République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr Yahia FARES de MEDEA
Faculté de Technologie
Département Génie des Procédés et Environnement

Thèse de Doctorat

Spécialité : Génie des Procédés

Option : Génie des Procédés

Présentée Par Khadidja Youcef Ettoumi

Thème

Valorisation physico-chimique de la biomasse locale en vue de la synthèse de macromolécules et composés actifs. Application en bioformulation

Soutenue devant le jury composé de :

Oumouna Mustapha	PR	Université de Médéa	Président
Boutoumi Houcine	PR	Université de Blida	Examinateur
El Hadi Djamel	PR	Université de Blida	Examinateur
Moulai-Mostefa Nadji	PR	Université de Médéa	Directeur de thèse
Zouambia Yamina	MCA	Université de Médéa	Invitée

Médéa, Mai 2017

ملـخـــــص

يهدف هذا العمل الى تثمين قشور الحمضيات وهي الليمون *C. limonum* والبرتقال الحلو *C .sinensis* والنرنج *Citroncirus webberi* من خلال استخلاص جزيئات حيوية ألا وهي الزيوت العطرية والبكتينات. الزيوت العطرية تم استخلاصها بواسطة التقطير المائي، في حين تم استخلاص البكتينات في وسط حمضي . استخلاص هذه الجزيئات الحيوية باستعمال طريقة جديدة وهي التحريض الكهرومغناطيسي أعطى نتائج جيدة من حيث المردود ومدة الاستخلاص. أظهرت التحاليل الفيزيوكميائية للزيوت العطرية المستخلصة أنها موافقة للمعايير الدولية. أما التحاليل الكرومتوغرافية الغازية المرفقة بالطيف الكتلي للزيوت العطرية المستخلصة من البرتقال الحلو بواسطة التحريض الكهرومغناطيسي أظهرت أن هذه الأخيرة تحتوي على نسبة كبيرة من الكربوهيدرات مقارنة بالزيوت المستخلصة بواسطة التسخين التقليدي . كما بينت نتائج الخصائص الفيزيوكميائية للبكتينات المستخلصة أن طبيعة المادة النباتية وكذا الشروط التجريبيّة للاستخلاص لها تأثير على الخصائص البنيوية للمواد المستخلصة. أوضحت النتائج أن استقرار المستحلبات المحضرة بواسطة الجزيئات المستخلصة مع إضافة مادة مضادة للأكسدة متعلق بتركيز البكتين. بينت نتائج النشاط البيولوجي للزيوت العطرية وكذا مستحلباتها أن استحلاب هذه الزيوت أدى الى تحسين نشاطها المضاد للأكسدة وكذا المضادة للميكروبات وذلك راجع إلى التأثير المزدوج لمكونات هذه المستحلبات.

كلمات مفاتيح :الحمضيات -التقطير المائي - التحريض الكهرومغناطيسي- الزيوت العطرية- بكتين- المستحلب- النشاط المضاد للميكروبات- النشاط المضاد للأكسدة

Résumé

Cette étude a pour principal objectif la valorisation des écorces de *Citrus* à savoir *C. limonum* (Citron), *C. sinensis* (Orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange) par extraction de biomolécules, essentiellement les huiles essentielles et les substances pectiques. Les huiles essentielles (HEs) ont été extraites par hydrodistillation, alors que les pectines ont été extraites par voie acide à chaud. La méthode d'extraction de ces biomolécules, en adoptant un nouveau mode de chauffage assisté par induction électrmagnétique (IM), a montré de meilleurs résultats en termes de rendement et de temps d'extraction, par rapport au système de chauffage conventionnel (CC). La détermination des indices physico-chimiques a révélé que les HEs des espèces *Citrus* extraites sont conformes aux normes internationales. Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) ont montré que les hydrocarbures monoterpèniques sont importants dans les huiles essentielles de *C. sinensis* extraites par la technique IM en comparaison avec CC. De plus, les caractérisations physicochimiques des pectines extraites ont révélé que la nature de la matière végétale ainsi que les conditions d'extractions ont une influence sur les propriétés structurelles de ces substances. Par ailleurs, la formulation des émulsions de type huile dans eau (H/E) à base des biomolécules extraites en présence d'un antioxydant a montré que leur stabilité dépend principalement de la concentration en pectine. L'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles seules et en émulsion a montré que la mise en émulsion de ces HEs mène à une amélioration de leurs pouvoirs antioxydant et antimicrobien due à l'effet synergique résultant des différents constituants de ces émulsions.

Mots clés: Citrus, Hydrodistillation, Induction électromagnétique, Huiles essentielles, Pectines, Emulsion, Activité antibactérienne, Activité antioxydante.

Abstract

This study aims to enhance the peel of *Citrus* namely *C. limonum* (Lemon), *C. sinensis* (sweet orange) and *Citroncirus webberi* (Citrange) by extraction of biomolecules which are essential oils and pectic substances. The essential oils (EOs) were extracted by steam distillation, while pectins were extracted by hot acidified aqueous solution. The extraction of these biomolecules, by adopting a new technique of heating assisted by electromagnetic induction (IM), showed better results in terms of efficiency and extraction time compared to the conventional heating (CC). The physicochemical indices indicated that the extracted citrus EOs are compatible with international standards. The analysis results determined by gaz chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) revealed that the monoterpene hydrocarbons are important in the essential oils of *C. sinensis* extracted by the IM technique in comparison with CC. Moreover, the physicochemical characterizations of the extracted pectins revealed that the nature of the plant material as well as the extraction conditions have an influence on the structural properties of these substances. Furthermore, the formulation of oil-in-water (O/W) emulsions based on extracted biomolecules in the presence of an antioxidant showed that their stability depends mainly on the pectin concentration. The evaluation of the biological activities of the essential oils used alone or encapsulated in emulsions displayed that the emulsification of these HEs leads to an improvement of their antioxidant and antimicrobial powers due to the synergistic effect resulting from the different constituents of these emulsions.

Key Words: Citrus, Hydrodistillation, Electromagnetic induction, Essentials oils, Pectins, Emulsion, Antimicrobial activity, Antioxidant activity.

TABLE DES MATIERES

Résumé
Remerciements
Table des matières
Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des symboles et abréviations

Introduction générale *1*

I. Synthèse bibliographique *4*

I.1. Notions sur la biomasse **4**
I.1.1. Définition de la biomasse 4
I.1.2. Principales provenances de la biomasse 4
I.1.3. Avantages de l'utilisation de la biomasse 5
I.1.4. Composition élémentaire de la biomasse 5
I.1.5. Biomasse agroalimentaire - Sources de molécules bioactives 6
I.1.5.1. Fibres diététiques 6
I.1.5.2. Enzymes 7
I.1.5.2.1. Pectinases 7
I.1.5.2.2. Xylanases 7
I.1.5.2.3. p-diphénol 8
I.1.5.3. Acides organiques 8
I.1.5.3.1. Acide citrique 8
I.1.5.3.2. Acide linolénique 8
I.1.5.3.3. Acide lactique 9
I.1.5.4. Colorants 9
I.1.5.5. Aromatisants 10
I.1.5.6. Métabolites secondaires 10

I.2. Valorisation de la biomasse agroalimentaire **11**
I.2.1. Bioénergies 11
I.2.1.1. Biocarburants 11
I.2.1.2. Biocombustibles 13
I.2.2. Bioproduits 13
I.2.2.1. Biomolécules 14
I.2.2.2. Biomatériaux 15
I.2.3. Autres applications des résidus agroalimentaires 16
I.2.3.1. En biosorption pour le traitement des eaux résiduelles 16
I.2.3.2. En bioformulation 17

I.3. Extraction et analyse de molécules bioactives **19**
I.3.1. Extraction des Huiles essentielles 19
I.3.1.1. Généralité sur les huiles essentielles 19
I.3.1.2. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de Citrus 20

I.3.1.3. Classification et composition chimique des huiles essentielles 21
I.3.1.4. Facteurs influençant la composition chimique 25
I.3.1.5. Activités biologiques des huiles essentielles 25
I.3.1.6. Techniques conventionnelles d'extraction 26
I.3.1.6.1. Entraînement à la vapeur d'eau 26
I.3.1.6.2. Hydrodistillation 26
I.3.1.6.3. Expression à froid 27
I.3.1.6.4. Distillation sèche 27
I.3.1.7. Extraction par des techniques innovantes 28
I.3.1.7.1. Extraction par des solvants supercritiques 28
I.3.1.7.2. Extraction par ultrasons 29
I.3.1.7.3. Extraction assistée par micro-ondes 29
I.3.1.7.4. Extraction assistée par induction électromagnétique 30
I.3.1.7.5. Autres méthodes d'extraction 31
I.3.1.8. Caractérisation et analyse des huiles essentielles 31
I.3.1.9. Domaines d'application des huiles essentielles 32
I.3.2. Extraction des pectines 32
I.3.2.1. Généralité sur les pectines 32
I.3.2.2. Définition et localisation des pectines 33
I.3.2.3. Sources de pectines à usages industriels 35
I.3.2.4. Propriétés physico-chimiques des pectines 36
I.3.2.4.1. Masse moléculaire 36
I.3.2.4.2. Solubilité et précipitation des pectines 36
I.3.2.4.3. Viscosité des pectines en solution 38
I.3.2.4.4. Propriétés gélifiantes et stabilisantes 38
I.3.2.4.5. Propriétés émulsifiantes 40
I.3.2.5. Méthodes d'extraction des pectines 40
I.3.2.5.1. Extraction chimique 40
I.3.2.5.2. Extraction enzymatique 42
I.3.2.5.3. Extraction physique 43
I.3.2.6. Analyse et caractérisation structurale des pectines 43
I.3.2.6.1. Analyse des compositions monosaccharidiques 43
I.3.2.6.2. Analyse structurale des polysaccharides pectiques 44
I.3.2.7. Applications des pectines 45

***II. Matériels et Méthodes* 46**

II.1. Matériel végétal 47

II.2. Réactifs et solvants 46

II.3. Détermination de la teneur en eau 47

II.4. Extraction des huiles essentielles 48

II.4.1. Procédure d'extraction 48
II.4.1.1. Extraction par hydrodistillation par chauffage classique (HCC) 48
II.4.1.2. Extraction par hydrodistilation assistée par induction électromagnétique 48

II.4.1.3. Suivi de la cinétique d'extraction 49
II.4.1.4. Calcul du rendement en huiles essentielles 49

II.5. Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles extraites 50
II.5.1. Détermination des indices physico-chimiques 50
II.5.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) 50

II.6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites 51

II.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites 52

II.8. Extraction des pectines 56
II.8.1. Préparation du matériel végétal 56
II.8.2. Extraction de la pectine par chauffage conventionnel 56
II.8.3. Extraction par induction électromagnétique 58
II.8.4. Caractérisations physicochimiques des pectines 58
II.8.4.1. Rendement 58
II.8.4.2. Analyse par spectroscopie FTIR 59
II.8.4.3. Taux humidité (H %) 59
II.8.4.4. Degré d'estérification 59
II.8.4.5. Taux de cendre 59
II.8.4.6. Mesures viscosimétriques et estimation de la masse moléculaire 60
II.8.4.7. Caractérisation des contenus saccharidiques 61

II.9. Formulation et caractérisation des émulsions à base des HEs stabilisées par les pectines 62
II.9.1. Formulation des émulsions 62
II.9.2. Caractérisations des émulsions 63
II.9.3. Evaluation de l'activité biologique 65

***III. Résultats et Discussions* 46**

III.1. Introduction 66

III.2. Teneur en eau des espèces citrus 66

III.3. Extraction des huiles essentielles 67
III.3.1. Effet du rapport pondéral (matière végétale/eau) 67
III.3.2. Influence du mode d'extraction sur le rendement 68
III.3.3. Evolution de la cinétique d'extraction 69
III.3.4. Caractérisation physicochimique des huiles essentielles d'agrumes 72
III.3.5. Analyse de la composition chimique par CG/MS 73
III.3.5.1. Composition de l'huile essentielle de C. sinensis 73
III.3.5.2. Composition de l'huile essentielle de C. limonum 76
III.3.6. Evaluation de l'activité antioxydante des HEs extraites 79
III.3.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HEs extraites 82
III.3.7.1. Aromatogramme 82
III.3.7.2. Méthode de dilution en milieu liquide 85

III.3.8. Conclusion 86

III.4. Extraction des pectines 88

III.4.1. Aspect général 88

III.4.2. Rendement en pectine 88

III.4.3. Taux d'humidité 89

III.4.4. Taux de cendre 90

III.4.5. Degré d'estérification 91

III.4.6. Analyse par infrarouge 92

III.4.7. Caractérisation moléculaire des substances pectiques 93

III.4.8. Caractérisation des contenus saccharidiques 95

III.4.9. Conclusion 96

III.5. Formulation et caractérisation d'émulsions d'HEs stabilisées par la pectine 97

III.5.1. Caractérisation physico-chimiques des émulsions à base de pectine seule 97

III.5.1.1. Observations macroscopiques 97

III.5.1.2. *Examen microscopique* 98

III.5.1.3. Mesure du pH et de la conductivité 100

III.5.2. Influence de l'acide ascorbique sur la stabilité des émulsions d'HEs 100

III.5.2.1. Observation Visuelle 100

III.5.2.2. pH et conductivité des émulsions 101

III.5.3. Taille des gouttelettes et morphologie des émulsions 102

III.5.4. Analyse rhéologique 104

III.5.4.1. Etude du comportement rhéologique- Courbes d'écoulement 105

III.5.4.2. Analyse rhéologique en régime oscillatoire 107

III.5.5. Détermination de l'activité antioxydante des émulsions d'HE avec et sans acide ascorbique 108

III.5.6. Détermination de l'activité antimicrobienne des émulsions d'HE 110

III.5.7. Conclusion 112

Conclusion générale* *114

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I-1 Filières classiques de production de biocarburants (biodiesel et bioéthanol) 12
Figure I-2 Ethanol produit par *Sacchromyces cerevisaes* en solutions de résidus d'agrumes hydrolysés en présence d'huile de peaux d'orange à différentes concentrations..... 13
Figure I-3 Rétention des ions cadmium sur différents sous-produits d'origine végétale..... 17
Figure I-4 Ecorces de citron adulte montrant les glandes schizolysigène 21
Figure I-5 Structures chimiques de quelques composés terpéniques rencontrés dans les huiles essentielles..... 22
Figure I-6 Structures chimiques de quelques phénols volatils des huiles essentielles..... 23
Figure I-7 Procédé de distillation sèche 28
Figure I-8 Hydrodistillation assistée par micro-ondes 30
Figure I-9 Chauffage par induction d'un cylindre 30
Figure I-10 Représentation schématique de la localisation de pectine dans la paroi cellulaire. 34
Figure I-11 Modèle moléculaire de la structure primaire des pectines 34

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Figure II-1 A) Orange ; B) Citrange ; C) Citron 47
Figure II-2 Montage d'hydrodistillation assistée par induction électromagnétique..... 49
Figure II-3 Réaction du DPPH• avec un antioxydant 52
Figure II-4: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme..... 54
Figure II-5 Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide..... 55
Figure II-6 Protocole d'extraction de la pectine 57
Figure II-7 Montage de chauffage par induction électromagnétique..... 58
Figure II-8 Viscosimètre Ubbelohde..... 61
Figure II-9 Dispositif d'homogénéisation: Ultra Turax 63

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

Figure III-1 Teneur en eau des oranges, A : Ecorces complètes, B : Albédos..... 66
Figure III-2 Teneur en eau des citranges, A : Ecorces complètes, B : Albédos..... 66
Figure III-3 Teneur en eau des citrons ; A : Ecorces complètes, B : Albédos 67
Figure III-4 Variation du rendement global d'extraction de C.sinensis en fonction du rapport pondéral..... 68
Figure III-5 Variation du rendement en huile essentielle de C. sinensis..... 70

Figure III-6 Variation de la composition chimique des substances volatiles de C. sinensis Influence du mode d'extraction 76
Figure III-7 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations des HEs de C.sinensis extraites par HIM et HCC..... 79
Figure III-8 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles des agrumes..... 80
Figure III-9 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique..... 80
Figure III-10 Halo d'inhibition de l'H.E de C.sinensis sur: S. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa et C.albicans 83
Figure III-11 Halo d'inhibition de l'H.E de C.limonum sur: S. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa et C.albicans 83
Figure III-12 Pectines extraites des écorces de citrange par : A) CC, B) IM..... 88
Figure III-13 Spectre FTIR des pectines de citrange obtenues par les deux techniques de chauffage à partir des albédos natifs et à partir des marcs 92
Figure III-14 Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour les pectines de citrange 94
Figure III-15 Apparence des différentes formulations à T=20°C pendant 20 jours..... 98
Figure III-16 Vues microscopiques des différentes formulations à base de pectine seule..... 99
Figure III-17 Apparence des différentes formulations après 20 jours de conservation 101
Figure III-18 Distribution des tailles de gouttelettes d'émulsions stabilisées 102
Figure III-19 Vues microscopiques d'émulsions stabilisées avec de 103
Figure III-20 Courbes d'écoulement des émulsions stables..... 106
Figure III-21 Evolution des modules élastique (G') et visqueux (G'') en fonction de l'amplitude de la déformation appliquée..... 107
Figure III-22 Effet de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE 110

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1 Composés les plus communs trouvés dans les huiles essentielles 24
Tableau I.2 Principales sources de pectines d'intérêt industriel 35
Tableau I.3 Comparaison entre les pectines de citrouille extraites par voie enzymatique et voie chimique 42

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Tableau II.1 Différents constituants des émulsions d'HE formulés 63

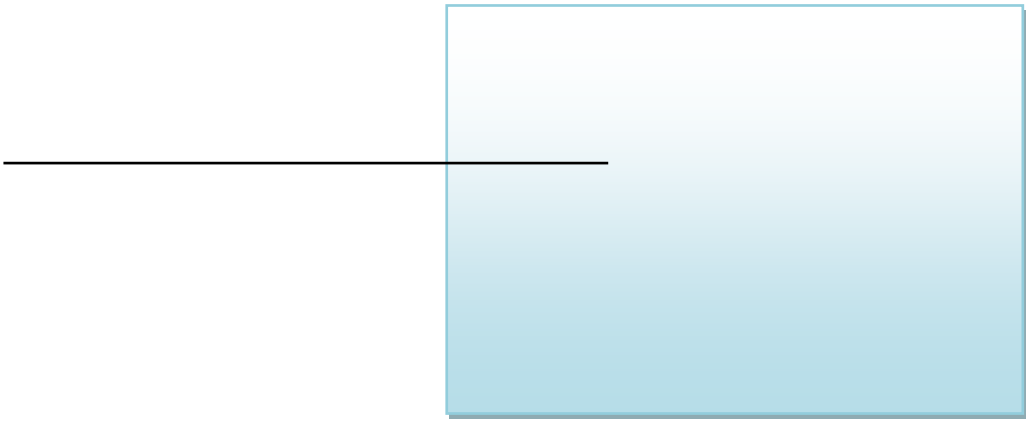
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III.1 Rendement en HE (%) des trois espèces d'agrumes selon deux (2) méthodes d'extraction 69
Tableau III.2 Propriétés physico-chimique des huiles essentielles d'espèces Citrus 72
Tableau III.3 Principaux composés chimiques (%) de l'H.E de C. sinensis extraite par HIM et HCC 75
Tableau III.4 Composition chimique des HEs des C. limonum extraites par HCC 78
Tableau III.5 Valeurs des IC50 trouvées pour les HE de Citrus 81
Tableau III.6 Diamètres des zones d'inhibition des H.Es de Citrus 82
Tableau III.7 CMI (µl/ml) des huiles essentielles d'agrumes en milieu liquide 85
Tableau III.8 Rendement en pectines des espèces citrus 88
Tableau III.9 Taux d'humidité des pectines des espèces citrus 90
Tableau III.10 Résultats des taux de cendres pour les pectines des espèces citrus 90
Tableau III.11 Résultats des degrés d'estérification pour les pectines des espèces citrus 91
Tableau III.12 Principales fréquences observées sur les spectres IR pour la pectine 93
Tableau III.13 Viscosité intrinsèque et masse moléculaire 94
Tableau III.14 Composition massiques ($mg.g^{-1}$) en sucres 95
Tableau III.15 Caractéristiques organoleptiques des émulsions fraîchement préparées 97
Tableau III.16 Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions 100
Tableau III.17 Résultats des mesures du pH et de la conductivité des émulsions en présence d'acide ascorbique 102
Tableau III.18 Diamètres moyens des gouttelettes et valeurs des PDI des émulsions préparées avec différentes compositions en pectine:acide ascorbique 104
Tableau III.19 Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'HEs d'agrume 108
Tableau III.20 Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'huiles essentielles 109
Tableau III.21 CMI (µl/ml) des huiles essentielles et leurs émulsions 111

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
AFNOR : Association Française de Normalisation
ATCC : American type culture collection
C : Concentration
°C : Degré Celsius
CG : Chromatographie en phase Gazeuse
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
DM : Degré de Méthylation
DE : Degré d'estérification
DO : Densité optique (%)
EC : Ecorce complète
FM : Faiblement Méthylées
FTIR : Fourier Transform Infra Red spectroscopy
Gluc : Glucose
GluA : Acide glucuronique
GRAS : Generally Recognized As Safe
H/E : Huile dans eau
HCC : Hydrodistillation par Chauffage Classique
HD : Hydrodistillation
HES : Huiles essentielles
HG : Homogalacturonanes
HIM : Hydrodistilation assistée par Induction électromagnétique
HM : Hautement Méthylées
H : Taux d'humidité (%)
I_R : Indice de rétention (ou de kovats)
I% : Pourcentage d'Inhibition
IC50% : Concentration Inhibitrice à 50% de DPPH perdu
ID : Diamètre interne
KBr : Bromure de Potassium
MHB : Mueller Hinton Bouillon
M : Masse molaire (g/mol)
M_v : Masse moléculaire viscosimétrique (kDa)
MV : Matière végétale
N : Normalité

Ac asc	: Acide ascorbique
Pect	: Pectine
PDI	: Indice De Polydispersité
PG	: Polygalacturonases
PPm	: Partie Par million
P	: Poids de pectine (g)
Rha	: Rhamnose
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
R	: Rendement (%)
RP	: Rapport Pondéral
R^2	: Coefficient de corrélation
SM	: Spectrométrie de Masse
T	: Température (°C)
UFC	: Unité Formant Colonie
Xyl	: Xylose
η_{red}	: Viscosité réduite
dav	: diamètre moyen
g	: gramme
h	: heure
kDa	: kilodaltons
mg	: milligramme
m	: masse de l'échantillon
min	: minute
m-HDP	: méta-hydroxydiphény
ml	: millilitre
t	: temps (s)
trs	: tours
η_{red}	: Viscosité réduite
η_{sp}	: Viscosité spécifique
$[\eta]$	: Viscosité intrinsèque en dl.g-1
µl	: Microlitre
$\alpha°$	: Pouvoir rotatoire (en degrés d'angle)
$[\alpha]$	: Pouvoir rotatoire spécifique



L'exploitation des coproduits (déchets) agro-alimentaires en vue de leur valorisation a bénéficié au cours de ces dernières années d'un regain d'intérêt pour des raisons économiques aussi bien qu'environnementales. Actuellement, plusieurs pays ont imposé de nouvelles réglementations pour limiter la combustion de ces coproduits en réponse aux restrictions concernant l'émission de gaz à effet de serre à l'origine du réchauffement climatique. Ceci a permis de stimuler l'intérêt pour l'utilisation des coproduits agro-industriels en tant que ressources naturelles renouvelables.

En effet, les résidus agro-industriels ont été utilisés comme une source renouvelable d'énergie et pour la production de nombreux composés chimiques, incluant le bioéthanol, le charbon actif, et ils ont été aussi utilisés dans les procédés de fabrication de pâte à papier et la production de biomatériaux ; ceci permet d'une part, de fournir des substrats alternatifs et d'autre part de résoudre le problème de pollution engendré par la non utilisation effective de ces résidus.

Conformément aux données statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, en 2015, plus de 120 millions de tonnes d'agrumes ont été obtenues au niveau mondial, dont plus de 500 milles de tonnes en Algérie [1]. Ces fruits constituent un des éléments principaux pour une alimentation équilibrée. Ils sont consommés frais ou sous formes de différents produits obtenus après certaines transformations. Les importantes quantités de résidus issus de ces processus sont facilement dégradables et peuvent contribuer à l'augmentation de taux de pollution de l'environnement.

L'isolement et la caractérisation des composés connus généralement sous l'appellation de «composés bioactifs» constituent une des voies de la valorisation de la biomasse agroalimentaire. De nombreuses études explorent aujourd'hui la possibilité de leur transformation en ingrédients incorporables dans différents produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Cet intérêt particulier est dû au fait qu'au cours des dernières années, les consommateurs ont commencé à se réorienter vers l'utilisation de produits naturels au détriment de ceux issus de la synthèse chimique. De plus, les résultats des études épidémiologiques mettent en évidence la capacité de ces composés bioactifs à participer au bon déroulement des fonctions vitales de l'organisme humain. Les multiples effets bénéfiques de ces composés issus de sources naturelles sont attribués à leurs diverses activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne, antivirale et anti inflammatoire).

La recherche de produits et de procédés de séparation alternatifs plus efficaces du point de vue de productivité, rendement et sélectivité liée aux exigences pour la protection de l'environnement, occupent une place primordiale en recherche et développement; le chauffage par induction électromagnétique, par exemple, participe à cette maitrise.

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont l'objectif principal est la valorisation d'une biomasse agroalimentaire et en particulier, les écorces d'agrumes. Partant de l'idée d'existence de biomolécules et composés actifs dans la même source végétale, on s'est proposé alors dans ce travail de réaliser des extractions consécutives de composés actifs à savoir les huiles essentielles (HEs), et les substances pectiques de nature polysaccharidique.

Les huiles essentielles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique [2]. D'autre part, la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances GRAS, qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires [3]. Alors que l'intérêt des polysaccharides ne se limite pas à leurs propriétés rhéologiques, le rôle biologique de certains d'entre eux les désigne comme des molécules à forte valeur ajoutée dans un large champ d'applications (cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels...).

Un deuxième objectif visé dans ce travail consiste à étudier la possibilité d'améliorer le procédé d'extraction des biomolécules, en étudiant l'impact d'une nouvelle technique assistée par induction électromagnétique sur les propriétés caractéristiques des produits extraits. Il s'agit alors d'une étude comparative en termes de rendement, de cinétique d'extraction et de composition chimique des pectines obtenues par l'extraction par chauffage classique et celle assistée par un chauffage à induction électromagnétique.

Notre intérêt s'est porté sur les extraits obtenus des écorces de trois espèces de Citrus : *C. limonum* (citron), *C. sinensis* (orange douce) et *C. aurantium* (orange amère). Ces extraits ont été proposés pour la formulation de systèmes dispersés biologique ou naturels en tant que composés actifs ou excipients, tout en permettant une préservation de leur stabilité sur une durée prolongée et optimisée. Sachant que ce domaine de formulation aqueuse intéresse un nombre croissant de domaines d'applications (agro-alimentaire, cosmétique et galénique). Des analyses physico-chimiques ont été abordés ensuite afin d'évaluer l'efficacité de ces bio-molécules.

La problématique posée dans ce sujet de recherche consiste en les points suivants :

- comment exploiter les ressources naturelles ?
- comment développer de nouveaux protocoles à utiliser ainsi que le choix des conditions opératoires devant être suffisamment sélectives pour permettre l'extraction privilégiée de la substance en question ?

Certes, l'extraction doit répondre à trois critères fondamentaux : quantitative, sélective et non altérante.

Les contraintes écologiques et l'émergence de la sécurité alimentaire et industrielle incitent à découvrir de nouvelles applications aux technologies innovantes. Toutes ces techniques visent une performance accrue et un meilleur respect de l'environnement.

Pour ce faire, nous avons subdivisé notre travail en deux parties :

Dans la première partie nous présenterons une revue bibliographique des connaissances sur la biomasse, en insistant plus particulièrement sur sa composition, et ses principales provenances, suivi par une présentation des différentes possibilités de valorisation des résidus agroalimentaires, en mettant l'accent sur ceux des agrumes. Nous présenterons également une revue de littérature sur les huiles essentielles et les pectines, leur localisation, les procédés d'extraction, la composition et les propriétés physico-chimiques et biologiques y sont également présentés.

La deuxième partie est dédiée à l'étude expérimentale de ce travail, dont laquelle, une description du matériel et méthodes utilisés sont présentés. Les principaux résultats relatifs premièrement aux caractéristiques et aux propriétés physicochimiques des substances extraites à partir des différentes sources d'agrumes par les deux techniques de chauffage (classique et nouvelle) sont exposés. Ensuite, les résultats relatifs à la formulation et la caractérisation d'émulsions d'HEs stabilisées par la pectine sont présentés. Et en dernier, sont exposés les principaux résultats relatifs à l'évaluation des activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) des huiles essentielles seules et en émulsion.

Nous terminerons enfin ce travail par une conclusion générale.

Chapitre I

I.1.1. Définition de la biomasse

En toute rigueur**,** c'est l'ensemble de la matière d'origine vivante**.** La biomasse se définit comme la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales, issues de la terre et de la mer, de la sylviculture et des industries connexes ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers.

I.1.2. Principales provenances de la biomasse

La biomasse constitue la 1ère source des énergies renouvelables produites dans le monde. L'agence internationale de l'énergie (AIE) estime à 10 % la quantité d'énergie primaire issue de la biomasse produite en 2009 au niveau mondial. D'après l'échelle établie par Hoogwijk et al. [4], la production de la biomasse est divisée en huit catégories:

- biomasse produite par le surplus des terres agricoles, non utilisées pour l'alimentation humaine ou animale : cultures énergétiques
- biomasse produite par le déboisement (entretien de forêt) ou le nettoyage de terres agricoles,
- résidus agricoles issus des cultures des céréales, vignes, vergers, oliviers, fruits et légumes,… ; résidus de l'agroalimentaire,
- résidus forestiers issus de la sylviculture et de la transformation du bois,
- résidus agricoles issus de l'élevage (fumier, lisier, litières…),
- déchets organiques des ménages (fraction fermentescibles des ordures ménagères (FFOM), papiers, cartons, déchets verts),
- biomasse directement utilisée à des fins non alimentaires (bois pour le papier), déchets organiques des déchets industriels banals (papiers, cartons, bois, déchets putrescibles).

Certains distinguent la « biomasse sèche », constituée de divers déchets de bois et résidus agricoles (déchets ligneux) également appelée « bois-énergie », et la « biomasse humide » constituée de déchets d'origine agricole (fumiers, lisiers…), agroalimentaire ou urbaine (déchets verts, boues d'épuration, fraction fermentescible des ordures ménagères…) et pouvant être transformés en énergie ou en engrais/amendement.

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons plus particulièrement à la « biomasse humide » que nous appellerons également biomasse agroalimentaire.

I.1.3. Avantages de l'utilisation de la biomasse

Depuis une dizaine d'années, il existe un regain d'intérêt pour l'utilisation de la biomasse comme source d'énergie renouvelable. Il y a plusieurs raisons à cette situation [5].

Premièrement, les développements technologiques concernant les procédés de conversion et la production de cultures permettent d'avoir des efficacités de conversion plus importantes à des coûts bien plus intéressants que par le passé. Par exemple, lorsque nous utilisons des résidus de biomasse comme carburant, le coût de l'électricité produite atteint un niveau concurrentiel par rapport au coût de l'électricité d'origine fossile.

Le deuxième stimulus est que la biomasse participe à la lutte contre les émissions de gaz à effet de serre dans la mesure où le CO_2 dégagé par la combustion des bioénergies est compensé par le CO_2 absorbé par les végétaux lors de leur croissance. La récupération du biogaz dans les décharges permet de capter le méthane issu de la biomasse (dont l'effet de serre est considéré comme 21 fois plus fort que le CO_2).

De plus, l'avantage de la conversion énergétique de la biomasse, par rapport aux autres sources énergétiques renouvelables, réside dans le fait qu'en plus de la production d'énergie, elle participe activement au traitement des déchets organiques contribuant ainsi à la réduction de l'impact de nos activités sur l'environnement.

Mais il existe encore d'autres incitants à l'utilisation de la biomasse. La valorisation énergétique de la biomasse peut permettre d'augmenter la part des énergies renouvelables dans un mix énergétique et de réduire la dépendance au pétrole ou au gaz. La diversité des matières organiques constituant la biomasse permet à de nombreux pays d'avoir accès à cette ressource. Elle peut donc favoriser leur indépendance énergétique. Si l'agriculture intensive est remplacée par des cultures énergétiques moins intensives et contrôlées, d'autres avantages environnementaux vont apparaître, tels que une réduction de la lixiviation des engrais et de l'utilisation des pesticides.

I.1.4. Composition élémentaire de la biomasse

La biomasse est principalement composée de carbone (C), d'oxygène (O), d'hydrogène (H) mais également d'azote (N) et de matières minérales (MM). Le pourcentage de matière minérale dans les biomasses peut varier dans de grandes proportions. La littérature indique également que la nature de cette matière minérale varie beaucoup d'une biomasse à une autre.

La matière minérale se trouve généralement sous forme de sels ou d'espèces inorganiques liées à des espèces organiques. Les principaux éléments présents dans la matière minérale des

biomasses sont généralement à base de calcium (Ca), de silicium (Si) et de potassium (K) [6,7].

I.1.5. Biomasse agroalimentaire - Sources de molécules bioactives

Ces dernières années, un intérêt accru a été porté pour les molécules naturelles bioactives de matières premières d'origine végétale, comme source potentielle pouvant constituer une alternative aux produits de synthèse, utilisées, en général, dans les aliments, produits pharmaceutiques et cosmétiques. Cet intérêt est soutenu surtout par les possibles effets nocifs attribués aux substances de synthèse.

Par la suite, nous allons présenter les différents composés bioactifs qui peuvent être obtenus en utilisant comme matière première les résidus de fruits notamment les résidus d'agrumes

I.1.5.1. Fibres diététiques

Les études épidémiologiques ont lié l'apport de fibres à une large gamme de maladies telles que l'athérosclérose, la diverticulose et, le cancer de colon. Les fibres végétales sont souvent ajoutées aux aliments pour diminuer l'incidence de ces maladies.

Les fibres alimentaires consistent en une variété de polysaccharides non amylacés qui comprennent la cellulose, l'hémicellulose, la pectine, les B-glucanes, les gommes et la lignine [8,9].

Parmi les produits les plus riches en fibres, nous pouvons citer le son de blé, les balles d'avoine, les drèches de brasserie. Les résidus d'agrumes constituent également une source importante de fibres car ils sont très riches en pectines.

La pectine est un polysaccharide complexe extrait de la paroi cellulaire des plantes supérieures. Sa capacité de former des gels aqueux la rend utile comme ingrédient fonctionnel dans le processus de fabrication de différents produits alimentaires (confitures, gelées, boissons de fruits concentrées, jus de fruits, produits fermentés). Une tonne d'agrumes convenablement traitée fournit environ 10 kg de Pectine.

Milnes et al. [10] ont trouvé que l'orange contient entre 20 et 50 % de pectine et que ces valeurs varient selon les variétés. Farvash et Ashitiani [11] ont également noté l'influence de la température, du pH initial et le temps de solubilisation sur les rendements en pectines.

Une autre étude concernant la récupération de la pectine de résidus de pommes a été réalisée par Wang et al. [12] ; ainsi 2 g de résidus de pommes séchés ont été soumis à l'extraction à l'acide chlorhydrique sous l'action de microondes. La durée d'extraction, le pH

de la solution d'acide chlorhydrique, le rapport solide/liquide et la puissance des microondes ont été les paramètres suivis. Les extraits obtenus ont été filtrés et la pectine précipitée avec un volume égal d'éthanol 95% et séchée à 50°C jusqu'à une masse constante. L'application de la méthodologie de surface de réponse indique le fait que la durée d'extraction, le pH de l'acide chlorhydrique et son interaction avec le rapport solide/liquide sont les facteurs qui ont le plus d'influence sur le rendement d'extraction.

I.1.5.2. Enzymes

I.1.5.2.1. Pectinases

Le groupe pectinases inclut les pectin-estérases qui hydrolysent la pectine jusqu'au méthanol et acide polygalacturonique et les polygalacturonases qui hydrolysent l'acide polygalacturonique jusqu'à l'acide monogalacturonique par destruction de la liaison glycosidique. Les pectinases sont utilisées pour la clarification du vin et du jus de fruits, pour l'obtention de l'amidon sans pectine, dans le durcissement du café. Elles sont produites par plusieurs champignons tels qu'*Aspergillus*, *Rhizopus stolonifer* et, *Tricoderma*.

Les polygalacturonases ont un large palier d'applications dans les industries alimentaire et textile ou dans le traitement des effluents aqueux. Communément elles sont obtenues à l'aide de bactéries, de levures ou de champignons par fermentation submergée ou à l'état solide. Les bactéries produisent plutôt des polygalacturonases alcalines et stables du point de vue thermique pendant que les champignons sont utilisés pour l'obtention des polygalacturonases acides [13].

Afin d'obtenir des rendements élevés en pectinases, l'amélioration des souches et l'optimisation des conditions de culture doivent être envisagées. Un grand intérêt est orienté vers la production de polygalacturonases (PG) à partir de résidus alimentaires.

Dans cette optique, Maciel et al. [14] ont utilisé la poudre d'écorce d'orange séchée comme substrat pour la fermentation pour la production de PG. Les résultats obtenus montrent qu'un réacteur à lit fixe avec un support d'écorce d'orange en utilisant comme souche *Aspergillus Niger* est un procédé prometteur pour la production de PG à l'échelle industrielle.

I.1.5.2.2. Xylanases

L'éffet de quelques résidus végétaux (résidus et peaux d'oranges et de citrons, résidus de pommes, peaux de poires, de bananes, de melons, coquilles de noisettes) sur la production de la xilanase par *Trichoderma harzianum* a été étudié par Seyis et al. [15].

L'activité la plus importante a été observée pour les peaux de melons suivie par celle obtenue pour les résidus de pommes et les coquilles de noisettes.

I.1.5.2.3. p-diphénol

Les p-diphénol ou dioxygène oxydoréductases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation d'une grande variété de composés phénoliques et de composés inorganiques. Leur obtention peut être réalisée par fermentation sur support solide représenté par des résidus issus de la valorisation de fruits.

Rosales et al. [16] ont étudié l'effet de la concentration initiale d'ammoniac sur la production de ces enzymes par inoculation des souches de *Trametes hirsuta* sur des résidus de kiwi à différentes concentration d'ammonium et sont arrivés à la conclusion que les activités les plus élevées ont été obtenues pour la concentration en sels d'ammonium la plus faible.

I.1.5.3. Acides organiques

I.1.5.3.1. Acide citrique

L'acide citrique est un acide tricarboxylique utilisé dans l'industrie pharmaceutique et dans l'industrie alimentaire comme acidifiant et comme exhausteur de goût. Il est obtenu notamment par fermentation submergée des milieux riches en hydrates de carbone. Les résidus de pomme ont été utilisés comme substrats pour la production microbienne de l'acide citrique par *Aspergillus Niger* dans un bioréacteur. Une quantité de 124 g d'acide citrique a été obtenue à partir d'un kilo de résidus de pommes séchés avec un rendement de 80% basé sur le sucre total [17].

I.1.5.3.2. Acide linolénique

L'acide γ-linolénique, un précurseur d'une grande variété d'eicosanoïdes biologiquement actifs présente des effets bénéfiques contre les eczémas, le diabète et le cancer. Il est souvent incorporé dans différents produits pharmaceutiques ou utilisé pour fortifier les aliments en acides gras polyinsaturés.

Différents substrats tels que le glucose, l'amidon, l'acide acétique, l'éthanol ont été utilisés pour l'obtention de l'acide γ-linolénique. Une évaluation de la production de cet acide par fermentation en état solide sur des résidus de pommes a été réalisée par Stredansky et al. [18]. En utilisant une souche de *Thamnidium elegans* sur un substrat composé d'un mélange de résidus de pommes et drèche de malt et enrichie avec huile d'arachides, ils ont obtenu après 8 jours d'incubation 3.5 g d'acide γ-linolénique/kg de substrat humide.

I.1.5.3.3. Acide lactique

L'acide lactique est un acide organique naturel. Celui-ci trouve diverses applications dans les industries chimiques, alimentaires et pharmaceutiques [19]. Il est également utilisé notamment dans la production de polymères biodégradables [20]. Il est produit notamment par fermentation à partir de l'hydrolysat enzymatique d'amidon de céréales mais les résidus agroindustriels et forestiers (le lactosérum, mélasses, amidon de résidus, matériaux lignocellulosiques) peuvent être aussi utilisés comme matières premières.

Boudjelal et al. [21] ont utilisé le jus de dattes comme substrat dans la fermentation pour la production d'acide lactique par une souche de *Lactobacillus rhamnosus*. Des essais de fermentation ont été menés afin d'optimiser les conditions de cultures et d'améliorer ainsi les performances de la souche. Les résultats obtenus à partir des essais de fermentation montrent que *Lactobacillus rhamnosus* peut produire jusqu'à 30 g/l d'acide lactique sur milieu à base de jus de dattes contenant 60 g/l de sucres totaux. Une production maximale de 47 g/l d'acide lactique a été atteinte après optimisation des conditions physico-chimiques avec lesquelles une série d'essais de fermentation a été réalisée.

I.1.5.4. Colorants

Les colorants naturels sont utilisés depuis très longtemps comme additifs alimentaires. La demande croissante et le souci des consommateurs concernant les effets des produits synthétiques sur la santé ont conduit au développement des technologies microbiennes pour son obtention. Plusieurs microorganismes (*Rhodotorula, Cryptococcus, Bacillus*) peuvent produire des pigments mais le milieu de culture est complexe et nécessite plusieurs nutriments.

La couleur naturelle joue un rôle important dans la détermination du degré d'acceptation du produit par le consommateur. En outre, les caroténoïdes (précurseurs de la vitamine A) ont des valeurs nutritionnelles élevées qui sont importantes pour la nutrition humaine. Francis et Isaksen [22] ont déclaré que les caroténoïdes jouent un rôle très important pour la protection de la santé contre le cancer, les maladies cardiovasculaires et oculaires et comme anti-oxydants.

Shukla et al. [23] ont étudié l'effet de différents solvants organiques tels que l'acétone (85%), l'hexane, l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et l'éthanol (90%) sur l'extraction de pigments à partir d'écorces d'agrumes et sont arrivés à la conclusion que l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant pour extraire les caroténoïdes des écorces d'agrumes, suivi par l'éthanol (90%). Ils ont également trouvé que les pigments naturels extraits utilisés dans un produit

alimentaire (modèle) ont donné de meilleurs résultats en termes de couleur, d'arôme et de goût comparativement aux échantillons commerciaux contenant des additifs artificiels.

I.1.5.5. Aromatisants

L'huile essentielle est le sous-produit le plus important habituellement obtenu à partir de pelure d'agrumes et constitue le plus grand secteur de la production mondiale d'huiles essentielles. Les H.Es de *Citrus* sont largement utilisées pour la préparation des parfums, les savons, désodorisant, les bougies parfumées, et en industries alimentaires comme aromatisants, en confiseries, pâtisseries, les glaces…. En raison de leur grande importance sur le plan nutraceutique et économique, de nombreuses recherches ont été menées afin d'identifier la composition chimique des huiles essentielles provenant des pelures et des feuilles de différentes espèces d'agrumes.

Christen et al. [24] ont étudié la bioconversion des résidus agro-industriels en biomasse et en métabolites volatils aromatisants (alcools, esters) par des souches de *Rhizopus*. Afin de sélectionner les conditions optimales du processus quatre souches de Rhizopus (*Rhyzopus oryzae* ATCC 34612, *Rhyzopus oryzae* NRRL 395, *Rhyzopus oryzae* MUCL 28627, *Rhyzopus sp*. NRRL 25975) ont été cultivées sur huit mélanges de substrats solides parmi lesquels deux contenant différentes proportions de résidus de pommes. La fermentation en état solide a été menée à pH 6 et 30 °C pendant quatre jours.

I.1.5.6. Métabolites secondaires

Les plantes produisent un grand nombre de substances appelées métabolites secondaires, ces métabolites secondaires végétaux peuvent être définit comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes. Ces métabolites secondaires exercent cependant une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédations d'insectes, sécheresse, lumière UV…).

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence [25] :

- les terpènes,
- les alcaloïdes,
- les composés acétyléniques,
- les cires,
- les composés phénoliques ;

Chez l'homme, ces éléments traces jouent également un rôle important, en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leurs impacts sur la santé des consommateurs sont maintenant avérés (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers, ou au contraire micro-toxiques indésirables).

I.2. Valorisation de la biomasse agroalimentaire

Selon Proot [26], la valorisation est toute transformation de résidus ou de sous-produits industriels alimentaires en vue de les réintroduire sur le marché à titre de nouveaux ingrédients ou comme nouveaux produits.

L'agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (ADEME) définit la valorisation comme "le ré-emploi, le recyclage ou toute autre action visant à obtenir, à partir de déchets, des matériaux réutilisables ou de l'énergie".

Pour une stratégie de développement durable de l'environnement, et pour la valorisation des résidus des filières agricoles et de l'industrie alimentaire, l'industrie de la transformation des fruits est souvent confrontée à plusieurs solutions. Par la suite, nous allons nous intéresser aux différents domaines d'utilisation des résidus agro-alimentaires en mettant l'accent notamment sur les résidus d'agrumes.

I.2.1. Bioénergies

L'utilisation de la biomasse à des fins énergétiques est aujourd'hui envisagée dans trois secteurs : transport (***biocarburants***), électricité et chaleur (***biocombustibles***).

I.2.1.1. Biocarburants

Il existe deux grandes filières industrielles de production des biocarburants comme le montre la Figure I.1. Il existe par ailleurs, un potentiel de développement pour la filière courte de l'huile végétale pure.

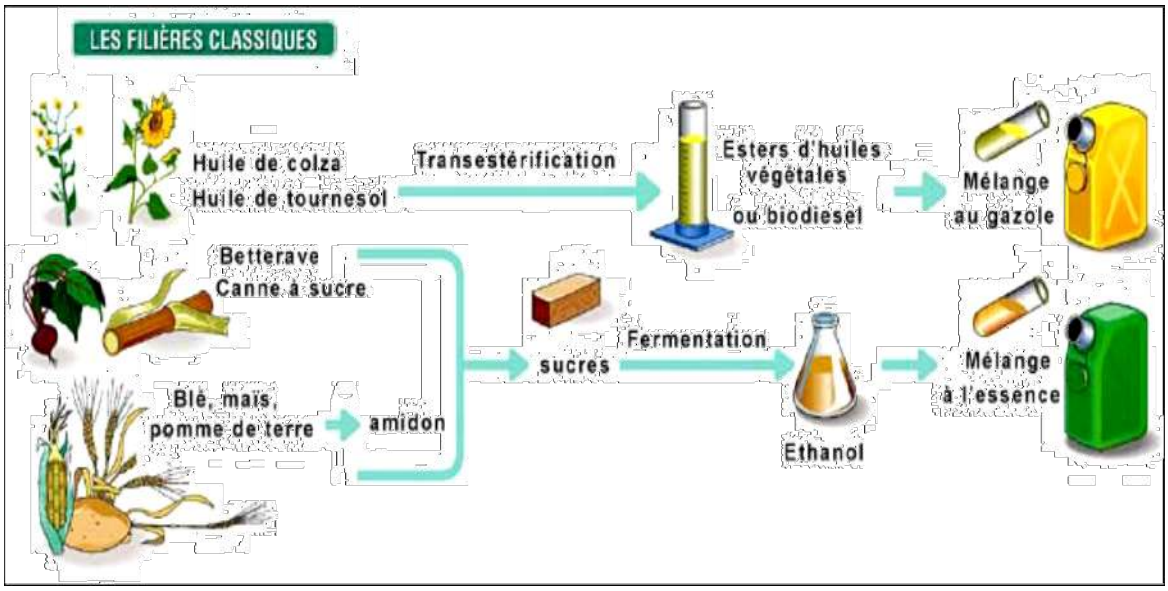


Figure 0-1 Filières classiques de production de biocarburants (biodiesel et bioéthanol)

- Filière industrielle des huiles végétales

Les huiles végétales sont utilisées après estérification des esters méthyliques d'huiles végétales (ou **biodiesel**) ; Le produit de l'estérification est utilisé en un mélange composé de 90 % d'huiles végétales pures et 10 % de méthanol et qui est utilisé comme biodiesel pour les véhicules. La production s'appuie sur les huiles de colza, tournesol, soja ou palme.

- Filière éthanol

Le bioéthanol est aujourd'hui produit à partir de la fermentation de blé, de maïs, de betterave ou de canne à sucre.

Plusieurs recherches [27-28] ont eu comme objectif l'obtention du bioéthanol (comme une alternative reconnue pour les combustibles pétroliers) en présence de résidus d'oranges ou des produits obtenus à partir de ces résidus. Cependant, une de ces études [27] a montré que la présence de l'huile des peaux d'oranges dans le milieu de fermentation inhibe la production du bioéthanol à cause du contenu élevé en limonène. Une autre étude [28] a également montré que la fermentation induite par *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus* est inhibée par la présence de l'huile de peaux d'oranges. Les concentrations minimales d'huile de peaux d'oranges pour lesquelles le rendement en éthanol est inhibé à 30°C et à 37°C sont présentées dans la Figure I.2. Aucune inhibition de la production d'éthanol n'a été observée à une concentration en huile de peaux d'agrumes inférieure ou égale à 0.2% après 96 h.

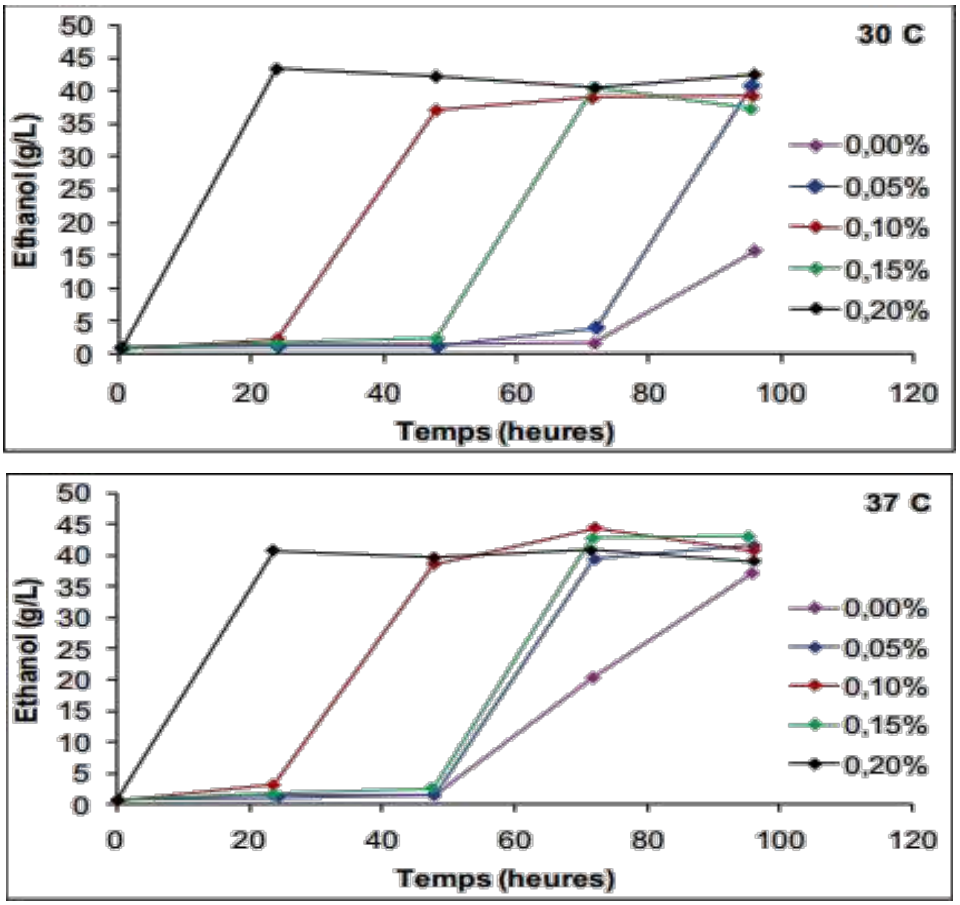


Figure 0-2 Ethanol produit par *Sacchromyces cerevisaes* en solutions de résidus d'agrumes hydrolysés en présence d'huile de peaux d'orange à différentes concentrations [28]

Sharma et al. [29] sont arrivés à la conclusion que les résidus de tangerine Kinnow (hybride de mandarine et d'orange amère) en combinaison avec les peaux de bananes peuvent constituer un bon substrat pour la production du bioéthanol par fermentation.

I.2.1.2. Biocombustibles

On peut brûler à l'échelle industrielle du marc de raisin, des noyaux de fruits, des déchets d'usines papetières (liqueurs noires, boues papetières), des déchets de collectivités, etc. et aussi du biogaz issu de la fermentation de déchets divers mis en décharge ou traités (déchets verts, effluents d'usines agroalimentaires, sous-produits animaux issus des centres d'équarrissage, déjections animales…). L'énergie ainsi dégagée peut trouver de nombreuses applications, notamment pour la production d'énergie électrique.

I.2.2. Bioproduits

Les végétaux ne possèdent pas uniquement des caractéristiques énergétiques. En dehors de la valorisation via les filières biocarburants et biocombustibles, la biomasse trouve ses

applications industrielles dans deux autres champs, comme les biomatériaux et les biomolécules. Les végétaux ont donc la capacité à se substituer aux dérivés pétroliers.

Chacun de ces deux champs d'application recouvre une série de composants intermédiaires qui correspondent à des secteurs d'activités et des marchés précis.

I.2.2.1. Biomolécules

Une multitude de molécules issues de la biomasse agroalimentaire peut être valorisée (principes actifs, alcools et solvants, colorants, huile et lubrifiants, tensioactifs, intermédiaires chimiques…) dans de nombreuses filières agroalimentaires et industrielles.

a/ Dans l'alimentation animale

Les résidus de fruits constituent un produit éminemment instable qui doit être traité rapidement. Le traitement le plus simple est le surpressage qui a essentiellement le rôle de diminuer le volume et d'augmenter la densité de la matière par diminution de la quantité de liquide résiduel. Ceci facilite l'ensilage en amenant le taux de matière sèche à 30 – 40%, ce qui entraîne aussi la réduction du coût du transport.

Différentes études ont été réalisées afin de déterminer l'influence des ajouts de résidus de fruits dans l'alimentation animale. Villas-Bôas et al. [30] ont montré aussi que les résidus de pommes peuvent être convertis dans un substrat ayant des caractéristiques nutritionnelles améliorées en particulier en ce qui concerne le niveau de protéines et la digestibilité.

Etant riche en sucres, en pectines et en parois peu lignifiées, la pulpe d'agrumes se dégrade rapidement dans le rumen ; pour éviter les problèmes d'acidose, il importe donc d'accoutumer progressivement les animaux à l'ingestion de la pulpe d'agrume [31].

b/ Epandage, compostage

Les résidus de fruits peuvent-être utilisés directement comme fertilisants par épandage mais il est nécessaire de remarquer que si cette pratique n'est pas suffisamment contrôlée elle peut entraîner certains risques liés à un excès d'éléments minéraux qui peut provoquer :

- de fortes perturbations de la flore présente ;
- un déséquilibre des minéraux présents dans le sol ;
- une accumulation des minéraux et des métaux lourds dans le sol ;
- des fuites de ces minéraux vers les milieux aqueux.

c/ Dans l'industrie alimentaire

- **Obtention de la gelée**

Une valorisation possible des résidus de fruits et notamment de ceux d'agrumes consiste à utiliser leurs propriétés gélifiantes. Dans plusieurs applications les pectines de pomme sont caractérisées par les propriétés de gélification supérieures par rapport aux pectines d'agrumes [32].

- **Obtention de l'huile végétale**

L'huile végétale peut être obtenue par pressage ou par extraction par solvants à partir d'un matériel végétal huileux tel que les pépins des fruits. L'huile raffinée obtenue à partir de pépins de fruits est composée principalement d'acide oléique, d'acide palmitique et, d'acide stéarique. Elle présente une odeur et un goût agréables et peut être utilisée dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et alimentaire.

- **Obtention du vinaigre et de l'alcool alimentaire**

Tous les résidus de fruits peuvent-être utilisés pour l'obtention de vinaigre et de l'alcool alimentaire par fermentation à condition d'avoir une teneur minimale de 8% en sucres. Les résidus qui ne sont pas valorisés immédiatement peuvent être conservés par séchage ou par fermentation alcoolique avec des levures sélectionnées tout en évitant le contact avec l'air par le remplissage total des bassins de fermentation. Le résidu obtenu par ce processus peut être utilisé comme fourrage pour les animaux tel quel ou après séchage dans un séchoir à tambour rotatif [33].

I.2.2.2. Biomatériaux

Les biomatériaux sont fabriqués à partir du bois et ses dérivés (papiers, cartons, panneaux de process), mais aussi le chanvre et autres plantes textiles, de l'amidon de céréales ou de pomme de terre, et des plantes fibreuses. Les utilisations de la biomasse végétale en tant que matériaux peuvent se répartir en 3 grands domaines :

- matériaux polymères biodégradables ou biopolymères (bioplastiques),
- fibres et les matériaux composites (agromatériaux),
- industrie papetière.

I.2.3. Autres applications des résidus agroalimentaires

I.2.3.1. En biosorption pour le traitement des eaux résiduelles

Les méthodes traditionnelles pour l'élimination des métaux lourds à partir des effluents sont généralement très couteuses surtout si les concentrations des métaux sont de l'ordre de 1 à 100 ppm en métaux dissous. Parmi ces méthodes, on cite la précipitation chimique, l'échange d'ions, les procédés membranaires et, l'osmose inverse.

La biosorption est une méthode alternative rentable qui peut être appropriée dans la purification des effluents contenant de faibles quantités de métaux dissous par des biomasses microbiennes qui peuvent être non vivantes.

Récemment une attention particulière a été orientée vers les déchets agricoles des opérations industrielles à grande échelle notamment les polymères naturels dans la rétention de métaux lourds [34]. Différentes études montrent qu'outre la fibre de laine [35] ou des adsorbants microbiens [36], la peau d'oranges [37] ou les fibres alimentaires de pommes [38] peuvent être utilisées comme adsorbants des métaux lourds dans le traitement des eaux résiduelles.

La pectine – polysaccharide anionique constitué de parois cellulaires végétales – est obtenue par extraction de la pulpe de betterave, de résidus de pomme ou de peaux d'agrumes et peut être utilisée pour la complexation des métaux lourds conformément à la séquence d'affinité suivante [39]:

$Pb^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+}$

Les études réalisées par Ajmal et al [40] indiquent que les ions nickel ont une affinité plus importante pour les peaux d'oranges que les ions cuivre, plomb, zinc ou chrome.

Schiewer et al. [39] ont utilisé des matériaux bioadsorbants riches en pectine et ont constaté que les peaux de raisins présentent la capacité de rétention de métaux lourds la plus élevée suivie par les peaux d'oranges et de citrons (Figure I.3). La capacité de ces sous-produits à complexer les métaux est proche de celle des autres bioadsorbants tels que les algues brunes, mais les résidus de fruits présentent l'avantage de ne pas nécessiter de dépenses de récolte vu qu'ils s'obtiennent suite à la valorisation de fruits [39].

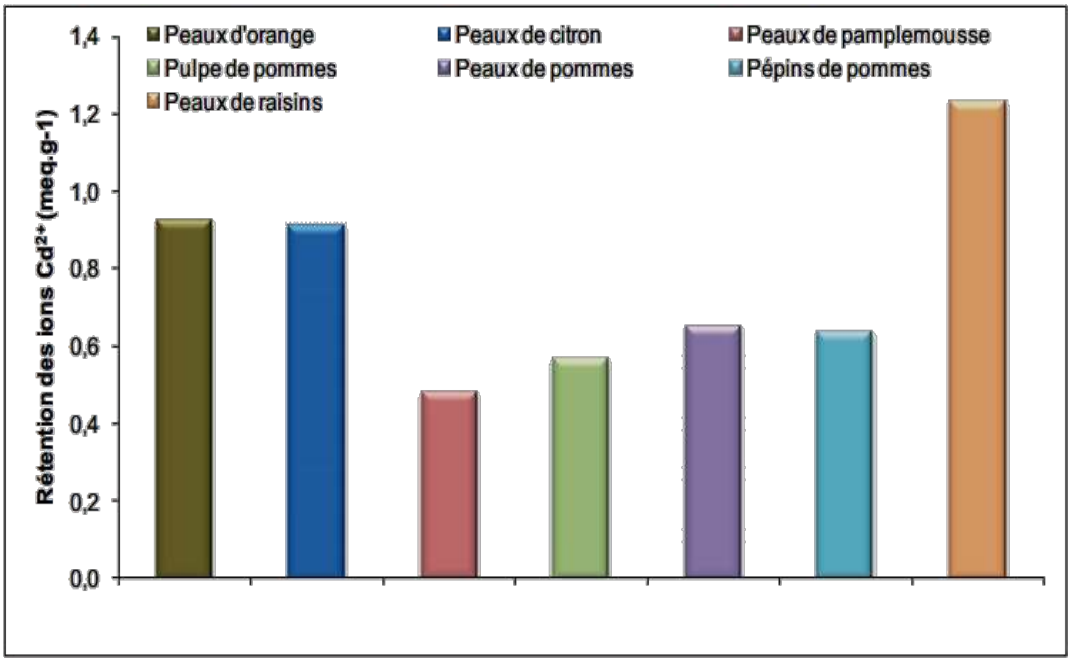


Figure 0-3 Rétention des ions cadmium sur différents sous-produits d'origine végétale (concentration initiale 693 ppm) [39]

I.2.3.2. En bioformulation

Un produit biologique se définit par des conditions de production, de transformation et de conservation [41]. Malgré ce qu'on pourrait penser, un produit biologique n'est pas défini par l'absence de résidus de pesticides. C'est un produit qui est respectueux de la vie et de l'environnement. Les organismes génétiquement modifiés, les hormones, les pesticides et les engrais n'ont pas leur place au sein de l'agriculture biologique.

Dans la même optique, le Guide pratique du Ministère de l'Écologie [42] préconise principalement que seul le composant agricole du produit soit qualifié de « bio », que le produit soit composé d'une part significative d'ingrédients d'origine agricole certifiés biologiques et qu'il ne contienne pas, ou très peu, de substances chimiques de synthèse.

Une étude a été réalisée par Barkat et al. [43] afin de valoriser les écorces du citron (*Citrus limon*) en utilisant leur huile essentielle comme agent naturel conservateur et aromatique. L'essai de formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus limon* a été expérimenté, en vue de les exploiter et de substituer un additif synthétique (le Tocoblend). Les caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées (gras, non gras et point de fusion) s'avèrent conformes à la recette préétablie. L'évaluation de la stabilité oxydative a montré que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* étaient plus résistantes que celle au Tocoblend et que la margarine à l'huile essentielle était la plus

résistante vis-à-vis de l'oxydation forcée, la métrologie sensorielle a été faite par les assesseurs de la margarinerie de Cevital (Algérie) et indique que les margarines aux huiles essentielles obtenues sont considérées comme étant homogènes, de couleur, de saveur et d'odeur acceptables et appréciées.

Au cours de ces dernières années, l'industrie chimique a, pour sa part, profondément évolué en contrôlant la plupart des cycles de vie des produits (production, manipulation et recyclage) et en s'efforçant ainsi à intégrer les principes d'une chimie durable dite chimie écocompatible ou chimie verte [44]. Les concepts principaux (il y en a douze) sont les suivants :

1. prévention de la pollution à la source en évitant la production de résidus,
2. économie d'atomes et d'étapes qui permet de réaliser, à moindre coût, l'incorporation de fonctionnalités dans les produits recherchés tout en limitant les problèmes de séparation et de purification,
3. conception de synthèses moins dangereuses grâce à l'utilisation de conditions douces et la préparation de produits peu ou pas toxiques pour et l'homme et l'environnement,
4. conception de produits chimiques moins toxiques avec la mise au point de molécules plus sélectives et non toxiques impliquant des progrès dans les domaines de la formulation et de la vectorisation des principes actifs et des études toxicologiques à l'échelle cellulaire et au niveau de l'organisme,
5. recherche d'alternatives aux solvants polluants et aux auxiliaires de synthèse.
6. limitation des dépenses énergétiques avec la mise au point de nouveaux matériaux pour le stockage de l'énergie et la recherche de nouvelles sources d'énergie à faible teneur en carbone,
7. utilisation de ressources renouvelables à la place des produits fossiles. Les analyses économiques montrent que les produits issus de la biomasse représentent 5% des ventes globales de produits chimiques et pourraient atteindre 10 à 20% en 2010. Plus de 75% de l'industrie chimique globale aurait alors pour origine des ressources renouvelables,
8. réduction du nombre de dérivés en minimisant l'utilisation de groupes protecteurs ou auxiliaires,
9. utilisation des procédés catalytiques de préférence aux procédés stœchiométriques avec la recherche de nouveaux réactifs plus efficaces et minimisant les risques en termes de manipulation et de toxicité. La modélisation des mécanismes par les méthodes de la chimie théorique doit permettre d'identifier les systèmes les plus efficaces à mettre en œuvre (incluant de nouveaux catalyseurs chimiques, enzymatiques et/ou microbiologiques),

10. conception de produits en vue de leur dégradation finale dans les conditions naturelles ou forcées de manière à minimiser l'incidence sur l'environnement,

11. mise au point de méthodologies d'analyses en temps réel pour prévenir la pollution, en contrôlant le suivi des réactions chimiques. Le maintien de la qualité de l'environnement implique une capacité à détecter et si possible à quantifier, la présence d'agents chimiques et biologiques réputés toxiques à l'état de traces (échantillonnage, traitement et séparation, détection, quantification).

12. développement d'une chimie fondamentalement plus sûre pour prévenir les accidents, explosions, incendies et émissions de composés dangereux.

Ces douze principes de la Chimie verte permettent de participer plus activement au développement durable et de proposer des produits transformés chimiquement plus respectueux de l'environnement.

I.3. Extraction et analyse de molécules bioactives

La récupération des molécules bioactives constitue une des multiples possibilités disponibles pour la valorisation de la biomasse agroalimentaire. De nombreuses études explorent aujourd'hui la possibilité de leur transformation en ingrédients incorporables dans différents produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Cet intérêt particulier est dû au fait qu'au cours des dernières années, les consommateurs ont commencé à se réorienter vers l'utilisation de produits naturels au détriment de ceux issus de la synthèse chimique.

Dans cette étude nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles et des pectines à partir d'écorces d'agrumes.

I.3.1. Extraction des Huiles essentielles

I.3.1.1. Généralité sur les huiles essentielles

Selon Durvelle [45,46], les essences ou huiles essentielles (HE), connues également sous le nom d'huiles volatiles ou de parfums, sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres, inflammables qui s'altèrent facilement à l'air. Elles sont liquides à température ordinaire ; quelques-unes sont solides ou en partie cristallisées. Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité. Leur odeur plus ou moins forte, suave, piquante ou désagréable. Elles ont la propriété de ne pas laisser de tache durable sur le papier.

D'après Naves [47], aucune des définitions des HE n'a le mérite d'être claire, ni précise. Les HEs sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être étendue aux HEs obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de Citrus, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères.

L'Association Française de Normalisation (AFNOR), a défini les HEs comme étant des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Beaucoup de plantes produisent des HEs en tant que métabolites secondaires. Ces derniers ne sont pas essentiels pour la croissance des plantes [48]. Dernièrement, des études ont montré que dans les plantes, les HE ont pour fonction d'attirer les insectes pollinisateurs ou repousser les insectes hostiles. Un certain nombre d'entre elles ont également des propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides [49].

I.3.1.2. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus*

Les HEs sont présentes en quantité appréciable chez environ 2 000 espèces de plantes aromatiques et médicinales, réparties en 60 familles. Elles se localisent dans toutes les parties vivantes (fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines) de la plante et avec une quantité plus importante au niveau des parties supérieures (fleurs et feuilles). Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule [50].

L'accumulation des HEs, partie des métabolites secondaires, se fait généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante telle que les poils sécréteurs pour la famille des Lamiacées, les poches sécrétrices pour les Myrtacées et des canaux sécréteurs pour les Astéracées [51].

Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae* qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices [52].

Dans les fleurs de plantes du genre *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme. Le fruit de *Citrus* se compose de l'épicarpe, l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière (Figure I.4).

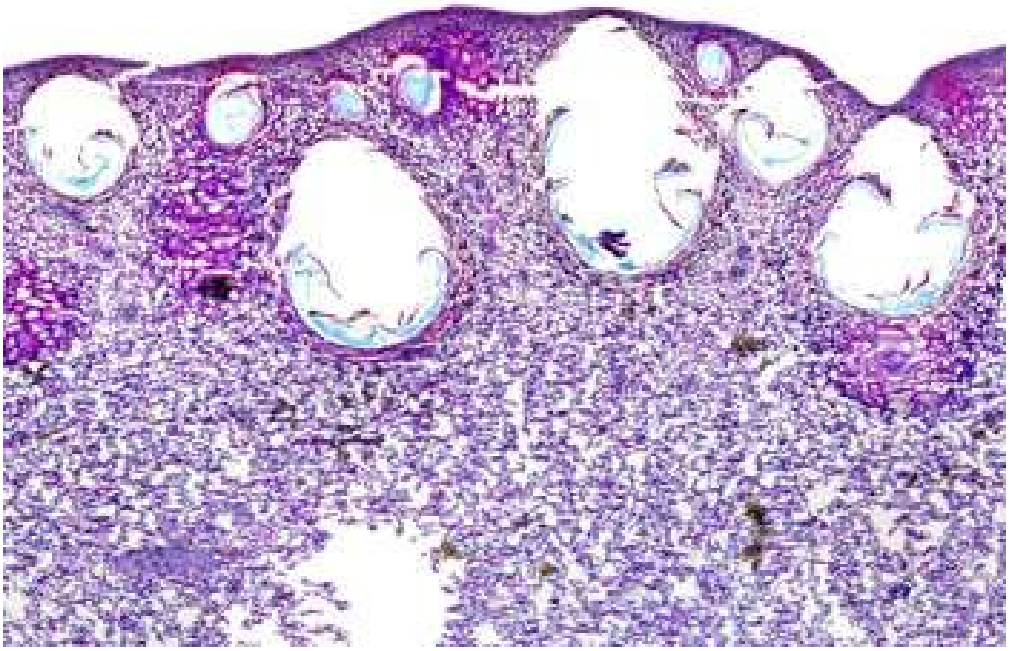


Figure 0-4 Ecorces de citron adulte montrant les glandes schizolysigène (poche à essence) au niveau de l'épicarpe (x4) [53]

I.3.1.3. Classification et composition chimique des huiles essentielles

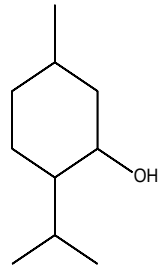
Chaque huile essentielle est très complexe, elle est constituée par un mélange de composants qualitativement définis pour une même espèce, et quantitativement variables suivant le lieu de développement de la plante. De nombreux travaux scientifiques ont mis en évidence la composition des HE. En général, chacune comporte un nombre important de composants (jusqu'à une centaine), tous ne sont pas encore identifiés [54] :

Certains composants, appelés communément terpènes, dérivent de la formule générale $(C_5H_8)_n$ **:**

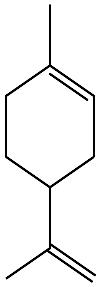
- ✓ n=1 hémiterpènes.
- ✓ n=2 monoterpènes.
- ✓ n=3 sesquiterpènes.

Les terpènes (Figure I.5) peuvent être :

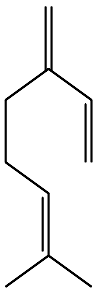
- à chaine ouverte, exemple : Farnésol, Myrcène,
- monocycliques : exemple : limonène, menthol,
- bicycliques : pinène, caryophyllène.



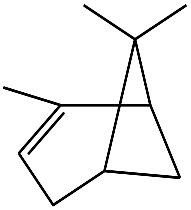
Menthol
(Menthe poivrée)



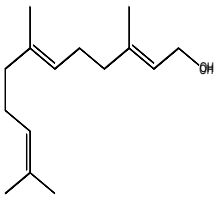
Limonène
(Citron et orange)



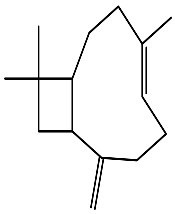
Myrecène
(Feuille de laurier)



Pinène
(Muguet)



Pharnésol (Muguet)
(Clous de girofle)



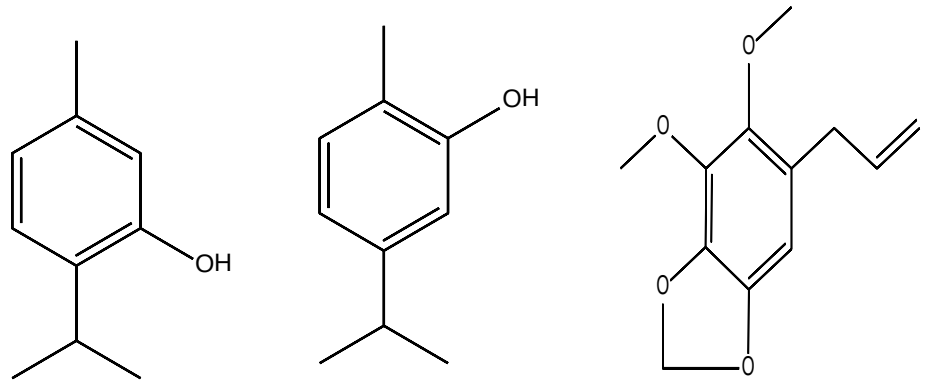
Cariophyllène
(Thérébentine)

Figure 0-5 Structures chimiques de quelques composés terpéniques rencontrés dans les huiles essentielles [55]

D'autres composés peuvent être des hydrocarbures [56]:

- de la série aliphatique :
  - carbures : heptane, hexadécane.
  - alcools primaires (méthyliques).
  - alcools secondaires (méthylcarbinol).
  - acides saturés (isobutyrique, isovalérianique).
  - acides insaturés (diméthylacrylique).

- de la série aromatique :
    - carbures (toluène, paracymène).
    - phénols (thymol, carvacrol, apiol, eugénol)
    - alcools (benzylique).
    - aldéhydes (vanilline).
    - acide (benzoïque).



Thymol (Thym) Carvacrol (Origan) Dillapiol (Anethindien)

Figure 0-6 Structures chimiques de quelques phénols volatils des huiles essentielles [55]

Bien qu'une huile essentielle puisse contenir un grand nombre d'éléments biochimiques, le Tableau I.1 représente les composés les plus communs trouvés dans les huiles essentielles et qui sont classés selon leurs poids moléculaires, leurs températures d'ébullition et leurs solubilités dans l'eau. [57].

Tableau 0.1 Composés les plus communs trouvés dans les huiles essentielles [57]

	Formule moléculaire	Température d'ébullition	Solubilité dans l'eau (g. L^{-1})
Monoterpènes			
Limonène	$C_{10}H_{16}$	175.4	$< 10^{-3}$
Pinène	$C_{10}H_{16}$	157.9	$< 10^{-3}$
Myrcène	$C_{10}H_{16}$	167	$< 10^{-3}$
γ-Terpinène	$C_{10}H_{16}$	183	$< 10^{-3}$
Sesquiterpènes			
β-Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	268.4	$< 10^{-3}$
α-Santalene	$C_{15}H_{24}$	247.46	$< 10^{-3}$
Diterpène			
Phytol	$C_{20}H_{40}O$	335.5	$< 10^{-3}$
Alcools			
Géraniol	$C_{10}H_{17}OH$	229.5	0.67
Linalool	$C_{10}H_{17}OH$	198.5	0.67
Aldéhydes			
Citral	$C_{10}H_{16}O$	210.9	2.61
Cuminic	$C_{10}H_{12}O$	254.6	0.26
Cétones			
Camphor	$C_{10}H_{16}O$	207.4	0.92
Carvone	$C_{10}H_{14}O$	230.5	1.60
Phénols			
Thymol	$C_{10}H_{14}O$	233	0.85
Eugénol	$C_{10}H_{12}O_2$	255	2.52
Acétates			
Neryl acétate	$C_{12}H_{20}O_2$	274.5	0.71
Linalyl acétate	$C_{12}H_{20}O_2$	220	0.57
Oxydes			
1,8-Cineol	$C_{10}H_{18}O$	174.8	5.8×10^{-3}
Linalool	$C_{10}H_{18}O$	198.5	0.67

I.3.1.4. Facteurs influençant la composition chimique

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée [58]. Les conditions externes soit géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences [59]. Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles [60]. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en H.E, par exemple : les *citrus* ont une teneur importante en H.E lorsque la température est élevée [61].

I.3.1.5. Activités biologiques des huiles essentielles

Les HEs sont reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, elles agissent de manière remarquable dans la plupart des domaines de la santé et de la maladie. Ce sont des substances douées d'activités pharmacologiques beaucoup plus importantes que les plantes fraiches [50]. Elles possèdent de nombreuses activités biologiques [61].

En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaires [62] et contre les dermatophytes au niveau de la microflore vaginale [63]. Elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques [64] qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les HEs ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes [65] et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires [66]. Les travaux de Zakarya et al. [67], en étudiant les variations qualitatives et quantitatives de 21 espèces, ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait. L'utilisation des HEs et leurs composants dans l'industrie alimentaire a été l'un des principaux défis pour satisfaire aux exigences des consommateurs qui réclament plus de naturel et des produits peu transformés [68,69]. Selon ces propriétés, les HEs de plantes aromatiques et médicinales ont été utilisée comme agents antimicrobiens naturels et antioxydants rapportés dans la viande, le poisson, les fruits, les

légumes et les produits laitiers [68]. Les HEs les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae :* origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HEs riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries (*E.coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Clostridium spp,Helicobacter pylori*) [70].

Belleti et al. (71) et Fisher et al. (72) ont démontré que les HEs de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que *Mycobacterium jejuni, Listeria monocytogenes, E. coli O157:H7, Staphylococcus aureus, Salmonella Thyphimurium***,** et *Acrobacter butzleri*.

I.3.1.6. Techniques conventionnelles d'extraction

I.3.1.6.1. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. Les particules de vapeur d'eau font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant où la température diminue, provoquant le déclanchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leurs poids spécifiques différents [73]. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques.

I.3.1.6.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation (HD) demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles mais aussi de fournir de meilleurs rendements [74,53]. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité [53,74,75,76,]. Lors de l'extraction des HEs, plusieurs phénomènes sont à la base du transfert de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence de différents paramètres sur la qualité et le rendement de l'huile

obtenue [77]. Ces facteurs peuvent avoir deux types d'origines : naturelle et technologique. La localisation des structures d'élaboration ou de stockage des HEs peut être superficielle ou interne. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'HD, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée d'extraction. Ainsi durant la distillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'HE de cellule sécrétrice interne. La solution aqueuse chargée de composés terpéniques, diffuse ensuite à travers une épaisseur de tissu, plus ou moins dense, selon l'organe, vers la surface extérieure où l'HE est vaporisée et entraînée sous forme d'azéotrope. On attribue le terme d'hydrodiffusion à ce type de transport contrôlé par la polarité des constituants. Ce phénomène est responsable de la vitesse relative de distillation des différentes substances naturelles dépendant davantage de leurs solubilités dans l'eau que de leurs points d'ébullition. Si l'hydrodiffusion constitue l'étape limitant de l'HD, alors l'ordre de sortie des composés est dicté par leur polarité et non par leur volatilité [78,79].

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation [74].

La durée de l'hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement, mais également sur la composition de l'extrait [80].

I.3.1.6.3. Expression à froid

Les HEs d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé de pression à froid [81,82,83]. Ce procédé est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entrainée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation [81]. Diverses techniques manuelle ou mécanique, traitant le fruit entier ou seulement les écorces sont utilisées [53]. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique [81].

I.3.1.6.4. Distillation sèche

La distillation sèche, aussi appelée distillation destructive, est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. On peut ainsi obtenir, à partir du bois, par calcination, de la créosote (mélange de phénols), de l'alcool méthylique et de nombreux autres produits.

En revanche, rares sont les documents se rapportant à la distillation sèche en tant que méthode d'extraction de composés aromatiques volatils. Pourtant, il s'agit d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristique des végétaux fragiles tels que les pétales de rose. Dans le domaine de l'extraction végétale, la distillation sèche consiste à chauffer de façon très modérée les plantes ou parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction : inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles.

La Figure I.7 représente les montages de distillation sèche utilisés pour l'isolement de l'huile essentielle de rose par distillation sèche. Mais si cette technique présente un avantage certain au niveau de la qualité, elle aboutit cependant à des rendements extrêmement faibles en huile essentielle [75].

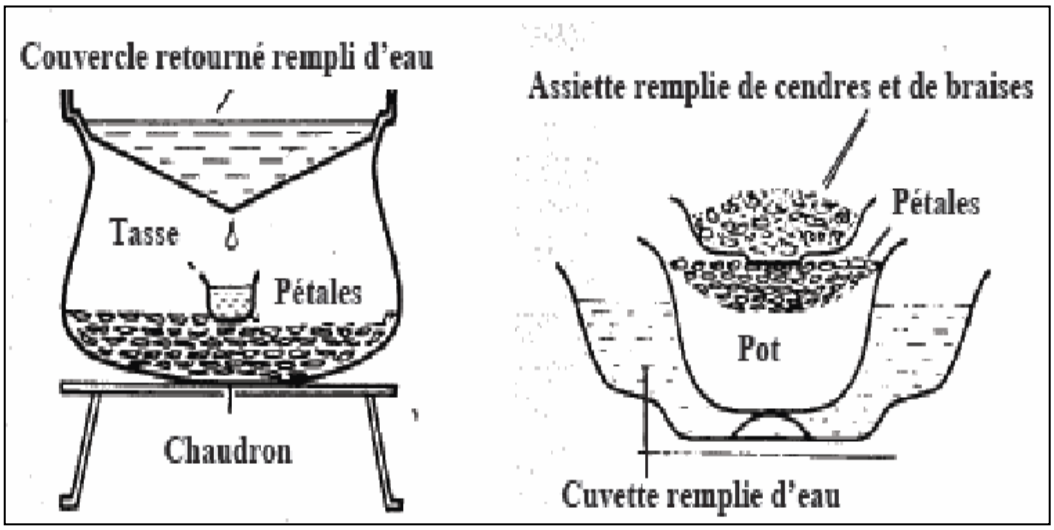


Figure 0-7 Procédé de distillation sèche [75]

I.3.1.7. Extraction par des techniques innovantes

I.3.1.7.1. Extraction par des solvants supercritiques

C'est une nouvelle technologie utilisée industriellement qui fait encore l'objet de nombreuses recherches. L'originalité de cette technique repose sur le comportement du solvant utilisé sous des conditions particulières puisque au-delà d'un certain point, dit point critique, caractérisé par une température (*Tc*) et une pression (*Pc*), les corps purs se trouvent dans un état particulier dit supercritique.

Le fluide supercritique le plus utilisé est le dioxyde de carbone ou CO_2 [84]. Le CO_2 est thermodynamiquement stable, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de

résidus. Son point critique est de *Pc* = 73.6 bar et *Tc* = 31.4 °C. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation [84]. En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars [85].

I.3.1.7.2. Extraction par ultrasons

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante «pré» ou «post» opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous l'effet des ondes ultrasonores et les micros cavitations générées par les ultrasons [86]. Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HEs. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement.

I.3.1.7.3. Extraction assistée par micro-ondes

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux HEs et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entrainées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée [87]. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile (Figure I.8). Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite [88].

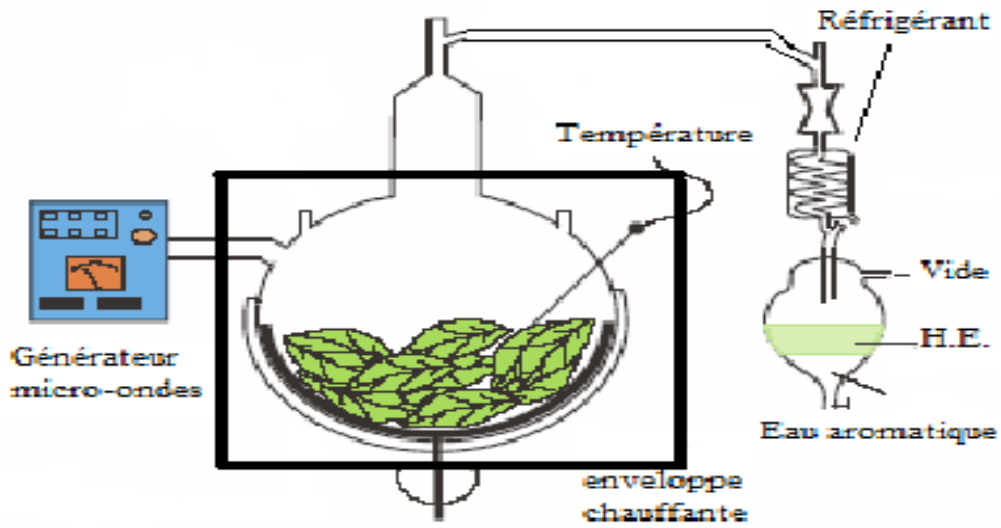


Figure 0-8 Hydrodistillation assistée par micro-ondes [75]

I.3.1.7.4. Extraction assistée par induction électromagnétique

Récemment, l'intérêt a été consacré au chauffage électromagnétique (EM). Le principe de base d'une application de chauffage EM dans un réservoir est de transformer l'énergie EM en énergie thermique [89,90]. Le chauffage par induction électromagnétique (EMI) est une application très directe à la fois de la loi de l'induction (la loi de Lenz) et de l'effet Joule, par un dispositif approprié appelé "inducteur" comme le montre la Figure I.9. Dans ce cas, un champ magnétique alternatif est créé. Tout conducteur parcouru par un courant crée un champ magnétique dont l'intensité est proportionnelle à celle du courant. Conformément à la loi de Lenz, toute substance conductrice d'électricité, si elle se trouve dans ce champ magnétique variable, est le siège de forces électromotrices d'induction, donc de courants induits. A leur tour, ces courants induits appelés courants de Foucault, dissipent de la chaleur par effet Joule dans la substance même où ils ont pris naissance [89].

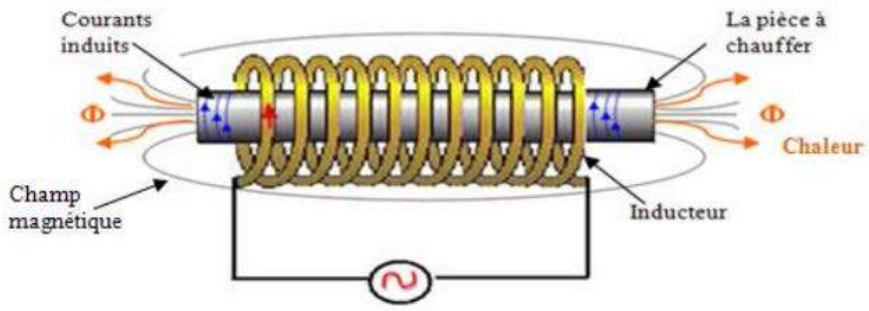


Figure 0-9 Chauffage par induction d'un cylindre

L'hydrodistillation d'huile essentielle par chauffage assisté par induction électromagnétique n'a pas été beaucoup rapportée dans la littérature. Plus récemment, l'étude préliminaire de l'extraction des huiles végétales à partir de clou de girofle et de myrte de citron a signalé que l'hydrodistillation par chauffage ohmique pourrait être proposée comme une méthode améliorée pour l'extraction des huiles essentielles car il avait augmenté le rendement de l'huile extraite [91].Une autre étude portant sur l'hydrodistillation du carvi (*Carum Carvi L.*) par chauffage assistée par induction magnétique a montré que le temps d'extraction est beaucoup plus court que l'hydrodistillation par chauffage classique .[92] Comme le montre l'étude présentée par Bera et al [89], la méthode de chauffage EM est plus efficace sur le plan énergétique que les autres méthodes de chauffage. C'est une technique qui économise du temps (Un temps plus court par rapport à d'autres procédés de chauffage) dans lequel il peut augmenter la température et, par conséquent, augmenter la vitesse de production.

I.3.1.7.5. Autres méthodes d'extraction

Plusieurs autres nouvelles technologies d'extraction des huiles volatiles à partir des plante aromatiques et médicinales sont développées tels que l'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression et l'extraction par la flash détente [53].

I.3.1.8. Caractérisation et analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles doivent répondre à des caractéristiques imposées par les lois des pays producteurs et exportateurs et par les pays importateurs. Ces critères sont définis dans des normes internationales ISO (International Organization for Standardization) ou françaises AFNOR (Association Française de Normalisation) (NF ISO 855). Ainsi, les propriétés organoleptiques et physiques sont contrôlées telles que la coloration, l'odeur, la réfraction, la solubilité, le point éclair mais également les propriétés chimiques telles que les indices d'acides et d'esters [82].

Les huiles essentielles de *Citrus* extraites à partir de zeste de fruit sont largement utilisées dans les industries alimentaires et de parfumerie. Du point de vue commercial, elles présentent une importance économique considérable. Malheureusement, la production et l'introduction des huiles essentielles de mauvaise qualité et/ou altérées dans le marché est une occurrence courante. Par conséquence, les analystes des huiles essentielles des agrumes exigent le développement et la disponibilité des méthodes d'analyses de haute résolution, rapides, sensibles et sélectives [93].

La plupart des méthodes appliquées dans l'analyse d'huiles essentielles reposent sur des procédures chromatographiques. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une huile ; elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative [94]. La CPG couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM), permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, qui sont comparés ainsi avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres [95], ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG [96].

I.3.1.9. Domaines d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) [97]. L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, et aromatiser les aliments [98,99, 97]. Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles [97].

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes [100;101]. L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange [97].

Les huiles essentielles de *Citrus limon* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries [102,103,104]. Récemment, certaines études ont montré la possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent antioxydant [105,106].

I.3.2. Extraction des pectines

I.3.2.1. Généralité sur les pectines

Le terme de pectines désigne un groupe d'hétéropolysaccharides acides qui comporte des domaines structuraux distincts entrent dans la composition des parois cellulaires végétales. Ces molécules sont très utilisées par les industries agro-alimentaires et on estime à environ 5 grammes, la quantité de pectines consommées chaque jour dans un régime alimentaire occidental moyen [107]. Les propriétés biologiques des pectines tant dans le domaine thérapeutique en santé humaine que dans celui de l'organisation et de l'évolution des

structures pariétales en physiologie végétale, font d'elles une classe de molécules remarquables. La relation étroite entre leur structure et leur fonction a motivé de nombreuses études et explique le nombre considérable de références bibliographiques à leur sujet [108].

En effet, la composition des pectines varie bien évidemment en fonction de l'espèce végétale qui est à l'origine de leur synthèse, des procédés d'extraction et de purification mis en œuvre pour les extraire ainsi que d'un certain nombre de caractéristiques écologiques et physico-chimiques de l'environnement [109]. C'est pourquoi, la détection de grandes quantités de pectines dans une source végétale n'est pas un argument suffisant pour que ces dernières puissent être valorisées à une échelle industrielle [110,111]. Il convient donc dans un premier temps de dresser le bilan des données actuellement disponibles dans la littérature sur les pectines en considérant plusieurs aspects complémentaires : leur localisation, et leur caractérisation chimique, leur structure fine, leur organisation tridimensionnelle et enfin leur valorisation dans le domaine thérapeutique et cosmétique.

I.3.2.2. Définition et localisation des pectines

Le nom « pectine » (du grec pektos signifiant « prise en gelée ») a été attribué en1825 par le chimiste français Henri Bracconot aux substances extraites de fruits et qui se gélifient en milieu sucré et acide. Depuis le début du XXème siècle, les pectines sont produites industriellement et utilisées comme agent gélifiant des denrées alimentaires, connu sous le code Européen comme le E440 [112].

Les substances pectiques sont une grande famille des éléments structuraux des parois cellulaires primaires et des régions intercellulaires de plantes supérieurs où elles fonctionnent comme agent d'hydratation et matière de cimentage du réseau cellulosique**.** La figure I.10 montre la localisation de la pectine dans la paroi cellulaire. Elles sont généralement produites pendant les étapes initiales de la croissance de cellules primaires et constitues d'environ un tiers des substances sèches des parois de la cellule. La concentration la plus élevée des pectines dans la paroi des cellules est vue dans la lamelle moyenne, avec une diminution progressive de la paroi de cellules primaires vers la membrane de plasma [113].

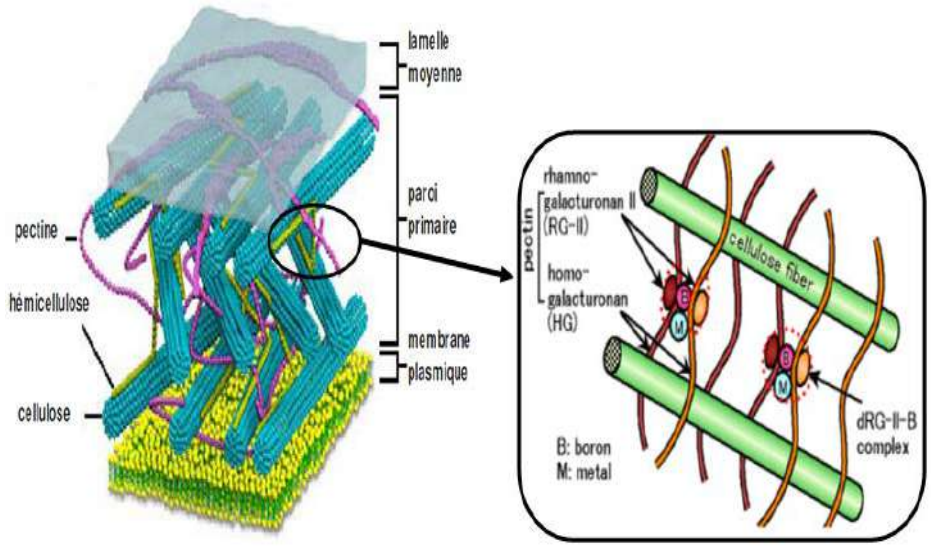


Figure 0-10 Représentation schématique de la localisation de pectine dans la paroi cellulaire [114,115]

Généralement, les pectines sont constituées essentiellement de trois unités structurelles distinctes comme le montre la Figure I.11.

- ***Les homogalacturonanes (HG)***: ils sont composés principalement de chaînes d'acides D-galacturonique liés en α (1→4).

- ***Les rhamnogalacturonanes (RG):*** les RG représentent la liaison entre l'acide galacturonique et le rhamnose, ce dernier est suivi de chaînes d'arabinane et d'arabinogalactane.

- ***Les xylogalacturonanes:*** sont des résidus de xyloses liés à l'acide galacturonique [116].

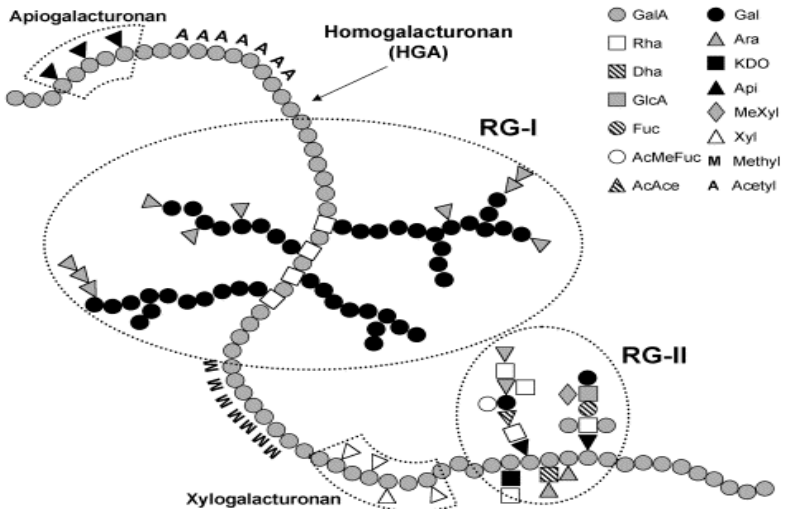


Figure 0-11 Modèle moléculaire de la structure primaire des pectines [117]

I.3.2.3. Sources de pectines à usages industriels

Même si les pectines sont très largement répandues dans les tissus végétaux où elles sont un ciment intercellulaire dans la lamelle moyenne et un liant intermoléculaire dans la paroi primaire, le nombre de sources naturelles qui peuvent être utilisées pour des usages industriels est limité. Les propriétés physico-chimiques des pectines - base de leur utilisation industrielle - dépendent très largement de leurs caractéristiques structurales qui elles-mêmes sont expliquées par la plante qui est à l'origine de leurs synthèses. Le Tableau I.2 précise les sources actuelles de pectines commerciales [118**].**

Tableau 0.2 Principales sources de pectines d'intérêt industriel [119]

Fruits	% de pectines (% massique)
Pomme (*Malus spp*.)	0.5-1.6
Marc de pomme	1.5-2.5
Banane (*Musa acuminata L.*)	0.7-1.2
Pulpe de betterave (*Beta vulgaris*	1.0
Carambole (*Averrhoa carambola*	0.66
Carotte (*Daucuscarota L.*)	0.2-0.5
Goyave (*Psidium guajava L.*)	0.77-0.99
Pulpe de citron (*Citrus lemon L.*)	2.5-4.0
Litchi (*Litchi chinesis S.*)	0.42
Mangue (*Mangifera indica L.)*	0.26-0.42
Zeste d'orange (*Citrus sinensis*)	3.5-5.5
Papaye (*Carcia papaya*)	0.66-1.0
Fruit de la passion (*Passiflora*	0.5
Péricarpe de fruit de la passion	2.1-3.0
Pêches (*Prunus persica*)	0.1-0.9
Ananas (*Ananas sosmosus L.*)	0.04-0.13
Fraise (*Fragaria ananassa*)	0.6-0.7
Tamarin (*Tamarindus indica L.*)	1.71
Mûre (*Rubus rosalfolius*)	0.72
Tomate (*Lycopersicon esculentum*)	0.2-0.6

I.3.2.4. Propriétés physico-chimiques des pectines

I.3.2.4.1. Masse moléculaire

La détermination de la masse moléculaire des pectines est une donnée difficile à mesurer pour trois raisons [120].

- Les pectines sont par définition des molécules hétérogènes ;
- Une fois extraites et purifiées, elles deviennent parfois insolubles dans l'eau qui est pourtant le solvant qui a servi à leur extraction.
- Molécules polyanioniques par définition, les pectines forment - *à la suite d'interactions électrostatiques* - des agrégats multimoléculaires.

La détermination de la masse moléculaire des pectines doit donc être effectuée par plusieurs méthodes physico-chimiques complémentaires, dont la convergence des résultats permettra d'établir une valeur significative de la masse moyenne des pectines. Afin d'en améliorer la précision, les méthodes devront être étalonnées par l'utilisation d'oligogalacturonides et d'acides pectiques et auront recours, pour s'affranchir des interactions électrostatiques intermoléculaires, à l'utilisation de tampons compatibles avec la méthode physico-chimique.

Récemment, Ralet et al. [120] ont développé une technique HPLC d'exclusion stérique couplée au *laser light scattering* (SEC-MALLS) qui améliorerait sensiblement la caractérisation du poids moléculaire des pectines. En fonction des techniques utilisées pour les extraire et les analyser, la masse moléculaire des pectines peut donc varier de quelques dizaines à quelques centaines de KDa.

I.3.2.4.2. Solubilité et précipitation des pectines

Les pectines sont des hydrocolloides, c'est-à-dire des polysaccharides qui, par définition, sont solubles ou solubilisables dans et par l'eau. Cette propriété est à la base même de leur valorisation dans le secteur agro-alimentaire. Toutefois, lors de la solubilisation d'un polymère, il y a compétition entre les interactions macromolécule/solvant et les interactions macromolécule/macromolécule [121]. La pectine est généralement soluble dans l'eau et insoluble dans la plupart des solvants organiques et elle doit être complètement dissoute pour assurer son utilisation entière.

La dissolution complète présume une dispersion sans formation des agrégats. D'une façon générale, tout facteur tendant à diminuer les possibilités d'association intermoléculaire contribue donc à augmenter la solubilité des macromolécules.

Les pectines, comme d'autres agents gélifiants, ne se dissoudront pas dans un système ou les conditions de gélification existent. L'augmentation des quantités du sucre et des ions de calcium dans l'eau donne une pectine de plus en plus difficile à se dissoudre. En conséquence, il est toujours recommandé de dissoudre la pectine avec un taux de solide soluble au-dessous de 25% et de préférence dans l'eau chaude pour assurer l'hydratation et la désintégration maximale des grands agrégats moléculaires présents dans la poudre de pectine. Les substances pectiques sont également solubles dans la formamide, le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde [122,123].

La solubilité des substances pectiques dans l'eau et les différents solutions organiques dépend de plusieurs facteurs [122,123] **:**

- la diminution du poids moléculaire et l'augmentation de degré de distribution des groupes carboxylique augmentent la solubilité des substances pectiques dans l'eau.
- les acides pectiques et les acides pectiniques avec un faible degré d'estérification sont seulement solubles comme sel de sodium ou de potassium.
- l'état d'ionisation des groupes carboxyles, le degré de polymérisation et leur distribution car l'ionisation de ces fonctions permet l'individualisation des chaînes grâce aux répulsions électrostatiques entre les charges et donc la solubilisation du polymère.
- le pH, la température, la nature et la concentration des pectines ont un rôle important sur la solubilité, celle-ci peut être augmentée en empêchant les associations moléculaires (présence de substituant ; augmentation du degré de méthylation) ou en augmentant la force ionique (échange des charges).
- l'hydrosolubilité des substances pectiques croit avec l'augmentation de degré de méthylation (DM), les pectines hautement méthylées (HM) très solubles dans l'eau.

En effet, tout facteur tendant à diminuer les possibilités d'association intermoléculaires contribue donc à augmenter la solubilité des macromolécules. Ces dernières peuvent être d'ordre stérique (présence de substituant) ou chimique (présence des groupes de liaisons ionisés).

En général, les substances pectiques d'un DM supérieur à 50% ne sont pas précipitées par les cations polyvalents. Pour une valeur de DM (50-60%), une pectine ayant une distribution au hasard des groupes méthyles ne sera pas précipitée par les cations divalents, alors qu'une pectine dont les fonctions acides libres sont regroupées dans une partie de la macromoléculaire se montra sensibles à la présence de cations [123, 124].

I.3.2.4.3. Viscosité des pectines en solution

Les solutions des pectines ont des viscosités relativement faibles comparées à d'autres hydrocolloïdes végétaux [122]. Dans l'eau, les substances pectiques forment des solutions visqueuses, la mesure de la viscosité est utile pour étudier leur dégradation ou pour évaluer leur masse moléculaire. Dans les solutions diluées, où les interactions entre les molécules de pectine sont négligeables, la viscosité augmente avec l'augmentation de la dissolution des groupes carboxyliques, et atteint un plateau quand presque la dissolution complète est obtenue [125]. Ce phénomène peut être interprété par l'augmentation du volume hydrodynamique de la molécule provoqué par les répulsions entre les groupes carboxyliques chargé adjacents. [126].

La viscosité est une fonction de certains paramètres qui sont [122,123]:

- la concentration (la viscosité des pectines comme pour toutes les macromoléculaires augmente avec l'augmentation de la concentration en pectines dans la solution) ;
- la masse moléculaire de la pectine, la taille et la forme des molécules ;
- le DM (degré de méthylation), et du pH ; la viscosité des solutions de pectines totalement méthylées comportant des fonctions carboxyliques libres. En effet, ces groupes acides peuvent s'ioniser par élévation du pH provoquant une répulsion électrostatique et une augmentation du volume hydrodynamique de la macromoléculaire, ce qui entraîne un accroissement de la viscosité.
- la présence d'électrolytes masque les fonctions carboxyliques dissociées, donc les effets électrostatiques sont annulés et la viscosité ne change pas.
- le degré de polymérisation (la viscosité augmente avec l'augmentation du degré de polymérisation).

Mais la formation des agrégats macromoléculaires et les interactions avec les électrolytes ou les molécules d'eau peuvent affecter les propriétés d'écoulement de la solution [123].

I.3.2.4.4. Propriétés gélifiantes et stabilisantes

Les substances pectiques peuvent former des gels sous certaines conditions, ces propriétés sont très largement utilisées en industrie agroalimentaire où les pectines sont utilisées comme épaississant des solutions et stabilisant des émulsions. La formation d'un gel nécessite la constitution d'un réseau tridimensionnel retenant entre ses mailles la phase liquide, les macromolécules doivent donc fortement s'associer entre elles. Dans le cas des substances pectiques, les groupes hydroxyles et les fonctions acides peuvent permettre l'établissement de

liaisons hydrogènes ou de liaisons de type ioniques. Les substances pectiques hautement métylées (HM) et faiblement méthylées (FM) donnent des gels dans des conditions différentes [122].

Les gels de pectines sont des gels physiques formés par associations locales entre les chaines macromoléculaires au niveau de zones de jonctions. La nature exacte de la zone de jonctions dépend de la structure chimique des pectines et doit être d'une longueur minimale pour être stable compte-tenu des caractéristiques du milieu. Outre un nombre non négligeable de facteurs intrinsèques (masse moléculaire, charge….) et extrinsèque (température, pH, force ionique, nature des ions dans le milieu…), les mécanismes de gélification sont principalement gouvernés par l'appartenance des pectines aux familles HM ou FM [127].

a/ Gélification des pectines HM

Une application connue depuis longtemps de ce type de pectine réside dans la fabrication des confitures ; en présences de sucre et en milieu acide, les pectines HM forment des fruits gélifiants. Les zones de jonction de ce type de gels sont formées de segments de deux molécules, ou plus, qui sont stabilisés par une combinaison de liaisons hydrogène et hydrophobe [127].

La gélification a lieu en milieu acide (pH<3.5), permettant le rapprochement hydrogène et en présence de Co-soluté (généralement du saccharose) destiné à promouvoir les interactions hydrophobes en diminuant l'activité de l'eau. La gélification se produit au cours de refroidissement dans les conditions appropriées. La vitesse de gélification augmente si la température ou le pH diminue et si le DM ou la teneur en co-soluté augmente. Les gels obtenus ne sont pas thermoréversibles [127].

b/ Gélification des pectines FM

Le mode de gélification des pectines FM est totalement différent de celui des pectines HM. Il requiert la présence d'ions divalents et conduits à des gels qui peuvent être thermoréversibles. Une augmentation de température se traduit par affaiblissement des zones de jonctions et une diminution de la force de gel [127]. Les gels de pectines FM peuvent se former dans une zone de pH de 2.5-6.5 avec ou sans sucre, la quantité de calcium nécessaire (en mg de calcium par g de pectine) varie entre 10-60 selon le DM et selon le mode de dé-estérification [122,124].

Le calcium est le principal ion utilisé pour la gélification des pectines FM car il est naturellement présent dans les fruits ou ajouté artificiellement. Comme les pectines FM, la

gélification des alginates à également lieu en présence de calcium. L'agrégation des chaines d'alginates a été présentée comme un phénomène électrostatique suivant le modèle de la «boit-à-œufs». Par homologie avec l'alginate, ce modèle a été appliqué aux pectines FM [128].

I.3.2.4.5. Propriétés émulsifiantes

La seule substance hypocycloïde commercialement reconnue comme émulsifiante est la gomme arabique (Acacia senegal) [129], mais la cherté de la gomme arabique amènera à rechercher d'autres hypocycloïdes pouvant émulsifier des systèmes: huile dans eau. Ce sont les pectines de betteraves et des pectines dépolymérisées d'agrumes et de pommes qui s'avèrent aptes à émulsifier et stabiliser des systèmes biphasiques : huile dans eau.

Le mécanisme d'émulsification des pectines commence par la formation des gouttelettes d'émulsion, par la fraction protéique, par son caractère amphotère, ensuite ces gouttelettes sont stabilisées par les chaînes polysaccharidiques hydrophiles qui fournissent une couche protectrice épaisse le long des molécules. La présence des groupements acétyles contribue à une forte stabilité de l'émulsification [130,131].

I.3.2.5. Méthodes d'extraction des pectines

Dans la paroi végétale, les pectines existent sous des formes liées (en association avec d'autres polymères pariétaux) et sous formes libres. Les pectines libres (ou pectines solubles) proviennent généralement des activités endogènes des enzymes et des agents chimiques de la paroi sur les pectines liées. Une action physique peut aussi provoquer la libération et la solubilisation des pectines initialement liées. Les pectines peuvent par conséquent être extraites des parois végétales par trois différentes méthodes : Chimique, Enzymatique et Physique.

I.3.2.5.1. Extraction chimique

En industrie, les principales fonctionnalités recherchées des pectines sont les propriétés gélifiantes. Il s'agit donc de produire des pectines solubles en milieu aqueux capable de former des gels dans des conditions précises. Actuellement les recherches sur les pectines s'orientent vers d'autres applications, leur activité émulsifiante et la stabilité des émulsions d'huile dans l'eau [132].

La plupart des pectines solubles des fruits passent dans le jus. L'extraction consiste à solubiliser les pectines restantes dans les pulpes ou les écorces, à l'aide d'acide dilué à chaud.

Les deux matières premières qui servent à produire des pectines commerciales sont les écorces (humides ou sèches) d'agrumes et des marcs (secs) de pomme. Leurs teneurs sont relativement importantes : 10-15 % pour les marcs secs de pommes [120,133] et 20-30 % pour les pelures sèches d'agrumes [120, 130,134].

En général après extraction industrielle du jus de citron ou de pomme, les marcs de pommes sont rapidement séchés tandis que les pelures d'agrumes sont d'abord blanchies avant d'être séchés, pour éviter une désintégration de matière, lors de l'extraction des pectines et pour empêcher tout développement de microorganismes susceptibles de produire des enzymes de dégradation des pectines, et augmenter la stabilité du produit pendant le transport et le stockage [120, 135].

Le processus de production de pectines comprend trois étapes principales:

- préparation de la matière première et solubilisation de la protopectine.
- précipitation alcoolique des pectines.
- lavage, séchage, broyage et standardisation des pectines extraites.

Les pectines sont extraites des matériels pariétaux par un acide dilué, communément avec l'acide nitrique. Les conditions d'extraction (pH, température, temps et rapport: solide-liquide) doivent être optimisées pour obtenir chaque type de pectine avec des rendements acceptables. Pour des pH de l'ordre de 1.5 à 3 et des températures de 60 à 100° C, la durée de l'extraction peut varier de 30mn à plusieurs heures.

Le rapport solide-liquide doit être correctement défini pour assurer une bonne agitation du milieu réactionnel au cours de l'extraction et une séparation aisée du liquide de la matière insoluble. Il se défini en tenant compte de la nature (humide ou sèche) des matières premières.

En général, les pectines de marcs de pommes sont extraites avec un rapport solide –liquide plus élevé (1/17) que les pectines d'écorces sèches d'agrumes (1/35), car les premières sont plus sujettes à la désintégration.

A la fin de l'extraction, les deux phases sont séparées par centrifugation et/ou filtration. Cette étape est assez délicate car la séparation des liquides visqueux des particules solides est parfois moins aisée, surtout pour des matières sujettes à la désintégration. Ces opérations sont souvent réalisées à températures relativement élevées dans le but de diminuer la viscosité. Cette étape requiert par conséquent l'établissement d'un bon compromis entre une extraction efficace et une séparation aisée [120,134]. Toutes les deux dépendent du rapport solide-liquide.

Les extractions limpides obtenues contiennent environ 0.3-0.4 % de pectines [134], qui sont ensuite récupérées par précipitation soit dans l'alcool (isopropanol, méthanol ou éthanol) soit dans les sels à bases d'aluminium (chlorure et sulfate) [135,136,137]. Les précipités sont récupérés par centrifugation et filtration et puis graduellement purifiés de contaminants de toutes sortes (pigments, métaux lourds, polyphénols, etc.) par plusieurs lavages avec l'alcool à différentes concentrations [134].

Les opérations de broyage et de tamisage sont ensuite effectuées, car les pectines sont le plus souvent vendues sous forme de poudres [138].

I.3.2.5.2. Extraction enzymatique

Les enzymes non pectolytiques sont les cellulases, hémicelluloses et protéases. Ces enzymes solubiliseraient les pectines par destruction des réseaux celluloses, hémicelluloses et protéiques [139].

En comparaison avec l'extraction acide, l'extraction des pectines par les enzymes non pectolytiques conduit à un rendement plus important [138]. En revanche les pectines extraites par ces types d'enzymes ont des masses molaires et des viscosités intrinsèques moins élevées que les pectines extraites par voie acide. De plus leur pouvoir gélifiant est quasiment nul [138,139]. Le Tableau I.3 donne une comparaison entre l'extraction enzymatique et l'extraction chimique.

Tableau 0.3 Comparaison entre les pectines de citrouille extraites par voie enzymatique et voie chimique [139]

	Extraction enzymatique	Extraction chimique
Rendement (%)	14	7
Humidité (%)	09	92
Cendre (%)	5	3.7
Acide galacturonique (%)	64	79
DE (%)	53	66
Masse moléculaire (KDa)	45	70

Une préparation enzymatique de *Bacillus subtilis* possédant des activités principales d'endoarabinase et d'endogalactanase et une activité résiduelle d'endopectatelyase, a permis l'extraction de pectines de différentes parois avec des rendements assez importants suivant l'origine végétale [140].

I.3.2.5.3. Extraction physique

L'extraction des pectines de parois végétales exige un milieu aqueux (eau pure, agent chimique dilué ou enzymatique). Cependant de nombreux procédés d'extraction des pectines sont considérés comme physiques (ou mécaniques). Parmi ces procédés on trouve :

- extraction par cuisson– extrusion.
- extraction par Micro-onde [141].
- extraction par Soxhlet ou pression manuelle.
- extraction par Flash-détente.

Le rendement et la composition osidique des pectines extraites par cuisson-extrusion varient en fonction des paramètres d'extraction. Le rendement est dans certains cas similaire à celui obtenu par extraction acide [138].

L'extraction par Soxhlet donne un rendement pectique plus important que l'extraction par pression manuelle. Cette dernière conduit dans certaines conditions à un rendement plus élevé que l'extraction assistée par micro-onde [141].

I.3.2.6. Analyse et caractérisation structurale des pectines

I.3.2.6.1. Analyse des compositions monosaccharidiques

Le dosage et l'identification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessitent la rupture de toutes les liaisons glycosidiques. L'analyse repose d'une part sur des techniques colorimétriques et d'autre part sur des techniques chromatographiques en phase gazeuse.

Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosage simples à mettre en œuvre et rapides, qui s'appliquent aussi bien à des résidus qu'à des extraits et permettent de doser de manière globale les sucres totaux et de manière spécifique les acides uroniques.

Le principe des dosages colorimétriques repose sur la condensation, par estérification, d'un chromogène avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5-hydroxyméthylfurfural et de l'acide 5-formylfuroïque. Les chromophores ainsi

formés absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité de sucres présents. Le dosage de la quantité de sucres totaux, mesurée selon la méthode de Dubois [142], utilise le phénol plus sensible à la détermination quantitative des oses que des chromogènes tels que le naphtol ou l'anthrone. Le *méta*-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium a été utilisé comme chromophore sélectif lors du dosage des acides uroniques. Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidiques ont été déterminées par la méthode de correction développée par Montreuil et Spick [143].

Le dosage des oses réducteurs peut être déterminé par la méthode de Nelson Somogiyi ou encore par celle de l'acide parahydroxybenzoïque hydrazide (PAHBAH) de Lever **[**144**]**. Les monosaccharides libérés sont ensuite analysés aussi bien par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) que par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en utilisant diverses procédures de dérivation.

I.3.2.6.2. Analyse structurale des polysaccharides pectiques

La méthodologie d'analyse d'un polysaccharide repose sur l'obtention d'unités oligosaccharidiques plus faciles à caractériser par les techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM). L'obtention des oligosaccharides est réalisée principalement par une hydrolyse acide ou enzymatique. Néanmoins, il faut préalablement purifier ces mélanges complexes par diverses techniques chromatographiques comme l'exclusion stérique en fonction de la masse moléculaire des composés et la chromatographie d'échange d'ions en fonction de la charge des molécules.

La spectroscopie infra-rouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu de quantités de matières à analyser. Basée sur les transitions entre les états vibrationnels et rotationnels d'une molécule, elle peut être employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés. Certains groupements ou liaisons, considérés comme marqueurs et notamment les fonctions acides carboxyliques des acides galacturoniques, peuvent révéler la présence des pectines [145].

La spectroscopie RMN est une méthode physicochimique non destructive permettant, à partir de quelques micromoles de polysaccharide, de réaliser le dosage et l'identification de chacun des monosaccharides, d'en préciser l'enchaînement, et leurs points de branchement [146,147].

I.3.2.7. Applications des pectines

Les applications traditionnelles des pectines ont été dans le domaine alimentaire. En fait les pectines ont été toujours un constituant naturel de l'alimentation humaine. Les pectines sont utilisées dans différents aliments comme gélifiant, épaississant, texturant, émulsifiant et stabilisant. Dans les années récentes, les pectines ont été utilisées comme substituts de la graisse ou du sucre dans les aliments à faible teneur en calories [119,136,148].

Les arabinogalactanes ont des applications en minéralurgie (pour le traitement des minerais) ou dans l'industrie pharmaceutique (comme liants dans les comprimés ou émulsifiants). Dans les applications non-alimentaires, la filière principale est l'industrie pharmaceutique. Dans ce domaine, les pectines contribuent aux activités, antiulcère, antityphoïde, antidiarrhée, anticholestérol et pour la libération contrôlée de médicaments [119,148].

Ainsi, les substances pectiques ont pris une place importante dans le monde des polymères comme le prouve le nombre croissant des études citées. Outre, l'intérêt connu de ces substances pectiques, leur modification chimique en dérivés amphiphiles s'est développée malgré le peu d'informations disponibles. Ces dérivés, qui ont notamment des potentialités intéressantes en solution et aux interfaces, offrent un large spectre d'applications dans divers domaines pharmaceutiques et/ou agroalimentaires.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Notre travail a été réalisé sur les écorces de trois espèces d'agrumes à savoir *C. limonum* (Citron), *C. sinensis* (Orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange) par extraction de biomolécules qui sont les huiles essentielles et les substances pectiques. La récolte a été réalisée durant la période allant du mois de décembre jusqu'au mois de Avril. Les fruits soigneusement collectés, ont été lavés par l'eau de robinet et essuyés avec une serviette propre.

a/ Citron

Le citron (*Citrus limonum*) est un agrume, fruit du citronnier. Le citronnier (*Citrus limonum*) est un arbuste de 5 à 10 m de haut, à feuilles persistantes. Le fruit a une écorce lisse jaune éclatante (Figure II.1). Sa chair est juteuse, très acide et riche en vitamine C. De l'écorce jaune, on extrait une huile essentielle qui contient entre autres substances du limonène et du citral. Il est principalement cultivé en Italie, aux États-Unis et en Argentine [149].

Dans cette étude, nous avons utilisé les écorces des citrons. Ces citrons, issus de la région de Mitidja, ont été soigneusement sélectionnés de façon à choisir que les bons citrons qui possèdent de grosses écorces.

b/ Citrange

Le citrange est une espèce hybride de l'oranger (*Citrus sinensis*) et du citronnier épineux (*Poncirus trifoliata*). Ce croisement était une tentative pour créer un citronnier/oranger vigoureux et résistant au froid donnant des fruits délicieux. Cependant, la plupart des citranges sont amers. Cet hybride a été créé par Webber et Swingle [150]. Les citranges possèdent d'abord une rusticité intermédiaire, ils ont tous de même une résistance au froid très intéressante, de l'ordre de -10 à -12°C ; ils sont également très utilisés en tant que porte-greffe, donnant notamment une vigueur plus importante à l'arbre que *Poncirus trifoliata*. Les citranges sont des arbustes très intéressants et décoratifs, encore rares à la vente [151]. Dans cette étude, nous avons utilisé les fruits de citrange (Figure II.1). Ces derniers ont été récoltés à partir des arbres du citrange cultivés dans la région de Ain D'Heb située dans la wilaya de Médéa. Ces fruits ont été récoltés en fin de maturité et ils ont été sélectionnés de façon à ne retenir que les fruits sains.

c/ Orange

L'orange douce est le fruit de l'oranger (*Citrus sinensis)*, un petit arbre de la famille des Rutacées poussant sous les climats méditerranéens ou chauds, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant, la floraison blanche très parfumée. Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir [152] Les agrumes étudiés sont très cultivés en Algérie surtout dans la région de Mitidja.



Figure II-1 A) Orange ; B) Citrange ; C) Citron

II.2. Réactifs et solvants

L'eau déminéralisée est utilisée pour la préparation de toutes les solutions. L'acide chlorhydrique (37%), l'acide sulfurique (95%), le glycérol (99-101%), l'Acétone (99%), l'Ethanol (96%), l'hydroxyde de sodium, le chlorure de sodium, le sulfate de sodium, le Tween 80 (polysorbate 80), la pectine industrielle hautement méthylée ont été fournis par Sigma-Aldrich. Le DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), le bouillon et la gélose de Muller Hinton sont fournis par Fluka. L'acide ascorbique (99.85%) a été fourni par Shandong Luwei Pharmaceutical Co. Hexamétaphosphate de sodium $(NaPO_3)_6$ fourni par Sigma-Aldrich.

II.3. Détermination de la teneur en eau

Le teneur en eau des espèces végétales étudiées est déterminé selon la pharmacopée européenne à partir d'une masse de matière végétale introduite dans un creuset en porcelaine taré, puis séchée dans une étuve à 103°C. Les échantillons sont ensuite pesés avec précision toutes les vingt minutes, après avoir été refroidis à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à obtention d'un poids constant.

La teneur en eau (T) est exprimée en pourcentage (%) est donnée par la relation suivante :

$$T = (m_i - m_f)/m_i * 100 \qquad (II.1)$$

Où m_f est la masse sèche des écorces d'agrume et, m_i est la masse initiale des écorces d'agrume fraîches.

II.4. Extraction des huiles essentielles

II.4.1. Procédure d'extraction

Dans cette partie, nous avons opté pour l'extraction des huiles essentielles (HEs) des agrumes par hyrodistillation en adoptant deux modes de chauffage à savoir le chauffage classique (CC) et le chauffage par induction électromagnétique (IM).

II.4.1.1. Extraction par hydrodistillation par chauffage classique (HCC)

Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation. Une quantité de zeste d'agrumes frais est introduite dans un ballon de 500 ml contenant une quantité d'eau distillée suffisante pour l'imprégner. Après installation, la mise en marche du chauffe ballon est effectuée avec un réglage adéquat du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée.

II.4.1.2. Extraction par hydrodistilation assistée par induction électromagnétique (HIM)

L'extraction par induction électromagnétique a été réalisée sur une plaque chauffante vitrocéramique à induction magnétique (Samsung) caractérisée par 9 niveaux, chaque niveau correspond à une puissance précise voir une température bien déterminée. Dans notre étude et pour atteindre la même température utilisée pour le chauffage classique, le niveau 7# a été choisi.

Le montage utilisé est présenté dans la Figure II.2. Il est constitué d'un réacteur (1500ml) en acier inoxydable magnétique compatible avec le type de chauffage, dans lequel une quantité de matière végétale fraiche est introduite imprégnée d'eau distillée. Le système de réfrigération est composé d'un réfrigérant afin d'assurer une condensation et un refroidissement maximal du fluide hydrodiffusé saturé en molécules aromatiques et d'obtenir un liquide le moins chaud possible pour éviter une dégradation thermique éventuelle des molécules aromatiques. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par simple décantation, Elle est ensuite séchée par sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis récupérée et conservée dans des vials de couleur brune, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation.



Figure II-2 Montage d'hydrodistillation assistée par induction électromagnétique

II.4.1.3. Suivi de la cinétique d'extraction

Selon Bachelot et al. [153], la cinétique d'extraction a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes du temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Dans notre étude, le rendement a été déterminé chaque 07 min en tenant compte du temps d'extraction dès la formation de la première goutte du distillat; cette étape correspond à l'élévation de la température d'ébullition d'eau.

La cinétique a été explorée en effectuant des prélèvements à intervalles de temps réguliers sur le distillat durant l'extraction afin d'en récupérer des quantités importantes et surtout mesurable.

II.4.1.4. Calcul du rendement en huiles essentielles

Selon la norme AFNOR [154], le rendement d'extraction est le rapport entre la masse de l'HE extraite et la masse de la matière végétale utilisée. Le rendement ($R_{H.E}$) est exprimé en pourcentage (%) et il est calculé par la formule suivante:

$$R_{H.E} = (m_{HE}/m_{MV}) * 100 \qquad \text{(II. 2)}$$

Où m_{HE} est la masse de l'huile essentielle en gramme, m_{MV} est la masse de la matière végétale en gramme.

II.5. Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles extraites

II.5.1. Détermination des indices physico-chimiques

a/ Densité relative

Selon la norme AFNOR, la densité relative est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle à 20 ºC, à la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est d_{20}^{20} [155]. La densité relative est donnée par la formule suivante :

$$d = \rho_{huile}/\rho_{eau} = (m/V)_{huile}/(m/V)_{eau} \quad \text{(II.3)}$$

b/ Indice de réfraction

Selon la norme AFNOR [115], l'indice de réfraction d'une HE est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à température constante.

L'indice de réfraction n_D^T, à la température de référence (T=20°C) est donné par la formule suivante :

$$n_D^T = n_D^{T'} + 0.0004(T' - T) \quad \text{(II. 4)}$$

Où T'est la température de l'expérience (25°C).

c/ Mesure du pouvoir rotatoire

Selon la norme AFNOR [115], la mesure du pouvoir rotatoire est obtenue à l'aide d'un polarimètre de type Laurent. Il est composé d'une source lumineuse de longueur d'onde (589.3 ± 0.3 nm). Pour ce faire on remplit la cellule avec une huile essentielle déjà diluée dans l'éthanol, puis l'angle de rotation de la lumière polarisée est lu directement sur l'appareil.

Le pouvoir rotatoire spécifique [α] est donné par la formule suivante :

$$[\alpha]^T = \frac{\alpha}{l} * C \quad \text{(II.5)}$$

Où α est la valeur lue sur l'appareil en degré d'angle, *l* est l'épaisseur du film (cellule) en dm et C, la concentration de l'huile essentielle exprimée en en (g/ml)

II.5.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) ont été réalisées avec un GC HP 6890 (II) couplé à un spectromètre de masse HP 5973. L'appareil de chromatographie est équipé d'une colonne capillaire RTX-5MS (30 m, ID 0.25 mm, 0.25 µm épaisseur de film). La quantité injectée est 1µl de HE 1% v/v (Hexane). Le débit d'hélium dans la colonne est de 1 mL/min.

La température du four est programmée à 40°C durant 8min puis a été augmentée à 180°C avec une vitesse de chauffage de 3 °C/min, et avec 20°C/min de 180°C à 230°C. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur est de 210°C. On a appliqué un split de 1:100. Les spectres de masse sont enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

L'identification des constituants de l'huile essentielle se fait par comparaison du spectre de masse de chaque pic séparé par GC avec ceux reportés comme références dans des bases de données spécialisées de spectrométrie de masse : NIST-MS (National Institute of Standards and Technology Mass Spectra) et Wiley Library.

La fiabilité de la reconnaissance est principalement donnée par un taux de vraisemblance (supérieur à 90 %) du spectre de masse du soluté inconnu par rapport à celui de la banque de données. Cette présence est confirmée par le calcul des indices de rétention propres à ce composant.

Le système des indices de rétention de Kovàts est d'un usage général ; il a dépassé largement le cadre de l'analyse qualitative pure et simple. Il est utilisé pour caractériser les phases stationnaires [156]. Dans les conditions de montée linéaire de la température de la colonne, Van Den Dool et Kratz [157], ont donc proposé la formule suivante de calcul des indices :

$$\mathrm{I_R} = 100 * \frac{(T_R)_i - (T_R)_n}{(T_R)_{n+1} - (T_R)_n} + 100 * n \qquad \text{(II. 6)}$$

Où I_R est l'indice de rétention du soluté considéré, $(t_R)_i$ est le temps de rétention du soluté considéré, $(t_R)_n$ est le temps de rétention de l'alcane contenant "n" atomes de carbone et dont le pic précède celui du soluté, $(t_R)_{n+1}$ est le temps de rétention de l'alcane contenant "n+1" atomes de carbone et dont le pic sort après celui du soluté, n et n+1:sont les nombres de carbones des hydrocarbures (n-alcanes).

II.6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites

L'activité antioxydante des huiles essentielles extraites a été évaluée *in Vitro* par la mesure du pouvoir de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•).

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517nm. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure II.3).

Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire [158].

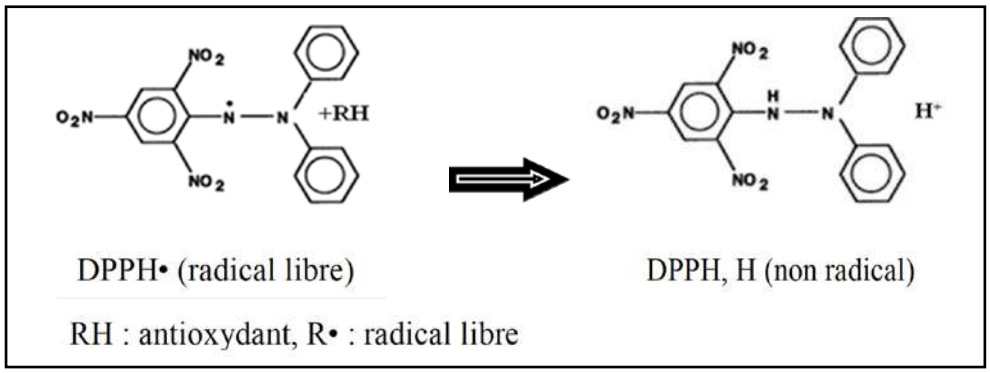


Figure II-3 Réaction du DPPH• avec un antioxydant [159]

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH•**.** L'effet de chaque extrait sur le DPPH• est mesuré par la procédure décrite par Benhammou et al. [160].

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 0.004% de DPPH dans l'éthanol, différentes concentrations de solutions échantillons sont ajoutées à 1ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurés à 517 nm contre le blanc correspondant. Le paramètre IC50 (concentration inhibitrice à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui conduit à la perte de 50% de l'activité de DPPH. Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical. Les résultats exprimés en IC50 sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque échantillon. Le pouvoir d'inhibition (%) est déterminé en appliquant la formule suivante [158].

$$\%\ \text{d'activité antioxydante} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})/\text{Abs échantillon} * 100 \qquad \text{(II.7)}$$

II.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielle testées a été réalisée par deux méthodes : des aromatogrammes et celle de dilution. Dans cette partie, nous avons testé quatre souches microbiennes, trois souches bactériennes et une souche de levure**.**

- ***Microorganismes testés***

Le pouvoir antibactérien et la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été déterminés contre des souches de référence ATCC (*American type culture collection*) très fréquentes en pathologie humaine qui sont :

- ✓ *Staphylococcues aureus* ATCC (29213)
- ✓ *Escherichia coli* ATCC (11105)
- ✓ *Condidas albicans* ATCC (10231)
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (9027)

Les souches bactériennes d'*Escherichia coli*, et de *Pseudomonas aeruginosa* sont des bactéries à Gram négatif d'origine hospitalière et celle de *Staphylococcues aureus* (Gram+) est d'origine alimentaire. Ces souches ont été fournies gracieusement par le laboratoire de microbiologie des centres hospitaliers de Médéa, et par le service de microbiologie du groupe Antibiotical (Saidal, Médéa).

a/ Préparation de l'inoculum

- ✓ *Préparation de pré-culture*

La réactivation des souches a été effectuée par repiquage de l'espèce bactérienne dans des boites de Pétri contenant de la gélose Mueller Hinton (MH) puis l'incubation à 37°C pendant 24 heures.

- ✓ *Préparation de la suspension bactérienne*

A partir des cultures jeunes sur MH, on prélève 1 à 2 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes.

La standardisation de la suspension à 10^8 UFC/ml est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm.

b/ Méthode de diffusion en milieu gélosé ou des aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Dans des boites contenant 10^8 UFC/ml de culture bactérienne effectuée à la surface de 10 ml de gélose MH, des disques imprégnés d'HEs de dose connues sont appliqués à la surface à des distances déterminés. Les boites sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum se traduisant par un halo qui sera mesuré par papier millimétré. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs comme le montre la Figure II.4 **[**161**].**

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

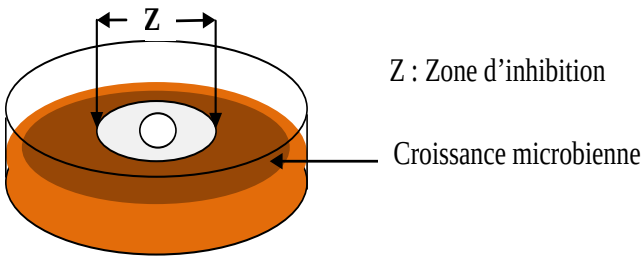


Figure II-4: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'antibiogramme

c/ Méthode de dilution en milieu liquide

Cette technique consiste à inoculer, par une suspension bactérienne, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne [162].

L'échantillon à tester est placé dans un tube stérile contenant le bouillon Mueller Hinton, supplémenté en Tween 80 (0.01 %, v/v). Une dilution en cascade est effectuée dans du milieu Mueller Hinton bouillon-Tween 80 (0.01 %, v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 40µl/ml et 1.25µl/ml. La procédure est décrite dans la Figure II.5-a **[**163**]**.

Un volume de 0.5 ml d'une suspension bactérienne (10^8 CFU/ml) est déposé dans chacun des tubes de la série (Figure II.5-b), lesquels sont incubés après agitation en vortex, à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 30 °C à 48h pour les levures. Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 0.5 ml de la suspension microbienne a été déposé dans du milieu MHB-Tween 80 (0,01 %, v/v), est également réalisé (Figure II.5-c).

Après une observation macroscopique, le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice. Les tubes sont centrifugés ensuite à 6000 trs/min, pendant 5 min pour confirmer la présence ou non du précipité bactérien.

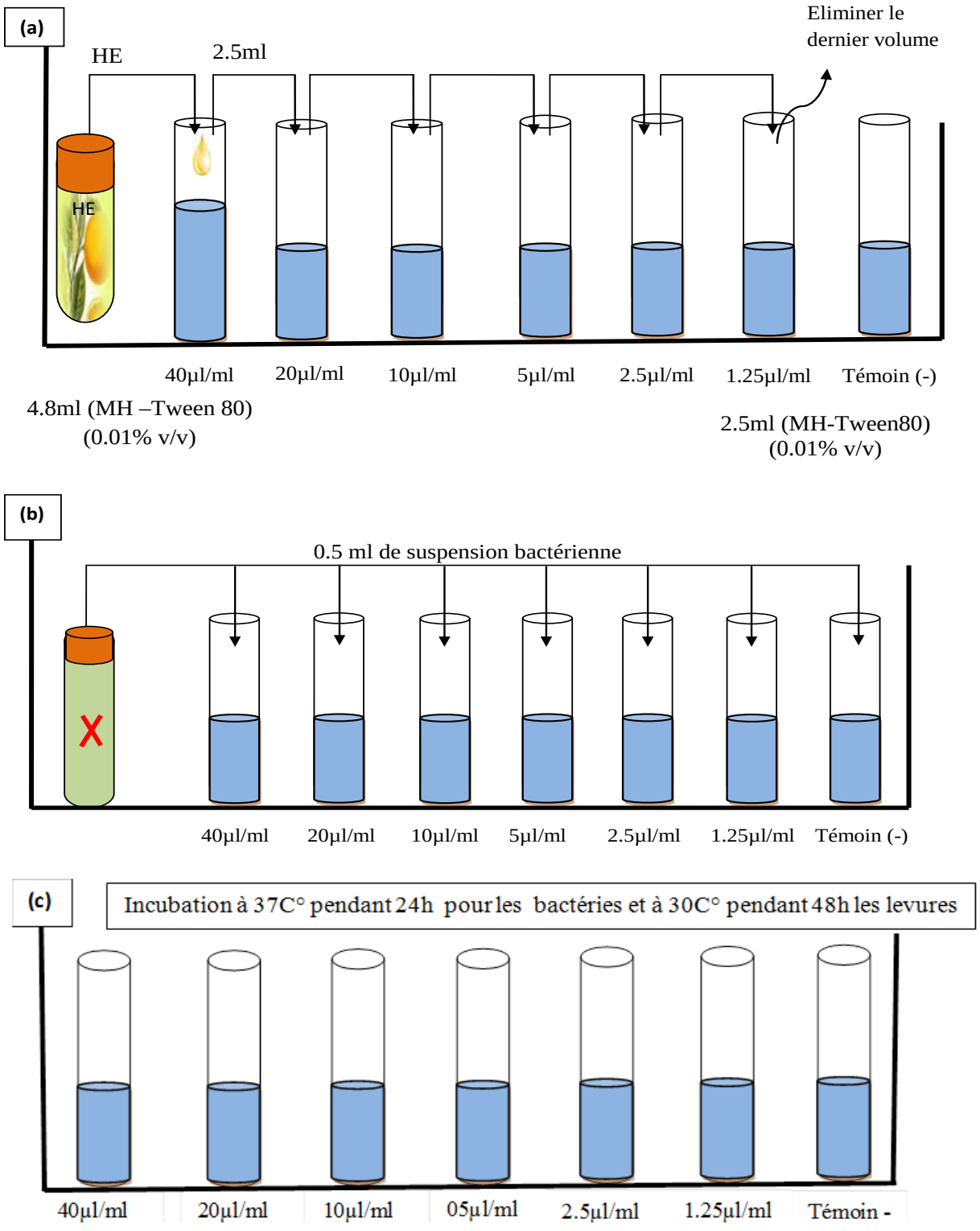


Figure II-5 Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide

II.8. Extraction des pectines

II.8.1. Préparation du matériel végétal

Dans cette partie, on a utilisé le matériel végétal suivant: les albédos d'agrumes et les marcs d'agrumes issus de l'hydrodistillation.

Les albédos sont séchés à une température de 50°C dans une étuve pendant 48h puis broyés et tamisés dans une tamiseuse pour obtenir des particules ayant des diamètres compris entre 0.63 et 1.25mm.

Le marc d'agrumes est compressé à la main en utilisant une bande à gaze, séché à une température de 50°C dans une étuve pendant 48h, puis broyés et tamisés dans une tamiseuse pour obtenir le même diamètre que les particules d'albédos (0.63 et 1.25mm).

La matière végétale est placée ainsi dans des flacons en verre hermétiquement fermé jusqu'à utilisation.

II.8.2. Extraction de la pectine par chauffage conventionnel

L'extraction des pectines des trois sources d'agrumes étudiées dans cette étude se fait en milieu acide à chaud [164], sous des conditions opératoires optimales que nous les avons déjà déterminé dans nos travaux antérieurs [165].

A 5 grammes de la matière végétale, on ajoute 250 litres d'eau distillée, le pH est ramené à 1.2 par l'ajout de l'acide sulfurique 2M. Le mélange est chauffé pendant 90 min à 80°C dans un bain marie, sous agitation continue au moyen d'un agitateur magnétique.

Les différentes étapes d'extraction des pectines par chauffage conventionnel sont résumées dans la Figure II.6.



Figure II-6 Protocole d'extraction de la pectine

II.8.3. Extraction par induction électromagnétique

Les albédos ainsi que le marc du citrange ont subi le même protocole d'extraction que la méthode classique et sous les mêmes conditions opératoires seulement cette fois-ci nous avons utilisé la plaque chauffante à induction électromagnétique comme moyen de chauffage. Le protocole opératoire consiste alors à mélanger une quantité de la matière première séchée (5g) avec un volume de 250 ml d'un milieu aqueux acide à pH 1.2 (le pH est ajusté par l'ajout de H2SO4 1M), le mélange est ensuite mis dans un récipient magnétisable et émaillé puis chauffé sur une plaque à induction, en fixant le niveau de la puissance correspondant à la température de 80°C (niveau 2#), sous une agitation continue (Figure II.7).



Figure II-7 Montage de chauffage par induction électromagnétique

II.8.4. Caractérisations physicochimiques des pectines

II.8.4.1. Rendement

Après l'extraction, la pectine humide est séchée à 50° C jusqu'à ce que son poids devient constant, refroidie au dessiccateur, puis pesée au moyen d'une balance de précision. Le rendement est exprimé en poids de pectine sèche extraite à partir de 5g de matière première sèche (écorces et marcs), et il est donné par l'expression suivante :

$$R\ \% = \frac{\mathrm{p}}{\mathrm{p}'} * 100 \qquad \text{(II.7)}$$

Où P est le poids de pectine sèche et, P' le poids de la matière première sèche.

II.8.4.2. Analyse par spectroscopie FTIR

L'échantillon à analyser sous forme de poudre est broyé en présence de KBr (1mg d'échantillon avec 100 mg de KBr) dans un mortier en agate et le mélange obtenu est ensuite comprimé pour former une pastille translucide. Les spectres d'absorption infrarouge sont enregistrés dans la gamme de nombres d'ondes comprise entre 400 et 4000 cm^{-1}.

II.8.4.3. Taux humidité (H %)

Le taux d'humidité a été calculé selon la méthode de Karl Fisher. Il est calculé par la formule suivante:

$$H(\%) = \frac{\Delta V(ml) * f}{m(mg)} * 100 \qquad (II.8)$$

Où H est le taux d'humidité, ΔV est le volume final-volume initial, m est la masse d'échantillon (mg), *f* est le facteur spécifique de solution de pyridine (f= 4.61779).

II.8.4.4. Degré d'estérification

Le degré d'estérification (DE) des pectines est déterminé par la méthode titrimétrique. Un échantillon de pectine (500mg) a été transféré dans un erlenmeyer de 250ml, humidifié avec 2ml d'éthanol et dissous dans 100 ml d'eau distillée. Après la dissolution complète quelques gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées, et la solution a été titrée avec NaOH (0.5M) et le résultat est enregistré comme titre initial. Puis, 10 ml de NaOH (0.5M) a été ajouté, et le mélange a été agité rigoureusement, et laissé reposer 15 min, ensuite 10 ml d'HCl (0.5M) a été ajoutée et le mélange a été agité jusqu'à disparition de la couleur rose. Par la suite, quelques gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées et la solution est titrée avec NaOH (0.5M) à une couleur rose clair. Ce volume de titrage est enregistré comme titre final [166].

Le DE est calculé par la formule suivante :

$$DE(\%) = \frac{titre\ final}{titre\ initial + titre\ final} * 100 \qquad (II.9)$$

II.8.4.5. Taux de cendres

Un échantillon de pectine (1g) a été incinéré dans un four à moufle à 600 ℃ pendant 4 h puis refroidi et stocké dans un dessiccateur. Le taux de cendre (C) est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$C(\%) = \frac{P2}{P1} * 100 \qquad (II.10)$$

Où P1 est le poids initial de pectine en g, P2 est le poids de la pectine après incinération en g.

II.8.4.6. Mesures viscosimétriques et estimation de la masse moléculaire

L'étude de la viscosité des solutions macromoléculaires s'est avéré une méthode empirique très utile pour la détermination des masses moléculaires des polymères. La méthode viscosimétrique est une technique simple et rapide à mettre en œuvre. Elle s'appuie sur le fait que la viscosité intrinsèque d'un polymère est liée par les lois empiriques à la masse moléculaire du polymère [167].

Dans la pratique, la viscosité intrinsèque des solutions macromoléculaires est définie comme étant la limite de la viscosité réduite lorsque la concentration tend vers zéro [167].

$$[\eta] = \lim_{c\to 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{(II.11)}$$

Où $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque (m^3/Kg), η_{sp} est la viscosité spécifique, C est la concentration du soluté (Kg/m^3).

Cette viscosité est liée à la masse moléculaire selon la relation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = KM_v^a \quad \text{(II.12)}$$

Où $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque, K et a sont des constantes, Mv est la masse molaire viscosimétrique.

Les deux constantes K et a sont des paramètres caractéristiques qui dépendent du système polymère-solvant à une température donnée. La viscosité spécifique η_{sp} et la viscosité réduite η_{red} des solutions sont déterminées selon les relations suivantes :

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{(II.13)}$$

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{(II. 14)}$$

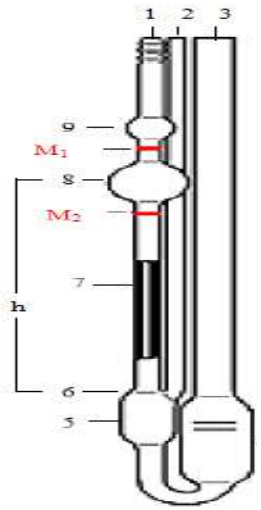
Où t est le temps d'écoulement de la solution (s), t_0 est le temps d'écoulement du solvant (s) et C, la concentration du soluté (g/l).

Dans le cas de la pectine, le solvant choisi est l'hexamétaphosphate de sodium (1%) [168]. Pour ce système particulier, les constantes K et a ont été établies par Anger et Berth [169], l'équation II.17 est écrite alors comme suit :

$$[\eta] = 9.55 \times \frac{10^{-2} M_v^{0.73} ml}{g} \quad \text{(II.15)}$$

La mesure de la masse moléculaire moyenne (M_v) des échantillons de pectine a été déterminée à partir de la mesure de la viscosité intrinsèque à 20°C des solutions de pectines de l'hexamétaphosphate de sodium (1%) en utilisant l'équation II.15.

Les solutions de pectines (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5 et 0.25 g/l) ont été préparées dans une solution d'hexamétaphosphate de sodium (1%). Les mesures de viscosité ont été effectuées sur 13 ml de solution de pectine à l'aide d'un viscosimètre capillaire de type Ubbelohde (Figure II-8) à une température de 20±1°C. On mesure le temps d'écoulement du solvant pur dans les mêmes conditions.



1 : Tube avec capillaire.
2 : Tube de ventilation.
3 : Tube de remplissage.
4 : Réservoir.
5 : Récipient de détente.
6 : Calotte sphérique.
7 : Tube capillaire.
8 : Boule de mesure.
9 : Boule d'entrée.
M_1 : Marque annulaire supérieur.
M_1 : Marque annulaire au-dessous.

Figure II-8 Viscosimètre Ubbelohde [170]

II.8.4.7. Caractérisation des contenus saccharidiques

La quantification des sucres est réalisée par la méthode au phénol sulfurique ou dosage de Dubois [171] pour les oses neutres, et par la méthode au méta-hydroxydiphényl (*m*-HDP) pour les acides uroniques appelé aussi dosage de Blumenkrantz-Asboe [172].

a/ Dosage de Dubois

A 200 µl de solution de pectine à doser, on ajoute 200 µl d'une solution aqueuse de phénol à 5%. Le mélange est homogénéisé au vortex, puis 1ml d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit dans le milieu réactionnel. Après homogénéisation, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 min. Les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 30 minutes. Une coloration orange apparaît. La lecture des densités optiques est réalisée à 492nm. Les quantités de sucres en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon de glucose de concentration de 25, 50, 100 $\mu g.ml^{-1}$.

b/ Dosage de Blumenkrantz-Asboe

A 200 µl de la solution pectique à doser, on ajoute 1.2 ml d'une solution de tétraborate de sodium à 0,125M dans l'acide sulfurique concentré. Le mélange est homogénéisé au vortex, et réfrigéré dans la glace. Les tubes sont ensuite portés à 100°C au bain-marie durant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, on ajoute 20 µl d'une solution de m-HDP (métahydroxydiphényle) à 0.15% dans une solution de soude à 0.5%. Les tubes sont agités. Une coloration rose se développe pendant 5 minutes. La lecture des densités optiques est réalisée à 520 nm. Les quantités de sucres en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon d'acide galacturonique de concentration 25, 50, 100 et 200 $\mu g.ml^{-1}$.

II.9. Formulation et caractérisation des émulsions à base des HEs stabilisées par les pectines

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au préalable à la formulation des émulsions huile-dans-eau stabilisées par la pectine de citrus commerciale (hautement méthylée). Les huiles essentielles d'agrume extraites représentent la phase huileuse. Nous avons étudié également l'effet de l'acide ascorbique sur la stabilité physico-chimique et rhéologique des émulsions d'HEs. Il était nécessaire aussi de déterminer l'activité antioxydante et antimicrobiennes des huiles essentielles seules et en émulsions avec et sans ajout d'acide ascorbique afin d'évaluer l'aptitude d'une émulsion H/E à base de pectine de garder les propriétés biologiques de l'huile essentielle encapsulé.

II.9.1. Formulation des émulsions

Des émulsions de type H/E ont été préparées par incorporation de 4% (g/g) d'HE d'agrumes dans la phase aqueuse, le mélange a été homogénéisé par un Ultra Turax avec une vitesse de 1500 tr/min pendant 3 min (Figure II.9).



Figure II-9 Dispositif d'homogénéisation: Ultra Turax

Notons que la phase aqueuse a été préparée en dispersant la pectine dans un mélange eau : glycérol (1 :2 g/g) sous une agitation continue à température ambiante pendant 24 h pour compléter leur hydratation. Les concentrations (en%) en chaque constituant sont données dans le Tableau II.1. On note que les différentes concentrations en pectine ont été déduites des essais préliminaires.

L'effet de l'acide ascorbique sur la stabilité et les propriétés inhérentes des émulsions a été étudié par addition de différentes concentrations d'acide ascorbique (0.5 et 1%) dans la phase continue, recouverte avec différentes quantités de pectine.

Tableau II.1 Différents constituants des émulsions d'HE formulés

Essais / Constituants	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Pectine (%)	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5
Phase aqueuse (%)	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp
Huile (%)	4	4	4	4	4	4	4	4

II.9.2. Caractérisations des émulsions

a/ Suivi visuel de la stabilité

Afin de déterminer la stabilité des différentes émulsions formulées, nous avons réalisé un suivi visuel des émulsions au cours du temps. En effet, une fois l'émulsion formulée, on la

répartit dans des tubes à essais. Ces tubes nous permettent de réaliser un suivi visuel dans le temps à l'aide de photographies et de déterminer la stabilité par l'absence des phénomènes d'instabilités (coalescence, floculation…)

b/ Examen microscopique

La microscopie optique est une technique très intéressante pour l'étude des systèmes colloïdaux. Elle permet d'obtenir des informations qualitatives essentielles à la compréhension générale des systèmes. Dans le cas des émulsions, cette technique permet d'évaluer la taille des gouttelettes, d'estimer leur polydispersité, d'identifier certaines instabilités comme la coalescence ou la floculation. L'échantillon à analyser est déposé au préalable entre lame et lamelle en verre de façon à obtenir une monocouche d'émulsion. La morphologie des formulations est visualisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase (micros, Australia Mc×100) connecté à une caméra digitale (Infinity lite, Canada), l'ensemble étant contrôlé par un ordinateur en utilisant le logiciel Infinity, permettant de récupérer les images.

c/ Granulométrie des gouttelettes d'émulsions

Un granulomètre Zetasizer 6,34 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Royaume-Uni) a été utilisé pour déterminer la taille moyenne des gouttelettes (Z-moyennes) exprimée en diamètre moyen des gouttelettes (dav). La mesure de taille a été réalisée pour des émulsions stables macroscopiquement pendant 3 semaines.

d/ Analyse Rhéologique

La rhéologie est une branche de la physique qui étudie l'écoulement ou la déformation de la matière, et en particulier des fluides complexes, sous l'effet des contraintes qui leur sont appliquées [173]. Il existe deux méthodes classiques de mesure du comportement rhéologique: i/ rhéologie linéaire, ii/ rhéologie non-linéaire.

Les paramètres rhéologiques des émulsions préparées ont été obtenus à l'aide d'un rhéomètre modulaire compact (Physica MCR 302, Anton Paar GMbH, Graz, Autriche) à plaques parallèles de diamètre de 25 mm, séparés par un espace de 1 mm. Les courbes d'écoulement ont d'abord été déterminées par la variation de la viscosité apparente en fonction d'un taux de cisaillement allant de 0.001 à 1000 (1/s). Les propriétés viscoélastiques dynamiques et linéaires ont ensuite été déterminées par des essais de balayage de contrainte dans une gamme de déformation de 0.1 à 1000% sous une fréquence de 1 Hz.

II.9.3. Evaluation de l'activité biologique

a/ Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante, exprimée en tant que pourcentage d'inhibition (I%), de l'huile essentielle d'Orange (*Citrus sinensis*), de Citron *(citrus limonum*) et de Citrange *(Citroncirus webberi*), seules et en émulsion avec et sans ajout d'acide ascorbique, a été réalisée par la méthode de DPPH décrite dans la section II.6. L'acide ascorbique est utilisé comme un antioxydant de référence.

b/ Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Orange (*Citrus sinensis*), de Citron *(citrus limonum*) et de Citrange *(Citroncirus webberi*), seules et en émulsion avec et sans ajout d'acide ascorbique a été évaluée par la méthode de dilution en milieu liquide décrite dans la section II.7.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Introduction

Après avoir décrit dans le chapitre précédent toutes les méthodes expérimentales utilisées, nous présentons dans le présent chapitre les résultats obtenus ainsi que les interprétations et les conclusions que nous avons tirées. Les résultats obtenus sont regroupés en trois parties distinctes: i) extraction et caractérisation des huiles essentielles à partir de différentes espèces d'agrumes étudiés, ii) extraction et caractérisation des pectines extraites à partir de la même biomasse et, iii) formulation et caractérisation des émulsions à base d'huiles essentielles extraites et stabilisées par les pectines commerciales hautement méthylées.

Dans les deux premiers cas, nous évaluerons l'impact d'une nouvelle méthode d'extraction assistée par induction électromagnétique sur l'efficacité d'extraction. Dans le troisième cas, nous étudierons l'effet de l'acide ascorbique sur la stabilité physico-chimique et rhéologique des émulsions formulées. Nous présenterons également, les résultats d'évaluation des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles extraites seules et en émulsions.

III.2. Teneur en eau des espèces *Citrus*

Les résultats de la détermination de la teneur en eau des différentes matières végétales sont regroupés sur les Figures III.1, III.2 et III.3.

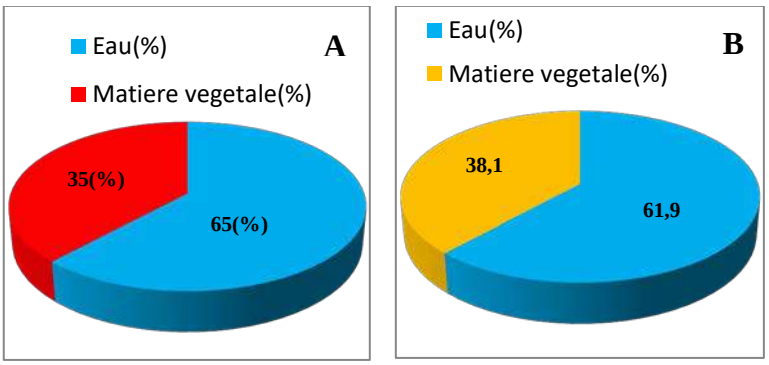


Figure III-1 Teneur en eau des oranges, A : Albédos, B : Ecorces complètes

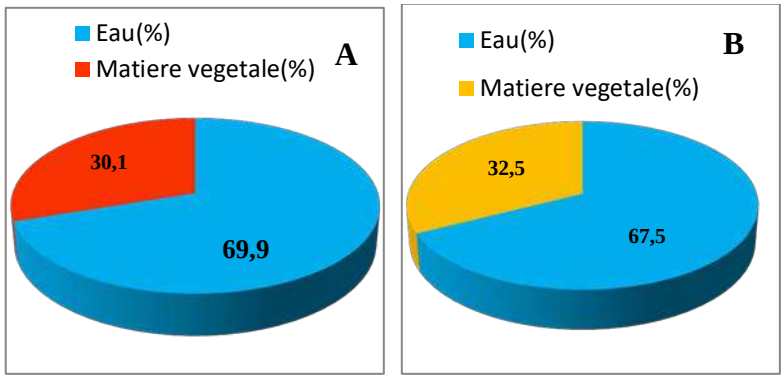


Figure III-2 Teneur en eau des citranges, A : Albédos, B : Ecorces complètes

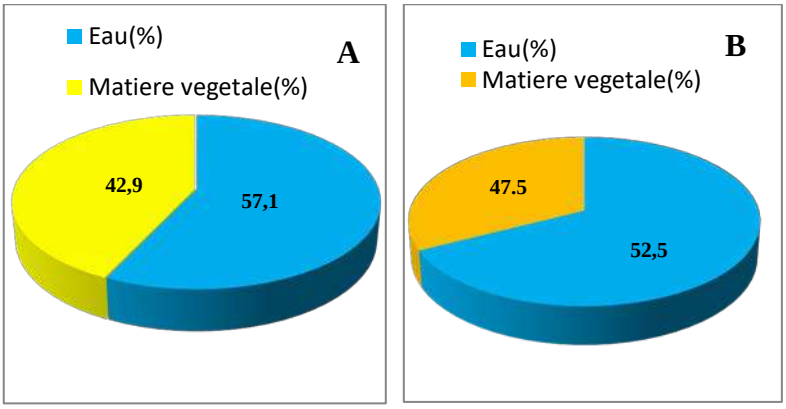


Figure III-3 Teneur en eau des citrons ; A : Albédos, B : Ecorces complètes

Les résultats obtenus montrent que toutes les matières végétales sont riches en eau avec des teneurs supérieures à 30%. Les teneurs en eau enregistrées varient entre 30% et 47.5%.

III.3. Extraction des huiles essentielles

Dans cette première partie, nous nous somme intéressé à la valorisation des écorces d'agrumes par extraction des huiles essentielles (HEs) à partir des zestes de trois espèces d'agrumes à savoir *Citrus. limonum* (Citron), *Citrus. sinensis* (Orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange). Notre but vise également l'étude d'une façon comparative l'application d'une nouvelle méthode d'extraction par hydrodistillation assistée par induction électromagnétique (HIM) avec une autre méthode conventionnelle hydrodistillation par chauffage classique (HCC). Pour cela, nous avons effectué une comparaison en termes de rendement, cinétique d'extraction et activités biologiques des huiles essentielles extraites.

III.3.1. Effet du rapport pondéral (matière végétale/eau)

Dans le but de déterminer la quantité de matière végétale et de solvant à utiliser pour garantir une meilleure extraction en terme du rendement, une étude préliminaire de l'effet du rapport pondéral (RP) (matière végétale/eau : g/ml) sur l'extraction de l'huile essentielle d'orange (*C.sinensis*) a été réalisée. Les résultats sont représentés dans la Figure III.4.

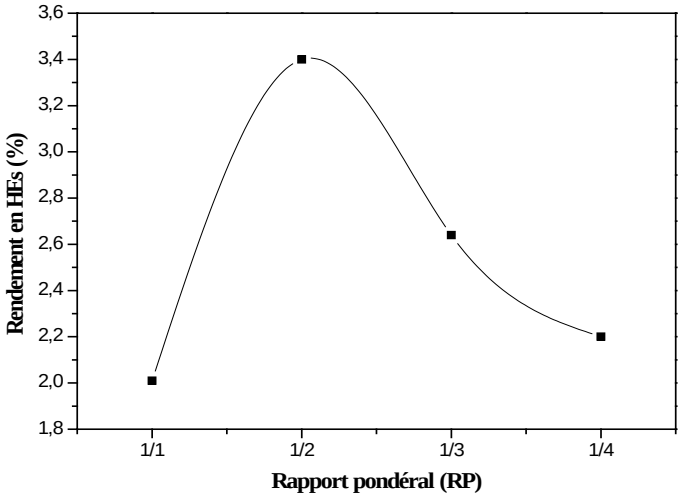


Figure III-4 Variation du rendement global d'extraction des HEs de *C.sinensis* en fonction du rapport pondéral.

Les résultats montrent que le rendement global d'extraction de l'huile essentielle dépend de la quantité de matière utilisée ainsi que de la quantité de solvant correspondant à celle-ci, où apparait un optimum autour de RP= 1/2. Ceci a également été mis en évidence par Hazwan et al. [174]. En effet, avec une quantité d'eau optimale (RP =1/2), où la totalité de la matière végétale immergée dans l'eau est nécessaire pour obtenir un système d'ébullition solide-liquide efficace. Cependant, l'utilisation d'un RP>1/2 conduit à une diminution du rendement. Ceci peut probablement être dû à une perte de solutés hydrosolubles dans un volume plus important d'eau. De plus, la diminution du rendement final des HEs pour un taux de solvant élevé peut être attribuée à la dissolution et/ou à la transformation hydrolytique des constituants de l'huile dans le trop grand volume d'eau comme le suggère Milojevic et al. [175]. Cette influence négative des valeurs excessives de taux de solvant a également été observée par Sovová et al. [176], et cela a été expliqué et justifié par leur approche de modélisation**.**

III.3.2. Influence du mode d'extraction sur le rendement

Toutes les huiles essentielles étudiées ont été obtenues à partir de plantes d'agrumes cultivés sous les mêmes conditions pédoclimatiques. En outre, elles ont été extraites et analysées dans les mêmes conditions. Le Tableau III.1 présente les rendements en huile essentielle des trois espèces d'agrumes extraites par hydrodistillation par chauffage classique

et celle assisté par induction électromagnétique. Nous observons que le rendement moyen en huiles essentielles obtenues par la technique classique, est de l'ordre de 1.54%, 2.17% et 2.72% pour *C. limonum*, *Citroncirus webberi* et *C. sinensis* respectivement. Les résultats obtenus dans ce travail sont similaires aux résultats cités dans la littérature scientifique. En effet, Hosni et al. [177] ont rapporté des rendements allant de 2.31% à 4.62% pour l'orange douce (*C. sinensis)* et la mandarine *(C. reticulata)*, respectivement. Fisher et al. [178] et Eleni et al. [179] ont rapporté que les rendements en H.Es chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et contre toute attente ont signalé des rendements de 1 à 3%. Cependant, Minh Tu et al. [180] ont rapporté un rendement de 0.03%, 0.13% et 0.25% pour pamplemousse, orange et tangerine, respectivement. Les pelures fraîches d'orange (Valencia late) poussant en Algérie possèdent un rendement en huiles essentielles de 0.39% [181]. Un rendement de 0.71% et 0.79% a été enregistré pour la mandarine colombienne et les huiles d'écorce d'orange [182]. Cette différence pourrait être expliquée selon Kelen & Tepe [183] par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'H.E. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraicheur et la méthode d'extraction employée sont des facteurs qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en H.Es [184].

Tableau III.1 Rendement en HE (%) des trois espèces d'agrumes selon deux (2) méthodes d'extraction

	Méthodes d'extraction	
Espèce de Citrus	HCC	HIM
C. limonum	1.54 %	2.86 %
Citroncirus webberi	2.17 %	2.29%
C. sinensis	2.72 %	3.77

III.3.3. Evolution de la cinétique d'extraction

La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus. Les représentations graphiques regroupant les résultats de suivi cinétique sur l'extraction de l'huile essentielle de *C.sinensis* par HCC et HIM sont décrites sur la Figure III.5.

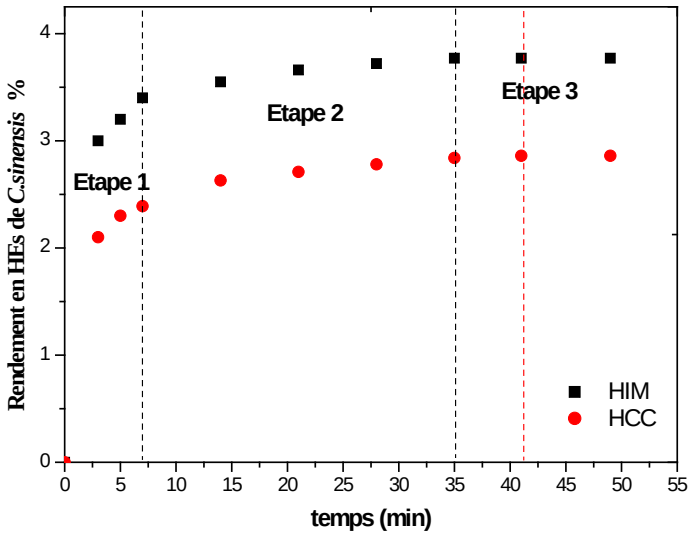


Figure III-5 Variation du rendement en huile essentielle de *C. sinensis* en fonction du temps

Comme le montre clairement la Figure III.5, les deux courbes de cinétique d'extraction obtenues ont pratiquement la même allure, le rendement croit au fur et à mesure que le temps d'hydrodistillation augmente ; il est caractérisé par trois phases distinctes. La première phase (phase 1) est caractérisée par une augmentation rapide du rendement qui détermine les premières quantités d'huiles essentielles extraites, ce qui représente environ 85% du rendement global obtenu après un temps d'extraction de 7 min. Selon Boukroufa et al. [185], ces premières quantités d'huiles essentielles extraites sont localisées à la surface des particules végétales. Cette phase est suivie par une seconde ligne croissante (phase 2) due à la diffusion interne de la solution aqueuse chargée de composés organiques à travers une épaisseur de tissu, plus ou moins dense, selon l'organe, vers la surface extérieure où l'huile essentielle sera vaporisée et entraînée [185]. Au cours de cette étape d'hydrodistillation, le taux de distillation des huiles est ralenti car la diffusion d'huiles essentielles est lente [186]. Ainsi environ 9.81% du rendement global a été obtenu en 28 min par HIM et 16% en 34 min obtenus par HCC. Une partie terminale (phase 3) qui se traduit par l'apparition d'un pseudo palier, est atteinte après 35min par HIM et après 41 min par le processus HCC, indiquant l'épuisement total de la matière végétale en huile essentielle.

La comparaison des résultats obtenus de l'extraction des huiles essentielles de *C.sinensis*, *C. limonum* et de *Citroncirus webberi* par induction électromagnétique avec ceux obtenus par hydrodistillation classique a permis de mettre en évidence des différences de comportement et

d'évolution du rendement selon la méthode d'extraction. En effet, l'hydrodistillation assistée par induction électromagnétique est nettement plus performante que l'HD classique car il est possible d'augmenter le rendement en HEs à 2.86, 2.29 et 3.77% pour *C. limonum*, *Citroncirus webberi* et *C. sinensis*, respectivement en un temps d'extraction plus court, contre 1.54, 2.24 et 2.72% par l'HD classique pour *C. limonum*, *Citroncirus webberi* et *C. sinensis*, respectivement.

Par conséquent, dans nos conditions de travail, la technique de chauffage par induction électromagnétique est clairement plus rapide que la technique classique avec un gain évident de temps de 7 à 10 min.

Ces observations laissent à penser que l'accélération de la vitesse d'hydrodistillation par induction électromagnétique est due au champ magnétique. Colic et Morse [187] suggèrent que l'eau traitée avec des radiations électromagnétiques produit des agrégats de molécules de taille réduite. Si la taille des agrégats d'eau est réduite, par conséquent l'hydrodiffusion pourrait en être améliorée favorisant une plus grande vitesse d'hydrodistillation. La réduction de la taille des agrégats de molécules intervient sur l'hydrodiffusion et les échanges liquide-solide**.** Rivera et al. [188] soutiennent que cet effet peut être attribué à la capacité du champ magnétique à augmenter la vitesse d'hydrodistillation, en augmentant l'hydrodiffusion soit de l'ionisation du milieu d'extraction ou de réduction de la taille des agrégats d'eau.

Des résultats similaires, en termes d'effet du temps d'extraction, ont été signalés sur la pectine extraite par chauffage assisté par induction électromagnétique à partir des albédos de citrange par Zouambia et al. [189] ; ces auteurs ont suggéré que l'application d'un champ électromagnétique crée une agitation des ions et des composés d'électrolyte qui conduisent à l'augmentation de la température de la solution aqueuse. Au bout de quelques minutes, la solution aqueuse déclenche un mouvement avec les parties solides et ensuite commence l'ébullition. Durant l'extraction, l'ébullition est homogène dans tout le volume du réacteur. Cette spécificité d'homogénéité favorise ainsi une plus grande vitesse d'extraction.

Une étude menée par Ferhat et al. [181] sur l'extraction des HEs d'orange par hydrodistillation assistée par micro-ondes, suggère que les micro-ondes induisent des effets déstructurants plus marqués, ciblés sur les éléments cellulaires spécifiquement impliqués dans la synthèse et dans l'accumulation des huiles essentielles dans le flavédo de l'orange, due à l'élévation brutale de la température à l'intérieur des structures cellulaires riches en eau provoquant une augmentation de la pression interne des cellules. Cette augmentation de la pression interne des glandes peut rapidement atteindre des niveaux qui excèdent la capacité d'expansion des tissus protecteurs entraînent ainsi leur désintégration et le largage de leur

contenu dans le milieu d'extraction plus rapidement que dans le cas de la méthode d'hydrodistillation par chauffage classique.

III.3.4. Caractérisation physicochimique des huiles essentielles d'agrumes

Les H.Es des espèces de *Citrus* présentent un aspect liquide huileux, limpide pour *Citroncirus webberi* et *C. sinensis* et jaunâtre pour *C. limonum.* Elles sont caractérisées par une note fraîche d'agrumes significative.

Le Tableau III.2 regroupe les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles des espèces *Citrus* obtenues par les deux techniques d'extraction. Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nos essais ont été effectués selon un protocole précis et obéissent aux normes édictées par l'association française de normalisation (AFNOR).

Tableau III.2 Propriétés physico-chimique des huiles essentielles d'espèces *Citrus*

Propriétés physico-chimiques	*C. sinensis*		*C. limonum*		*Citroncirus webberi*		**Norme AFNOR**
	CC	IM	CC	IM	CC	IM	
Densité relative (à 25°C)	0.855	0.851	0.846	0.852	0.805	0.778	<0.876
Indice de réfraction(à 25°C)	1.4731	1.4730	1.4772	1.4774	1,4760		(1.4700-1.4780)

L'analyse du Tableau III.2 montre que les HEs des espèces *Citrus* extraites par les deux techniques de chauffage représentent :

✓ Une densité presque similaire à tous les échantillons testés, avec des valeurs appartenant à un intervalle étroit, entre 0.814 et 0.851, signifiant que les huiles essentielles extraites sont conformes aux normes internationales. Kamal et al. [190] ont rapporté une densité de 0.815 et 0.834 à 25ºC des HEs de *C. sinensis* et *C. reticulate* respectivement.

✓ Un indice de réfraction varie entre 1.4731 et 1.4772 correspondant aux normes d'AFNOR (1.4700-1.4780), ce paramètre dépend de la composition chimique, il augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'instauration et de la température. Il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés.

Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs [191], le faible indice de réfraction de l'huile essentielle indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques.

Les résultats obtenus des analyses physicochimiques indiquent que les échantillons analysés se trouvent dans les fourchettes de référence établies par les normes AFNOR. Selon Gildo [192], ces paramètres physicochimiques sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de culture des plantes ; cela fait partie aussi de la complexité de la notion de chémotype.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction…) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques (GC/MS) qui sont souvent utilisées comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles ; elles ont été employées pour identifier qualitativement les huiles essentielles des espèces *Citrus* extraites.

III.3.5. Analyse de la composition chimique par CG/MS

Les huiles essentielles récupérées par les deux procédés ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse CPG/SM.

III.3.5.1. Composition de l'huile essentielle de C. sinensis

Les résultats de l'identification qualitative et quantitative des composés chimiques par CG/MS des H.Es de *C. sinensis* sont présentés dans le Tableau III.3. Les chromatogrammes obtenus sont représentés sur les annexes 1et 2.

Cette analyse montre d'une part que, l'huile essentielle des oranges, qu'elle soit extraite par HIM ou par HCC est constituée par un nombre de composés aromatiques identiques (21 composés), et d'autre part que la plupart des substances identifiées sont des hydrocarbures monoterpèniques : le limonène avec une teneur de 94.427 et 93.258 % dans l'huile essentielle obtenue par HIM et par HCC, respectivement, et β-myrcène, avec une teneur de 2.158 et 2.278%, respectivement pour les procédés HIM et HCC. Ces deux composés sont incontestablement les plus abondants dans l'huile essentielle de *C. sinensis* avec des taux relativement équivalents quelques soit la méthode d'extraction. Les principaux monoterpènes oxygénés sont principalement composé de linalool, avec 0.29% et 0.62% respectivement pour HIM et HCC, de Néral dont la teneur ne dépasse pas 0.11%. Les sesquiterpènes sont

représenté principalement par Valencene avec, 0.16% pour HIM et 0.04% pour le HCC. La fraction des composés non terpéniques est représentée par des alcools et des aldéhydes.

Les résultats trouvés dans cette étude concernant le profil chimique de l'huile de *C. sinensis* concordent avec ceux obtenus par Tan et al. [193] qui ont trouvé que le limonène (96.46%) est le composé majoritaire suivi de β-myrcène (2.13%) dans l'huile essentielle de l'orange. Djenane et al. [194] rapportent que l'analyse chimique de l'HE de *C. sinensis* provenant d'Algérie a permis de recenser un total de 20 composés dont le limonène est le composé majoritaire représenté avec un pourcentage de 77.37%. D'autres composés mineurs sont représentés par β-pinène (3.45%), β- phellandrène (1.9%), naphtalène (1.41%), d'octanal (1.24%), linalol (1.21%), ainsi que sous forme de traces : le décanal (0.82%) et α- pinène (0.76%).

Nos résultats sont relativement différents de ceux obtenus par Egharevba et al. [195] sur l'orange *C. sinensis L.* provenant du Nigeria. La composition chimique de cet HE est constituée principalement de α-terpineol (35.39%), suivi par : D-limonene (17.74%), linalool (9.73%), Citronellol (4.88%), γ-Muurolene (4.44%) et Isopiperitenone (3.58%).

Selon la technique d'extraction utilisée, les huiles essentielles de *C. sinensis* extraites par la technique HIM en comparaison avec HCC, une importante variabilité a été observée dans les teneurs relatives à la fraction oxygénée (Figure III-6). Les plus fortes teneurs en fractions oxygénées ont été enregistrées dans les HEs extraites par le biais de l'HCC (1.01%) par rapport aux celles extraites par HIM (0.68%). Cette forte proportion en composés oxygénés dans les HEs extraites par la technique HCC est probablement due à l'oxydation de certains composés. Cela pourrait être vérifié par la forte concentration des produits d'oxydation (du limonène, du terpinene et de phellandrene) dans les HEs extraites par HCC qui inclut linalool (0.626 %) et terpineol (0.085%). Il convient de noter que tous ces composés ont été détectés à des concentrations faibles dans les substances volatiles obtenues par HIM.

Tableau III.3 Principaux composés chimiques (%) de l'H.E de *C. sinensis* extraite par HIM et HCC

N°	Composés	Temps de rétention	HIM(%)	HCC(%)
Monoterpènes			*98.087*	*97.079*
1	α-Pinene	10.95	0.537	0.592
2	Sabinene	13.54	0.463	0.767
3	β-Myrcene	14.94	**2.158**	**2.278**
4	α-Phellandrene	15.46	0.072	0.042
5	γ-terpinene	15.79	0.328	0.120
6	D-Limonene	17.28	**94.427**	**93.258**
7	Ocimene	18.39	0.030	0.026
8	α- terpinene	20.46	0.072	0.022
Monoterpènes oxygénés			*0.68*	*1.01*
9	Linalool	21.33	**0.293**	**0.626**
10	Citronellal	24.18	0.095	0.041
11	γ-Terpineol	26.03	0.068	0.085
12	Neral	28.63	0.102	0.098
13	Citral	30.11	0.122	0.151
Sesquiterpène			*0.245*	*0.10*
14	β-Cubebene	37.28	0.026	0.018
15	Germacrene-D	39.51	0.026	0.025
16	Valencene	40.04	**0.165**	0.044
17	δ-Cadinene	41.37	0.028	0.020
Autres			*0.977*	*1.014*
18	Octanal	15.63	**0.435**	0.780
19	Nonanal	21.56	0.102	0.125
20	Decanal	26.94	0.377	-
21	n-Dodecanal	36.55	0.063	0.064
22	Hexadecanol	26.94	-	0.0454

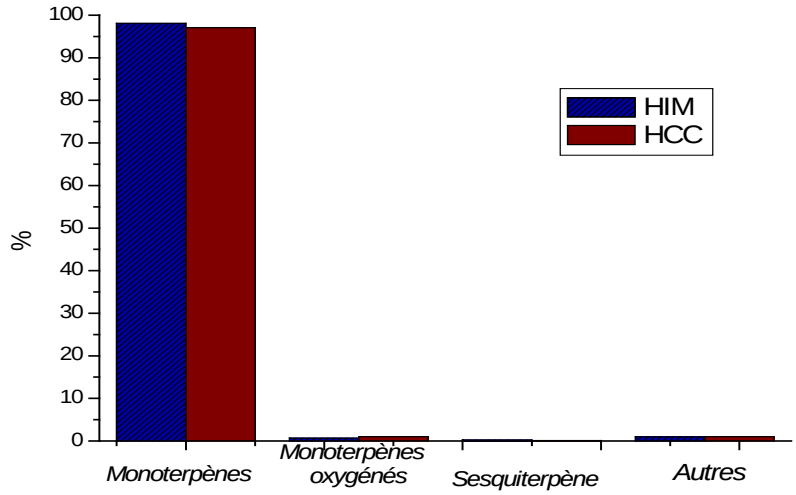


Figure III-6 Variation de la composition chimique des substances volatiles de *C. sinensis.* Influence du mode d'extraction

III.3.5.2. Composition de l'huile essentielle de C. limonum

Les résultats d'analyse par CG/MS des H.Es de zestes de *C. limonum* obtenus par la méthode classique d'extraction (HCC) sont présentés dans le Tableau III.4. Le chromatogramme obtenu est représenté sur l'annexe 3.

L'identification, est réalisée à l'aide des indices de rétention calculés sur la base des n-alcanes (C_8-C_{28}) en comparaison avec ceux des composés de référence de la base de données NIST et ceux de Wiley.

Au total 33 composés ont été identifiés. Cette analyse montre d'une part que, la plupart des substances identifiées sont des hydrocarbures monoterpèniques, et d'autre part le D-limonène est incontestablement le composé majoritaire (65.54%) suivi par γ-terpinene (11.301%) et β-Pinene (8.471%). Les autres composés monoterpéniques identifiés pour cette même H.E ont des teneurs appréciables comme Z-Citral (2.122%), et E-Citral (2.841%), et en quantités moins importantes on retrouve β- Myrcene (1.579%), α-Pinene (1.480%), β-Bisabolene (0.665%), et α-Terpinolène (0.592%).

Nos résultats concernant le profil chimique de l'huile de *C. limonum* concordent avec ceux de Djenane [194] qui ont montré que les essences de citron (*C. limonum*) sont caractérisées par des concentrations élevées en limonène, β-pinène et, γ-terpinène (51.4, 17.04 et 13.46%).

En étudiant la composition chimique des H.Es de *C. limonum,* Moufida et Marzouk [196] ont confirmé que ces H.Es sont constituées majoritairement de limonène. Ce composé varie

entre 45 à 76%, et que le linanol n'est représenté qu'à des taux faibles (10.23%), ainsi que les composés néral/géranial, ensemble dénommés souvent le citral sont présents avec une concentration de 0.1%.

Les données de la littérature ne sont pas toujours facilement comparables car les conditions d'extraction, la nature du sol, de l'ensoleillement, de l'aire géographique, de la pluviosité sont très souvent différentes. Il faut noter aussi que selon Minh et al. [197], la maturité du fruit a un impact important sur la composition chimique de l'huile essentielle. Ainsi, les terpènes sont exclusivement présents dans l'HE du fruit non mûr, à mesure que le fruit murisse les concentrations en aldéhydes, les terpènes oxygénés et sesquiterpènes aliphatiques augmentent.

Tableau III.4 Composition chimique des HEs des *C. limonum* extraites par HCC

N°	Composés	Indice de rétention	(%)
Monoterpènes			
1	α-Thujene	851	0.375
2	α-Pinene	855	1.480
3	Camphene	864	0.038
4	β-Pinene	885	8.471
5	β- Myrcene	895	1.579
6	α-Phellandrene	905	0.090
7	α-Terpinene	917	0.294
8	D-Limonene	942	65.54
9	--	944	0.177
10	δ- 3 Carène	952	0.183
11	γ-terpinene	965	11.301
12	α-Terpinolène	989	0.592
Monoterpènes oxygénés			
13	Linalool	1005	0.270
15	Citronella	1055	0.138
16	--	1067	0.088
18	α-Thujone	1085	0.091
19	α-Terpineol	1094	0.571
20	Nerol	1133	0.368
21	Z-Citral	1146	2.122
22	Geraniol	1161	0.218
23	E-Citral	1177	2.841
Sesquiterpène			
26	Caryophyllene	1316	0.384
27	α-Farnésène	1334	0.499
28	α-Humulene	1350	0.025
30	Valencene	1390	0.033
31	Bicyclogermacrene	1393	0.121
32	Cis- α –Bisabolene	1402	0.053
33	β-Bisabolene	1406	0.665
Sesquiterpène oxygénés			
29	Farnesol	1358	0.061
17	Terpineol	1079	0.230
Autres			
14	Nonanal	1007	0.152
24	Neryl acetate	1267	0.546
25	Geranyl acetate	1286	0.226

III.3.6. Evaluation de l'activité antioxydante des HEs extraites

Pour déterminer la capacité antioxydante des différentes huiles essentielles de *Citrus* extraites, nous avons utilisé le 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), car cette méthode est simple, reproductible et est largement utilisée dans l'industrie alimentaire [198]. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH (ou notée : DPPH$^{\bullet}$) en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée [199]. L'évaluation de cette activité antiradicalaire a été faite en comparaison avec celle d'un antioxydant de référence, qui est l'acide ascorbique.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les HEs possèdent une activité antiradicalaire avec dose dépendante comme le montre les figures III.7, III.8 et III.9. Les IC50 de chacun des différents extraits sont déduits de la droite d'étalonnage correspondante (Tableau III.5). Ce paramètre représente la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH$^{\bullet}$. Plus la valeur d'IC50 est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande [200].

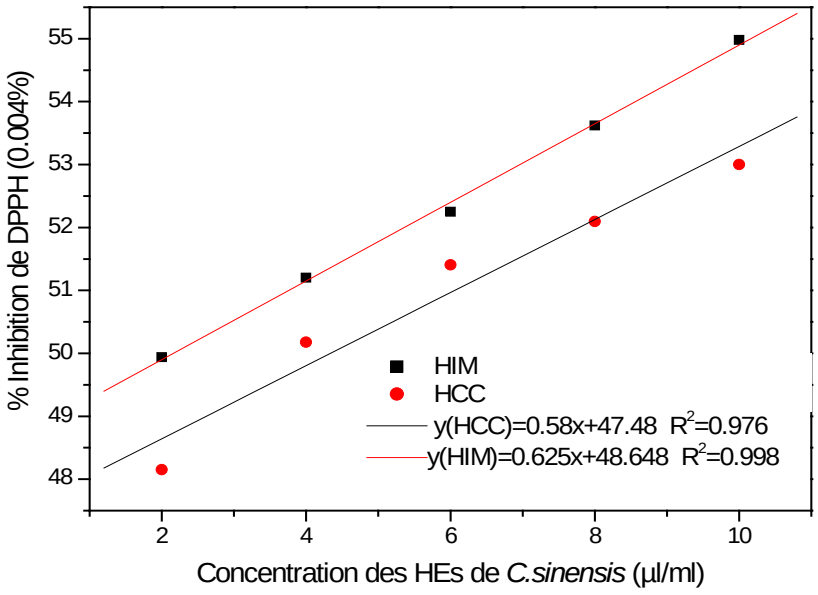


Figure III-7 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH$^{\bullet}$ en fonction des différentes concentrations des HEs de *C.sinensis* extraites par HIM et HCC

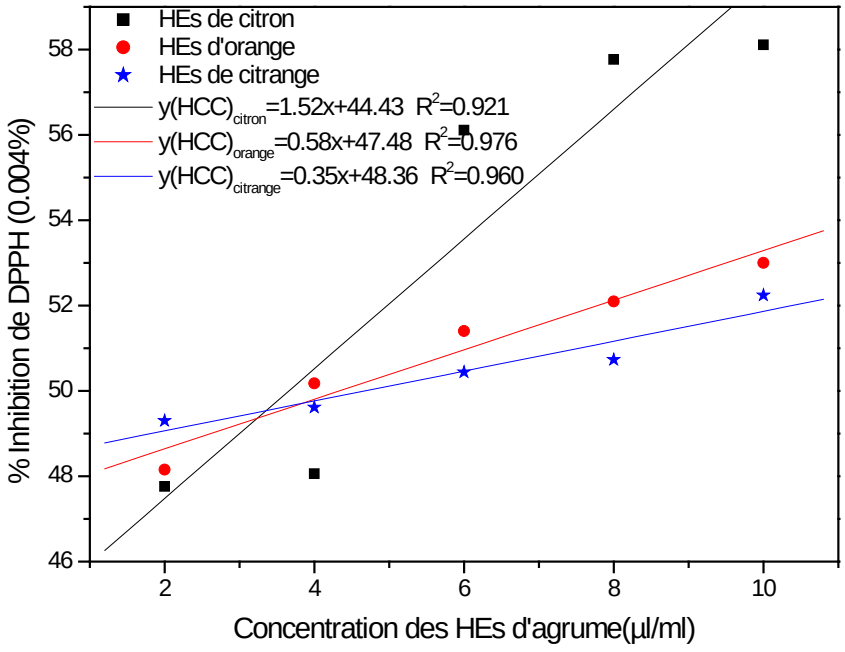


Figure III-8 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles des agrumes extraites par HCC

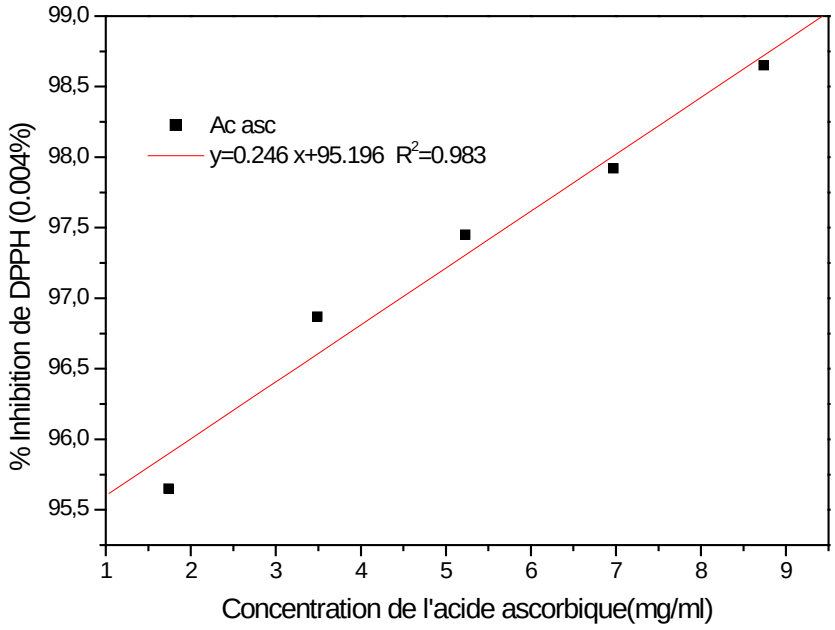


Figure III-9 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique

Tableau III.5 Valeurs des IC50 trouvées pour les HE de *Citrus*

HEs de *Citrus*	Technique d'extraction	IC_{50} exprimées en µl/ml
C.sinensis	HIM	2.17
	HCC	4.34
C.limonum	HCC	3.66
Citroncirus webberi	HCC	4.68

L'examen du Tableau III.5 et des figures III.7 et III.8 montre que les HEs testées extraites par hydrodistillation en utilisant le chauffage classique ont un pouvoir antioxydant presque similaire, de l'ordre de 3.66, 4.34 et 4.68 µl/ml pour l'HE de *C. limonum*, *C. sinensis* et *Citroncirus webberi*, respectivement. L'activité antioxydante des huiles essentielles d'agrumes extraites peut être corrélée à la présence de monoterpènes, qui sont les composés les plus abondants dans les huiles étudiées et ont été signalés comme possédant une bonne activité antioxydante [201-202], mais aussi à la présence des autres composés en faibles quantités ou en synergie entre eux. Plusieurs études sur la composition chimique et l'activité biologique des différentes huiles d'agrumes suggèrent que, même à de faibles concentrations, les composants de saveur authentique, tels que γ-terpinène, le terpinolène, le géraniol, le β-pinène, de myrcène ont des activités antioxydantes élevées [203-204]. Les HEs testées dans cette étude présentent des activités antioxydantes relativement basses par apport à celles étudiées par Frassinetti et al. [205], qui ont rapporté des capacités antiradicalaire de 20–70% à des concentrations allant de 50 à 1000 µg/ml des huiles essentielles de Bitter orange, orange douce, de citron et de mandarine cultivées en Italie. Cette différence dans les résultats est probablement due à la diversité de la composition chimique et selon des facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir la région de cultivar, la méthode utilisée dans l'extraction et d'évaluation.

De plus, nous remarquons que la méthode d'extraction des HEs assistée par induction électromagnétique a montré des résultats relativement différents en termes d'activité antioxydante, par rapport au système de chauffage conventionnel. Les HEs de *C. sinensis* extraites par chauffage classique présentent un IC50 de l'ordre de 4.34 µl/ml et de l'ordre de 2.17 µl/ml pour celles extraites par chauffage assistée par induction électromagnétique. Cette différence peut être due à la présence de quantités un peu élevées de monoterpènes (≈1%), dans les HEs de *C.sinensis* extraites par HIM en comparaison avec celle extraites par HCC.

En comparant avec l'acide ascorbique, le pourcentage d'inhibition est de 95.65 % à une concentration de 1.74 mg/ml (Figure III.9). Ces huiles ont donné alors des activités plus faibles à celle de l'acide ascorbique.

III.3.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HEs extraites

III.3.7.1.Aromatogramme

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es de *Citrus* sur la croissance des souches microbiennes testées: *S. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa et C.albicans*, sont représentées dans le Tableau III.6 et les Figures III.10 et III.11.

Tableau III.6 Diamètres des zones d'inhibition des H.Es de *Citrus*

Echantillon		**Diamètres d'inhibition (mm)**			
		S. aureus	*E .coli*	*C. albicans*	*Ps. aeruginosa*
C. sinensis	IM	22	9	19	9
	Sensibilité	Très sensible	Résistante	Très sensible	Résistante
	CC	20	9	17	9
	Sensibilité	Très sensible	Résistante	Sensible	Résistante
C. limonum	IM	20	18	20	9
	Sensibilité	Très sensible	Sensible	Très sensible	Résistante
	CC	19	15	18	9
	Sensibilité	Très sensible	Sensible	Sensible	Résistante
Amoxicilline		38	25	-	27

* Les diamètres des disques sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

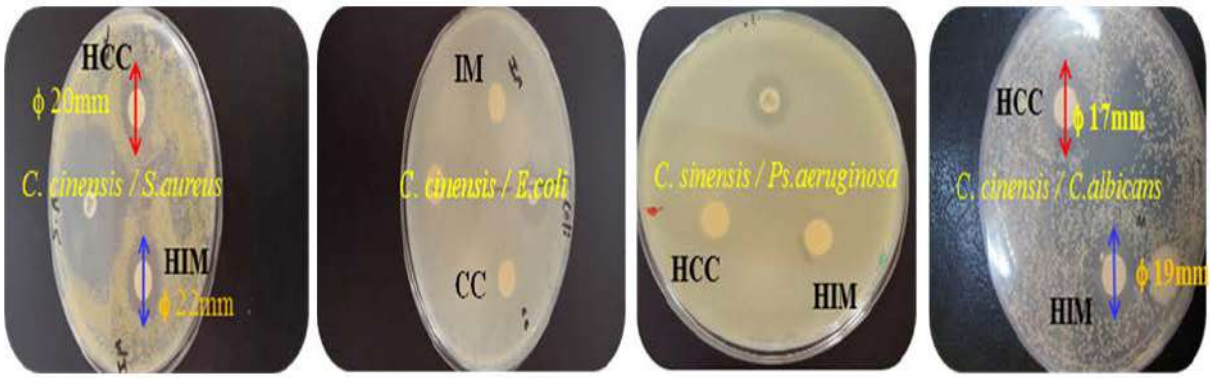


Figure III-10 Halo d'inhibition de l'H.E de *C.sinensis* sur: *S. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa* et *C.albicans*

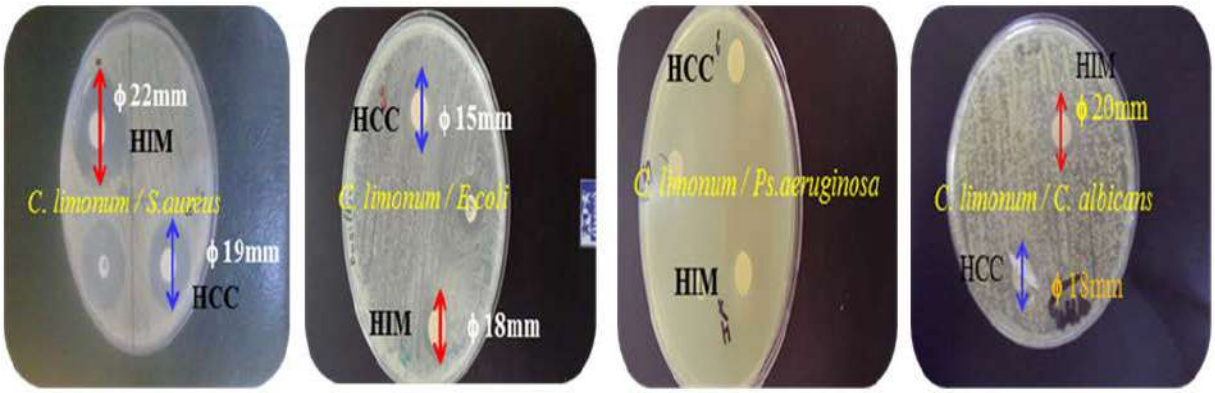


Figure III-11 Halo d'inhibition de l'H.E de *C.limonum* sur: *S. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa* et *C.albicans*

Les résultats d'aromatogramme obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton, révèlent que l'activité antibactérienne des H.Es testées est en fonction de la bactérie cible. Il est clair qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Ps. aeruginosa.* Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.Es de *Citrus* testées. Les résultats ont montré aussi que l'H.E de *C. limonum* est la seule à présenter une activité antibactérienne contre *E. Coli* dont le diamètre de la zone d'inhibition est d'environ 15-18 mm. Moreira et al. [206] ont montré que l'H.E de *C. limonum* était efficace contre 3 souches d'*E. coli* avec des diamètres des halos d'inhibition variant de 9 à 12 mm. Par contre *S. aureus* est l'espèce la plus sensible à l'action de toutes les H.Es testées (*C. sinensis et C. limonum)* dont le diamètre de la zone d'inhibition est situé entre 20-22 et 19-20 mm respectivement. Quant à *C. albicans* a montré une sensibilité modérée vis-à-vis des H.Es de *C. sinensis et C. limonum* avec des zones d'inhibitions de 17-19 et 18-20 mm respectivement. Ces résultats concordent avec les travaux

de Burt et al. [207] qui ont montré que les bactéries Gram négatif étaient généralement plus résistants aux huiles essentielles d'agrumes que Gram positive. Selon Burt et al. [207] et Busatta et al. [208], la grande résistance des bactéries Gram (-) aux H.Es est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui possèdent une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram (+). A l'inverse, Smith-Palmer et al. [209], en utilisant la méthode de puits sur milieu gélosé, ont rapporté que l'H.E de lime était plus efficace contre *S. Enteritidis* Gram (-), qu'avec l'H.E de citron pour *S. aureus*.

Il est à noter qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la teneur en composants chimiques et l'activité antibactérienne des HEs d'agrumes. L'étude de djenane [194] a révélé que l'HE d'orange dont le limonène représente un pourcentage de 77.40%, était moins efficace comme antimicrobien que l'HEs de bregamot, qui présente le même composé à faible concentration (2.20%), indiquant que les composés présents en grandes proportions peuvent ne pas être nécessairement responsables de l'activité antibactérienne des H.Es. Ainsi, Inouye et al. [210] ont remarqué que les H.Es contenant du phénol (alcool) comme composé majoritaire étaient plus actives que celles contenant le limonène (hydrocarbure monoterpènique) comme composé majoritaire. Selon des études antérieures [211- 212], l'activité antimicrobienne de certaines HEs pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à des faibles taux non négligeables tels que le nérol, le néral, bornéol, linanol, carvacrol, géraniol, myrténal et eugénol connus pour exhiber une activité antibactérienne impliquée dans les phénomènes de synergie entre les différents constituants qui peuvent être à l'origine d'une activité antimicrobienne beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires. Ces mêmes auteurs ont rapporté que les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires ; dégradation de la paroi cellulaire.

Les résultats montrent aussi que l'activité antimicrobienne des HEs extraites par HIM est légèrement supérieure à celles obtenues par HCC. Ceci peut être vraisemblablement justifié par la composition chimique des HEs qui varie selon les conditions expérimentales d'extraction.

Par conséquent, la comparaison de l'efficacité des HEs des différentes espèces testées ainsi à travers les différentes publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables, comme la composition chimique des

HEs qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce [194] et les conditions expérimentales.

III.3.7.2. Méthode de dilution en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle du *Citrus*, déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide, est présentée dans le Tableau III.7.

Tableau III.7 CMI (µl/ml) des huiles essentielles d'agrumes en milieu liquide

Echantillons		**CMI (µl/ml)**			
		S. aureus	*E. coli*	*C. albicans*	*P. aeruginosa*
***C.sinensis* (Orange)**	IM	10	20	20	>40
	CC	20	40	40	>40
***C. limonum* (Citron)**	IM	10	20	20	> 40
	CC	20	40	40	>40
Antibiotique	Céfalozine	<2.5	___	___	<2.5
	Peniciline G	----	>2.5	-----	-----

Les résultats obtenus ont montré que toutes les HEs testées ont exhibé des CMI > 40µl/ml vis-à-vis de *P. aeruginosa*. L'HE de *C. limonum* et celle de *C. sinensis* extraites par la technique d'HCC, ont montré un effet inhibiteur sur *S. aureus, E.coli, et C. albicans* avec des CMIs de l'ordre de 20, 40 et 40 µl /ml, respectivement.

La haute résistance constatée de *P. aeruginosa* peut être due à sa membrane externe particulière et à sa capacité de métaboliser un éventail de composés organiques [213-214-215]. Les bactéries du genre *Pseudomonas* utilisent les terpènes comme une source de carbone et d'énergie ; elles transforment le limonène (comme molécule modèle des terpènes) en alcool perillyl, en acide perillyl, en aterpinéol, ou en limonène-6,8-diol [216]. Hinou et al. [217] ont prouvé que *P.aeruginosa* est la bactérie la plus résistante à 32 huiles essentielles différentes. Boontawan et Stuckey [218] ont montré une dégradation des terpènes par la souche *P. fluorescens.* Oussalah et al. [219] ont réalisé une étude sur la détermination des CMIs de plusieurs HEs vis-à-vis de *S. aureus.* Ils ont rapporté que parmi vingt-huit (28) HEs testées, vingt-six (26) ont exhibé une CMI ≤ 0,4% vis-à-vis de la bactérie cible. Egalement, Kim et al. [220] et Fisher et al. [221] ont évalué l'effet antibactérien des HEs de citron, de

l'orange douce, de la bergamote et leurs composants (le linalol et le citral) « *in vitro* » par contact direct contre *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *E. coli O157 H:7, Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Le linalol et le citral ont présenté des CMIs allant de 0.06 à 0.125 % (v/v).

Dans le même contexte, Fuselli et al. [222] ont estimé des valeurs de CMIs respectivement de 839.9 et 763.8 mg/l pour les HEs de *C. sinensis* et *C. limonum* contre *Paenibacillus larvae,* et par conséquent, ces deux huiles sont caractérisées par une faible performance antimicrobienne vis-à-vis du microorganisme à cause de leurs CMIs élevées.

Selon Conner et Beuchat [223], le mode d'action des HEs contre les levures pourraient être dû également à l'affaiblissement des processus enzymatiques impliqués dans la production énergétique et la synthèse de composés structuraux. Les constituants majeurs de l'huile essentielle du citron β- pinene et le D-limonene, peuvent inhiber l'activité respiratoire dans les cellules intactes de levures et dans les mitochondries isolées [224].

Notre étude a montré également que les HEs de *C.sinensis* ont exercé une activité antimicrobienne (40 µl/ml) à l'encontre d'*E. coli.* Contrairement à nos résultats d'aromatogramme, qui ont montré que cette dernière est résistante aux HEs de *C.sinensis.* Ce qui signifie que les activités antimicrobiennes d'une HE peuvent changer en raison de la composition chimique, les génotypes, et les méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque sur agar ou par méthode de dilution). Ainsi, les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes peuvent être différents.

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation assistée par induction éléctromagnétique ont montré une meilleure performance antimicrobienne par rapport aux HEs extraites par chauffage classique, avec des CMIs de 10, 20 et 20 µl/ml contre *S. aureus, E.coli, et C.albicans,* respectivement.

III.3.8.Conclusion

A la fin de cette partie, nous tirons les points suivants :

- Les rendements en H.Es obtenus par hydrodistillation varient selon l'origine de la matière première utilisée.
- La comparaison des résultats obtenus de l'extraction des huiles essentielles des espèces *Citrus* étudiés par induction électromagnétique avec ceux obtenus par hydrodistillation classique a montré que l'hydrodistillation assistée par induction magnétique est meilleure que

l'HD classique car il est possible d'augmenter le rendement en HEs avec un gain du temps allant jusqu'à 10 minutes.

- L'identification qualitative et quantitative des composés chimiques par CG/SM a montré que les huiles essentielles de *C. sinensis* extraites par la technique HIM en comparaison avec HCC, révèlent une composition presque identique en hydrocarbures monoterpèniques tandis qu'une variabilité importante relative à la fraction oxygénée a été observée.
- Les HEs des trois espèces étudiés, extraites par hydrodistillation en utilisant le chauffage classique ont un pouvoir antioxydant presque similaire. Alors que, la différence en pouvoir antioxydant, observée entre les HEs extraites par les deux techniques HIM et HCC peut être attribuée à la faible différence en compsition monoterpéniques.
- La composition chimique des HEs montre aussi un effet sur l'activité antimicrobienne, où les HEs extraites par HIM ont une activité antimicrobienne légèrement supérieure à celles obtenues par HCC.

III.4. Extraction des pectines

Nous rappelons que dans cette partie, nous avons procédé à l'extraction des pectines par voie acide à chaud, à partir des albédos de citrange et aussi à partir du marc séché obtenu après extraction des huiles essentielles. L'extraction a été effectuée en utilisant deux modes de chauffage : chauffage classique (CC) et induction électromagnétique (IM).

III.4.1. Aspect général

Les pectines issues des écorces de citrange extraites par les deux modes de chauffage ont des caractéristiques similaires. En général, les pectines extraites présentent un certain degré de coloration en tant que produit final. La coloration s'étale de jaune pâle brun au beige très clair. La Figure III.12 représente les poudres des pectines extraites à partir des écorces de citrange. La coloration des pectines est provoquée par la combinaison de deux facteurs : couleur naturelle (pigmentation) des matériaux bruts et leur composition chimique (teneur en acide galacturonique, groupements acétyles, groupements d'acide féruliques, teneur en polyphénols…).



Figure III-12 Pectines extraites des écorces de citrange par : A) CC, B) IM

III.4.2. Rendement en pectine

Les calculs des rendements en pectines pour les écorces de citrange révèlent que la teneur en pectines varie selon la nature de la matière végétale et de la technique d'extraction. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau III.8.

Tableau III.8 Rendement en pectines de citrange

R(%)	CC	IM
Marc du citrange	17.14	21.75
Albédos du citrange	24.5	29

La première constatation à retenir de ces résultats, est que la teneur en pectine peut varier pour la même matière végétale selon les conditions expérimentales. Les rendements obtenus pour les pectines extraites par CC à partir des albédos et de marc de citrange, varient avec des moyennes de 24.5 et 17.5 %, respectivement.

Wang et al. [225] ont étudié le rendement de pectines sur huit variétés d'agrumes ; cette étude confirme qu'il y a une variation de la teneur en pectine d'une variété à une autre. En effet, Le rendement en pectine dépend du type de la matière première et des méthodes de traitements préliminaires. Le processus d'extraction, la variété, et le taux de la maturité peuvent affecter la quantité et la qualité de la pectine extraite [226].

La deuxième constatation, c'est que le rendement maximal obtenu par l'extraction classique à partir des albédos du citrange est de 24.5% , alors que l'extraction assistée par induction électromagnétique a permis d'atteindre une valeur de 29% dans les mêmes conditions en termes de pH, température et temps d'extraction, ce qui signifié que l'induction a augmenté le rendement avec un rapport de 4-5%. Ceci peut être expliqué par l'homogénéité et la rapidité du chauffage grâce à son principe de production de la chaleur au sein même du matériau à chauffer. Le principe du processus de chauffage par induction assistée par champ magnétique consiste à utiliser la propriété de conductivité électrique des solutions acides ou basiques [227]. L'explication la plus probable alors, est que pour les liquides conducteurs (acide sulfurique dilué dans notre cas), la mise en route du champ électromagnétique provoque l'agitation des ions présents ($2H^+$, SO_4^{2-}), par conséquent, l'augmentation de la température de la solution aqueuse. Au bout de quelques minutes, la solution aqueuse déclenche un mouvement avec les parties solides et ensuite commence l'ébullition. Durant l'extraction, l'ébullition est homogène dans tout le volume du réacteur. Cette spécificité d'homogénéité favorise ainsi une plus grande vitesse d'extraction. Ceci peut être traduit par la destruction rapide de la paroi végétale ce qui conduit à la libération facile des pectines de la matrice cellulaire. Yeoh et al. [228] ont montré qu'une durée de chauffage par microondes de quinze-minute était suffisante pour extraire la même quantité de pectine que celle obtenue par soxhlet en trois heures.

III.4.3. Taux d'humidité

Les résultats obtenus (Tableau III.9) montrent que les pectines possèdent des taux d'humidité variant entre 8 et 10%. Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés par plusieurs travaux comme ceux de Yapo et al. [229] (6.8 - 9.8%), Kurita et al. [230] (8.3 - 9.6%). Alors que les travaux menés par Mesbahi et al. [231] donnent des valeurs entre 2.01 et

3.21%, des valeurs nettement inférieures à nos résultats. Cette différence peut être justifiée d'un côté par le type de séchage utilisé et d'un autre côté par le type de broyage, c'est-à-dire la taille des particules de pectines. Le mode de stockage a aussi une influence sur la teneur en humidité. De ce fait, il faut stocker les pectines dans des flacons hermétiquement fermés et dans des endroits secs. Toutefois, il faut noter que les résultats du taux d'humidité montrent également que les substances pectiques sont faiblement hygroscopiques et ce niveau de perméabilité permet une bonne conservation des pectines.

Tableau III.9 Taux d'humidité des pectines de citrange

H(%)	CC	IM
Marc du citrange	08	10.71
Albédos du citrange	10.01	7.9

III.4.4. Taux de cendre

Les résultats des taux des cendres obtenus pour les pectines extraites sont regroupés dans le Tableau III.10. Les cendres sont souvent les oxydes de métaux restés après calcination de toute matière organique. Le taux de cendre varie entre 6 et 8%. De plus, il faut signaler que ces valeurs sont susceptibles de varier selon les variétés, la saison, le degré de maturité et les conditions de culture.

Tableau III.10 Résultats des taux de cendres pour les pectines de citrange

Cendres (%)	CC	IM
Marc du citrange	6.12	8.28
Albédos du citrange	6.26	7.9

Ces teneurs augmentent également avec le pH de précipitation et avec la concentration du sulfate d'aluminium, par contre les solvants organiques tel que l'alcool, permettent sa réduction par augmentation de la lessivation des impuretés présentes au cours de précipitation des pectines. Selon Cheftel et al. [232], les sels minéraux sont précipités avec la pectine, lors de la précipitation de celle-ci à l'alcool ayant un degré de 50 -60.

Dennapa et al. [233] ont obtenu des teneurs en cendres de 22.19 % pour les pectines extraites à partir de pulpe de papaya (*Carica papaya*) précipitées par du chlorure d'aluminium, alors que les cendres des pectines précipitées à l'alcool ne sont que de 5.22 %.

Les conditions d'extraction peuvent aussi exercer un effet sur la précipitation des impuretés avec les pectines, Yapo et al. [234] ont montré que les pectines extraites à pH 1.5 sont plus pures que celles obtenues par solubilisation à pH 2.0 à partir de pulpes de betteraves.

Selon Miyamoto et Chang [235], la teneur en cendres affecte la capacité de gélification des pectines. Plus la teneur en cendres est élevée, plus la solubilité et les propriétés de gonflement de la pectine diminuent.

De même selon Khotimchenko et al. [236], les substances pectiques présentent une affinité vis-à-vis des métaux lourds en particulier le plomb. La prise en métal dépend de la structure chimique de la pectine et l'augmentation de celle-ci s'accorde à la réduction du degré d'estérification.

III.4.5. Degré d'estérification

Les résultats de DE pour les pectines extraites sont illustré dans le Tableau III.11. Compte tenu de leur DE $\leq$ 50 %, les pectines extraites à partir de citrange entrent dans la catégorie des pectines faiblement méthylées.

Le degré de méthyl estérification des pectines peut varier selon la maturité, la partie, l'origine botanique du fruit et la méthode d'extraction. Dennapa et al. [237] et Beradini et al. [238] ont obtenu des pectines à partir de mangues et de fraises à pH 1.5 (HCl ou H_2SO_4), avec des DE variant entre 66 et 76 %, alors que Koubala et al. [239] ont trouvé à partir des mangues des pectines ayant un DE variant entre 52 et 86 %.

Selon le même tableau nous constatons, que le degré d'estérification de la pectine extraite à partir des albédos de citrange par chauffage classique est de l'ordre de 48%, ce résultat est similaire à celui de la pectine extraite par induction électromagnétique, cela veut dire que le mode de chauffage n'a pas d'influence sur la qualité de la pectine.

Tableau III.11 Résultats des degrés d'estérification pour les pectines de citrange

DE(%)	CC	IM
Marc du citrange	47.9	48
Albédos du citrange	48	49

Il faut noter que le DE est un paramètre qui affecte fortement la solubilité des pectines et leur tendance de former des gels. Iglesias et al. [240] ont montré que la pectine FM peut être employée pour préparer des gelées avec une faible teneur ou sans sucre en présence d'ions de calcium et peut être employée comme ingrédient pour les aliments à basses calories (allégés).

III.4.6. Analyse par infrarouge

Les spectres FT-IR des pectines extraites par les deux modes de chauffage (chauffage classique et à induction électromagnétique) sont illustrés dans la Figure III.13.

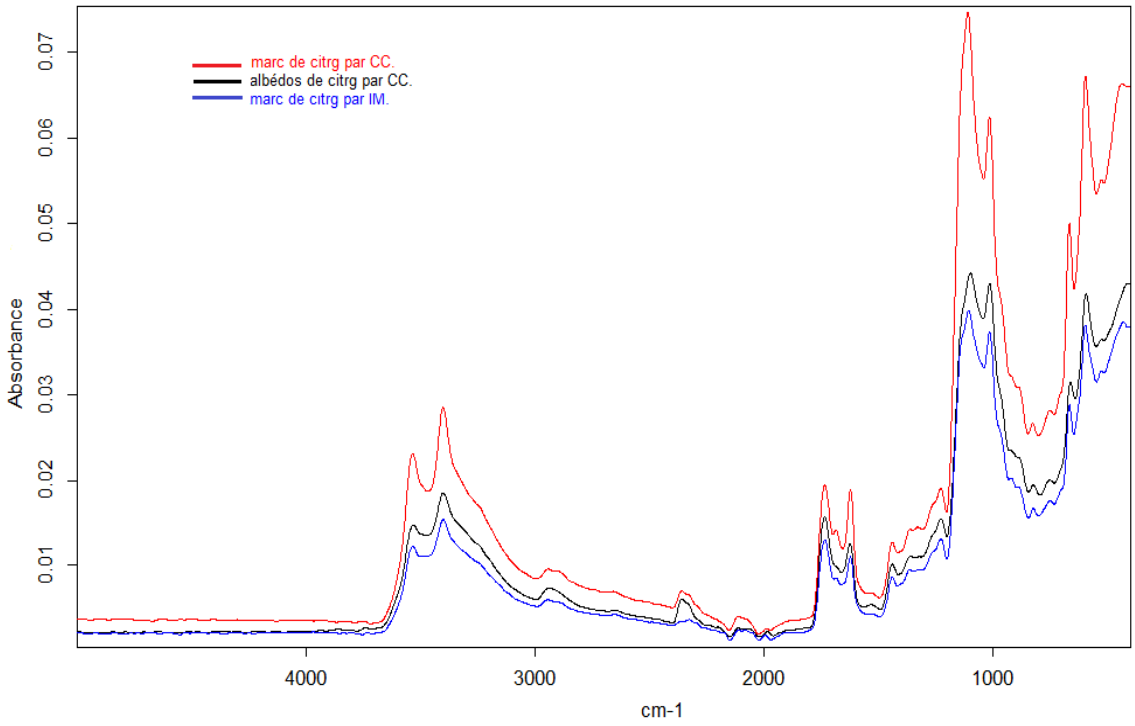


Figure III-13 Spectre FTIR des pectines de citrange obtenues par les deux techniques de chauffage à partir des albédos natifs et à partir des marcs

Cette figure représente la superposition des spectres correspondant aux différentes pectines de citrange extraites par les deux techniques de chauffage à partir des albédos natifs et aussi à partir des marcs. L'aspect général montre une similitude entre les différents spectres enregistrés entre 4000 et 500 cm^{-1}. En effet, les échantillons analysés possèdent les mêmes pics avec de légères différences en intensité. On remarque une bande vers 3600-3000 cm^{-1} caractéristique des groupements OH due aux liaisons d'hydrogène, un pic vers 2930 cm^{-1} correspondant à la vibration de valence du groupement CH, des pics à 1730 - 1760 cm^{-1} correspondant aux groupements carbonyles esters ($COOCH_3$), un pic vers 1600-1630 cm^{-1} caractéristique des ions carboxyles (-COO-), un pic vers 1070-1055 cm^{-1} caractéristiques des déformations des C-O exocycliques des sucres et des acides gluconiques.

Après avoir identifié les différents groupements d'atomes présents dans les fractions analysées, nous nous sommes intéressés par la suite à la bande correspondante aux groupements δ(C-C-O) et δ(C-O-C). En effet, cette région située entre 1000 et 1300 cm^{-1} est

dominée par des liaisons glycosidiques δ(C-O-C) en combinaison avec d'autres modes tels que δ(C-O-H), δ(C-C), δ(C-H), caractéristiques des substances pectiques.

En effet, ces absorbances attribuées aux pectines s'accordent avec celles trouvées dans la littérature (1145, 1100,1018, et 960 cm-1) [241,242]. Les groupements fonctionnels des pectines, leurs fréquences correspondantes ainsi que la nature des bandes sont représentés dans le Tableau III.12.

Tableau III.12 Principales fréquences observées sur les spectres IR pour la pectine

Fréquence (cm^{-1})	**Groupement fonctionnel**
1039	ν(COH)
1000-1200	Elongation C=O
1380	Liaison C-H
1400	Elongation symétrique COO
1600-1630	Elongation asymétrique COO
1730-1760	C=O, estérifié.
2500-3600	O-H d'alcool
2800-3600	C-H

III.4.7.Caractérisation moléculaire des substances pectiques

Les représentations graphiques regroupant les résultats typiques obtenus après les mesures viscosimétriques réalisées pour les pectines de citrange sont illustrées sur la Figure III.14.

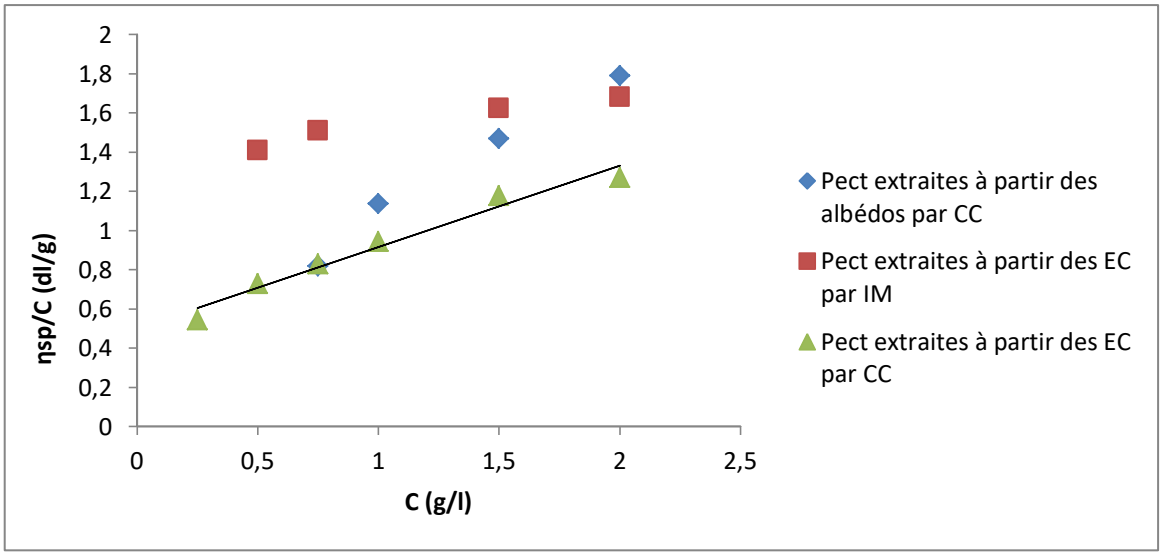


Figure III-14 Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour les pectines de citrange

Le Tableau III.13 regroupe les valeurs de la viscosité intrinsèque, la masse moléculaire ainsi que le coefficient de corrélation (R^2) pour les pectines extraites.

Tableau III.13 Viscosité intrinsèque et masse moléculaire de pectine extraite

	M_v (Da)	[η](dl/g)	R^2
Pect de marc du citrange par CC	12000	0.502	0.968
Pect de marc du citrange par IM	39000	1.351	0.9543
Pect d'albédos du citrange par CC	6660	0.323	0.9812

La viscosité intrinsèque reflète le volume hydrodynamique occupé par le polymère dans des conditions de solvant/polymère données. Elle dépend des conditions extrinsèques (température, conditions de solvant) et des caractéristiques intrinsèques de la pectine comme sa masse molaire [243-244]. L'examen des résultats obtenus confirme la nature des pectines extraites ; ce sont des macromolécules à poids moléculaire élevé variant de 6000 à 39000 Da. Les différences en masses moléculaires observées entre les différentes pectines justifient clairement la différence de la méthode utilisée pour l'extraction de ces pectines. Par ailleurs, il faut noter que les résultats des masses moléculaires obtenus pour toutes les pectines testées sont faibles par rapport à ceux cités dans la littérature [245,246]. Kaya et al. [247] ont trouvé des masses molaires allant de 140 à 400 KDa pour des pectines extraites à partir des écorces de citron de pamplemousse et d'orange.

Ceci est probablement lié aux différentes méthodes utilisées pour l'estimation de la masse moléculaire comme la chromatographie d'exclusion stérique à haute performance (HPSEC) ou par diffusion de la lumière aux angles multiples couplée à une chromatographie d'exclusion SEC/MALLS) et par les conditions d'extraction utilisées.

III.4.8. Caractérisation des contenus saccharidiques

Les résultats du dosage des sucres totaux par colorimétrie réalisée pour les pectines de citrange extraites sont représentés sur le Tableau III.14. Nous remarquons que l'acide galacturonique est le monosaccharide le plus dominant dans la composition chimique de la pectine du citrange (291-300 $mg.g^{-1}$). En effet, il représente la chaine principale de la substance pectique (Homogalacturonane). Ces résultats sont similaires aux travaux déjà publiés cités dans la bibliographie notamment ceux rapportés par Ralet et al. [248]. Pour les sucres neutres, les pectines de citrange sont riches en sucres neutres, des teneurs en monosaccharides typique de pectine comme le glucose (110-116 $mg.g^{-1}$), et la xylose (150-180 $mg.g^{-1}$), ceci signifie que la chaine d'acide homogalacturonique est considérablement ramifiée par des chaines courtes de sucres neutres.

Tableau III.14 Composition massiques ($mg.g^{-1}$) en sucres

	Gluc	GluA	Xyl
Albédos du citrange par IM	110	294.5	150
Albédos du citrange par CC	110	291	150

De nombreux auteurs, dont Zhang et al. **[**249**]** et Prabasari et al. [250] s'accordent sur le fait que la composition osidique des pectines varie en fonction de l'origine de la matière végétale, de la méthode et les conditions d'extraction de ces substances pectiques. Néanmoins, tous confirment que le rhamnose, la galactose, l'arabinose et le xylose constituent les sucres les plus abondants, contrairement au glucose, mannose et fructose qui sont les moins courants.

III.4.9.Conclusion

A la lumière des résultats obtenus, nous avons abouti aux conclusions suivantes :

- Le citrange constitue une source importante des substances pectiques qui pourront jouer un rôle potentiel pour une valorisation industrielle soit tels quelles ou modifiées.
- Les différents tests physicochimiques réalisés, montrent que, la nature de la matière végétale constitue un paramètre structural caractéristique des substances pectiques.
- L'extraction assistée par induction électromagnétique, dans ce cas précis, ne modifie pas qualitativement la pectine extraite, mais accélère la cinétique d'extraction. Par conséquent, l'extraction par chauffage à induction électromagnétique peut être une méthode alternative pour l'extraction des pectines.

III.5. Formulation et caractérisation d'émulsions d'HEs stabilisées par la pectine

Dans cette partie, des émulsions de type H/E d'HEs de *citrus* (à savoir *C. limonum*, *C. sinensis* et *Citroncirus webberi*) ont été élaborées à base d'un biopolymère émulsifiant, qui est une pectine hautement méthylée, additionnée de l'acide ascorbique, en tant qu'antioxydant fort. L'effet de la concentration en pectine et de l'acide ascorbique sur la stabilité des formulations a été étudié. L'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles seules et en émulsion a été aussi effectuées. Dans l'ensemble, cette étude serait utile dans le développement de systèmes plus efficaces avec des propriétés physiques, antioxydantes et antimicrobiennes prometteuses pour la conservation des aliments.

III.5.1. Caractérisation physico-chimiques des émulsions à base de pectine seule

III.5.1.1. Observations macroscopiques

Toutes les émulsions préparées ont été soumises à des analyses visuelles et organoleptiques telles que l'aspect, la couleur et l'homogénéité (Tableau III.15). Par ailleurs, la Figure III.15 montre l'évolution de l'aspect des différentes formulations durant le stockage à température ambiante. Toutes les émulsions présentent un aspect laiteux avec une consistance variée selon la teneur en pectine. Il est à noter que les émulsions contenant 3.5, 4 et 4.5% de pectine ont une consistance plus élevée que les autres formulations, cela s'explique par la quantité élevée en pectine.

Tableau III.15 Caractéristiques organoleptiques des émulsions fraîchement préparées

Emulsions	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Aspect	F	F	F	F	F	± E	± E	± E
Homogénéité	H	H	H	H	H	H	H	H
Couleur	B	B	B	B	B	B	B	B

**E : Epaisse, F : Fluide, H : Homogène, B : Blanche*

L'analyse des résultats obtenus montre l'effet de la concentration en pectine sur la stabilité des émulsions préparées. À des faibles concentrations de pectine (1 à 3.5%), un phénomène de crémage est apparu après 4 jours de conservation. Selon Kaltsa et al. [251], cette instabilité est causée par l'absence d'interactions de pontage pectine chargée négativement avec les gouttelettes d'huile positivement chargées. Alors pour les échantillons contenant (4 à 4.5%) de pectine, aucune séparation de phase n'a été signalée après 20 jours de conservation. L'ajout

de cette quantité de pectine (4 et 4.5%) a probablement provoqué une saturation des gouttelettes et donc une stabilisation stérique et électrostatique. De plus, la viscosité de la phase continue a été augmentée. En outre, la proportion de 4% de pectine semble former des émulsions plus stables. Ce comportement pourrait être attribué à la concentration appropriée de pectine avec un degré élevé d'estérification (DE = 88%) qui assure une bonne capacité d'émulsification. A haut DE, Schmidt et al. [252] ont montré que la plupart des groupements carboxyles sont méthylés, conduisant alors à des interactions hydrophobes entre les molécules de pectine, ce qui mène à une bonne stabilité.

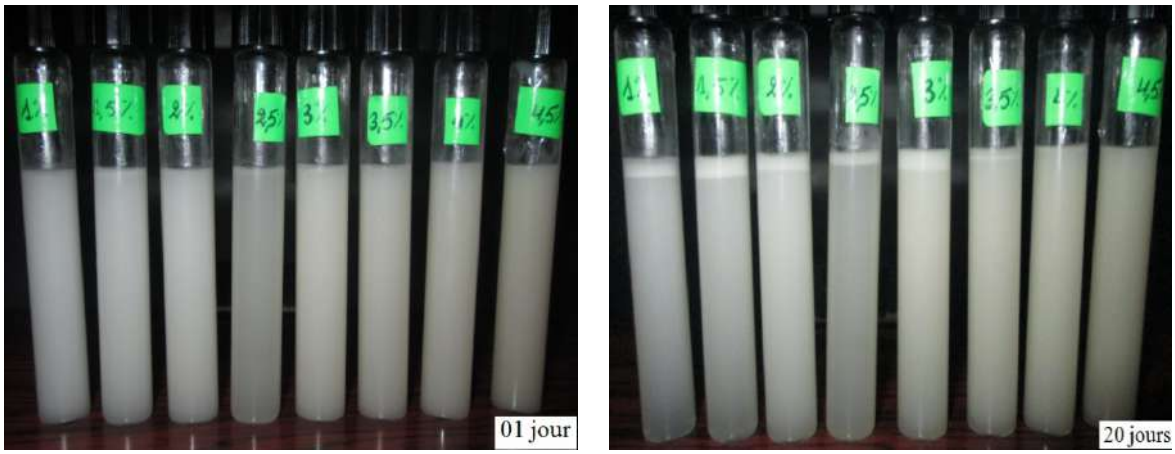


Figure III-15 Apparence des différentes formulations à T=20°C pendant 20 jours

III.5.1.2. *Examen microscopique*

Les émulsions fraichement préparées ont été analysées par un microscope optique avec un agrandissement de 10 fois. Les vues microscopiques des différentes formulations sont représentées dans la Figure III.16. L'examen microscopique montre la dispersion des gouttelettes huileuses dans la phase aqueuse. Cette dispersion varie selon la concentration en agent émulsionnant. Plus la concentration de pectine augmente, plus la dispersion est plus fine, et on obtient une émulsion stable (formulations contenant 4 et 4.5% en pectine). Une granulométrie plus visible est observée avec des différents diamètres de globules formés.

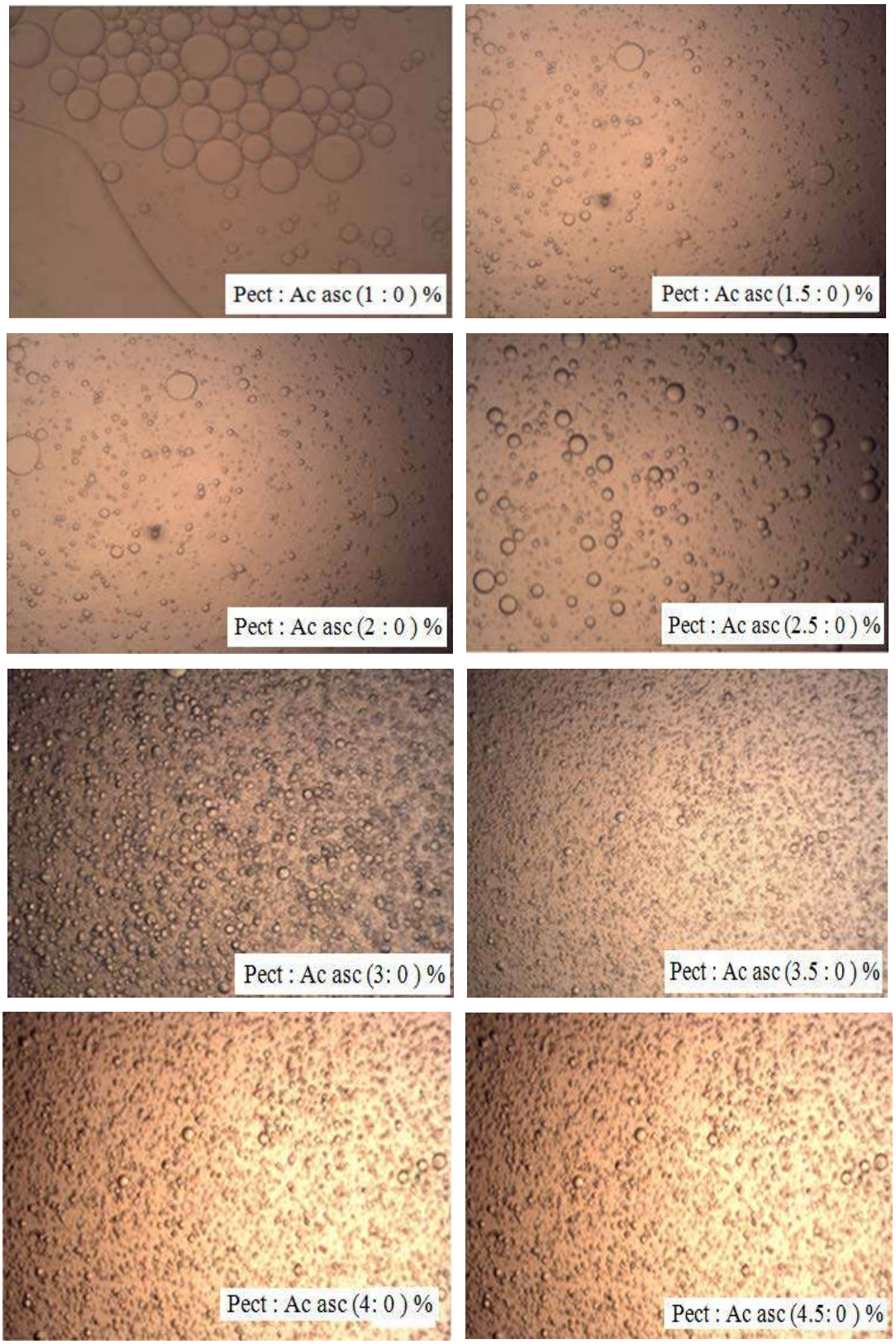


Figure III-16 Vues microscopiques des différentes formulations à base de pectine seule

III.5.1.3.Mesure du pH et de la conductivité

Les résultats de mesures du pH et de la conductivité électrique pour les différentes émulsions fraîchement préparées avec pectine seule sont représentés dans le Tableau III.6. Il est clair que le pH des différentes formulations présente des valeurs acides (pH =3.74-3.40) dans tout le domaine de concentrations testé. Du fait de la présence d'une chaîne principale d'acides polygalacturoniques, la pectine a un caractère acide [165], ce qui explique la diminution significative du pH. Par ailleurs, la conductivité électrique est proportionnelle à la concentration en pectine. Cela est dû au caractère ionique (anionique) de la pectine qui se comporte comme un polyélectrolyte en solution, et donc l'augmentation de la concentration en pectine contribue à l'augmentation des charges présentes en solution, ce qui conduit à une augmentation de la conductivité électrique, avec des valeurs allant de 250 à 710 µs/cm. Ceci confirme le caractère aqueux des émulsions, c'est à dire que la phase continue est l'eau [253].

Tableau III.16 Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions

Pectine	**1%**	**1.5%**	**2%**	**2.5%**	**3%**	**3.5%**	**4%**	**4.5%**
pH	3.74	3.62	3.60	3.56	3.53	3.52	3.42	3.40
Conductivité µs/cm	250	337	427	502	547	627	724	710

III.5.2. Influence de l'acide ascorbique sur la stabilité des émulsions d'HEs

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de l'acide ascorbique sur la stabilité et les propriétés inhérentes des émulsions de type H/E en ajoutant diverses concentrations d'acide ascorbique en phase continue, recouvertes de différentes quantités de pectine.

III.5.2.1. Observation Visuelle

L'aspect des différentes émulsions d'HE en présence d'acide ascorbique durant 20 jours de conservation a été évalué et les photographies obtenues sont représentées sur la Figure III.17. L'examen des résultats obtenus montre que les formulations contenant des quantités faibles en pectine (1 à 2.5%) avec l'acide ascorbique (0.5 et 1%) sont instables à cause du phénomène de crémage ou probablement à l'agrégation des gouttelettes d'huiles due aux interactions de pontage [254].

Par contre, l'ajout d'acide ascorbique à des émulsions avec des quantités en pectine allant de 3 à 4%, ne montre aucune séparation de phases, ce qui a permis l'obtention d'émulsions stables. Cette stabilité peut être attribuée aux interactions pectine-acide ascorbique. Les polysaccharides pectiques, en tant que glucides anioniques, peuvent former des liaisons hydrogènes entre l'atome d'oxygène du glucide et le groupement hydroxyle de l'acide ascorbique et par des interactions hydrophobes. Ce processus a été suggéré par Soltani et al. [255] pour les interactions pectine-composé phénolique.

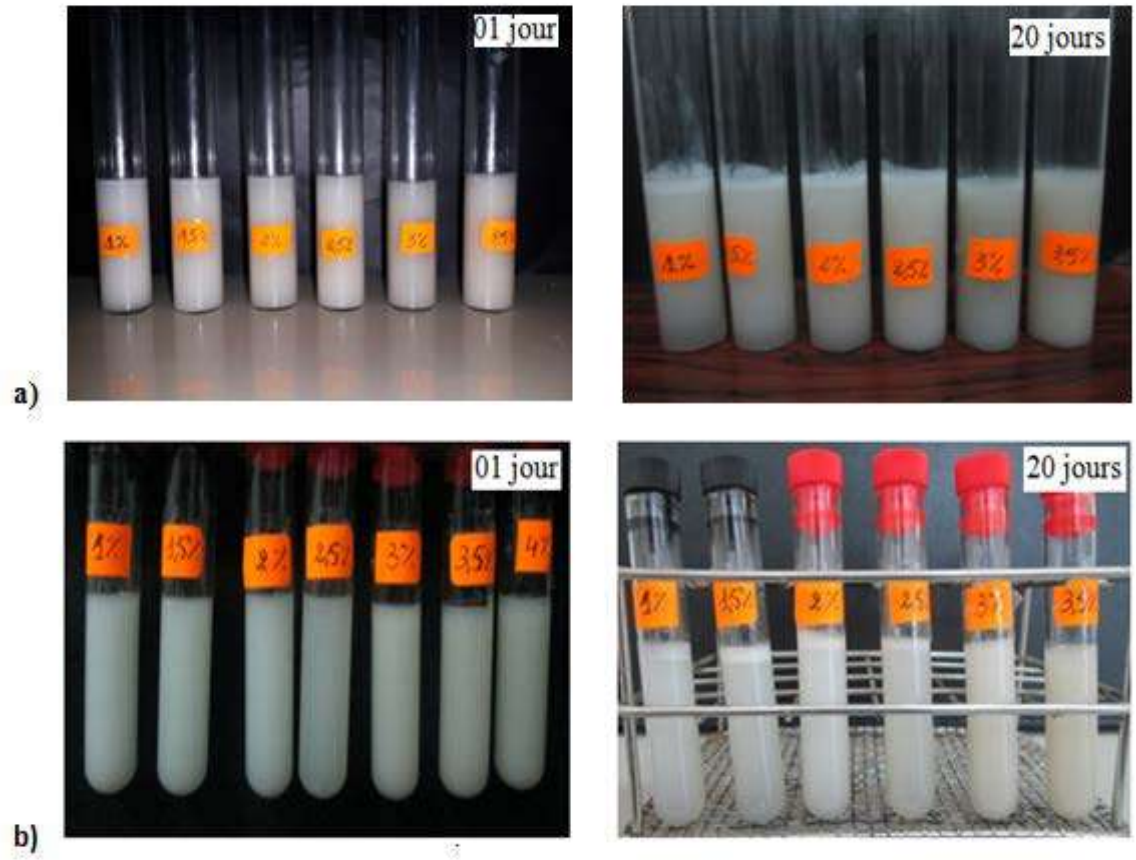


Figure III-17 Apparence des différentes formulations après 20 jours de conservation à T_{amb} avec: a) 0.5%, b) 1 %, d'acide ascorbique

III.5.2.2. pH et conductivité des émulsions

Les résultats de mesures de pH et de la conductivité électrique pour les différentes émulsions fraîchement formulées avec 0.5 et 1% d'acide ascorbique sont illustrés dans le Tableau III.17. En comparant les résultats de mesure du pH en absence et en présence d'acide ascorbique, on remarque bien que l'acidité des émulsions formulées en présence d'acide ascorbique est relativement augmentée par rapport à celles préparées sans acide ascorbique.

Cela est certainement dû à la présence simultanée du caractère acide de l'acide ascorbique et celui de la pectine (acides galacturoniques).

La mesure de la conductivité électrique donne des valeurs élevées, ce qui montre que la phase continue est aqueuse, c'est à dire qu'on est toujours en présence des émulsions H/E.

Tableau III.17 Résultats des mesures du pH et de la conductivité des émulsions en présence d'acide ascorbique

(Pect:Ac asc) %	**1:0.5**	**1.5:0.5**	**2:0.5**	**2.5:0.5**	**3:0.5**	**3:1**	**3.5:0.5**	**3.5:1**	**4:0.5**	**4:1**
pH	3.32	3.32	3.31	3.30	3.34	3.4	3.33	3.40	3.32	3.41
Conductivité µs/cm	543	643	714	754	719	676	727	709	774	814

III.5.3. Taille des gouttelettes et morphologie des émulsions

La distribution de la taille des gouttelettes et les vues microscopiques des émulsions préparées avec 3, 3.5 et 4% de pectine et renfermant différentes quantités d'acide ascorbique (0.5 et 1%) sont illustrées sur la Figure III.18 et la Figure III.19. La taille des gouttelettes de toutes ces émulsions montre une distribution monomodale, avec une polydispersité similaire, comme le confirme l'indice de polydispersité (PDI <0,7) comme indiqué dans le Tableau 18. Ceci confirme la bonne uniformité des gouttelettes. Ces résultats concordent avec les microstructures où les gouttelettes d'huiles dans les émulsions contenant de l'acide ascorbique sont de forme plus sphérique et homogène comparées à celles obtenues pour les émulsions sans acide ascorbique. Ces résultats confirment la stabilité pendant le stockage.

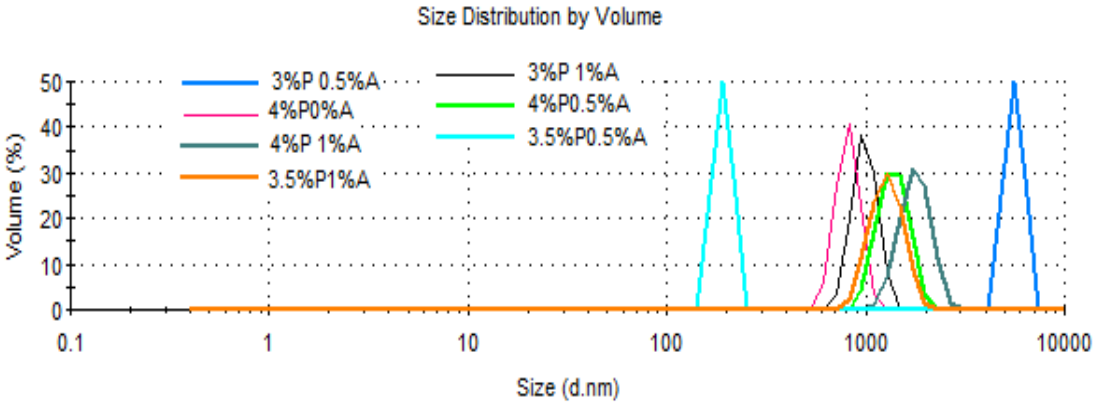


Figure III-18 Distribution des tailles de gouttelettes d'émulsions stabilisées

avec de la pectine en présence d'acide ascorbique

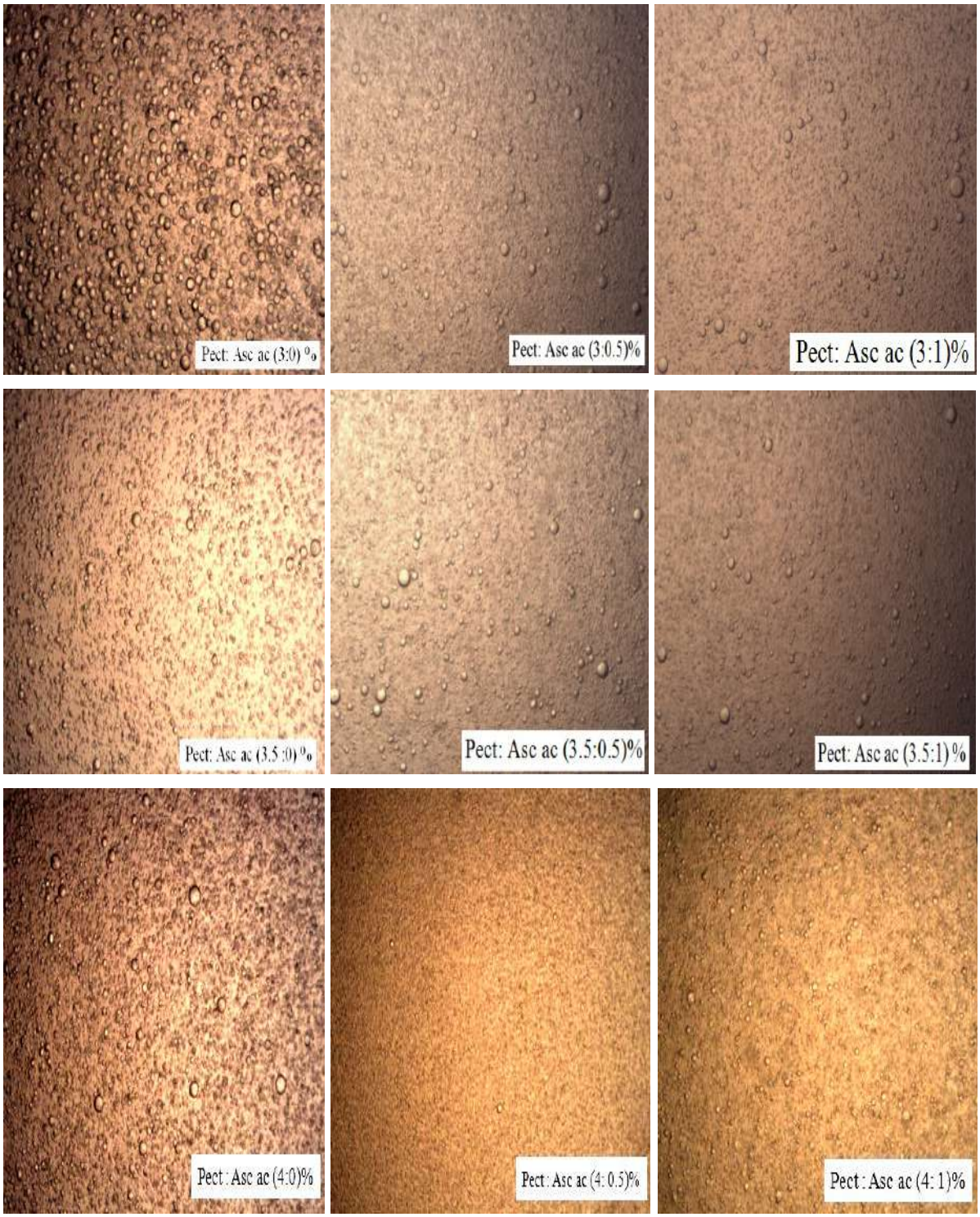


Figure III-19 Vues microscopiques d'émulsions stabilisées avec de la pectine en présence d'acide ascorbique

Le Tableau III.18 montre l'effet de la concentration en acide ascorbique sur le diamètre moyen (d_{av}:average diameter) des gouttelettes d'émulsions préparées. Les formulations ayant une composition de 4:0.5 et 4.1 en pectine:acide ascorbique, ont les plus petites tailles des gouttelettes d'environ 4.32 et 4.44 µm comparativement aux émulsions formulées sans acide ascorbique (4:0 pectine:acide ascorbique) avec une taille de 7.32 µm. L'ajout d'acide ascorbique diminue la taille des gouttelettes de l'émulsion, mais il n'y a pas de différence significative avec l'augmentation de la teneur en acide ascorbique (0.5 à 1%). Cet effet peut être attribué à l'aptitude de la pectine à former avec l'acide ascorbique un film multicouche qui contribue à la stabilité des émulsions à long terme contre le crémage, principalement due à une augmentation de la répulsion stérique et électrostatique. Des résultats similaires en termes de stabilité, ont été rapportés par Qiu et al. [256] pour les émulsions H/E revêtues par des couches interraciales gliadine-polysaccharide anionique.

Tableau III.18 Diamètres moyens des gouttelettes et valeurs des PDI des émulsions préparées avec différentes compositions en pectine:acide ascorbique

Pectin:acide ascorbique	**dav(µm)**	**PDI**
3:0.5	8.136	0.672
3:1	7.571	0.886
4:0	7.329	0.526
3.5:0.5	5.856	0.591
3.5:1	5.121	0.431
4:0.5	4.446	0.478
4:1	4.322	0.548

III.5.4. Analyse rhéologique

L'étude du comportement rhéologique des émulsions H/E fournit des informations significatives importantes sur les effets des paramètres de fonctionnement sur le mécanisme de stabilité et la structure colloïdale dans des conditions de stress. Les analyses rhéologiques effectuées dans cette étude ont été classées en deux types : analyse rhéologique en régime d'écoulement permanent et en régime oscillatoire.

III.5.4.1. Etude du comportement rhéologique- Courbes d'écoulement

Pour réaliser cette étude, nous avons appliqué à l'échantillon d'émulsion une rampe croissante de vitesses allant de 0.001 à 1000 s^{-1}, le test a été conduit à la température de 25°C.

La Figure III.20 représente la courbe d'écoulement décrivant le comportement rhéologique des émulsions étudiées, sous forme contrainte cisaillement-vitesse de cisaillement (courbe a) ou bien viscosité-vitesse de cisaillement (courbe b). L'allure de la Figure III.20-a montre clairement l'effet de la composition (pectine:acide ascorbique). Aucune des émulsions n'a montré une relation linéaire entre la contrainte de cisaillement et la vitesse de cisaillement, confirmant ainsi que les fluides sont non-newtoniens. Ce comportement peut être expliqué par des changements structurels, lorsque les chaînes déforment les globules sphériques et quand les gouttelettes d'émulsions commencent à se déformer en formant des couches qui coïncident avec le plan de cisaillement, offrant ainsi moins de résistance au flux comme le suggère Vianna-Filho et al. [257].

La viscosité de tous les échantillons étudiés diminue avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement, confirmant également le caractère rhéofluidifiant (Figure III.20-b).

Il semble que l'augmentation de la concentration du polysaccharide pectique augmente la viscosité, ceci est dû aux propriétés viscosifiantes et gélifiantes de la pectine [258].

De plus, la propriété rhéologique des émulsions dépend fortement de la taille des gouttelettes ainsi que du degré de polydispersité [259]. L'émulsion ayant une taille de gouttelette et une polydispersité plus faibles aura plus de formation de globules avec un garnissage plus ouvert pour provoquer une augmentation de la viscosité [260]. Ceci est en accord avec les résultats microscopiques (Figure III.19), où l'incorporation d'acide ascorbique a diminué la taille des gouttelettes et, la distance moyenne de séparation entre les gouttelettes a diminué, augmentant ainsi la viscosité. Selon Qiao et al [261], l'augmentation de la viscosité de l'émulsion diminue la possibilité de coalescence des gouttelettes et donc améliore sa stabilité.

Ainsi, il apparaît évident que l'introduction de l'acide ascorbique dans une émulsion simple entraîne des modifications des propriétés rhéologiques ; l'émulsion présente une viscosité et un caractère rhéofluidifiant supérieurs en comparaison avec une émulsion formulée sans acide ascorbique.

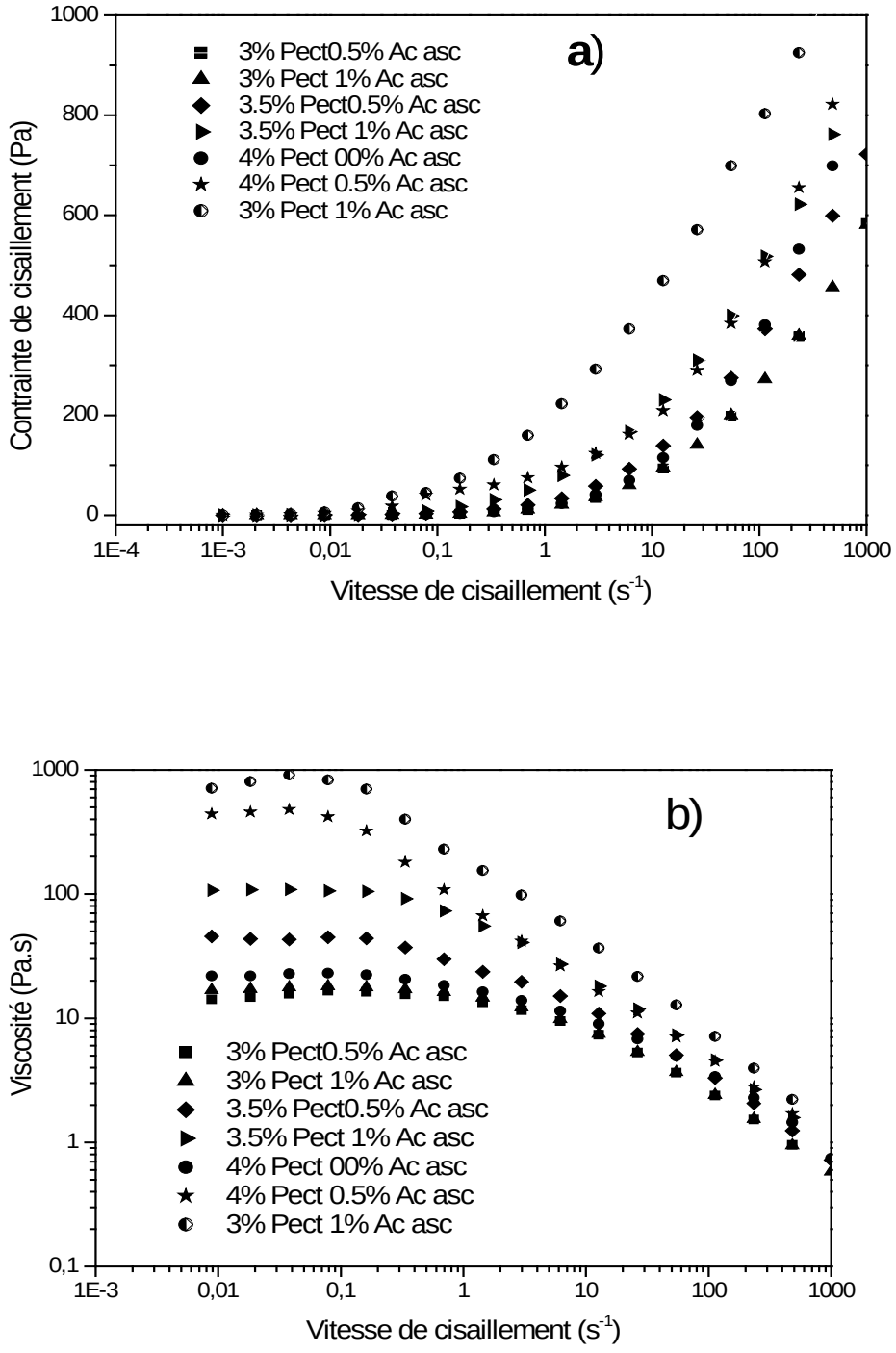


Figure III-20 Courbes d'écoulement des émulsions stables: « a) » Evolution de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement, « b) » Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement

III.5.4.2.Analyse rhéologique en régime oscillatoire

Le but de ce test est d'étudier le comportement viscoélastique des émulsions mises au point, ce qui va permettre d'évaluer la structure complexe du système et son élasticité. Nous avons pour cela procédé à la détermination de la transition entre le comportement élastique et visqueux par la détermination du module élastique (G') et du module visqueux (G'').

L'analyse viscoélastique est réalisée en imposant une gamme de déformation (ε) de 0.1 à 1000% sous une fréquence de 1 Hz.

L'évolution des modules G' et G'' en fonction de la déformation, pour les émulsions d'HEs avec différentes proportions en Pectine:acide ascorbique est illustrée sur la Figure III.21.

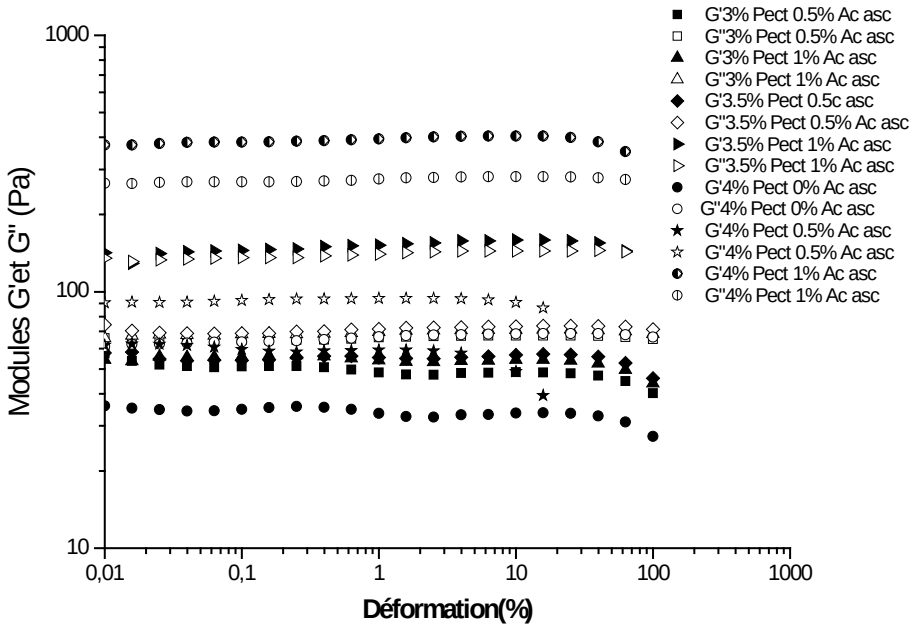


Figure III-21 Evolution des modules élastique (G') et visqueux (G'') en fonction de l'amplitude de la déformation appliquée, courbes comparatives pour les émulsions préparées

Les propriétés viscoélastiques d'une émulsion, telles que le module élastique G' et le module visqueux G", sont généralement mesurées pour évaluer si l'émulsion est fortement ou faiblement floculée [262]. Toutes les formulations étudiées présentaient un comportement viscoélastique linéaire, et le module visqueux (G") est toujours supérieur à celui élastique (G'), traduisant l'accroissement des frottements entre les gouttes résultants des réarrangements sous l'effet de cisaillement, sauf pour les émulsions contenant 3.5 et 4% en pectine avec 1% d'acide ascorbique, où G'> G " a été observé, traduisant le caractère élastique dominant de

l'émulsion concentrée en pectine-acide ascorbique. Ce résultat justifie la bonne élasticité de ces systèmes et la plus ou moins résistance des globules à la rupture. Il s'agit d'un comportement typique pour les émulsions concentrées, comme indiqué dans les travaux de Famuso et al. [263] pour des formulations commerciales. Un module élastique plus élevé implique qu'une contrainte plus élevée était nécessaire pour provoquer l'écoulement de l'émulsion [264]. D'autre part, les modules viscoélastiques des émulsions augmentent avec l'augmentation des concentrations en pectine-acide ascorbique. Selon Hayati et al. [265], ces observations peuvent être dues aux fortes interactions entre les gouttelettes.

III.5.5. Détermination de l'activité antioxydante des émulsions d'HE avec et sans acide ascorbique

Afin d'évaluer l'aptitude d'une émulsion H/E à base de pectine avec et sans ajout d'acide ascorbique à garder les propriétés biologiques des huiles essentielles d'agrume encapsulées, une étude comparative de l'activité antioxydante et antimicrobienne des émulsions et de ces composants individuels, à savoir l'huile essentielle d'agrume, la pectine et l'acide ascorbique a été effectuée.

Le Tableau III.19 regroupe alors les résultats du test DPPH des huiles essentielles seules et en émulsions avec et sans ajout d'acide ascorbique, de pectine et d'acide ascorbique qui ont été utilisés à une concentration fixe de 5mg/mL.

Tableau III.19 Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'HEs d'agrume

HE seule (5mg/ml)	Ac asc (5mg/ml)	Pectine (5mg/ml)	Emulsions H/E (5 mg/ml)		
			4%Pect (0.2mg/ml) 00% Asc ac HE (0.209mg/ml)	4%Pect(0.2mg/ml) 0.5%Ac asc (0.025mg/ml) HE (0.209mg/ml)	3.5%Pect(0.175mg/ml) 0.5% Ac asc (0.025mg/ml) HE (0.209mg/ml)
53.37 *(Orange)*	93.69	48.29	51.94	93.47	92.78~93
51.27 *(Citron)*			48.78	89.16	89.00
51.90*(Citrange)*			51.24	86.29	86.382

L'analyse des résultats montre que les émulsions contenant une proportion de 0.5% d'acide ascorbique provoquent une réduction presque totale de $DPPH^{\bullet}$ avec des pourcentages

d'inhibition de l'ordre de 93, 89 et 86% pour les émulsions d'huile essentielle d'orange, de citron et de citrange respectivement avec une teneur en huile de 0.209 mg/ml. Alors que les émulsions dépourvues en acide ascorbique présentent des pourcentages allant de 48.78 à 51.94%. Ainsi, les émulsions formulées ont présenté une activité antioxydante nettement supérieure à celle des composants individuels, cela peut être attribué à l'effet synergique de l'huile essentielle d'agrume, de la pectine et de l'acide ascorbique utilisés ensemble.

Stevanović et al. [266] ont rapporté que l'activité antimicrobienne des composites polymères/nanoparticules métalliques est due à une approche synergique très efficace à faible concentration, par rapport aux propriétés antioxydantes obtenues pour les composants individuels. Par conséquent, la combinaison des effets synergiques de l'huile essentielle d'agrume, de la pectine et de l'acide ascorbique comme agents antioxydants dans le même système peut offrir une activité antioxydante plus efficace pour la conservation des aliments.

L'évaluation d'activité antioxydante des émulsions d'HEs après 7 jours de conservation à 4°C et à l'abri de la lumière a montré des résultats identiques à ceux trouvés pour des émulsions d'HE fraichement formulées (Tableau III.20). Tandis que, les émulsions d'HE à base d'acide ascorbique conservées sous une température ambiante et à l'exposition de la lumière ont présentées une coloration jaunâtre au cours du temps (Figure III.22). D'après Yuan et al [267], la température a un effet major sur la dégradation de l'acide ascorbique. Donc le changement de couleur dans notre cas, est un signe de dégradation de l'acide ascorbique et donc de l'émulsion.

Tableau III.20 Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'huiles essentielles après 7 jours de conservation à 4°C et à l'abri de la lumière

Espèce d'agrumes	*Emulsions H/E*		
	4% Pectine 00% Ac asc	4% Pectine 0.5% Ac asc	3.5% Pectine 0.5% Ac asc
Citrus sinensis	50.313	91.77	92.985
Citrus limonum	48.641	88.16	88.246
Citroncirus webberi	51.696	86.63	86.30

A l'issue de ces résultats, faire conserver les émulsions d'HE à base d'acide ascorbique dans des conditions adéquates est un paramètre très important pour garantir leur stabilité chimique.

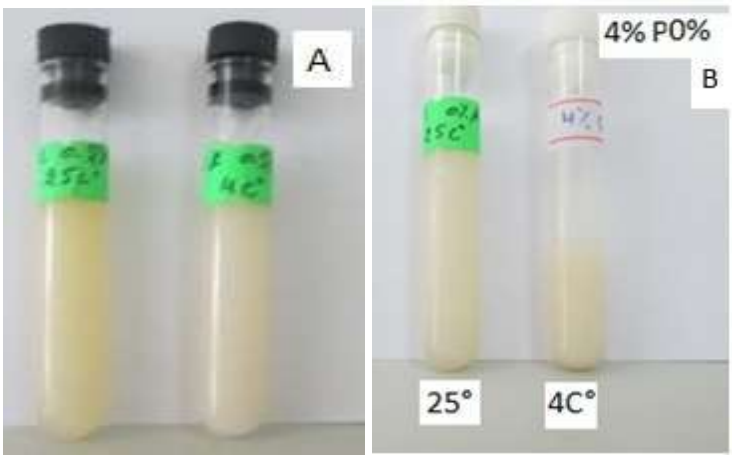


Figure III-22 Effet de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE

A) avec acide ascorbique, B) sans acide ascorbique

III.5.6. Détermination de l'activité antimicrobienne des émulsions d'HE

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'orange (*Citrus sinensis*), de citron *(citrus limonum*) et de citrange *(Citroncirus webberi*), seules et incorporées dans une émulsion H/E à base de pectine avec et sans ajout d'acide ascorbique, a été évaluée par la méthode de dilution en milieu liquide. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été calculées uniquement pour quelques émulsions qui ont été sélectionnées de telle sorte qu'on peut étudier l'effet de chaque composant sur l'activité antimicrobienne. Le Tableau III.21 regroupe les résultats des CMI des HEs seules ou incorporées dans les émulsions vis-à-vis de *S.aureus* et *C.albicans* (choisies comme exemple).

Des formulations à base de pectine seule et avec acide ascorbique sans HE ont été utilisées comme témoins pour étudier les propriétés antimicrobiennes potentielles de la pectine et de l'acide ascorbique par le biais d'un test de diffusion sur gélose. Comme on pouvait s'y attendre, ces formulations n'étaient pas capables de créer des zones claires autour des disques indiquant que ni la pectine ni l'acide ascorbique ne possédaient des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis des souches testées.

Face aux résultats des CMI obtenus à l'issue de l'étude comparative de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles seules et en émulsions, il ressort que les émulsions d'HEs avec une proportion de 4% en pectine avec ou sans ajout d'acide ascorbique, ont présenté des CMI de l'ordre de 20 µl/ml contre *S. aureus* ce qui correspond à une teneur en HEs de 0.697 mg/ml, alors les émulsions avec une proportion de 3.5% de pectine et 0.5 % d'acide ascorbique ont exhibé une CMI de 40 µl/ml correspondant à une teneur en HEs de

1.39 mg/ml. Il est évident d'après ces résultats que l'effet antibactérien exercé est proportionnel à la taille des gouttelettes des émulsions testées. En effet, les émulsions avec une composition de 4:0.5 et 3.5:0.5 % en pectine:acide ascorbique, ont une plus petite taille de gouttelette de l'ordre de 4.32 et 4.44 µm respectivement, par rapport à celles sans acide ascorbique (4:0 pectine:acide ascorbique) avec une taille de 7.32 µm.

Tableau III.21 CMI (µl/ml) des huiles essentielles et leurs émulsions

Echantillons			**CMI (µl/ml)**	
			S. aureus	*C. albicans*
Orange ***(Citrus sinensis*)**	HE seule		10	20
	Emulsions	4% Pectine 0% Ac asc	40	> 40
		4% Pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
		3.5% Pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
Citron **(*Citrus limonum*)**	HE seule		10	-
	Emulsions	4% Pectine 0% Ac asc	40	> 40
		4% Pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
		3.5% pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
Citrange ***(Citroncirus webberi)***	HE seule		10	> 40
	Emulsions	4% Pectine 0% Ac asc	40	> 40
		4% Pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
		3.5% Pectine 0.5% Ac asc	40	> 40

Dans une étude récente, Otoni et al. [268] ont testé l'efficacité antibactérienne des pectine/papaye purée/cinnamaldéhyde nanoémulsions vis-à-vis *d'E.coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* et *S. aureus.* Ils ont constaté que l'activité antimicrobienne fournie par le cinnamaldéhyde contre les pathogènes alimentaires a été remarquablement améliorée par la réduction de la taille des gouttelettes en raison de l'augmentation de la surface d'échange. En appui à cette dernière observation, Huang et al. [269] ont rapporté que les nanoparticules ont des surfaces d'échange beaucoup plus grandes que les gouttelettes de taille micronique, ce qui conduit à une accessibilité accrue des composés dispersés.

Les activités antimicrobiennes améliorées de gouttelettes plus petites trouvées ici sont attribuables à une plus grande capacité du composé actif à migrer à travers le film et à pénétrer dans des cellules microbiennes. Ceci est soutenu par Huang et al. [269] qui ont souligné comme un avantage des nanoémulsions par rapport aux émulsions classiques, le transport facilité des produits phytochimiques à travers les membranes cellulaires, entraînant des concentrations phytochimiques accrues dans le plasma et donc une biodisponibilité accrue.

Notre étude a montré également que les HEs de *C.sinensis et C. limonum* ont exercé une activité antimicrobienne de 10 µl/ml à l'encontre de *S. aureus* et des CMI = 20 µl/ml vis-à-vis de *Candida albicans.* Ces résultats ne sont pas en accord à nos résultats trouvés précédemment (section III.3.7.2) où nous avons trouvé des CMIs de l'ordre de 20 µl/ml vis-à vis *S. aureus.* Il est à noter ici que les HEs que nous avons testés dans les deux parties ne sont pas de la même période de récolte, ce qui signifie que les activités antimicrobiennes d'une HE peuvent changer en fonction de sa composition chimique. Selon Senatore et al. [270], les variations rencontrées dans la composition chimique des HEs, du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs comme le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante et la présence de chemotypes. Il faut noter aussi que selon Minh et al. [271], la maturité du fruit a un impact important sur la composition chimique de l'huile essentielle. Ainsi, les terpènes sont exclusivement présents dans l'huile du fruit non mûr, à mesure que le fruit murisse les concentrations en aldéhydes, terpènes oxygénés et sesquiterpènes aliphatiques augmentent.

III.5.7.Conclusion

Dans l'ensemble, il ressort de cette étude, sur les effets biologiques des émulsions d'HEs formulées, que l'encapsulation à base de pectine permet d'obtenir des microparticules avec une bonne stabilité, et que la combinaison des effets synergiques des agents antioxydants

multiples (huile essentielle d'agrume, pectine et acide ascorbique) dans le même système constitue une alternative naturelle prometteuse à la conservation chimique des aliments. De plus la formulation permet de moduler les propriétés des molécules d'intérêt encapsulées en contrôlant leur libération mais aussi leur activité.

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce manuscrit avait pour objectif la valorisation d'une biomasse agroalimentaire formée par les écorces de trois espèces de *Citrus* à savoir *C. limonum* (Citron), *C. sinensis* (Orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange), par l'extraction de biomolécules à grande valeur ajoutée et en particulier les huiles essentielles et les substances pectiques.

L'impact d'une nouvelle technique de chauffage assistée par induction électromagnétique sur les propriétés caractéristiques des produits extraits a été également étudié. Les extraits ainsi obtenus ont été valorisés dans la formulation de systèmes dispersés ou émulsions huile-dans-eau (H/E).

Pour ce faire, la partie expérimentale dédiée à ce travail est subdivisée en trois grandes parties. Une première partie a été consacrée à l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces de trois espèces de citrus par hydrodistillation en utilisant deux modes de chauffage à savoir le chauffage classique et celui assisté par induction électromagnétique. Les HEs obtenues ont été soumises à des analyses physicochimiques appropriées (densité, indice de réfraction, analyse par CG/SM) et biologique (activité antioxydante et antimicrobienne).

Les résultats obtenus ont révélé que les rendements en HEs varient selon l'origine de la matière première utilisée. Ainsi, nous avons enregistré des rendements moyens en HEs obtenus par la technique classique de l'ordre de 1.54, 2.24 et 2.72% pour *C. limonum*, *Citroncirus webberi* et *C. sinensis*, respectivement. De plus, l'effet du rapport pondéral sur le rendement d'extraction montre qu'un rapport pondéral de 1/2 est considéré comme optimal pour l'obtention du meilleur rendement en HEs d'agrumes. Aussi, l'extraction des HEs des espèces Citrus étudiés par hydrodistillation assistée par induction électromagnétique, a montré qu'il est possible d'augmenter le rendement en HEs à 2.86, 2.29 et 3.77% pour *C. limonum*, *Citroncirus webberi* et *C. sinensis*, respectivement en un temps d'extraction plus court, contre 1.54, 2.24 et 2.72% obtenus par l'hydrodistillation classique pour *C. limonum*, *Citroncirus webberi* et *C. sinensis*, respectivement. Donc, l'extraction par chauffage à induction électromagnétique peut être une alternative pour l'extraction des huiles essentielles avec de meilleurs rendements en un temps réduit.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus relatifs aux caractéristiques physiques (densité, indice de réfraction) ont révélé que les huiles essentielles extraites semblent répondre aux spécificités des normes internationales (AFNOR). L'identification qualitative et quantitative des composés chimiques par CG/SM des H.Es des *C. sinensis* a montré que l'huile essentielle des écorces d'oranges, qu'elle soit extraite par HIM ou par HCC est

constituée par un nombre de composés aromatiques identiques (21 composés) avec une composition presque identique en hydrocarbures monoterpéniques tandis que, une variabilité importante relative à la fraction oxygénée.

L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus in vitro* par la méthode de réduction du DPPH°, a démontré un certain pouvoir antioxydant des huiles extraites. Les HEs extraites des trois espèces de *Citrus* par hydrodistillation en utilisant le chauffage classique ont présenté un pouvoir antioxydant presque similaire de l'ordre de 3.66, 4.34 et 4.68 µl/ml pour les HEs de *C. limonum*, *C. sinensis* et *Citroncirus webberi*, respectivement. Alors que les HEs extraites par induction électromagnétique ont montré des pouvoirs antioxydants meilleurs (2.17 µl/ml) par rapport à celles extraites par chauffage conventionnel (4.34 µl/ml). Cette amélioration en pouvoir antioxydant peut être attribuée à la différence en composition chimique des huiles extraites par les deux modes du chauffage en particulier les composés monoterpènes qui marquent une présence un peu élevée dans les HEs de *C.sinensis* extraites par HIM en comparaison avec celle extraites par HCC.

L'évaluation antimicrobienne a quant à elle révélé que l'activité antibactérienne des H.Es testées varie en fonction de la bactérie cible. De plus, la composition chimique des HEs a montré aussi un effet sur l'activité antimicrobienne, où les HEs extraites par HIM ont une activité antimicrobienne légèrement supérieure à celles obtenues par HCC.

Dans la deuxième partie, l'accent a été mis sur la valorisation des marcs obtenus après l'hydrodistillation par l'extraction des substances pectiques. Ces dernières, ont été extraites à partir des marcs du citrange par voie acide à chaud en utilisant toujours les deux modes de chauffage conventionnel et celui par induction électromagnétique. Dans l'objectif de faire une comparaison en termes de rendement et des propriétés structurales des pectines, une extraction à partir des albédos du Citrange à l'état natif a été également réalisée dans les mêmes conditions que pour le cas des marcs.

Les résultats obtenus montrent que le citrange constitue une source importante de substances pectiques avec des rendements de l'ordre de 17 et 29% pour les marcs et les albédos, respectivement. C'est pourquoi les agrumes représentent la matière première la plus utilisée en pectinerie industrielle. Les degrés d'estérification déterminés par titrimétrie ont montré que les pectines extraites font partie des pectines faiblement méthylées (DE <50%). Par ailleurs, l'extraction des pectines assistée par induction électromagnétique a montré les meilleurs résultats en termes de rendement avec un maximum de l'ordre de 29% obtenu par HIM contre 24.5% obtenu pat HCC. Donc, l'extraction par chauffage à induction

électromagnétique peut être considérée comme une méthode alternative pour l'extraction des pectines. Son intérêt réside dans le fait qu'elle peut préserver la qualité des produits à extraire car elle fait appel à une technologie permettant une homogénéisation rapide de la température du milieu d'extraction.

La troisième partie de cette étude a été consacrée à la formulation des émulsions H/E à base d'huiles essentielles extraites et de pectine hautement méthylée. Les résultats obtenus ont montré que cette dispersion varie selon la concentration en agent émulsionnant c'est-à-dire, plus la concentration de pectine augmente, plus la dispersion est plus fine et par conséquent l'émulsion est plus rigide et stable (pour des formulations contenant 4 et 4.5% en pectine). Par ailleurs, il a été observé que l'ajout d'acide ascorbique à des émulsions avec des quantités en pectine allant de 3 à 4%, conduit à la production d'émulsions avec une bonne stabilité.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *citrus* utilisée seule ou en émulsions, par la méthode de réduction du DPPH° a montré que les émulsions possèdent un bon pouvoir antioxydant, et que le pourcentage d'inhibition pour toutes les émulsions formulées avec 4% de pectine et 0% acide ascorbique est similaire à celui de l'huile essentielle seule. Ceci confirme que la mise en émulsion à base de pectine n'a pas affecté l'activité antioxydante de l'huile essentielle. Alors que l'ajout de l'acide ascorbique peut provoquer une réduction presque totale de $DPPH^{\bullet}$ (88-99%) voir une amélioration du pouvoir antioxydant des émulsions formulées.

En matière d'activité antimicrobienne, le test antimicrobien des huiles essentielles seules et en émulsion déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide a révélé que les deux bactéries testées (*S. aureus et C. albicans*) présentent une sensibilité à ces huiles, tandis que les HEs de citron ont exercé une importante activité antimicrobienne (CMI=5 µl/ml) à l'encontre de *C. albicans* par rapport aux HEs d'orange et de citrange.

A l'issue de tous ces résultats, il faut signaler que ce travail est loin d'être achevé et il mérite une poursuite en développant les points suivants :

- utilisation des méthodes d'extraction des huiles essentielles plus appropriées, en étudiant profondément les facteurs modulants, les rendements et les propriétés des extraits ;
- développer la technique d'extraction par induction électromagnétique.
- faire d'autres applications en bioformulation

Références bibliographiques

1 : www.fao.org/publications. Consulté le 20/07/2017.

2 : Dung N.T., Kim J.M. and Kang S.C., 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology 46: 3632-3639.

3 : Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chem., 102: 898-904.

4 : Hoogwijk M, FaaijA, Van den Broek R, Berndes G, Gielen D, Turkenburg W, 2003. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy, Biomass and Bioenergy 25: 119-133.

5 : Anselmo Filho, P. and Badr O., 2004. Biomass resources for energy in North-Eastern Brazil. Applied energy, 77: 51-67.

6 : Fernández Llorente, M.J., Carrasco García, J.E., 2006.Concentration of elements in woody and herbaceous biomass as a function of the dry ashing temperature, Fuel 85: 1273-1279.

7 : Thy P., Jenkins B.M., et al., 2006.High temperature elemental losses and mineralogical changes in common biomass ashes, Fuel, 85:pp.783-795.

8 : Gallaher, D. et Schneeman, B.O., Dietary fiber. In:B. Bowman and R. Russel (Eds.). Present knowledge in nutrition (8th ed., 805p). Washington,2001, DC: ILSI.

9 : Lamghari R., Sanchez, C.,El Boustani, E.,Maucourt, N. M., Sauvaire, Y., Mejean, L. et Villaume, C., 2000.Comparison of effects of prickly pear (*Opuntia ficus indica* sp.) fruits, arabic gum and citrus pectin on viscosity and in vitro digestibility of casein. Journal of the Science of Food and Agriculture 80:359–364.

10 : Milnes B. A., AgmonG. &Hasharon R.,1995. Debittering and Upgrading Citrus Juice and By-Products Using Combined Technology. Koch Membrane Systems, Inc. is a Koch Chemical Technology Group, LLC company : 1-12.

11 : Faravash R.S., & Ashtiani F.Z., 2008. The influence of acid volume, ethanol-to extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace. Food Hydrocolloids, 22: 196-202.

12 : Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. 2007. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. Journal of Food Engineering 78 :693-700.

13 : Favela-Tores, E., Volke-Sepulveda, T., Viniegra-Gonzalves, G., 2006.Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technology and Biotechnology: 221-227.

14 : Maciel M, Ottoni C, Santos C, Lima N, Moreira K, Souza-Motta C., 2013.Production of Polygalacturonases by *Aspergillus* Section *Nigri*Strains in a Fixed Bed Reactor, *Molecules*, *18*, 1660-1671.

15 : Seyis, I., Aksoz, N., 2005.Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. Food Technology and Biotechnology, 43: 37-40.

16 : Rosales, E., Rodríguez Couto, S., ÁngelesSanromán, M., 2005. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. Journal of Food Engineering., 66: 419-423.

17 : Shojaosadati, S.A., Babaeipour, V., 2002.Citric acid production from apple pomace in multilayer packed bed solid-state bioreactor. Process Biochemistry, 37: 909-914.

18 : Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S., Zanetti, F,2000. [gamma]-Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. Bioresource Technology,73: 41-45.

19 : Hujanen M., et Linko, Y.Y., 1996. Effect of Temperature and Various Nitrogen Sources on L (+) Lactic Acid Production by *Lactobacillus Casei'*, Appl. Microbiol.Biotechnol., 45:307-313.

20 : Cheng, P., Muller, R.E., Jaeger, S. Bajpai, R., et Iannoti, E.L. 1991. Lactic Acid Production from Enzyme-thinned Corn Strach Using Lactobacillus Amylovorus', J. Ind. Microbiol., 7: 27-34.

21 : Boudjelal , A. et Nancib N., 2001. Production d'Acide Lactique par *Lactobacillus Rhamnosus* sur Milieu à Base de Jus de Dattes. Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse: 41-46.

22 : Francis G.W., Isaksen M., 1988. Thin-Layer Chromatography of Carotenoids with Tertiary Alcohol Petroleum Ether Solutions as Developing Solvents. Journal of Food Science 53: 979-980.

23 : Shukla P.S., Gawande S.S., Thorat A.V., 2016. Extraction, Identification and Utilization of Pigments Extracted from Citrus Wastes. International Journal of Science and Research (IJSR), 5: 2319-7064.

24 : Christen, P., Bramorski, A., Revah, S., Soccol, C.R., 2000. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus strains* grown on agro-industrial solid wastes. Bioresource Technology., 71: 211-215.

25 : Vermerris, W. ,2006. Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht.ISBN-10 1- 4020-5163-8 (HB).

26 : Proot J., 2002. Les technologies propres appliquées aux industries agroalimentaires. Aris.T, Bourgone, pp:12.

27 : Grohmann, K., Baldwin, E., Buslig, B., 1994. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* Applied Biochemistry and Biotechnology., 45-46: 315-327.

28 : Wilkins, M., Suryawati, L., Maness, N., Chrz, D., 2007. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange peel oil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 1161-1168.

29 : Sharma, N., Kalra, K., Oberoi, H., Bansal, S., 2007.Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. Indian Journal of Microbiology. 47: 310-316.

30 : Villas-Bôas, S.G., Esposito, E., de Mendonça, M.M., 2003.Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by Candida utilis and Pleurotusostreatus. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 461-467.

31 : Grasser L.A., Fadel J.G., Garnet I. and De Peters E.j., 1995. Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. Journal of Dairy Science, 78 : 962-971.

32 : Darvill A.G., Mc Neil M., Albersheim P., « Structure of plant cell wall. 8. A new pectic polysaccharides », Plant physiol., 1978, 62, 418-422.

33 : Cojocaru C., Opriş S., Costin G., Oţel I., Marinescu I., Spătaru N., 1965. Valorificarea deşeurilor din industria alimentară., Editura Tehnică, Bucureşti.

34: Mata, Y.N., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., Muňoz, I.A, 2009. Sugar-beet pulp pectin as biosorbent for heavy metals : Preparation and determination of biosorption and desorption characteristics. Chemical Engineering Journal : 289-301.

35 : Balkeose, D., Baltacioglu, H., 1992. Adsorption of heavy metal cations from aqueous solutions by wool fibers. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 54:393-397.

36 : Xie, J.Z., Chang, H.-L., Kilbane, J.J., 1996. Removal and recovery of metal ions from waste water using biosorbents and chemically modified biosorbents. Bioresource Technology., 57: 127-136.

37 : Namasivayam, C., Kadirvelu, K., 1999.Uptake of mercury (II) from wastewater by activated carbon from an unwanted agricultural solid by-product: coirpith. Carbon. 37: 79-84.

38 : Borycka, B., Zuchowski, J., 1998. Metal sorption capacity of fibre preparations from fruit pomace. Polish-Journal-of-Food-and-Nutrition-Sciences, 7: 67-76.

39 : Schiewer, S., Patil, S.B., 2008. Pectin-rich fruit wastes as biosorbents for heavy metal removal: Equilibrium and kinetics. Bioresource Technology, 99:1896-1903.

40 : Ajmal, M., Rao, R.A.K., Ahmad, R., Ahmad, J., 2000. Adsorption studies on Citrus reticulate (fruit peel of orange): removal and recovery of Ni (II) from electroplating wastewater. Journal of Hazardous Materials, 79: 117-131.

41 :http://cours-gratuits.toutapprendre.com/?cours=qu-est-ce-que-le-bio(Dernière consultation : 19/ 01/2017)

42 : http://www.economie.gouv.fr/files/guide_allegations_31janv. Consulté le 12/01/2017

43 : Barkat.M et Himed.L., 2014.Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de Citrus limon. Oilseeds& fats Crops and Lipids : A102.

44 : http://www.lesmetiersdelachimie.com/Tendances/Chimie-verte. Consulté le 12/01/2017.

45 : Durvelle j.-p., 1893 : fabrication des essences et des parfums. Editeur j. Fritsch, paris

46 : Durvelle j.-p., 1930 : fabrication des essences et des parfums. Ed. Desforges, girardot et cie, 807 .

47 : Naves Y.R., 1976 : Parfums, Cosmétiques, savons, 58 : 105. Cité in Garnero J., 1996 : Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 pp 1-45.

48 : Croteau R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites), in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones),American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA: 1250–1268

49 : Carson C. F. et. Hammer K. A., 2011. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils.In Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.* United Kingdom : John Wiley et Sons Ltd. pp. 204-238

50 : Marrouf, A. Tremblin, G., 2009. Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences.

51 : Hernandez Ochoa L.R., 2005. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine «solvant/actif» d'origine végétale, thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.

52 : Goris A. 1967. Manuel de botanique. Ed. Clin.265-268

53 : Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010. Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157

54 : Roquebert M.F., 2002. Les contaminants biologiques des biens culturels. Edition elsevier masson : 334, 335.

55 : Sarni-Manchado P.,& Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC and DOC, LAVOISIER ,56 : 60-62,270

56 : Roquebert M.F., 2002. Les contaminants biologiques des biens culturels. Edition Elsevier MASSON : 334, 335.

57 : Loupy A., 2006.Microwaves in Organic Synthesis, 2ieme édition, Tome I et II. Wiley-VCH, Weinheim,

58 : Besombes C. 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermo mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle : 289

59 : Olle M. and Bender I., 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation.Agronomy Research,8 :.687-696.

60 : Aprotosoaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V.,Stanescu U., 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (Foeniculum vulgare Mill.). FARMACIA, 58 : 46-54.

61 : Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3éme Edition Lavoisier, Paris. 1120.

62 : Benjilali, B. Tantaoui -Elaraki, A. Ayadi, A. Ihlal, M., 1984.Method to Study Antimicrobial Effects of Essential Oils: Application to the Antifungal Activity of Six Moroccan Essences.Journal of Food Protection 47: 748-752.

63 : Viollon C., Chaumont J.P., 1994.Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia 128: 151-153.

64 : Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., et Arsenakis M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. J. Agric. Food Chem. 44: 1202-1205.

65 : Teimouri M., 2012.Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis Celak* from Iran.Journal of Medicinal Plants Research 6: 631-635.

66 : Mangena T., Muyima N.Y., 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of artemisiaafra, pteroniaincana and rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. Letters in Applied Microbiology 28: 291-296.

67 : Zakarya D., Fathallah T., Chasctrette M., 1993.Use of multifunctional autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds, Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices. Journal of physical organic chemistry 6: 574-582.

68 : Sánchez-González L., Vargas M., González-Martínez C., Chiralt A., Cháfer M., 2011.Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. Food Engineering Reviews 3:1-16.

69 : Collins A.R., 2005.Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. European Journal of Cancer 41, 1923–1930.

70 : Pauli A., 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. International Journal of Aromatherapy, 11: 126-133.

71 : Belletti N., Nidagijimana, M., Sisto C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R.& Gardini F., 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of Citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. Journal Agricutural Food Chemistry, 52 :6932-6938.

72 : Fisher K., Rowe C. & Phillips C., 2007. The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components in vitro and food. Letters in Applied Microbiology, 44: 495-499.

73 : Padrini F., Lucheroni M. T. 1996. Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de100 Photographies. Ed. De Vecchi , Paris :11- 111.

74 : Bruneton J., 1993. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 2eme édition, Lavoisier, Paris : 41-54.

75 : Lucchesi M.E., 2005. Exraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.

76 : Baser K.H.C. et Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America: 994.

77 : Hajji S., Beliveau J., Simon D., 1985. Comparative study of an essential oil obtained according to two different extraction procedures: steam distillation and hydrodiffusion. Actes - Colloq. Int. Plant. Aromat. Med. Maroc, 229-230.

78 : Lagunez Rivera L., 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteurs chauffe par induction thermomagnétique directe, Thèse, INP Toulouse.

79 : Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessiere J.M., 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and HD. Flavour and Fragrance Journal, 18: 481-484.

80 : Ganou L, 1993. Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.

81 : Lesley B. 1996. *Plantes médicinales et aromatiques*. Ed. Lavoisier. Paris. : 58-61

82 : Roux D. 2008. Conseil en aromathérapie. 2ème Ed. Pro-Officina :187

83 : Fillatre Y., 2011. Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidusdans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie demasse en mode tandem. Thèse de doctorat, université d'Angers, France.

84 : Pellerin, P. 1991. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour andperfume industry.Perfum. Flavor. 16 : 37-39.

85 : Richard, H., 1992. Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. :339

86 : Romdhane M., 1993.Extraction solide liquide sous ultrasons thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.

87 : Marrouf A., Tremblin G., 2009.Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences.

88 : Huie C.W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and Bioanalytical Chemistry 373: 23-30.

89 **:** Bera, A., Babadagli, T., 2015. Status of electromagnetic heating for enhanced heavy oil/bitumen recovery and future prospects: A review.Applied Energy 151: 206–226.

90 **:**Greff J., Babadagli T., 2013. Use of nano-metal particles as catalyst under electromagnetic heating for in-situ heavy oil recovery. J Pet SciEng;112: 258–65.

91 **:** Hamzah, M. H.,Sudin, S. S.,Mutalib,T. N. A. T. A. N.,Malek,H.A.,Yusof,N.,Jamaludin, H.,Jamaludin,N. F., Man,H. C., et Abidin,Z. Z., 2011. Preliminary study of ohmic heated hydro distillation for essential oil plant extraction, IEEE Student Conference on Research and Development, Malaysia: 211-214.

92: Rivera, L. L., et Vilarem, G., 2007. Hydrodistillation of caraway by direct induction heating assisted by a magnetic field process," Flavour and Fragrance Journal, 22: 178-183.

93 : Tranchida P. Q. ,Dugo P., Mondello L., Dugo G. 2011. Advanced Analytical Techniques for the Analysis of Citrus Oils In Dugo G. et Mondello L. Citrus Oils: Composition Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. London and New York: Taylor and Francis Group: 477- 511.

94 : Paris R., Godon M. 1979. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.

95 : Bouchonnet S. & Libong D. ,2002. Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectromètrie de masse. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex.

96 : Zellner B. A., Dugo P., Dugo G., Mondello L. 2010. Analysis of essential oils. In Baser K. H. C., Buchbauer G. Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, New York,: 151-183.

97 : Grysole J. 2005. La commercialisation des huiles essentielles in Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales), Québec : 139-162.

98 : Pingot A. 1998. Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris : 230- 236.

99 : Aprotosoaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V.,Stanescu U., 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (Foeniculum vulgare Mill.).FARMACIA, 58: 46-54

100 : Conner D. E., 1993. Naturally occurring compounds. In Davidson P. M., Branen A. L. Antimicrobials in foods, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York,: 441-468.

101 : Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86: 985-990.

102 : Choi H-S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M., 2000. Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. J. Agric. Food Chem., 48 : 4156-4161.

103 : Robert A. et Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huilesessentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522.

104 : Bisignano G., Cimino F., Saija A., 2011. Biological Activities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques,

Contaminants, and Biological Activity. London and New York: Taylor and Francis Group. : 529-548.

105 : Himed L., 2011. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Mentouri – Constantine ,65.

106 : Hellal Z., 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus.* : Application sur la sardine (*Sardinapilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 78.

107: Pilnik W., 1990. Pectin, a many spendoured thing. G.O. Philips, P.A. Williams & D.J. Wedlock (Eds), In: Gums and stabilizers for the food industry, Oxford University Press, 313-262.

108: Brudieux V., 2007. Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges.

109: O'Neill M., Albersheim P., Darvill A.G., 1990.The pectic polyssacharides of primary cell walls, Methods Plant Biochim. Academic press London, 415-441.

110: Thibault J-F., Renard C., Guillon F., 1994. Physical and chemical analysis of dietary fibres in sugar beet and vegetables, Jackson j-F., Linsken H.F.(Eds), In: Modern methods of plant analysis, vegetables and vegetabl products, springer verlag Berlin, 16:23-55.

111: VoragenA.G.J.,pilnik W., Thibault J-F.,Axelos M.A.W., Renard C.M.C.C., 1995. Pectins in: Food polysaccharides (Stephen A.M., Dea Y.,Eds), London: MarcelDekker, , 287-339.

112 : Allam A., 2009. Nouveaux ligands uronamides derives de l'acide d-galacturonique : synthese, proprietes physico-chimiques et etudes de complexation avec les ions cuivre (ii)" thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne.

113: Goycoolea, F-M., Cárdenas, A., 2003. Pectins from *Opuntiaspp*: A Short Review. Laboratory of Biopolymers, 17-29.

114 :C.renard ; Année.les pectines définition et structure. université d'Avignon, Institut National de la Recherche Agronomique .

115: http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html Date de dernière consultation le : Mars 2016.

116 : Belhamri R., 2005 .extraction des macromolécules pariétales des eaux de presse de betteraves sucrières étude de leur composition, de leurs propriétés physico-chimiques et de leur effet sur le process sucrier ». Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne – Ardenne.

117: Willats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Knox J.P., 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis», Plant Molecular Biology, 47: 9-27.

118 : Brudieux V., 2007.Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique. Thèse de doctorat. Université de Limoges.

119: Thakur B.R, Singh R.K., Handa A.K., 1997. Chemistry and uses of pectin a review, Critical reviews in food science and nutrition, 37: 47-73.

120: Ralet M-C, Bonnin E., Thibault J-F., 2002. Pectin in biopolumersVol 8, Polysaccharides II, Steinbüchel A (Ed), Wiley-VCH VerlagGmbh, Weinheim, 12:345-380.

121: Habibi Y., 2004. Contribution à l'étude morphologique, ultra structurale et chimique de la figue de barbarie Les polysaccharides pariétaux : caractérisation et modification chimique » thèse Doctorat, Université Joseph Fourier (France) & Université Cadi Ayyad (Maroc) (UFR : chimie des molécules organiques d'intérêt biologique et industriel).

122 : Thibault, J-F., 1980. Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés », ed.gauthier-Villars, Bordas, Paris, 232-251.

123: Christensen Steen Hojgaard, 1984. Pectins. In: Glicksman, Martin. Food Hydrocolloids. Florida: CRC Press: 205-229.

124: William G.T, Willats J., Paulkno Xb. and dalgaard Mikkelsené, 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel »/trends in food science and technology17.

125: Michel F., Doulier,J-L., Thibault.J-F., 1982. Investigation on high-methoxylpectins by potentiometry and viscometry », Food Nutr.Sci: 6, 3- 67.

126: Ravanat, G, Rinaudo.M., 1987. Investigation on oligo and polygalacturonic acids by potensiometry and circular dischrosim», Biopolymers,83 :57-192.

127 : Donat L., 2004. Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques » thèse Doctorat. Canada.

128: Geneau C., 2004 .Procédé d'élaboration d'agromatériaux composite naturel par extrusion bivis et injection Moulage de tourteau de tournesol, thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.

129: Akhtar M., Dickinson E., Mazoyer J., &Langendorff V., 2002. Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. Food Hydrocolloids, 16: 249-256.

130: Herbstrieth & FOX (1998) (A). Chances and limits for the use of pectin as emulsifier. Corporate Group.Turnstraße . 37.75305 Neuenbürg/Württ,1-14. Germany.

131: Leroux J., Langendorff V., Schick G., Vaishnav V. & Mazyer J., 2003. Emulsion stabilising properties of pectin. Food Hydrocolloids, 1 7: 455-462.

132:Yapo B.M. & Koffi K.L., 2006. Yellow passion fruit rind-a potential source of low – methoxl pectin .Sci .et Technol. des aliments, 54:2738-44

133: Willats W.G.T., Knox J.P,. & Mikkelsen J.D., 2006. Pectin: new insights into and old polymer are starting to gel. Trends in Food Science and Technology 17: 97-104.

134 : Thibault J.-F., Renard C.MG.C., Axelos M.A.V. & Bonnin E., 2000. Les pectines. INRA, Centre de Recherché Agro-alimentaire, B.P., 71627,44316 Nante Cedex 03.

135: Lopes Da Silva J. A. &Rao M.A. (2006). Pectins: structure, functionality, and uses. In food polysaccharides and their applications, Second Edition. Taylor & Francis Group, LLC: 353-411.

136: May C. D., 2000 .Pectins. In Phillips G.O. and Williams P.A. (Eds). Handbook of Hydrocolloïds. Cambridge :woodheadPublishing,:169-188.11.

137 :Zhongdong L., Guohua W., Yunchang G. & Kennedy J.F., 2005. Image study of pectinextraction from orange skin assisted by microwave. Carbohy. Polym., 64:548-552.

138:Yapo B.M., Wathelet B. & Paquot M., 2007. Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. Food Hydrocolloids, 21: 245-255.

139: Ptichkina N.M., Markina O.A. & Rumyantseva G.N., 2008.Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. Food Hydrocolloïds, 22:192-195

140 :Sakai J. & Okushima M.,1980. Microbial production of pectin from citrus peel. Applied and Environmental Microbiolgy, 39:908-912.

141: Fishman M.L., Chau H.K., Hoagland P.D. & Hotchkiss A.T., 2006. Microwave-assisted extraction of lime pectin. 20 : 1170–1177.

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

143 : Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E. and Scheppler N., 1963. Methods of study of the structure of glycoproteins, Journal de Pharmaciede Belgique, 18: 529-546.

144: Lever M., 1972. New reaction for colorimetric determination of carbohydrates", Analytical Chemistry, 47: 273-279.

145 : Kacurakova M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N. and Ebringerova A., 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses", Carbohydrates Polymers, 43:195-203.

146 : Strecker G., 1993. Analyse structurale des chaînes glycaniques", Biofutur, 125 : 46-52.

147 : Strecker G.,1995. NMR, In: Methods on glycoconjugates", Verbert, A., Ed, Harwood Academic Publishers, 137-145.

148 : Yamada H., 1996 .Contribution of pectins on health care. In: Pectins and Pectinases, Visser, J. and Voragen, A. G. J., Eds, Elsevier Science B.V, 173.

149 : http://www.aprifel.com/fiches,produits,Citron (Octobre 2016).

150 :http://fr.wikipedia.org/wiki/Citrange. Consulté le 05/05/2016.

151 : http://www.isolotto-pepiniere-agrumes-citrus-corse. Consulté le 05/05/2016.

152 **:**http://www.gerbeaud.com/fruit-legume-de-saison/orange.php. Consulté le 05/05/2016.

153: Bachelot C., Blaise A., Corbel T. et Le Guernic A., 2006. Les huiles essentielles : extraction et comparaison. U.C.O Bretagne,1-18.

154: AFNOR, 2000 : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles : 663.

155 : A.F.N.0.R 2000, PARIS. Huiles essentielles, tome 1.

156 : Tranchant J., Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Vergnol A. et Witier P., 1995 : Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4ème édition. Edition MASSON : 700.

157 : Van Den Dool H. et Kratz P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. J. Chromato. A., 1: 463-471.

158: Boubekri C., 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, Université de Biskra, Alger.

159: Brand-Williams W., Cuvelier M E., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensm. Wiss. Technol. 28: 25-30.

160: Benhammou N., Atik Bekkara F., Kadifkova P., 2007. Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus L.* and *Pistacia atlantica Desf* . Advances in Food Sciences. 29:155-161.

161 : Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. & Roura S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic, 36 :679-684.

162 : Guinoiseau E. (2010) : Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action. Thèse Doctorat, Université De Corse-Pasquale Paoli.

163 : Kanko C., Sawaliho BE., Kone, S., Koukoua G., N'guessan YT., 2004. Étude des propriétés physico-chimiques des huilesessentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus, Cymbopogon nardus, Cymbopogon giganteus »*. Comptes rendus Chimie 7 1039–1042.

164 : Thibault J.F., Renard C., Guillon F., 1994. Physical and chemical analysis of dietary fibres in sugar beet and vegetables, Jackson J.F., Linsken H.F. (Eds), In: Modern methods of plant analysis, Vegetables and vegetable products, Springer Verlag Berlin,16: 23-55.

165: Youcef Ettoumi k., Extraction des pectines en utilisant le procédé de chauffage par induction électromagnétique. 2011, Mémoire de Magister, Université de Médéa, Alger.

166: Singthonga J., Cuib S-W., Ningsanonda, S., Goff, H-D.,2004. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (Cissampelospareira) pectin. Carbohydrate Polymers,58:391-400.

167: Prud'homme, J., Prud'homme, R., 1981. Synthèse et caractérisation des macromolécules. Presse de l'Université de Montréal.

168 : Kjoniksen, A-L., Hiorth, M., Nystrom, B., 2004. Temperature- inducef association and gelation of aqueous solution of pectin. A dynamic light scattering study. European polymer journal, 2427-2435.

169: Hiorth, M.,Tho, I., Sande, S-A., 2003. The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 56: 175-182.

170: Peggy Auchel, 2007.Optimisation de procédés innovants pour l'obtention de phycocolloides » thèse de Doctorat, Université de Nantes.

171: Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem.,28: 350-356.

172: Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., 1973. New method for quantitative determination of uronics acids, *Anal. Bioche.*Blumenkrantz N., Asboe-Hansen *m.,* 54: 484-489.

173 : Oswald P., 2005. Rhéophysique ou comment coule la matière. Belin.

174 : Muhammad Hazwan, H., Hasfalina, C.M., Hishamuddin, J., Zurina, Z.A.,2012. Optimization and Kinetics of Essential Oil Extraction from Citronella Grass by Ohmic Heated Hydro Distillation. International Journal of Chemical Engineering and Applications 3.

175 : Milojevic, S.Z., Stojanovic, T.D., Palic, R., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B., 2008.Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper *(Juniperus communis L.)* berries. Biochemical Engineering Journal 39: 547–553.

176: Sovová, H., Aleksovski, S.A., 2006. Mathematical model for HD of essential oils. Flavour and Fragrrance Journal 21: 881–889.

177 : Hosni K., Zahed N., Chrif R., et al. 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: evidence for the genotypic influence. Food Chemistry.;123: 1098–1104.

178 : Fisher, K.; Rowe, C.; Phillips, C., 2007. The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components *in vitro* and food. Lett. Appl. Microbiol., *44*: 495–499.

179 : Eleni, M.; Antonios, M.; George, K.; Alexios-Leandros, S.; Prokopios, M., 2009. High quality bergamot oil from Greece: Chemical analysis using chiral gas chromatography and larvicidal activity against the West Nile virus vector. Molecules, 14:839–849.

180 : Minh Tu, N. T., Thanh, L. X., Une, A., Ukeda, H., & Sawamura, M., 2002. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. Flavour and Fragrance Journal, 17:169–174.

181 : Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J., & Chemat, F.,2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. Journal of Chromatography A, 1112:121–126

182 : Blanco Tirado, C., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., & Martinez, J. R.,1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 697:501–513.

183 : Kelen M. & Tepe B., 2008. Chemical composition, antioxydant and antimicrobial proprieties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora. Bioresource Technology, 99:4096-4104.

184 : Vekiari S.A., Protopapadakis E.F., Papadopoulou P., Papanicolaou D., Panou C. & Vamvakias M.,2002. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 5:147-153.

185: Boukroufa,M.,Boutekedjiret,C.,Petigny,L.,Rakotomanomana,N.,Chemat,F., 2015.Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. Ultrasonics Sonochemistry 24: 72-79.

186. Milojevic, S.Z., Stojanovic, T.D., Palic, R., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B., 2008. Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries. Biochem. Engg. J., 39: 547 –553.

187 : Colic M., Morse D., 1999.The Elusive Mechanism of the Magnetic “Memory” of Water", Colloids Surf., A:, Physicochem. Eng. Asp. 154:167-174.

188. Rivera, L. L., and Vilarem, G., 2007. Hydrodistillation of caraway by direct induction heating assisted by a magnetic field process,” Flavour and Fragrance Journal, 22: 178-183.

189 . Zouambia Y., Youcef Ettoumi K., Krea,M. Moulai-Mostefa,N., 2014.A new approach for pectin extraction: Electromagnetic induction heating, Arabian Journal of Chemistry DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.11.011

190 : Kamal, G. M., Anwar, F., Hussain, A. I., Sarri, N. & Ashraf, M. Y., 2011. Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. International Food Research Journal 18: 1275-1282.

191: Kanko C., Sawaliho B.E., Kone S, Koukoua G., N’guessan YT., 2004. Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». Comptes rendus Chimie 7 : 1039–1042.

192 : Gildo P., 2006. Précis de phytotherapie, Larousse Encyclopedie MEMO, Edition Alpen, 3-4

193 : Tan, Q.P., Ai, M.V., Minh, T.T.V., 2011. Volatile constituents of essential oil from *Citrus sinensis* grown in Tien Giang Province, Vietnam, As. J. Food Ag-Ind. 4: 183-186.

194 : Djenane D., 2015. Chemical Profile, Antibacterial and Antioxidant Activity of Algerian Citrus Essential Oils and Their Application in *Sardina pilchardus*. Foods, 4:208-228;

195 : Egharevba H. O., Oladosun P., Izebe K. S., 2016. Chemical Composition and Anti-tubercular Activity of the Essential Oil of Orange (Citrus sinensis L.) Peel from North Central Nigeria. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 8: 91-94.

196 : Moufida S. & Marzouk B., 2003. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. Phytochemistry, 62 : 1283-1289.

197 : Minh Tu N.T., Thank L.X., Une A., Ukeda H. & Sawamura M., 2002. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and limepeel oils. Flavour and Fragrance Journal, 17 :169-174.

198 : Choi H.S., Song H.S., keda H.U., and Sawamura M., 2000. Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. J. Agric. Food Chem., 48:4156-4161.

199 : Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. and Pizzariello A., 2007.Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. Food Chem.; 100: 1481-1489.

200: Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2001. Antioxydants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.

201: Wei, A., & Shibamoto, T., 2007. Antioxidant activities of volatile constituents of various essential oils . J. Agric. Food Chem., 55:1737-1742.

202. Conforti, F., Statti, G.A., Tundis, R., Loizzo, M.R., & Manichini, F., 2007. In vitro activities of *Citrus medica* cv. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. *Phytotherap. Res.*,21: 427-433.

203. Sonbol, F.; Ibrahim, S.M.; Mohamed, B.M.,1992. Antimicrobial activity of oil of bitter orange. *Alex.J.Pharm. Sci.*, *9*:107–109.

204. Song, H.S.; Ukeda, H.; Sawamura, M., 2001.Antioxidative activities of *Citrus* peel essential oils and their components against linoleic acid oxidation. Food Sci. Technol. Res., 7: 50–56.

205 : Frassinetti S., Caltavuturo L., Cini M. & Della Croce C. M., 2011.Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from citrus spp. Journal of Essential Oil Research, 23:1.

206 : Moreira M.R., Ponce A.G., Del valle C.E. & Roura S.I., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Food Science and Technology,38: 565-570.

207 : Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods e a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.

208 : Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C., Rodriguez M.R.A., Corazza M.L., Vladimir O.J. & Cansian R.L., 2008. Appliication of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology, 25: 207-211.

209 : Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. Appl. Microbiol. 26, 118–122.

210 : Inouye S.,Takizawa T. & Yamaguchi H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract patogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47: 565-573.

211 : Mitiku S.B., Sawamura M., Itoh T., Ukeda H., 2000. Volatile components of peel cold-pressed oils of two cultivars of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck from Ethiopia. Flav. Frag. J., 15:240–244.

212 : Djenane, D.; Yangüela, J.; Montañés, L.; Djerbal, M.; Roncalés, P., 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef. Food Control, 22:1046–1053.

213 : Tassou C., DrosinosE. H., Nychas G.-J. E., 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. Journal of Applied Bacteriology, 78: 593– 600.

214 : Chao S.C., Young D.G. et Oberg G.J., 2000. Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. J. Essent. Oil Res., 12: 639-649

215 : Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F., 2010. Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger :157.

216 : Malecky M., 2007. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).Paris, 206

217 : Hinou J.B. Harvala C.E., Hinou E.B. 1989. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. Pharmazie 44, 4.

218 : Boontawan, A., Stuckey D. C., 2006. A membrane bioreactor for the biotransformation of alphapinene oxide to isonovalal by Pseudomonas fluorescens NCIMB 11671. Applied Microbiology and Biotechnology, 69:643-649

219 : Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* & *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18:414-420.

220 : Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston J.F. & Wei C.I.,1995.Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against Salmonella Thyphimurium on culture medium and on fish cubes. Journal of Food Science, 60:1364-1374.

221 : Fisher K., & Phillips C., 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, E.coli O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, in vitro and in food systems. Journal of Applied Microbiology, 101:1232-1240.

222 : Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., Martin J. & Rosalia F., 2008. Chemical omposition and antimicrobial activity of citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24:2067-2072.

223 : Conner D. E., Beuchat L. R., 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. Journal of Food Science, 49: 429–434.

224 : Uribe S., Ramirez J., Pena A. 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. Journal of Bacteriology, 161:1195–1200

225 : Wang Y.-C., Chuang Y.-C. & Hsu H.-W., 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. Food Chemistry, 106: 277-284.

226 : Kar F. & Arslan N., 1999. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. Carbohydrate Polymers, 40: 277–284.

227 : Lagunez R. L., 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.

228 : Yeoh, S., Shi J., Langrish, T.A.G., 2008. Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. Desalination. 218, 229-237.

229 : Yapo B.M., Robert, C., Etienne I. & Wathelet, B., 2006. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts", Food Chemistry:1-9.

230 : Kurita O., Fujiwara T., Yamazaki E., 2008. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid, Carbohydrate Polymers, 74: 725-730.

231 : Mesbahi, G., Jamalian, J. and Farahnaky, A.,2005. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems, Journal of Food Hydrocolloids, 19: 731-738.

232 : Cheftel J.C. & Cheftel H., 1978. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments.Techniques et documentation –Entreprise Moderne. Paris, 1 :147-236.

233 : Dennapa B., Kamonrad R. & Hataichanoke N., 2006. Extraction and physicochemical characteristics of acid-soluble pectin from raw Papaya (*Carica Papaya*) peel. Chiang Mai J.Sci., 33 :129-135.

234 : Yapo B.M. & Koffi K.L., 2006. Yellow passion fruit rind-a potential source of low –methoxl pectin .Sci .et Technol. des aliments, 54:2738-44.

235 : Miyamoto, A. and Chang, K.C.,1992. Extraction and physicochemichal characterization of pectin sunflower head residues", Journal of Food Science, 57 :1439-1443.

236 : Khotimchenko M., Kovalev V., Khotimchenko Y., 2007. Equilibrium studies of sorption of lead (II) ions by different pectin compounds. Journal of Hazardous Materials, 149: 693- 699.

237 : Dennapa B., Kamonrad R. & Hataichanoke N., 2006. Extraction and Physicochemical Characteristics of Acid-Soluble Pectin from Raw Papaya (Carica papaya) Peel. Chiang Mai J. Sci., 33: 129-135.

238 : Berardini N., Knödler M., Schieber A. & Carle R., 2005. Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. Innovative Food Science & Emerging Technologies,6 : 442-452

239 : Koubala B.B., Mbome L.I., Kansci G., Tchouanguep M.F., Crepeau M.-J., Thibault J.-F. & Ralet M.-C., 2008. Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (Spondias cytherea) obtained using different extraction conditions. Food Chemistry, 106: 1202-1207.

240 : Iglesias M.T. & Lozano J. E., 2004. Extraction and characterization of sunflower pectin. Journal of Food Engineering, 62: 215-223.

241: Cerna M., Barros A.S., Nunes A., Rocha S.M., Delgadillo I., Copikova J.,Coimbra M.A., 2003.Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives»,Carbohydrate Polymers, 51:383- 389.

242: Kacurakova M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds pectic polysaccharides and hemicelluloses. Carbohydrate Polymers,43, 195-203.

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

244 : Morawetz, H., 1975. Macromolecules in solution (2nd ed.). New York: Wiley pp. 344–363.

245 : Fishman, M. L., Cooke, P. H., & Coffin, D. R., 2004. Nanostructure of native pectin sugar acid gels visualized by atomic force microscopy. Biomacromolecules, 5, 334–341.

246 : Fishman, M. L., Chau, H. K., Hoagland, P., & Ayyad, K., 2000. Characterization of pectin, flash extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. Carbohydrate Research, 323:126–138.

247 : Kaya M., Sousa AG., Crépeau MJ., Sørensen SO., Ralet MC.,2014. Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction.Annals of botany, 114: 1319–1326.

248 : Ralet, M.C., Bonnin, E. and Thibault, J.F., 2002. Pectins. In: Biopolymers vol.8, Polysaccharides II, Steinbüchel, A., Ed, Wiley-VCH Verlag Gmbh, Weinheim, 345-380.

249 : Juan, Z., Wang, Z.W., Yuc, W.J. and Wu, J.H., 2011. Pectins from Canna edulis Ker residue and their physicochemical characterization, Carbohydrate Polymers, 83:210-216.

250 : Prabasari, I., Filomena, P., Liao, M.L. and Bacic, A., 2011. Pectic polysaccharides from mature orange (Citrus sinensis) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization, Carbohydrate Polymers, 84: 484–494.

251: Kaltsa O., Paximada P., Mandala I., Scholten E., 2014. Physical characteristics of submicron emulsions upon partial displacement of whey protein by a small molecular weight surfactant and pectin addition, 66:401–408.

252 : Schmidt U.S., Schmidt K., Kurz T., 2015. Endre, H.P. Schuchmann, Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions, Food Hydrocolloid 46: 59-66.

253: Luzio G., Cameron R., 2010. Contactless Conductivity: An HPLC Method to Analyze Degree of Methylation of Pectin. Florida State Horticultural Society, Proc. Fla. State Hort. Soc. 123:213–216

254 : Kaltsa O., Paximada P., Mandala I., Scholten E., 2014.Physical characteristics of submicron emulsions upon partial displacement of whey protein by a small molecular weight surfactant and pectin addition, Food Res. Int. 66: 401–408.

255 : Soultani G., Evageliou V., Koutelidakis A.E., Kapsokefalou M., Komaitis M., 2014.The effect of pectin and other constituents on the antioxidant activity of tea. Food Hydrocolloid. 35: 727-732.

256 : Qiu C., Zhao M., McClements D.J., 2015. Improving the stability of wheat protein-stabilized emulsions: Effect of pectin and xanthan gum addition. Food Hydrocolloid. 43:377–387.

257 :Vianna-Filho R.P., Petkowicz C.L.O., Silveira J.L.M., 2013. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neutral and charged polysaccharides. Carbohyd. Polym. 93:266–272.

258 : Petrova I., Petrova N., Kyobashieva K., Denev P., Mitchiev A., Todorova M., Dencheva N., 2014. Isolation of Pectic polysaccharides from Celery (Apium graveolens var.rapaceum D.C.) and Their Application in Food Emulsions. Turkish J. Agr. & Nat. Sci. Special Issue: 2.

259 : Pal R., 1997. Viscosity and storage/loss moduli for mixtures of fine and coarse emulsions. Chem. Eng. J., 67: 37–44.

260 : McClements D. J., 1999. Food Emulsions: principles, practice, and techniques. Boca Raton: CRC Press.

261 : Qiao X., Wang L., Shao Z., Sun K., Miller R., 2015. Stability and rheological behaviors of different oil/water emulsionsstabilized by natural silk fibroin. Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects.

262 : Erçelebi E., Ibanoğlu E., 2009. Rheological properties of whey protein isolate stabilized emulsions with pectin and guar gum, Eur. Food Res. Technol. 229: 281–286.

263 : Famuso L. B., Corredig M., Akoh C. C., 2001. A comparative study of mayonnaise and Italian dressing prepared with lipase-catalyzed interesterified olive oil and caprylic acis. J. Am Oil &Chem. Soc., 78:771–774.

264 : Mancini F., Montanari L., Peressini D., Fantozzi P., 2002. Influence of alginate concentration and molecular weight of functional properties of Mayonnaise. Lebensm.Wiss. u.- Technol, 35:517–525.

265 : Hayati I.N., Bin Che Man Y., Ping Tan C., Nor Aini I., 2007. Stability and rheology of concentrated O/W emulsions based on soybean oil/palm kernel olein blends. Food Res. Int. 40:1051–1061.

266 : Stevanovića M., Bračkob I., Milenkovićc M., Filipovića N., Nunićd J., Filipičd M., Uskokovića D. P., 2014. Multifunctional PLGA particles containing poly(l-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity. Acta Biomater. 10:151–162

267: Yuan J.-P., & Chen F. 1998. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 5078-5082.

268 : Otoni C.G., De Moura M.R., Aouada F.A., Camilloto G.P., Cruz R.S., Lorevice M.V., Soares N.d.F.F., Mattoso L.H.C., 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films, Food Hydrocolloids.

269 : Huang Q., Yu H., & Ru Q., 2010. Bioavailability and delivery on nutraceuticals using nanotechnology. J. Food Sci., 75: 50−57.

270 : Senatore F., Napolitano F., & Ozcan M., 2000. Composition and antibacterial activity of essential oil from *Crithmum maritimum L.* (Apiaceae) growing wild in Turkey. Flavour and Fragrance Journal, 15: 186-189.

271 : Minh Tu N.T., Thank L.X., Une A., Ukeda H. & Sawamura M.,2002. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and limepeel oils. Flavour and Fragrance Journal, 17 :169-174.