26,5 $\text{g.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ dans le cas du procédé intégré ; environ 0,4 $\text{g.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ d'anthocyanines dans le cas des extraction et adsorption successives et environ 1,0 $\text{g.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ dans le cas du procédé intégré). Cependant, ces productivités doivent être considérées sur une base indicative, car elles ont été calculées pour des conditions de fonctionnement non optimisés (volume et débit du solvant, durée du procédé, etc.).

Tableau IV.2. Impact de l'intégration des procédés: comparaison de (1) extraction et adsorption successives et (2) procédé intégré extraction-adsorption (10 g d'aronia, 800 mL d'eau ultra-pure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C).

		PT	AT
		(GAE)	(CGE)
(1) extraction et adsorption successives	quantité extraite (mg)	176,21	6,72
	quantité récupérée après l'élution (mg)	151,17	6,32
(2) procédé intégré extraction-adsorption	quantité extraite (mg)	222,21	8,80
	quantité récupérée après l'élution (mg)	201,20	7,62
Impact de l'intégration	en rendement d'extraction (%)	+26,1	+30,9
	en rendement de récupération (%)	+33,1	+20,6

Ces résultats correspondent à un volume d'élution de 180 mL, ce qui a permis de récupérer une quantité maximale de composés phénoliques. Mais si l'objectif est d'obtenir une fraction très pure de composés phénoliques antioxydants, il serait facile de sélectionner une fraction d'élution appropriée. Par exemple dans le Tableau IV.3 sont présentés les résultats pour une fraction de 50 mL (volume d'élution 10-60 mL). Environ 84% des polyphénols et 81% des anthocyanines ont été recueillies dans cette fraction, mais les teneurs en polyphénols et en anthocyanines ont atteint 53,4 et 1,94% m.s., respectivement, ce qui correspond à des améliorations de l'ordre de 27% pour les polyphénols et 22% pour les anthocyanines par rapport à leurs teneurs dans le volume total de 180 mL. L'enrichissement des polyphénols

dans cette fraction de 50 mL par rapport à l'extrait natif d'aronia est d'environ 17 fois et celui des anthocyanines d'environ 15 fois. Des teneurs encore plus élevées pourraient être obtenues dans de petites fractions d'élution en ciblant le pic d'élution (autours de 18 mL volume d'élution). Il faut rappeler que l'élution a été effectuée à un débit constant et avec un seul éluant (celui considéré comme optimal pour la désorption des composés phénoliques d'aronia adsorbés sur la résine XAD7HP sur la base des études préliminaires de l'équilibre de désorption). Le procédé d'élution pourrait être également optimisé pour l'obtention de fractions ayant des teneurs plus élevées en polyphénols et anthocyanines.

Tableau IV.3. Teneurs en polyphénols et en anthocyanines dans l'extrait d'aronia et dans différentes fractions d'élution (10 g de pellets d'aronia, 800 mL d'eau ultra-pure, 10 g d'adsorbant XAD7HP, T = 22 °C; élution avec éthanol 70% (vol.) avec un débit de 2 mL.min⁻¹).

		PT (GAE)	AT (CGE)
Extraction et adsorption successives	Teneur dans l'extrait (g/100g m.s.)	3,08	0,13
	Teneur dans la fraction d'élution complète de 180 mL (g/100g m.s.)	37,73	1,67
Procédé intégré extraction-adsorption	Teneur dans la fraction d'élution complète de 180 mL (g/100g m.s.)	42,01	1,59
	Teneur dans la fraction d'élution partielle de 50 mL (g/100g m.s.)	53,41	1,94
	rendement de récupération correspondant à la fraction d'élution partielle de 50 mL (% w/w)	84,41	81,05

Le nouveau procédé intégré proposé dans le présent travail a permis l'extraction des polyphénols et leur purification simultanée. En raison d'une grande sélectivité de l'adsorbant utilisé, la majeure partie des molécules co-extraites à partir des baies est restée dans la phase liquide et de cette façon, des extraits naturels très riches en composés phénoliques antioxydants ont été obtenus après l'élution de la colonne d'adsorption. L'intégration des procédés a permis d'améliorer la récupération des composés phénoliques antioxydants, mais également de simplifier le procédé car les étapes de séparation de l'extrait natif de la source végétale épuisée et la centrifugation de l'extrait liquide obtenu n'ont pas été nécessaires. L'intégration réduit également le temps et l'énergie utilisée pour l'extraction et la purification des composés phénoliques. Il est important de mentionner que dans cet éco-procédé, seuls

des éco-solvants alimentaires (eau et éthanol) ont été utilisés. À notre connaissance, c'est la première intégration des procédés d'extraction et d'adsorption permettant la récupération sélective de composés phénoliques antioxydants et notamment des anthocyanines à partir de baies. Une intégration similaire des étapes d'extraction et d'adsorption a déjà été proposée par Zhang et al. pour la récupération sélective de dérivés de crocétine (Zhang et al. 2007) et d'acide salvianolique (Zhang et al. 2011). Cependant, dans ces études, l'étape d'extraction a été effectuée à ébullition (100 °C) et des dispositifs de chauffage et de refroidissement ont été ajoutés au système entre l'extracteur et la colonne d'adsorption. Dans le présent travail, un procédé simple et moins cher a été proposé permettant une récupération sélective des composés phénoliques antioxydants à des conditions douces. Ces conditions permettent également de préserver certains composés phénoliques antioxydants thermosensibles comme les anthocyanines, par exemple.

IV.2.3. Conclusions

Le nouveau procédé intégré proposé extraction-adsorption permet l'extraction des polyphénols et leur concentration simultanée. Il permet de récupérer sélectivement des composés phénoliques antioxydants à partir de baies d'aronia en un seul procédé écologique, en utilisant uniquement des solvants de degré alimentaire. Évidemment, il pourrait être appliqué aussi pour la récupération sélective de ce type de molécules provenant d'autres sources végétales y compris de co-produits. De cette façon, des produits de haute qualité peuvent être obtenus par un procédé simple avec une faible consommation de temps et d'énergie. Un clair impact de l'intégration a été observé en comparant ce procédé intégré d'extraction-adsorption avec l'extraction et adsorption successives. L'intégration des procédés améliore les rendements d'extraction en polyphénols et en anthocyanines de plus de 25%, en préservant la capacité antioxydante des composés phénoliques des extraits d'aronia. Grâce à la sélectivité de la résine Amberlite XAD7HP utilisé comme adsorbant, le procédé intégré extraction-adsorption permet d'enrichir les extraits natifs d'aronia jusqu'à 17 fois en polyphénols et 15 fois en anthocyanines. Il est possible d'obtenir extraits très riches en composés phénoliques, en sélectionnant simplement des fractions d'élution appropriées.

IV.3. Optimisation de l'éco-procédé intégré extraction-adsorption et réalisation à l'échelle pilote

Afin de démontrer la possibilité d'appliquer le nouveau procédé intégré pour la production d'extraits riches en antioxydants, le procédé a été réalisé à l'échelle pilote. Avant de réaliser les expériences à une telle échelle, des études à l'échelle laboratoire ont été nécessaires pour optimiser le procédé intégré et ensuite le réaliser à l'échelle pilote en conservant les paramètres opératoires optimaux. Il a été envisagé d'augmenter 50 fois le volume du solvant, la quantité d'adsorbant et la quantité de matière première (pellets d'aronia) lors du passage à l'échelle pilote. Compte tenu des quantités de matière première, d'adsorbant et des équipements disponibles (cuve agitée de 100 L, colonnes d'adsorption permettant de mettre jusqu'à 200 g d'adsorbant dans une colonne), il a été décidé d'utiliser à l'échelle laboratoire 4 g de pellets d'aronia, 4 g d'adsorbant et 800 mL d'eau déminéralisée et respectivement à l'échelle pilote 200 g de pellets d'aronia, 200 g d'adsorbant et 40 L d'eau déminéralisée.

IV.3.1. Optimisation des conditions opératoires à l'échelle laboratoire

L'objectif de cette étude a été d'optimiser le procédé intégré extraction-adsorption pour la récupération des antioxydants d'aronia. Cette étude d'optimisation a été menée à l'échelle laboratoire pour des raisons évidentes de praticité et de consommations de matériel.

Il est apparu important d'étudier l'influence du débit de circulation du solvant, qui est un point important pour l'efficacité de l'adsorption dans la colonne à lit fixe. En effet, le débit doit être suffisamment faible pour que les molécules puissent se fixer sur l'adsorbant, mais également suffisamment élevé pour que la durée du procédé ne soit pas trop importante. L'efficacité de l'extraction nécessite effectivement de décharger le plus rapidement possible la phase aqueuse afin de maintenir un gradient de concentration (entre la phase liquide et la source) favorable à l'extraction. Finalement, le nombre de cycles de recirculation a semblé être un facteur important pour optimiser ce procédé intégré extraction-adsorption. Il a donc été décidé d'étudier l'influence de 2 paramètres : le débit de circulation de la phase liquide, et la durée du procédé (en modulant ces 2 paramètres, le nombre de cycles est également varié).

Ainsi, le volume de solvant (eau) et les quantités de pellets d'aronia et d'adsorbant ont été fixés (à 800 mL, 4 g et 4 g respectivement), et les paramètres considérés pour optimiser le procédé sont le temps et le débit de circulation du liquide. Un plan d'expériences simple a été réalisé en utilisant comme variables le temps (X_1) et le débit (X_2) avec trois niveaux différents (-1, 0, +1). Le temps a varié entre 2 et 8 h et le débit entre 1 et 5 L.h⁻¹ (Tableau IV.4). Les réponses prises en compte sont les rendements en polyphénols totaux, en anthocyanines totales et la capacité antioxydante de l'extrait récupéré après la désorption.

Tableau IV.4. Variables indépendantes et leurs valeurs codées et réelles utilisées pour l'optimisation.

Variables indépendantes	Unités	Symbole	Niveaux codés		
			-1	0	1
Temps	h	X_1	2	5	8
Débit	L.h ⁻¹	X_2	1	3	5

La désorption a été réalisée dans les mêmes conditions que décrit précédemment (cf §II.5.1). Des exemples de profils d'élution obtenus pour un des points centraux (5 h ; 3L.h⁻¹) du plan d'expérience sont présentés Figure IV.10. On retrouve l'allure des profils d'élution observés précédemment, avec un pic d'élution, ici situé à un volume d'élution d'environ 10 mL. On constate qu'à partir d'un volume d'élution d'environ 80 mL, la concentration en polyphénols dans l'éluant est proche de zéro, ce qui signifie que la colonne a bien été déchargée.

Après élution, les extraits enrichis ont été caractérisés, afin d'obtenir les valeurs pour les 3 réponses du plan d'expériences (PT, AT et CA). Les résultats des 7 essais (dont 3 points centraux) sont présentés dans le Tableau IV.5.

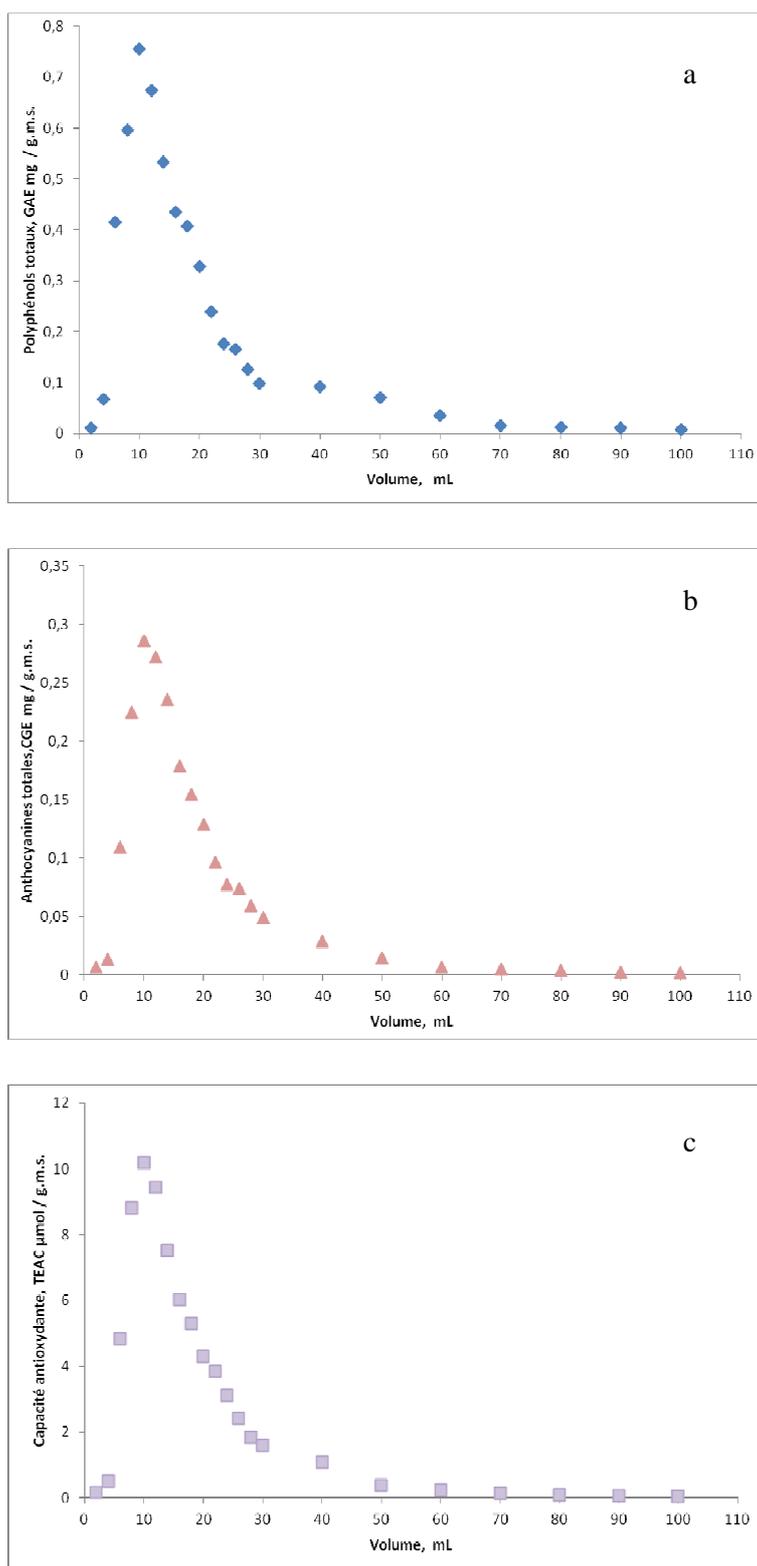


Figure IV.10. Evolution de la concentration en composés phénoliques d'aronia pendant l'élution de la colonne (70% d'éthanol (vol.)) suit au procédé intégré extraction-adsorption (temps 5h, débit de recirculation 3 L.h⁻¹, débit d'élution de 2 mL.min⁻¹): (a) PT (GAE); (b) AT (CGE); (c) CA (TEAC).

Tableau IV.5. Réponses observées et prédites par le modèle en PT, AT et CA pour les 7 essais du plan d'expériences.

Essai	Temps, h (X_1)	Débit, L.h ⁻¹ (X_2)	PT, mg/g.m.s. (GAE)		AT, mg/g.m.s. (CGE)		CA, μmol/g.m.s. (TEAC)	
			observation	prédiction	observation	prédiction	Observation	prédiction
			1	2 (-1)	1 (-1)	3,73	4,55	1,31
2	8 (1)	1 (-1)	8,45	8,43	2,94	3,05	107,94	113,17
3	2 (-1)	5 (1)	4,95	4,94	1,61	1,72	53,42	58,64
4	8 (1)	5 (1)	8,01	8,82	2,90	3,18	112,70	116,96
5	5 (0)	3 (0)	7,76	6,68	2,87	2,38	94,51	85,91
6	5 (0)	3 (0)	6,63	6,68	2,48	2,38	88,23	85,91
7	5 (0)	3 (0)	7,27	6,68	2,56	2,38	93,96	85,91

Le plan d'expériences utilisé permet de prendre en compte l'influence des variables (temps et débit) sur les réponses (PT, AT et CA) (les interactions entre variables ne sont pas considérées). Ainsi, la relation entre les réponses et les variables est exprimée suivant une équation polynomiale du type :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \quad (\text{IV.1}),$$

où Y est une des réponses (PT, AT, ou CA), β_0 , β_1 et β_2 sont les coefficients de régression, et X_1 , X_2 sont respectivement le temps et le débit (exprimés en niveaux codés).

L'analyse des résultats expérimentaux afin de tester la validité d'un tel modèle (équation IV.1) pour expliquer les variations de réponses en fonction des 2 variables a été réalisée avec l'outil statistique d'analyse de la variance (Anova). Les résultats de cette Anova sont présentés dans les Tableaux IV.6 et IV.7.

Dans le Tableau IV.6, on constate que les valeurs critiques de F sont inférieures à 0,05 pour chacune des 3 réponses et que les coefficients R^2 sont de 84% pour les composés phénoliques, 82% pour les anthocyanines et de 93% pour la capacité antioxydante (ce qui indique que seulement 16, 18 et 7% respectivement de la variation des réponses n'est pas expliquée par les différents modèles). Ainsi, on peut considérer que les modèles expliquent correctement les réponses.

Tableau IV.6. Analyse de la variance (Anova) pour le modèle décrit dans l'Equation IV.1.

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur critique de F	R^2
<i>Polyphenols totaux</i>					
Régression	2	15,25	7,62	0,02	0,84
Résidus	4	2,82	0,71		
Total	6	18,07			
<i>Anthocyanines totales</i>					
Régression	2	2,15	1,07	0,03	0,83
Résidus	4	0,45	0,11		
Total	6	2,60			
<i>Capacité antioxydante</i>					
Régression	2	3415,78	1707,89	0,00	0,94
Résidus	4	235,46	58,87		
Total	6	3651,24			

Tableau IV.7. Coefficients estimés du modèle pour PT, AT et CA.

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
<i>Polyphenols totaux</i>				
Interception	6,6849	0,32	21,05	0,00
Temps (X_1)	1,9424	0,42	4,62	0,01
Débit (X_2)	0,1959	0,42	0,47	0,67
<i>Anthocyanines totales</i>				
Interception	2,3826	0,13	18,69	0,00
Temps (X_1)	0,7301	0,17	4,33	0,01
Débit (X_2)	0,0660	0,17	0,39	0,72
<i>Capacité antioxydante</i>				
Interception	85,9057	2,90	29,62	0,00
Temps (X_1)	29,1607	3,84	7,60	0,00
Débit (X_2)	1,8974	3,84	0,49	0,65

Dans le Tableau IV.7 sont présentés les coefficients estimés du modèle (Equation IV.1). Les valeurs de probabilité indiquent que la variable temps est significativement influente sur chacune des 3 réponses (p -value < 0,05). En revanche, le débit n'apparaît pas significativement influent, puisque les p -values sont supérieures à 0,05. D'autre part, on constate que les coefficients associés aux 2 variables (X_1 et X_2) sont tous positifs, ce qui signifie que les valeurs de réponse croissent avec le temps et le débit. Les valeurs importantes des coefficients de régression associés à la variable temps confirment la forte influence du temps sur les 3 valeurs de réponse.

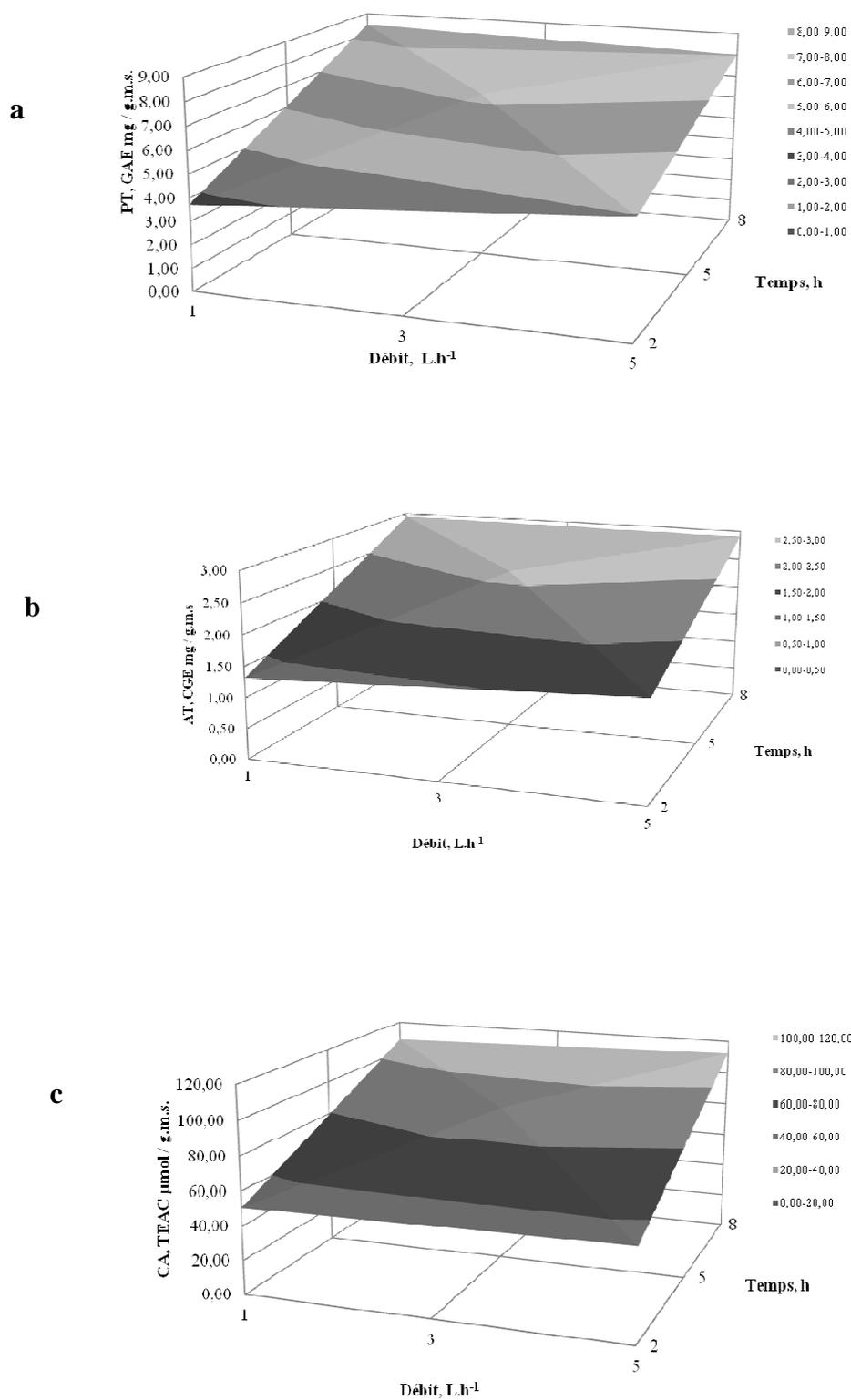


Figure IV.11. Surfaces de réponse pour (a) PT (GAE), (b) AT (CGE), et (c) CA (TEAC), en fonction du débit et du temps.

Les prédictions des modèles sont présentées dans le Tableau IV.7, mais également sous forme de surfaces de réponses dans le Figure IV.11. On observe clairement l'influence importante du temps sur les quantités de polyphénols et d'anthocyanines récupérées, et sur la capacité antioxydante des extraits. Pour le débit, l'influence a été quasi inexistante dans le domaine étudié. Un léger effet positif (de l'ordre de 2-3%) du débit sur les rendements en polyphénols, anthocyanines et sur la capacité antioxydante de l'extrait a tout de même été détecté par le modèle. Weisz et al. (2013) ont également constaté une influence très limitée du débit durant l'étude de l'optimisation du débit d'élution en colonne à lit fixe pour la récupération des polyphénols comme sous-produit de l'extraction des protéines de tournesol. Dans cette étude, 5 débits différents ont été testés, et aucune influence significative n'a été constatée sur la récupération des composés phénoliques.

Finalement, dans le domaine opératoire testé, les conditions optimales prédites par les modèles pour les 3 réponses étudiées sont une durée de 8 heures et un débit de 5 L.h^{-1} (correspondent à nombre de cycles de recirculation de 10). Dans ces conditions optimales, le modèle prédit une réponse maximale de composés phénoliques de 8,82 mg/g.m.s. (GAE), 3,18 mg/g.m.s. (CGE) d'anthocyanines totales et une capacité antioxydante de 116,96 $\mu\text{mol/g.m.s.}$ (TEAC) (Tableau IV.8).

IV.3.2. Procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote

L'étude d'optimisation du procédé intégré à l'échelle laboratoire a montré que, malgré les cinétiques assez rapides des deux étapes extraction et adsorption réalisées successivement (Figure IV.7), dans le cas du procédé intégré le temps reste un paramètre important à considérer (meilleurs résultats obtenus après 8 h du procédé intégré). Donc il a été décidé de réaliser le procédé intégré à l'échelle pilote durant 8 h. L'autre paramètre étudié lors de l'optimisation en petite échelle a été le débit de recirculation de la phase liquide. Un léger effet positif du débit sur les rendements en polyphénols, anthocyanines et sur la capacité antioxydante de l'extrait a été détecté par le modèle. Cependant cet effet n'a pas été significatif. Les autres conditions opératoires étant identiques, un débit supérieur correspond à un nombre de cycles supérieur et à une vitesse linéaire au sein de la colonne d'adsorption supérieure. Donc, à petite échelle, le débit a varié entre 1,0 et 5,0 L.h^{-1} , ce qui correspond respectivement à de vitesses linéaires entre 0,56 et 2,80 cm.s^{-1} et à un nombre de cycles de la

phase liquide à travers les deux contacteurs (extracteur et colonne d'adsorption) compris entre 10 et 50 lorsque le procédé dure 8 h. Pour la réalisation du procédé à l'échelle pilote il a été décidé d'utiliser un débit de 50 L.h^{-1} . Ce débit permet de réaliser le procédé à vitesse linéaire de $2,80 \text{ cm.s}^{-1}$ et avec 10 cycles de la phase liquide. Donc lors du passage à l'échelle pilote, le nombre des cycles, la vitesse linéaire dans la colonne d'adsorption et le temps de l'opération ont été conservés par rapport aux conditions optimales à petite échelle. Le volume de la phase liquide, le débit de recirculation, la masse de pellets d'aronia et la quantité d'adsorbant ont quant à eux été 50 fois plus grands qu'à l'échelle laboratoire.

Les expériences à l'échelle pilote ont donc été réalisées sur une durée de 8 h avec 200 g de source, 40 L d'eau, un débit de 50 L.h^{-1} et 200 g de résine XAD7HP dans la colonne d'adsorption. L'installation à l'échelle pilote est présentée Figure II.7. L'élution a été réalisée avec 5 litres d'éthanol à 70% vol. à un débit de 100 mL.min^{-1} . Deux expériences différentes ont été menées, correspondant à 2 configurations différentes : l'une avec une seule colonne d'adsorption, exactement comme pour le procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle laboratoire ; l'autre avec 2 colonnes d'adsorption en série, de manière à tester si une quantité plus importante d'adsorbant peut améliorer l'efficacité du procédé. Dans cette seconde configuration, chacune des 2 colonnes a été chargée avec 200g d'adsorbant XAD7HP.

Les profils d'élution sont présentés Figure IV.12 pour les polyphénols et les anthocyanines dans les configurations à 1 et à 2 colonnes. On retrouve des allures similaires à ce qui a été observé dans les expériences précédentes à l'échelle laboratoire. Le pic d'élution en composés phénoliques et anthocyanines apparaît au bout de 2 minutes (soit 200 mL d'éluant) pour la configuration à 1 colonne. Dans la configuration à 2 colonnes, le pic d'élution apparaît à environ 4 minutes d'élution (soit 400 mL d'éluant). Ce décalage s'explique simplement par le temps de passage plus long pour l'éluant dans la configuration à 2 colonnes (temps de remplissage des 2 colonnes).

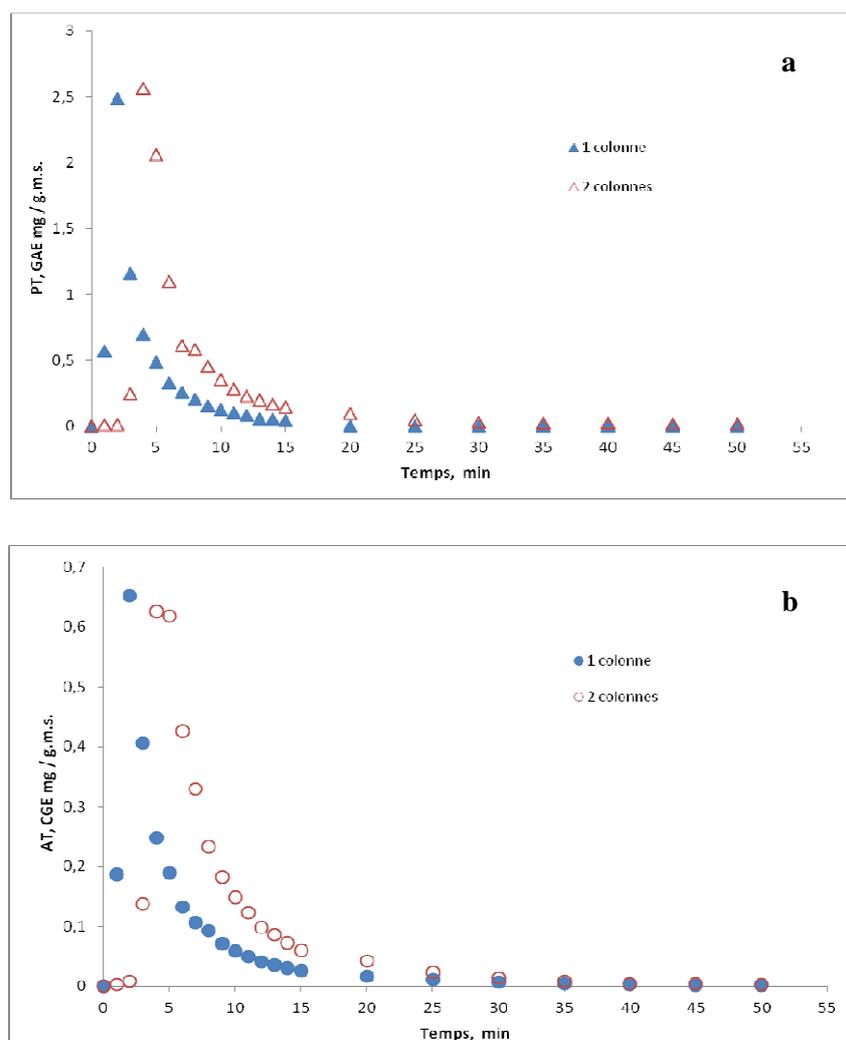


Figure IV.12. Comparaison de l'évolution de la concentration en composés phénoliques dans l'éluant suite au procédé intégré extraction-adsorption à l'échelle pilote avec 1 ou 2 colonne(s) (éluant 70% d'éthanol (vol.)), débit de 100 mL.min⁻¹): (a) PT (GAE); (b) AT (CGE).

Au terme de l'éluion, les extraits enrichis obtenus ont été caractérisés afin de déterminer les quantités de polyphénols récupérés. Les résultats sont présentés dans le Tableau IV.8, en comparaison avec les résultats obtenus dans les conditions optimales à l'échelle laboratoire. Les taux de récupération en polyphénols et anthocyanines ont été similaires à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote (avec 1 colonne). En revanche, avec 2 colonnes d'adsorption, des augmentations de 30 et 52% ont été obtenues pour les polyphénols et les anthocyanines respectivement par rapport à la configuration à 1 colonne. Cette amélioration est également perceptible dans la Figure IV.12, car l'aire sous la courbe d'éluion apparaît visuellement plus importante pour 2 colonnes. Il apparaît donc logiquement

qu'une quantité plus importante de résine améliore l'efficacité de récupération (l'adsorption plus efficace lorsque la résine est moins chargée).

Tableau IV.8. Comparaison des résultats de récupération de polyphénols et d'anthocyanines entre les procédés intégrés à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote.

	échelle laboratoire 1 L.h ⁻¹ (10 cycles, 0,56 cm.s ⁻¹)	échelle laboratoire 5 L.h ⁻¹ (50 cycles, 2,80 cm.s ⁻¹)	échelle pilote 1 colonne 50 L.h ⁻¹ (10 cycles, 2,80 cm.s ⁻¹)	échelle pilote 2 colonnes 50 L.h ⁻¹ (10 cycles, 2,80 cm.s ⁻¹)
Polyphénols totaux, mg/g.m.s. (GAE)	8,45	8,01	8,85	11,52
Anthocyanines totales, mg/g.m.s. (CGE)	2,94	2,90	2,41	3,67

Après l'élution de la colonne, 5 L d'extrait enrichi ont été récupérés. Une étape d'évaporation sous vide et à basse température (rotavapeur) de la partie alcoolique de l'extrait (3,5 L) puis une lyophilisation (sur 1,5 L d'extrait aqueux), ont permis d'obtenir un produit deshydraté. Ces étapes réalisées en laboratoire pourraient être aisément transposées à l'échelle industrielle (avec des techniques adaptées) pour la production de poudres d'extraits antioxydants.

IV.3.3. Conclusions

Les travaux d'optimisation du procédé intégré extraction-adsorption, basés sur la méthodologie des plans d'expériences avec les variables temps et débit de circulation de la phase liquide, ont permis de mettre en évidence la forte influence de la durée du procédé sur les taux d'extraction des polyphénols et des anthocyanines d'aronia et sur la capacité antioxydante des extraits. Finalement, dans le domaine opératoire testé, les conditions optimales prédites par les modèles pour les 3 réponses étudiées sont une durée de 8 heures et un débit de 5 L.h⁻¹ (correspondant à nombre de cycles de recirculation de 50). Les meilleurs résultats ont donc été obtenus avec une durée de procédé importante et avec des vitesses relativement faibles, permettant une bonne interaction entre la phase liquide et l'adsorbant dans la colonne.

La faisabilité du passage à l'échelle pilote a ensuite été démontrée. Les résultats obtenus en termes de taux d'extraction des polyphénols et anthocyanes d'aronia et de capacité antioxydante des extraits obtenus ont été similaires à ce qui a été obtenu à l'échelle laboratoire. L'utilisation de 2 colonnes d'adsorption en série et deux fois plus d'adsorbant a permis d'améliorer l'extraction et de récupérer 30 % de composés phénoliques totaux et 52% d'anthocyanines totales en plus par rapport à la configuration à 1 seule colonne. Après élution, des étapes d'évaporation et de lyophilisation ont permis d'obtenir un extrait déshydraté. Ces étapes pourraient être aisément transposées à l'échelle industrielle (avec des techniques adaptées) pour la production de poudres d'extraits antioxydants.

Conclusions Générales et Perspectives

Conclusions

Ce travail de thèse visait le choix d'une source riche en principes actifs, la valorisation des co-produits de cette source, la mise au point et l'optimisation des conditions opératoires de l'extraction de composés phénoliques en utilisant des techniques écologiques, l'enrichissement des extraits par adsorption, l'intégration des procédés d'extraction et d'adsorption et le scaling-up à l'échelle pilote du nouveau procédé intégré.

Les antioxydants naturels apparaissent comme des ingrédients à fort intérêt dans les industries alimentaires et cosmétiques pour remplacer les antioxydants synthétiques. Parmi les sources végétales, *Aronia melanocarpa* ressort comme une source encore peu étudiée et très riche en antioxydants, en particulier en anthocyanines. Les antioxydants d'aronia présentent des potentialités de valorisation comme colorants ou antioxydants naturels dans les industries alimentaire et cosmétique.

L'extraction assistée par ultrasons a montré son efficacité pour l'extraction de composés phénoliques à partir d'aronia et ses co-produits. L'étude des effets des principaux paramètres opératoires a permis d'identifier les paramètres les plus influents sur l'extraction. Les effets positifs de la température, de la puissance d'ultrasons et du taux d'éthanol dans le solvant observés lors de l'extraction à partir de baies d'aronia ont été confirmés dans le cas d'extraction à partir de co-produits d'aronia. Cependant, les températures très élevées ne sont pas appropriées pour l'extraction d'anthocyanines (une dégradation des anthocyanines a été observée à 70 °C). L'application des ultrasons améliore considérablement les cinétiques et les rendements d'extraction des composés phénoliques, en particulier quand les conditions opératoires sont moins favorables pour l'extraction. La sonication permet de réduire le temps et l'énergie consommés.

Le modèle proposé permet de décrire les cinétiques de l'extraction d'antioxydants à partir des co-produits d'aronia dans le domaine opératoire étudié (temps d'extraction entre 0 et 240 minutes, températures de 20 à 70 °C, composition du solvant de 0 à 50% d'éthanol (vol.) et puissance des ultrasons entre 0 et 100 W). Le modèle permet également de prédire les conditions opératoires optimales d'extraction d'anthocyanines et de polyphénols totaux dans le cadre de différentes contraintes technologiques.

Le grand potentiel de valorisation des co-produits d'aronia a été confirmé, puisque des extraits très riches en polyphénols et en anthocyanines, montrant des capacités antioxydantes

très importantes ont été obtenus. La capacité antioxydante des extraits d'aronia est directement corrélée à la concentration en polyphénols.

Les résultats des études d'adsorption et de désorption à différentes conditions ont mis en évidence que la résine Amberlite XAD7HP était le plus pertinent parmi les adsorbants testés, en tenant compte de la récupération de composés phénoliques et de la préservation de l'activité antioxydante. Grâce à la sélectivité importante de cette résine, des enrichissements très importants en polyphénols et en anthocyanines des extraits d'aronia peuvent être obtenus (plus de 15 fois).

L'intégration de l'extraction et de l'adsorption a donné naissance à un nouveau procédé écologique intégré extraction-adsorption permettant l'extraction des polyphénols et l'enrichissement simultané des extraits en antioxydants. Ce procédé permet de récupérer sélectivement les composés phénoliques antioxydants à partir de co-produits d'aronia en un seul processus écologique, en utilisant uniquement des solvants de degré alimentaire. De cette façon, des produits de haute qualité peuvent être obtenus dans un procédé simple avec une faible consommation de temps et d'énergie. L'intégration des procédés améliore les rendements d'extraction de polyphénols et anthocyanines de plus de 25%, en préservant la capacité antioxydante des composés phénoliques des extraits d'aronia.

La faisabilité du scale-up de ce nouveau procédé intégré extraction-adsorption a été validée à l'échelle pilote en obtenant des résultats très proches à ceux obtenus dans les mêmes conditions à l'échelle laboratoire.

Perspectives

Durant ce travail de thèse l'intérêt étant porté sur les rendements de polyphénols totaux, anthocyanines totales et la capacité antioxydante des extraits, il serait intéressant de connaître plus en détails les autres molécules co-extraites des baies d'aronia et ses co-produits.

En raison des limitations des équipements disponibles, l'extraction assistée par ultrasons n'a pas pu être effectuée qu'à l'échelle laboratoire, ce qui montre la nécessité de réaliser des expériences à l'échelle pilote pour pouvoir montrer la faisabilité du procédé dans une dimension plus proche de l'échelle industrielle.

Il serait intéressant d'optimiser l'élution des colonnes d'adsorption (chargées en antioxydants d'aronia) en utilisant différents gradients eau-éthanol pour essayer d'isoler les composés phénoliques de façon à obtenir des molécules avec un degré de pureté plus élevé.

Pour la mise en place de ce nouveau procédé écologique intégré, une seule source végétale a été utilisée, les co-produits d'aronia. L'application de ce procédé pour l'extraction d'antioxydants phénoliques à partir d'autres sources pour la récupération sélective des molécules actives pourrait être envisagée.

L'extraction dans le procédé intégré pourrait être réalisée en utilisant l'assistance d'ultrasons.

Une poudre riche en composés phénoliques a été obtenue après lyophilisation des éluions du procédé intégré. Il aurait été intéressant de tester aussi d'autres méthodes de séchage des extraits et d'évaluer l'impact du mode de séchage et du mode de conservation des extraits sur l'activité des antioxydants.

Malgré le fait que les baies d'aronia sont consommées par les hommes et qu'il n'y a pas d'effets indésirables enregistrés, des études sur la toxicité des molécules extraites et purifiées devraient être réalisées avant l'utilisation des extraits obtenus dans différentes formulations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

Références

A

- Abuja P. M.**, Murkovic M. & Pfannhauser W. 1998. Antioxidant and prooxidant activities of Elderberry (*Sambucus nigra*) extract in Low-Density-Lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 46, 4091-4096.
- Achour S.**, Khelifi E., Attia Y. & Noureddine Hellal A. 2012. Concentration of antioxidant polyphenols from *Thymus capitatus* extracts by membrane process technology. *Journal of Food Science*, 77(6):703-709.
- Adlercreutz H.** & Mazur W. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*; 29:95-120.
- Aehle E.**, Raynaud-Le Grandic S., Ralainirina R., Baltora-Rosset S., Mesnard F., Prouillet C., Mazière J.C. & Fliniaux M. A. 2004. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chemistry*, 86, 579–585.
- Agbangnan P.C.D.**, Alexandrova S., Chrostowska A., Tachon C., Fouquet E. & Sohounhloue K. 2011. Concentration of sorghum polyphenols by membrane filtration: case ultrafiltration. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 01/2011; 101.
- Aimar P.**, Bacchin P. & Maurel A. 2010. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) – Aspects théoriques : mécanismes de transfert. *Technique de l'Ingénieur*. J2789.
- Ajila C. M.**, Naidu K. A.; Bhat S. G. & Prasada Rao U. J. S. 2007. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105(3), 982-988.
- Albagnac G.**, Varoquaux P., Montigaud J-C. 2002. Technologies de transformations de fruits. Collections Sciences & Techniques agroalimentaires, Editions Tec & Doc, Lavoisier, ISBN : 2-7430-0505-X.
- Albright.** 1972. Brevet 3,663,467 5/1972 260/2.5 B
- Ananga A.**, Georgiev V., Ochieng J., Phills B. & Tsolova V. 2013. Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. *INTECH open science / open minds*, <http://dx.doi.org/10.5772/54592>. Chapter 11, 247-287.
- Andarwulan N.**, Fardiaz D., Wattimena G. A. & Shetty K. 1999. Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3158-3163.
- Appelo C.** & Postma D. 1993. *Geochemistry, Groundwater and Pollution*. Neth., 536 pp. Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- Aruoma O. I.** 1999. Antioxidant actions of plants foods, use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radical Research*, 30, 419-427.
- Ara V.** 2002. Schwarzfruchtige Aronia: Gesund – und bald “in aller Munde”? Flüssiges Obst; 10: 653–8

Arts I.C., van de Putte B. & Hollman P.C. 2000(a). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48:1746-51.

Arts I.C., van De Putte B. & Hollman P.C. 2000(b). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1752-7.

Atten M.J., Godoy-Romero E., Attar B.M., Milson T., Zopel M. & Holian O. 2005. Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Investigational New Drugs*; 23:111-9.

Azizah A. H., Nik Ruslawati N. M. & Swee Tee T. 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, 64, 199-202.

B

Baliga M.S., Meleth S. & Katiyar S.K. 2005. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clinical Cancer Research*, 11:1918-27.

Baublis A., Decker E. A. & Clydesdale F. M. 2000. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry*, 68, 1-6.

Bavaresco L. 2003. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 29:181-7.

Bazykina N.I., Nikolaevskii A.N., Filippenko T.A., Kaloerova V.G. 2002. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 36:100-103.

Bertelli A., Bertelli A.A., Gozzini A. & Giovannini L. 1998. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 24:133-8.

Bhat K.P. & Pezzuto J.M. 2002. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957:210-29.

Bocco A., Cuvelier M. E., Richard H. & Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.

Bonilla F., Mayen M., Merida J. & Medina M. 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66, 209-215.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. & Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 28:25-30.

Bridle P. & Timberlake C. F. 1997. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chemistry*. 58:103-109.

Brouillard R., George F. & Fougèrouse A. 1997. Polyphenols produced during red wine ageing. *Biofactors*, 6:403-10.

Bucic-Kojic A., Planinic M., Tomas S., Bilic M. & Velic D. 2007. Study of solid liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81:236-242.

C

Cabrini L., Barzanti V., Cipollone M., Fiorentini D., Grossi G., Tolomelli B., Zambonin L. & Landi L. 2001. Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:6026-32.

Cacace J.E., Mazza G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4):379-389.

Cai Y. Z., Luo Q., Sun M. & Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, 74, 2157-2184.

Cai Y., Ma L., Hou L., Zhou B., Yang L. & Liu Z. 2002. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 120(1-2), 109-117.

Caldwell C. R. 2003. Alkylperoxy radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4589-4595.

Calvet R. 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives*, 83:145-177.

Camire, M. E. & Dougherty, M. P. 1998. Added phenolic compounds enhance stability in extruded corn. *Journal of Food Science*, 63, 516-518.

Chambers S. J., Lambert N., Plumb G. W. & Williamson G. 1996. Evaluation of the antioxidant properties of a methanolic extract from 'Juice Plus fruit' and 'Juice Plus vegetable' (dietary supplements). *Food Chemistry*, 57, 271-274.

Chang L. W., Yen W. J., Huang S. C. & Duh P. D. 2002. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry*, 78, 347-354.

Che Man Y. B., Liu J. L., Jamilah B. & Rahman R. A. 1999. Quality changes of refinedbleached-deodorized (RBD) palm olein, soybean oil and their blends during deep-fat frying. *Journal of Food Lipids*, 6(3), 181-193.

Chemat F., Zill-E-Huma, Khan, M.K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonic Sonochemistry*, 18(4):813-815.

Chen B. H. & Tang Y. C. 1998. Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2312-2318.

- Chen X.** & Ahn D. U. 1998. Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 1717-1721.
- Chung H. S.**, Chang L. C., Lee, S. K., Shamon L. A., van Breemen R. B., Mehta R. G., Farnsworth N. R., Pezzuto J. M. & Douglas K. A. 1999. Flavonoid constituents of *Chorizanthe diffusa* with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 36-41.
- Chung Y.**, Chen S., Hsu C., Chang C. & Chou S. 2005. Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chemistry*, 91(3), 419-424.
- Chyau C.**, Tsai S., Ko P. & Mau J. 2002. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Chemistry*, 78(4), 483-488.
- Chidambara M. K. N.**, Jayaprakasha G. K. & Singh R. P. 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4791-4795.
- Cissé M.** 2010. Couplage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques: application à l'*Hibiscus sabdariffa*. Thèse de Doctorat à Montpellier SUPAGRO.
- Cissé M.**, Bohuon P., Sambe F., Kane C., Sakho M., Dornier M. 2012. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* : experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109:16–21.
- Clifford M.N.** 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of Sciences and Food Agriculture*, 80:1033-43.
- Connor A. M.**, Luby J. J., Hancock J. F., Berkheimer S. & Hanson E. J. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 893-898.
- Cortell J.M.** & Kennedy J.A. 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:8510-20.
- Covas M.I.**, Miro-Casas E., Fito M., Farre-Albadalejo M., Gimeno E., Marrugat J. & De La Torre R. 2003. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 29:203-6.

D

- Dasgupta N.** & De B. 2004. Antioxidant activity of Piper betel L. leaf extract in vitro. *Food Chemistry*, 88(2), 219-224.
- Dawes H. W.** & Keene J. B. 1999. Phenolic composition of kiwifruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2398-2403.

de la Torre R., Covas M.I., Pujadas M.A., Fito M. & Farre M. 2006. Is dopamine behind the health benefits of red wine?. *European Journal of Nutrition*,45:307-10.

Delmas D., Lancon A., Colin D., Jannin B. & Latruffe N. 2006. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, 7:423-42.

Denev P., Ciz M., Ambrozova G., Lojek A., Yanakieva I., Kratchanova M. 2010. Solid-phase extraction of berries anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*, 123:1055-1061.

Diaz-Reinoso B., Moure A., Dominguez H., et Parajo J. C. 2006. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2441–2469.

Dibert K., Cros E. 1989. Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, 10(3):199-214.

Di Matteo V. & Esposito E. 2003. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Target CNS Neurological Disorders*, 2, 95-107.

Diouf P.N., Stevanovic T. & Boutin Y. 2009. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and Products*, 30:297-303.

Dixon R.A. & Paiva N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism *Plant Cell*, 7:1085-1097.

Duh P. D., Yen W. J., Du P-C. & Yen. G. C. 1997. Antioxidant activity of mung bean hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1059-1063.

Duh P. D. 1998. Antioxidant activity of Burdock (*Arctium lappa* Linne), its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 455-461.

E

Eisen B., Ungar Y. & Shimoni E. 2003. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2212-5.

Es-Safi N.E., Cheynier V. & Moutounet M. 2002. Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5586-95.

Ericsson M. C. 2002. Lipid oxidation of muscle foods. En *Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. C. C. Akoh y D. B. Min, Eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 365-411.

F

Fan-Yung A.F. & Rechits MA. 1977. Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von Apfelbeeren während der Lagerung und Verarbeitung; Nachrichten höhere Lehranstalten Krasnodar. Izv Vyssh Uchebn Zaved, Pishch Tekhnol, 1:76–8

Farhoosh R., Golmovahhed G. A. & Khodaparast M. H. H. 2006. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). Food Chemistry, 100(1), 231-236.

Farombi E. O. & Britton G. 1999. Antioxidant activity of palm oil carotenes in organic solution, effects of structure and chemical reactivity. Food Chemistry, 64, 315-321.

Fischer U.A., Carle R., Kammerer D.R.. 2013. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions, Food Chemistry, 138:1800–1809.

Flaczyk E., Amarowicz R. & Korczak J. 2003. Antioxidant activity of protein hydrolyzates from by-products of the food industry. Journal of Food Lipids, 10, 129-140.

Foti M., Piattelli M., Baratta M. T. & Ruberto, G. 1996. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system Structure-activity relationship. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 497-501.

Frankel E.N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. Food Chemistry, 57, 51-55.

Frankel E. N. 1998. Lipid oxidation. En The Oily Press. Dundee, Scotland.

Frankel N., Meyer A.S. 2000. Review the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. Journal of Science and Food Agriculture, 80:1925-41.

G

Gabrielska J., Oszmianski J. & Lamer-Zarawska E. 1997. Protective effect of plant flavonoids on the oxidation of lecithin liposomes. Pharmazie, 52, 2-3.

Galván D'Alessandro L., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K. 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. Separation and Purification Technology, 93:42-47.

Garvin S., Ollinger K. & Dabrosin C. 2006. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. Cancer Letters, 231:113-22.

Gasiorowski K., Szyba K., Brokos B., Kolaczynska B., Jankowiak Włodarczyk M. & Oszmianski J. 1997. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from Aronia melanocarpa fruits. Cancer Letters, 119:37-46.

Ghosh D. & Konishi T. 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts : role in diabetes and eye function. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 16(2):200-208.

Giles C.H., McEwan T.H., Nakhwa S.N. & Smith D. 1960. Studies in adsorption. Part 11. A system of solution adsorption isotherms, & its use in diagnostic of adsorption mechanism & in measurement of specific surface areas of solids. *Journal Chemical Society*, 3:3973-3993.

Gorinstein S., Milena C., Machackova I., Haruenkit R., Park Y-S, Jung S-T, Yamamoto K., Ayala A. L. M., Katrich E. & Trakhtenberg S. 2004. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweets and white grapefruits. *Food Chemistry*, 84, 503-510.

Groubert A. 1984. Techniques d'extraction végétale: Montpellier, pharmacie.

Gustafson R. L. 1970. Enrichment and/or separation of an organic compound by adsorption processes. Rohm & Haas, United States Patent, 3531463.

Guyot S., Marnet N. & Drilleau J. 2001. Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:14-20.

H

Hagerman A. E., Riedl K. M., Jones G. A., Sovik K. N., Ritchard N. T., Hartzfeld P. W. & Riechel T. L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887-1892.

Han D., Kim S. J., Kim S. H. et Kim D. M. 1998. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. *Journal of Food Science*, 63, 69-72.

Harborne J.B. & Williams C.A. 2000. Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*, 55:481-504.

Harbourne N., Jacquier J.C. & O'Riordan D. 2009. *Optimisation of the aqueous extraction conditions of phenols from meadowsweet (Filipendula ulmaria L.) for incorporation into beverages*. *Food Chemistry*, 116:722-729.

Hardin J.W. 1973. The enigmatic chokeberries (Aronia, Rosaceae). *Bull Torrey Bot Club*, 100: 178-84

Heinonen M., Haila K., Lampi A-M. & Pironen, V. 1997. Inhibition of oxidation in 10% oil-in-water emulsions by β -carotene with α - and γ -tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1047-1051.

Henry M. C. & Yonker C. R. 2006. Supercritical fluid chromatography, pressurized liquid extraction, and supercritical fluid extraction. *Analytical Chemistry*, 78, 3909-3916.

Herrero M., Mendiola J.A., Cifuentes A. & Ibáñez E. 2010. Review: Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatographie A.*, 1217:2495-2511.

Hosny M. & Rosazza J. P. N. 1999. Novel isoflavone, cinnamic acid, and triterpenoid glycosides in soybean molasses. *Journal of Natural Products*, 62, 853-858.

Hsieh T.C., Wang Z., Hamby C.V. & Wu J.M. 2005. Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334:223-30.

Hu Q., Xu J., Chen S. & Yang F. 2004. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 943-947.

I

Imeh U. & Khokhar S. 2002. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6301-6306.

Ikken Y., Morales P., Martinez A., Marin M. L., Haza A. I. & Cambero M. I. 1999. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3257-3264.

J

Japon-Lujan R., Luque-Rodriguez J.M., Luque de Castro M.D. 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olives leaves. *Journal of Chromatographie A*, 1108:76-82.

Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E. & Vivanco J. M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83, 547-550.

Jayaprakasha G. K. & Patil B. S. 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, 101, 410-418.

Jayaprakasha G. K., Singh R. P. & Sacaria K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73(3), 285-290.

Jayaprakasha G. K., Tamil S. A. & Sacaria, K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 117-122.

Julkunen-Tiito R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows, methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 213-217.

Jun S. Y., Park P. J., Jung W. K. & Kim S. K. 2004 Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research Technology*, 219, 20-26.

Juntachote T. & Berghofer E. 2005. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry*, 92, 193-202.

K

Kabouche A., Kabouche Z., Oeztuerk M., Kolak U. & Topcu G. 2007. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry*, 102(4), 1281-1287.

- Kahkonen M. P.**, Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T. S. et Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kanatt S. R.**, Chander R., Radhakrishna P. & Sharma A. 2005. Potato peel extract-a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1499-1504.
- Karvela E.**, Makris D.P., Kefalas P. & Moutounet M. 2008. Extraction of phenolics in liquid model matrices containing oak chips : kinetics, liquid chromatography-mass spectroscopy characterisation and association with *in vitro* antiradical activity. *Food Chemistry*, 110:263-272.
- Kechinski C.P.**, Guimaraes P.V.R., Norena C.P.Z., Tessaro I.C., Marczak L.D.F. 2010. Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Journal of Food Science*, 75(2):C173–C176.
- Khan M.K.**, Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat F., 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavonone glycosides) from oranges (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119:851-858.
- Kim S. Y.**, Kim J. H., Kim S. K., Oh M. J. & Jung M.Y. 1994. Antioxidant activity of selected oriental herb extracts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 633-640.
- King J. W.** & Grabiell R. D. 2007. Isolation of polyphenolic compounds from fruits or vegetables utilizing subcritical water. Espacenet, US7208181. United States.
- Kitagawa Y.**, Suzuki K., Yoneda A. & Watanabe T. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62(7), 1186-1197.
- Klejdusa B.**, Kopecký J., Benesová L. & Vaceka J. 2009. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatographie. A.*, 1216:763-771.
- Koga T.**, Moro K., Nakamori K., Yamakoshi J., Hosoyama H., Kataoka S. & Ariga T. 1999. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1892-1897.
- Koiwai H.** & Masuzawa N. 2007. Extraction of catechins from green tea using ultrasound *Japanese Journal of Applied Physics*. 46:4936-4938.
- Kokotkiewicz A.**, Jaremicz Z. & Luczkiewicz M. 2010. Aronia plants : a review of traditional use, biological activities and perspectives for modern medicine. *Journal of medicinal food*. 13(2):255-269.
- Kubicka E.**, Jędrychowski L & Amarowicz R. 1999. Effect of phenolic compounds extracted from sunflower seeds on native lipoxygenase activity. *Grasas y Aceites*, 50, 3206-3209.

Kuo J. M., Yeh D. B. & Pan B. S. 1999. Rapid photometric assay evaluating antioxidant activity in edible plant material. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3206-3209.

Kulling S. E. & Rawel H. M. 2008. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta med.* 74:1625-1634.

Krishnan R. & Maru G.B. 2006. Isolation and analyses of polymeric polyphenol fractions from black tea. *Food Chemistry*, 94:331-340.

L

Lai L., Chou S. & Chao W. 2001. Studies on the antioxidative activities of hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 963-968.

Lalas S. & Tsaknis J. 2002. Extraction and identification of natural antioxidant from the seeds of the *Moringa oleifera* tree variety of Malawi. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, 79(7), 677-683.

Lang Q. & Wai C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — A practical review. *Talanta*, 53, 771–782.

Larrauri J. A., Sanchez-Moreno C. & Saura-Calixto F. 1998. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2694-2697.

Larrauri J. A., Ruperez P. & Saura-Calixto F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44,1390-1393.

Lazarova M. & Dimitrov K. 2009. Selective recovery of alkaloids from *Glaucium flavum crantz* using integrated process extraction-pertraction. *Separation Science and Technology*, 44(1):227-242.

Lee B. J. & Hendricks D. G. 1997. Antioxidant effects of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. *Journal of Food Science*, 62, 931-934.

Lee B. J., Hendricks D. G. & Cornforth D. P. 1998. Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. *Journal of Food Science*, 63, 394-398.

Lee J., Durst R.W. & Wrolstad R.E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5):1269-1278.

Lehmann H. 1982. About the aptitude of the black rowanberries (*Aronia melanocarpa*) for industrial processing. *Lebensmittelindustrie*, 29: 175–7.

Lehmann H. 1990. Die Aroniabeere und ihre Verarbeitung. *Flüssiges Obst*, 57:746–52.

Lehtinen P. & Laakso S. 1998. Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4842-4845.

Lempereur I., Rouau X. & Abecassis J. 1997. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25:103-10.

Leuzzi U., Caristi C., Panzera V. & Licandro G. 2000. Flavonoids in pigmented orange juice and second-pressure extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:5501-6.

Leybros J., Frémeaux P. 1990. Extraction solide-liquide aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés*.

Li S. J., Seymour A. J., King A. J. & Morrissey M. T. 1998. Color stability and lipid oxidation of Rockfish as affected by antioxidant from shrimp shell waste. *Journal of Food Science*, 63, 438- 441.

Lin M-Y. & Yen C-L. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1460-1466.

Lotito S. B. & Frei B. 2004. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(2), 201-211.

Louli V., Ragoussis N. & Magoulas K. 2004. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology*, 92(2), 201-208.

Lu Y. & Foo L. Y. 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197-202.

Lu Y. & Foo L. Y. 1999. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68, 81-85.

Luque de Castro M. D. & Garcia-Ayuso L. E. 1998. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369, 110.

Luther M., Parry J., Moore J., Meng J., Zhang Y., Cheng Z. & Yu L. 2007. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 104(3), 1065-1073.

M

Macheix J.J., Fleuriet A. & Billot J. *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.

Madrid A. & Cenzano, J. M. 2000. *Los aditivos en los alimentos según la Unión Europea y la legislación española*. AMV Editores. Madrid.

Mafart P. & Béliard E. 1992. *Génie Industriel Alimentaire. Tome II Technique Separatives*. Editions Tec & Doc, Lavoisier, ISBN : 2-85206-808-7.

- Mahir T.**, Sedat S., Sundaram G. 2002. Application of Peleg model to study water absorption in chickpea during soaking. *Journal of Food Engineering*, 53:153-159.
- Makarenko V.** 2008. Marek's juice, czyli Polska potęgą aronii (Le jus de Marek, l'aronia polonais de l'énergie). *Gazeta Wyborcza*.
- Malik M.**, Zhao C., Schoene N., Guisti M. M., Moyer M. P. & Magnuson B. A. 2003. Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutrition and cancer*, 46(2):186-196.
- Mamelona J.**, Pelletier E., Girard-Lalancette K., Legault J., Karboune S. & Kermasha S. 2007. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104(3), 1040-1047.
- Marinova E. M.** et Yanishlieva N. V. 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chemistry*, 58, 245-248.
- Mason, T. J.**, L. Paniwnyk, et al. 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3: 253-260.
- Matthaeus B.** 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3444-3452.
- Mattila P.**, Hellstrom J. & Torronen R. 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:7193-9.
- Mau J. L.**, Lai E. Y. C., Wang N. P., Chen C. C., Chang, C. H. & Chyau C. C. 2003. Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. *Food Chemistry*, 82, 583-591.
- Mazza G.**, Cacace J.E. & Kay C.D. 2004. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC International*, 87:129-45.
- McKay S.A.** 2004. Demand increasing for aronia and elderberry in North America. Available at <http://www.fruit.cornell.edu/Berries/specialtyfru%20pdf/aroniaelderberry.pdf>. Accessed April 19, 2008. (Reprinted from: New York Berry News, Vol. 3 No.11, March 17, 2004.)
- Mendiola J. A.**, Herrero M., Cifuentes A. & Ibanez, E. 2007. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography. A*, 1152, 234-246.
- Meyer A. S.**, Heinonen M. & Frankel E. N. 1998a. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61, 71-75.
- Middleton E.**, Kandaswamy C. & Theoharides T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.
- Miliauskas G.**, Venskutonis P. R. & van Beek T. A. 2003. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231-237.

Milic B., Djilas S. M. & Canadanovic-Brunet J. M. 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*, 61, 443-447.

Miura K., Kikuzaki H. & Nakatani N. 2002. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1845-1851.

Miyake T. & Shibamoto T. 1998. Inhibition of malonaldehyde and acetaldehyde formation from blood plasma oxidation by naturally occurring antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3694-3697.

Mohd Zin Z., Abdul-Hamid A. & Osman A. 2002. Antioxidative activity of extracts from mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry*, 78, 227-231.

Morello J. R., Vuorela S., Romero M. P., Motilva M. J. & Heinonen M. 2005. Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2002-2008.

Moure A., Dominguez H. & Parajo J. C. 2005. Antioxidant activity of liquors from aqueous treatments of *Pinus radiata* wood. *Wood Science Technology*, 39, 129-139.

Moure A., Pazos M., Medina I., Dominguez, H. & Parajo J. C. 2007. Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of almond shells acid hydrolysates. *Food Chemistry*, 101(1), 193-201.

Muanza D., Robert R. & Sparks W. 1998. Antioxidant derived from lentil and its preparation and uses. US Patent. US5762936.

Mudimu O.A., Peters M., Brauner F. & Braun G. 2012. Overview of membrane process for the recovery of polyphenols from olive mill wastewater. *American Journal of Environmental Sciences*, 8(3):195-201.

Murthy K. N. C., Singh R. P. & Jayaprakasha G. K. 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5909-5914.

N

Nacz M., Amarovicz R. Sullivan A. & Shahidi F. 1998. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola, a review. *Food Chemistry*, 62, 489-502.

Nave F., Cabrita M.J. & Teixeira da Costa C. 2007. Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1169:23-30.

Nenadis N. & Tsimidou M. 2002. Observation on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:1191-1195.

Nićiforović N. & Amarović H. 2014. Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13 : 34-51.

Noguchi Y., Fukuda K., Matsushima A., Haishi D., Hiroto M., Kodera Y., Nishimura H. & Inada Y. 1999. Inhibition of Df-protease associated with allergic diseases by polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2969-2972.

O

Obied H. K., Bedgood D. R., Prenzler P. D. & Robards K. 2007. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1238-1248.

Okada Y. & Okada M. 1998. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 401-406.

Ollanketo M., Peltoketo A., Hartonen K., Hiltunen R. & Riekkola M. L. 2002. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *European Food Research and Technology*, 215(2), 158-163.

Osuna-Garcia J. A., Wall M. M. & Waddell C. A. 1998. Natural antioxidants for preventing color loss in stored paprika. *Journal of Food Science*, 62, 1017-1021.

Oszmianski J. & Wojdylo A. 2005. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221:809-813.

P

Pan X., Niu G., Liu H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42:129-133.

Paleos J. 1969. Adsorption from aqueous and nonaqueous solutions on hydrophobic and hydrophilic high surface-area copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 31 (1), 7-18.

Pandjaitan N., Howard L. R., Morelock T. & Gil M. I. 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8618-8623.

Paré J.R.J., & Bélanger J.M.R. 1990. Extraction de produits naturels assistée par microondes. Brevet européen, EP 398798.

Peleg, M. 1988. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, 53 (4):1216-1219.

Penchev P. 2010. Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basse et haute pressions. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse.

Penchev P., Angelov G. & Condoret J.S. 2010. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de génie industriel*, 5:115-123.

- Peterson D. M.** 2001. Oat antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 33, 115-129.
- Pérez D.D.**, Leighton F., Aspee A., Aliga C. & Lissi E. 2000. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biological Research*, 33 (2) : 71-7
- Pinelo M.**, Rubilar M., Sineiro J. & Nunez J. M. 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85, 267-273.
- Pinelo M.**, Del Fabbro P., Marzocco L., Nunez M.J. & Vicoli M.C. 2005. Optimisation of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* By-products. *Food Chemistry*, 92:109-117.
- Pingret D.**, Fabiano-Tixier A.-S., Chemat F. 2013. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review, *Food Control*, 31:593–606.
- Piñeiro E.C.** 2009. Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Thèse de Doctorat de l'Universidad de Vigo, Espagne.
- Poirot R.** 2007. Methodologie pour le passage en continu d'extraction de solute a partir de matière végétale. Thèse de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Pokorny J.** 2007. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants ?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109:629-642.
- Pokorny J.** & Parkanyiova, J. 2004. Advantages and disadvantages of natural antioxidants in comparison with synthetic antioxidants. Euro Fed Lipid Congress, Edinburgh, Scotland.
- Pokorny J.**, Yanishlieva N. & Gordon M. 2001. Antioxidants in food. Practical applications. Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England.
- Ponginebbi L.** 1999. Influence of physical properties on oxidation in liquid and freeze-dried linolenic acid/sucrose/maltodextrin model systems. Electronic Doctoral Dissertation for UMass Amherst. Paper AAI9938951.
- Poux M.**, Cognet P. et Gourdon C. 2010. Génie des procédés durables, du concept à la concrétisation industrielle. L'usine nouvelle, Dunod, Paris, ISBN 978-2-10-051605-6.
- Pronyk C.**, & Mazza G. 2009. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of Food Engineering*, 95, 215–226.
- Prati S.**, Baravelli V., Fabbri D., Schwarzinger C., Brandolini V., Maietti A., Tedeschi P., Benvenuti S., Macchia M., Marotti I., Bonetti A., Catizone P. & Dinelli G. 2007. Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops. *Journal of Separation Science*, 30:491-501.
- Prasad K.N.**, Yang E., Yi C., Zhao M. & Jiang Y. 2009. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10:155-159.

Prior R. L., Cao G., Martin A., Soffic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G. & Mainland C. M. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2686-2693.

R

Ramos L., Kristenson E. M. & Brinkman, U. A. T. 2002. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography. A*, 975, 3–29.

Rapisarda P., Tomaino A., Lo Cascio R., Bonina F., De Pasquale A. & Saija A. 1999. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4718-4723.

Rasmussen S.E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K. & Poulsen L. 2005. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49:159-74.

Reinli K. & Block G. 1996. Phytoestrogen content of foods. A compendium of literature values. *Nutrition and Cancer*, 26:123-48.

Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L., Porter N. L., Avdalovic N. & Pohl C. 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1033–1039.

Rodriguez de Sotillo D., Hadley M. & Holm E. T. 1994b. Potato peel waste, stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. *Journal of Food Science*, 59, 1031-1033.

Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235-254.

Romdhane M. & Gourdon C. 2002. Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound, *Chemical Engineering Journal* 87: 11-19.

Ronze D. 2008. Introduction au génie des procédés. Editions Tec & Doc, Lavoisier, ISBN : 978-2-7430-1066-9.

S

Saint-Cricq de Gaulejac N., Provost C. & Vivas N. 1999. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 425-431.

Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S. & Yamaji N. 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1460-1464

Sakanaka S., Tachibana Y., Ishihara N. & Juneja L. R. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86, 98-103.

- Saleem M.**, Kim H.J., Ali M.S. & Lee Y.S. 2005. An update on bioactive plant lignans. *Natural Products Reports*, 22:696-716.
- Sawa T.**, Nakao M., Akaike T., Ono K. & Maeda H. 1999. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds, implications for the anti-tumorpromoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 397-402.
- Schwarz K.**, Bertelsen G., Nissen L.R., Gardner P.T., Heinonen M.I., Hopia A., Huynh-BA T., Lambelet P., Mcpail D., Skibsted L.H. & Tijburg. 2001. Investigation of plant extracts for protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212 (3):319 – 28.
- Seidemann J.** 1993. Chokeberries a fruit little-known till now. *Dtsch Lebensmitt Rundsch*, 89: 149–51
- Seymour T. A.**, Li S. J. & Morrissey M. T. 1996. Characterization of a natural antioxidant from shrimp shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 682-685.
- Shahidi F.** & Naczk M. 1995. Food phenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Technomic. Lancaster.
- Shaker E. S.** 2006. Antioxidative effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. *LWT-Food Science and Technology*, 39(8), 883-892.
- Sheabar F. Z.** & Neeman I. 1988. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 990-993.
- Sherwin E. R.** 1990. Antioxidants. En *Food Antioxidants*. Ed. Branen, A.L., Davidson, P.M. and Salminen, S. Marcel Dekker Inc. New York.
- Siddhuraju P.** & Becker K. 2006. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-19.
- Siddhuraju P.**, Mohan P. S. & Becker K. 2002. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 79(1), 61-67.
- Silva B. A.**, Ferreres F., Malva J. O. & Dias A. C. P. 2005. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90(1-2), 157-167.
- Singh R. P.**, Chidambara M. K. N. & Jayaprakasha G. K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81-86.
- Singleton V.L.**, Orthofer R. & Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299:152-178.

Sojka M., Kolodziejczyk K. & Milala J. 2013. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*, 51:77-86.

Sosulski F., Krygier K. & Hogge L. 1982. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30:337-40.

Soto M. L., Moure A., Domínguez H. & Parajó J. C. 2011. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption : a review. *Journal of Food Engineering*. 105:1-27.

Sparr Eskilsson C. & Björklund E. 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. 49 : 415-420.

Spigno G., Tramelli L. & De Faveri D.M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81:200-208.

Suja K. P., Abraham J. T., Thamizh S. N., Jayalekshmy A. & Arumughan C. 2003. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*, 84(3), 393-400.

Srivastava A., Harish R. & Shivanandappa T. 2006. Novel antioxidant compounds from the aqueous extract of the roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight and Arn.) and their inhibitory effect on Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 790-795.

Strigl A.W., Leitner E. & Pfannhauser W. 1995. Die schwarze Apfelbeere (*Aronia melanocarpa*) als natürliche Farbstoffquelle. *Dtsch Lebensmitt Rundsch*, 91: 177–80.

Sun L.M. & Meunier F. 2003. Adsorption. Aspects théoriques. *Techniques de l'Ingenieur*, J 2 370.

Sun Y., Liu D., Chen J., Ye X. & Yu D. 2011. Effectes of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1):243-249.

T

Talavera S., Felgines C., Texier O., Besson C., Mazur A., Lamaison J. & Remesy C. 2005. Bioavailability of a bilberry anthocyanin extract and its impact on plasma antioxidant capacity in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 90-97.

Takahashi R., Ohmori R., Kiyose C., Momiyama Y., Ohsuzu F. & Kondo K. 2005. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against Low Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4578-4582.

Talcott S. T. & Joon Hee L. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3186-3192.

Tanabe M., Kanda T. & Yanagida A. 1995. Fruit polyphenol; process for production thereof; and antioxidant, hypotensive agent, antimutagenic agent, antiallergenic agent and anticariogenic agent, each comprising said polyphenol. EP0657169.

Taruscio T. G., Barney D. L. & Exon J. 2004. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest Vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3169-3176.

Taylor L. T. 1996. Properties of supercritical fluids. *Supercritical fluid extraction* (pp. 7–27). New York, USA: John Wiley & Sons.

Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., & Byrne D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669-675.

Thompson D. & Moldeus P. 1988. Citotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in insolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 37, 2201-2207.

Toma M., Vinatoru M., Paniwnyk L. & Mason T.J. 2001. Investigation of the effect of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics. Sonochemistry*, 8:137-142.

Tomas-Barberan F.A. & Clifford M.N. 2000. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80:1024-32.

Tsaliki E., Lagouri V. & Doxastakis G. 1999. Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus* ssp. Graecus). *Food Chemistry*, 65, 71-75.

U

Ulubelen A. 2003. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*, 64(2), 395-399.

V

van Beek T.A., Tetala K.K.R., Koleva I.I., Dapkevicius A., Exarchou V., Jeurissen S.M.F., Claassen F.W. & van der Klift E.J.C. 2009. Recent developments in the rapid analysis of plants and tracking their bioactive constituents. *Phytochemistry Review*, 8:387-399.

Vargas-Arispuro L., Sanz B.I., Martinez-Téllez M.A., Primo-Yufera E. 1998. Antioxidant activity of isolated compounds in non-volatile residue from orange essential oil. *Grasas y Aceites*, 49(2):159-164.

Vega-Gálvez A., Notte-Cuello E., Lemus-Mondaca R., Zura L., Miranda M. 2009. Mathematical modelling of mass transfer during rehydration process of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller). *Food and Bioproducts Processing*. 87:254-260.

Vilegas W., Sanomimiya M., Rastrelli L. & Pizza C. 1999. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. *Evaluation*

of the antiulcer activity of the infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 403-406.

Vilkhu K.; Mawson R.; Simons L. & Bates D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. *Innovative Food Science Emerging*, 9:161-169.

Villaño D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. & Garcia-Parrilla M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71:230-235.

Vinatoru M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303–313.

Virot M., Tomao V., Le Bourvellec C., Renard C. et Chemat F. 2010. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6):1066-1074.

Visioli F., Romani A., Mulinacci N., Zarini S., Conte D., Vincieri F. F. & Galli C. 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3397-3401.

Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L. & Fogliano V. 2007. Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. *Journal of Nutrition*, 137:2043-8.

von Gadow A., Joubert E. & Hansmann C.F. 1997a. Effect of extraction and additional heating on the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:1370-1374.

von Gadow A., Joubert E. & Hansmann C. F. 1997b. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60, 73-77.

von Gadow A., Joubert E. & Hansmann C.F. 1997c. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 632-638.

W

Wagner H. 1985. New plant phenolics of pharmaceutical interest. *Annual proceedings of phytochemical society of Europe*. 25:409-425.

Wanasundara U.N., Shaidi F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63:335-342.

Wang B., Chang L., Yen W. & Duh P. 2007. Antioxidative effect of sesame coat on LDL oxidation and oxidative stress in macrophages. *Food Chemistry*, 102(1), 351-360.

Wang C.C., Chu C.Y., Chu K.O., Choy K.W., Khaw K.S., Rogers M.S., & Pang C.P. 2004. Trolox equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinical Chemistry*, 50 (5) : 952 – 4.

Wang M., Hettiarachchy N. S., Qi M., Burks W. & Siebenmorgen. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 411-416.

Wang L. & Weller C. L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 : 300-312.

Wang Y. & Ho C-T. 2009. Phenolic chemistry of tea and coffee: A century of progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 : 8109-8114.

Weisz G. M., Carle R., Kammerer D. R. 2013. Sustainable sunflower processing – II. Recovery of phenolic compounds as a by-product of sunflower protein extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17:169-179.

Wellwood R. L. C. & Cole R. A. 2004. Relevance of carnolic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), Accessions for optimization of antioxidant yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6101-6107.

Wongkittipong R., Prat L., Damronglerd S. & Gourdon C. 2004. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants-experimental study kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 40:147-154.

Wu H.C., Chen H.M. & Shiau C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-957.

Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12):4026-4037.

Wu X., Gu L., Prior R.L. & McKay S. 2004. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:7846-7856.

X

Xing Y. & White P. 1997. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 303-307.

Y

Yamaguchi F., Yoshimura Y., Nakazawa H. & Ariga T. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2544-2548.

Yanagida A., Shoji T. & Kanda T. 2002. Characterisation of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66(9):1972-1975.

Yanagida A. Shoji T. & Shibusawa. 2003. Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques. *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods*, 56(1-3):311-322.

Yang L., Jiang J.G., Li W.F., Chen J., Wang D.Y. & Zhu L. 2009. Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 32, 1437-1444.

Yanishlieva N.V.I., Marinova E. M., Gordon M. H. & Raneva V. G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59-66.

Yen G. C. & Wu J. Y. 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 65, 375-379.

Yen G. C. & Duh P. D. 1994. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on freeradical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629-632.

Yen G., Duh P. & Su H. 2004. Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chemistry*, 89(3), 379-385.

Yen G.C. & Hsieh, C. L. 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3952-3957.

Yilmaz Y. & Toledo R.T. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:41-44.

Youdim K. A., Dobbie M. S., Kuhnle G., Proteggente A. R., Abbott N. J. & Rice-Evans C. 2003. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: In vitro studies. *Journal of Neurochemistry*, 85, 180-192.

Yu L., Perret J., Davy B., Wilson J. & Melby C. L. 2002. Antioxidant properties of cereal products. *Journal of Food Science*, 67(7), 2600-2603.

Z

Zainol M. K., Abd-Hamid A., Yusof S. & Muse R. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry*, 81, 575-581.

Zancan K. C., Marques M. O. M., Petenate A. J. & Meireles M. A. A. 2002. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 24(1), 57-76.

- Zandi P.** & Gordon M. H. 1999. Antioxidant activity of extracts from old tea leaves. *Food Chemistry*, 64, 285-288.
- Zhang M.**, Hu P., Liang Q., Yang H., Liu Q., Wang Y. & Luo G. 2007 Direct process integration of extraction and expanded bed adsorption in the recovery of crocetin derivatives from *Fructus Gardenia*, *Journal of Chromatographie. B*, 858:220–226.
- Zhang M.**, Yang H., Chen X., Zhou Y., Zhang H., Wang Y. & Hu P. 2011. In-situ extraction and separation of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by integrated expanded bed adsorption, *Separation and Purification Technology*, 80:677–682.
- Zhu Q. Y.**, Huang Y., Tsang D. & Chen Z.-Y. 1999. Regeneration of s-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:2020-2025.
- Zarnowski R.**, & Suzuki Y. 2004. Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 649-664.
- Zhishen J.**, Mengcheng T. & Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Zielinski H.** & Kozłowska H. 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2008-2016.

Annexes

Publications dans des revues avec comité de lecture :

- Leandro Galvan d'Alessandro, Karim Kriaa, Iordan Nikov, Krasimir Dimitrov
“Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry”
Separation and Purification Technology, 93, 42-47 (2012).
- Leandro Galván D'Alessandro, Peggy Vauchel, Rémi Przybylski, Gabrielle Chataigné, Iordan Nikov, Krasimir Dimitrov
“Integrated process extraction-adsorption for selective recovery of antioxidant phenolics from *Aronia melanocarpa* berries”
Separation and Purification Technology, 120, 92-101 (2013).
- Leandro Galván D'Alessandro, Krasimir Dimitrov, Peggy Vauchel, Iordan Nikov
“Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes”
Chemical Engineering Research and Design, Accepted (November 2013).
(*Cet article a été soumis au journal Chemical Engineering Research and Design après une pré-sélection des résumés pour le volume spécial Green Processes and Eco-Technologies*).

Communications dans des congrès avec actes avec comité de lecture (acceptation sur résumé) :

Communications orales:

- Leandro Galván D'Alessandro, Krasimir Dimitrov, Peggy Vauchel, Guillermo Manrique, Pascal Dhulster, Iordan Nikov.
“Kinetics of Ultrasound Assisted Extraction of Polyphenols from Aronia By-products”
International Congress on Green Extraction of Natural Products: “GENP 2013”
Avignon, France, 16-17 avril 2013.
- Krasimir Dimitrov, Leandro Galván D'Alessandro, Peggy Vauchel, Pascal Dhulster, Iordan Nikov,
“Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry waste”
6th World Congress on Polyphenols Applications: “Paris Polyphenols 2012” Paris, France, 7-8 juin 2012.

Communications par posters :

- Leandro Galván D'Alessandro, Rémi Przybylski, Gabrielle Chataigne, Peggy Vauchel, Iordan Nikov, Pascal Dhulster, Krasimir Dimitrov
« Extraction en phase solide pour l'enrichissement en antioxydants des extraits de co-produits d'aronia »
SFGP2013 - XIV congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Lyon, France, du 8 au 10 octobre 2013.

- Leandro Galván D'Alessandro, Krasimir Dimitrov, Peggy Vauchel, Guillermo Manrique, Pascal Dhulster, Iordan Nikov
« Cinétique de l'extraction assistée par des ultrasons des antioxydants phénoliques à partir de coproduits d'aronia »
SFGP2013 - XIV congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Lyon, France, du 8 au 10 octobre 2013.
- Leandro Galván D'Alessandro, Krasimir Dimitrov, Peggy Vauchel, Guillermo Manrique, Pascal Dhulster, Iordan Nikov
“Ultrasound assisted extraction of antioxidant polyphenols from aronia wastes”
9th European Congress of Chemical Engineering, 2nd European Congress of Applied Biotechnology, ECCE₉ – ECAB₂ 2013, The Hague, Netherlands, 21 – 25, 2013.
- Leandro Galván D'Alessandro, Rémi Przybylski, Gabrielle Chataigne, Peggy Vauchel, Pascal Dhulster, Iordan Nikov, Krasimir Dimitrov
“Enrichment of extracts of black chokeberry wastes in phenolic antioxidants by solid-phase extraction”
9th European Congress of Chemical Engineering, 2nd European Congress of Applied Biotechnology, ECCE₉ – ECAB₂ 2013, The Hague, Netherlands, 21 – 25, 2013.
- Leandro Galván D'Alessandro, Krasimir Dimitrov, Rémi Przybylski, Gabrielle Chataigne, Peggy Vauchel, Iordan Nikov, Pascal Dhulster
“Solid-Phase extraction of antioxidant polyphenols from black chokeberry wastes”
6th World Congress on Polyphenols Applications: “Paris Polyphenols 2012” Paris, France, June 7-8, 2012.
- Krasimir Dimitrov, Leandro Galván d'Alessandro, Karim Kriaa, Madlena Lazarova, Iordan Nikov, Pascal Dhulster
« Extraction d'antioxydants phénoliques à partir d'aronia noir »
13^{ème} Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, SFGP'2011, Lille, France, Novembre 2011.

Communications orales sans actes avec comité de lecture

- Leandro Galván D'Alessandro
« Extraction des composés bioactifs antioxydants à partir des sources végétales et application des extraits comme ingrédients fonctionnelles »
Prix à la meilleur présentation poster, Doctoriales 2013 Lille Nord de France.
- Leandro Galván D'Alessandro, Krasimir Dimitrov, Peggy Vauchel, Iordan Nikov, Pascal Dhulster
« Extraction d'antioxydants assistée par ultrasons à partir de co-produits d'Aronia melanocarpa »
Journée UGéPE Nord-Pas-de-Calais Roubaix 31 mai 2012.



Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry

Leandro Galvan d'Alessandro^a, Karim Kriaa^{a,b}, Jordan Nikov^a, Krasimir Dimitrov^{a,*}

^a Laboratoire ProBioGEM EA 1026, PolytechLille, Université Lille Nord de France, Avenue Paul Langevin 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b Groupe de Génie des Produits Agro-alimentaires, Unité de Recherche en Mécanique des Fluides Appliqués et Modélisation, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP W 3038 Sfax, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2012

Received in revised form 16 March 2012

Accepted 21 March 2012

Available online 1 April 2012

Keywords:

Black chokeberry

Aronia melanocarpa

Ultrasound assisted extraction

Polyphenols

Antioxidants

Extraction kinetics

ABSTRACT

Ultrasound assisted extraction (UAE) of antioxidant polyphenols from *Aronia melanocarpa* berries was studied. The influence of various parameters (time and temperature of extraction, solvent composition, solid–solvent ratio, particle size, and ultrasonic irradiations) on the extraction kinetics and yields was evaluated. Very clear effect of ultrasound was observed (up to 85% increase of the yield of extracted polyphenols). High temperature and the presence of ethanol in the solvent improved also greatly the extraction process. The high antioxidant activity of the extracts determined by DPPH tests confirmed suitability of UAE for the preparation of antioxidant-rich plant extracts. A very good correlation between the concentration of polyphenols in the extracts and the corresponding antioxidant activity was observed.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phenolic compounds are commonly found in both edible and nonedible plants. Crude extracts of fruits, herbs, vegetables, cereals, and other plant materials rich in phenolics are increasingly of interest in the food industry because of their multiple biological effects, including antioxidant activity [1]. Polyphenols protect against the oxidation of high-density lipids and therefore improve the quality and nutritional value of food [2]. Among all common fruits and vegetables in the diet, berries, especially those with dark blue or red colors, have the highest antioxidant capacities [3]. Many of these fruits, including chokeberries, have a long tradition in European and North American folk medicine [4,5]. *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) fruits are ones of the richest plant sources of phenolic substances, mainly anthocyanins [3–5]. The high content of phenolics seems to correlate with the antioxidant activity reported for these berries [1,6]. *Aronia* juice exhibits the highest antioxidant capacity among the polyphenol-rich beverages [4]. Chokeberries and their extracts are useful for the prevention and treatment of cardiovascular disease [7] and colon cancer [8]. Antidiabetic and antimutagenic effects of phenolics from black chokeberry were also reported [6]. Black chokeberries have been also highlighted as a suitable and rather cheap source of a food colorant [9,10]. At present, there are no data about any unwanted and toxic effects of *A. melanocarpa* fruits, juice and extracts [5].

Till now mainly the composition and the antioxidant properties of the extracts of black chokeberry [1,3,4,11,12], as well as purification of the extracts [10,13,14] have been studied. Despite of the interesting properties of the black chokeberry and its extracts the optimal conditions for the extraction of polyphenols are not yet well investigated. One of the objectives of the present study was to elucidate the influence of the main extraction parameters (time and temperature of the extraction, solid–solvent ratio, type of solvent, particle size) on the yields of extracted polyphenols. The other objective of this work was to evaluate the effect of ultrasound on the extraction kinetics and yields and to outline the potential of ultrasound assisted extraction (UAE) in the preparation of aronia extracts rich in antioxidant polyphenols. The use of ultrasonic means for extraction purposes in raw materials is considered as an economical alternative to traditional extraction processes, this being a demand by industry for a sustainable development [15]. Ultrasound assistance has already demonstrated an important effect on the extraction of phenolics from other vegetal sources [16–19].

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Dried berries of *A. melanocarpa* grown in the region of Elena (Bulgaria) were used. The berries were stored at room temperature. The size of the berries was 6.0 ± 0.5 mm and their moisture content was $9.0 \pm 1.5\%$. To enhance the extraction of polyphenols,

* Corresponding author. Tel.: +33 3 28767408; fax: +33 3 28767401.
E-mail address: krasimir.dimitrov@polytech-lille.fr (K. Dimitrov).



Contents lists available at ScienceDirect

Separation and Purification Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/seppur

Integrated process extraction–adsorption for selective recovery of antioxidant phenolics from *Aronia melanocarpa* berries



Leandro Galván D'Alessandro, Peggy Vauchel, Rémi Przybylski, Gabrielle Chataigné, Jordan Nikov, Krasimir Dimitrov*

Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Biochimique et Microbien (ProBioGEM), UPRES-EA 1026, Polytech'Lille/UT A, Université Lille Nord de France, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2013

Received in revised form 25 September 2013

Accepted 28 September 2013

Available online 5 October 2013

Keywords:

Integrated process

Eco-extraction

Adsorption

Antioxidants

Aronia melanocarpa

ABSTRACT

Integration of extraction and adsorption processes for selective recovery of antioxidant phenolics from *Aronia melanocarpa* berries was studied. Studies on adsorption and desorption steps enabled to select the most efficient adsorbent among tested and to define relevant experimental conditions for both steps regarding polyphenols recovery and antioxidant activity preservation. Up to 82% of total polyphenols, up to 92% of total anthocyanins and up to 84% of antioxidant capacity of *Aronia* extracts were recovered using XAD 7HPresin. The proposed new integrated process extraction–adsorption provided simultaneous extraction of phenolics and their purification in a single operation. In this way, products of high quality were obtained in a simple eco-friendly process with low consumption of time and energy. The integrated process extraction–adsorption allowed to enrich the native *Aronia* extracts up to 17 times in polyphenols and 15 times in anthocyanins. Comparing this integrated process to extraction and adsorption conducted successively, a clear positive impact of integration was observed, namely more than 25% enhancement of the extraction yields of *Aronia* phenolics and more than twice increase of the process productivity.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aronia melanocarpa berries (black chokeberries) are one of the richest plant sources of phenolic compounds, especially anthocyanins [1,2]. Different beneficial effects on health have been reported for black chokeberries and their extracts, such as prevention and treatment of cardiovascular diseases [3] and colon cancer [4,5], antidiabetes and antimutagenic effects [6]. This may principally be due to the antioxidant activity exhibited by phenolic species in these berries and their extracts [6,7]. Applications for food preservation are also possible, since natural polyphenols enable to limit lipids degradation [8]. Hence, these natural compounds could be used as substitute to chemicals in food and cosmetic industries. Due to the intense color of anthocyanins, black chokeberries have been also highlighted as a suitable and rather cheap source of a food colorant [9,10]. The main anthocyanins present in *Aronia* berries are cyanidins and pelargonidins [1]. Their chemical structure is presented in Fig. 1a. Besides polyphenols (up to 78 mg g⁻¹ DW (dry weight)), *Aronia* berries contain also carbohydrates (namely glucose and fructose, together up to 176 mg g⁻¹ FW (fresh weight)), organic acids (13 mg g⁻¹ malic acid, 2 mg g⁻¹

citric acid, 0.8 mg g⁻¹ succinic acid, FW), proteins (7 mg g⁻¹ FW), pectins (3.4–5.8 mg g⁻¹ FW), fibers (56 mg g⁻¹ FW), ash (4.4–5.8 mg g⁻¹ FW), vitamins (up to 0.27 mg g⁻¹ FW vitamin C), etc. [1].

Till now, the composition and the antioxidant properties of the extracts of black chokeberry have been extensively studied [1,2,7], but only few studies have been reported on polyphenols extraction from *Aronia melanocarpa* and purification of the obtained extracts [11–13]. Solvent extraction is a classical technique to recover polyphenols from natural raw sources, it is however not very selective and many other molecules could be co-extracted with phenolics. Some of them can provoke an acceleration of polyphenols degradation and degrade their activity [10]. Hence, an additional purification is often required in order to obtain high quality products.

In this context, adsorption appears as the most relevant technique for selective polyphenols recovery from liquid extracts as it is relatively simple to design, operate and scale up, easy to regenerate, low cost, and very efficient in many cases [14]. Among adsorbents, macroporous resins seem to be the most efficient supports for polyphenols recovery [14]. They have been used for isolation and concentration of active polyphenols extracted from leaves [15–18], roots and rhizomes [19,20], fruits and fruit juices [21,22], or even from wastes of vegetal sources [23,24]. In some cases, adsorption-desorption using macroporous resins enabled also an enhancement of antioxidant activity for extracts from

* Corresponding author. Tel.: +33 328767408; fax: +33 328767356.

E-mail address: krasimir.dimitrov@polytech-lille.fr (K. Dimitrov).



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Research and Design

IChemE

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cherd

Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes

Leandro Galván D'Alessandro, Krasimir Dimitrov*, Peggy Vauchel, Iordan Nikov

Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM), UPRES-EA 1026, Polytech'Lille/UT A, Université Lille Nord de France, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ABSTRACT

Black chokeberry fruits are very rich in antioxidant phenolics. After juice extraction, the wastes of pressed berries (juice production by-products) still contain important amount of phenolic species and namely anthocyanins. Ultrasound assisted extraction (UAE) from such wastes was studied. The influence of extraction time (0–240 min), temperature (20–70 °C), solvent composition (0–50% ethanol in water) and ultrasound power (0–100 W) on anthocyanins and polyphenols yields and on antioxidant capacity of the extracts was studied. High temperature and ethanol content in the solvent improved greatly the extraction yields. Ultrasounds improved mainly the extraction kinetics. Ultrasound effect was higher in the beginning of extraction process and at low temperatures. Suitability of UAE for preparation of antioxidant-rich plant extracts at reduced time and energy was confirmed obtaining high extraction efficiencies and high antioxidant capacities of *Aronia* extracts. To optimize extraction conditions a kinetic mathematical model, based on Peleg's equation and considering also the rate of anthocyanins thermal degradation, was proposed. The influences of extraction time, temperature, solvent composition and ultrasound power on polyphenols and anthocyanins yields and on antioxidant capacity were considered. The optimal conditions for anthocyanins extraction predicted by this model were experimentally validated.

© 2013 The Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ultrasound assisted extraction; Anthocyanins; Extraction kinetics; Mathematical model; *Aronia melanocarpa*; Polyphenols

1. Introduction

Aronia melanocarpa (black chokeberry) fruits are among the richest on anthocyanins plant sources (Wu et al., 2004). The high content of these phenolics seems to correlate to the antioxidant activity reported for these berries (Kähkönen et al., 1999). Anthocyanins are water-soluble glycosides of anthocyanidins, normally found in the skin of fruits and responsible for the blue, red, purple and black colors of the fruits. Generally, they are considered as nonnutritive agents. However, several beneficial effects on health have been reported for anthocyanin-rich berries (Hou, 2003; Lau et al., 2006; Tall et al., 2004). Chokeberries and their extracts are useful for the prevention and treatment of diabetes

(Jayaprakasam et al., 2005; Gasiorowski et al., 1997), cardiovascular disease (Naruszewicz et al., 2007) and colon cancer (Zhao et al., 2004). Due to the high amount of anthocyanins, *Aronia* berries have been also highlighted as a suitable and rather cheap source of food colorant (Kraemer-Schaffhalter et al., 1998; Bridle and Timberlake, 1997). In North and East European countries black chokeberry is very popular, mainly for large-scale production of juices, jams and wines (González-Molina et al., 2008; Kokotkiewicz et al., 2010). In fact, *Aronia* juice exhibits the highest antioxidant capacity among the polyphenol-rich beverages (Kulling and Rawel, 2008). After juice extraction, many phenolic compounds and especially anthocyanins, are still present in the solid waste and could be valorized by suitable extraction process. Similar valorizations

* Corresponding author. Tel.: +33 328767408; fax: +33 328767356.

E-mail address: krasimir.dimitrov@polytech-lille.fr (K. Dimitrov).

Received 24 July 2013; Received in revised form 16 September 2013; Accepted 16 November 2013

0263-8762/\$ – see front matter © 2013 The Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.020>

Please cite this article in press as: Galván D'Alessandro, L., et al., Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. Chem. Eng. Res. Des. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.020>